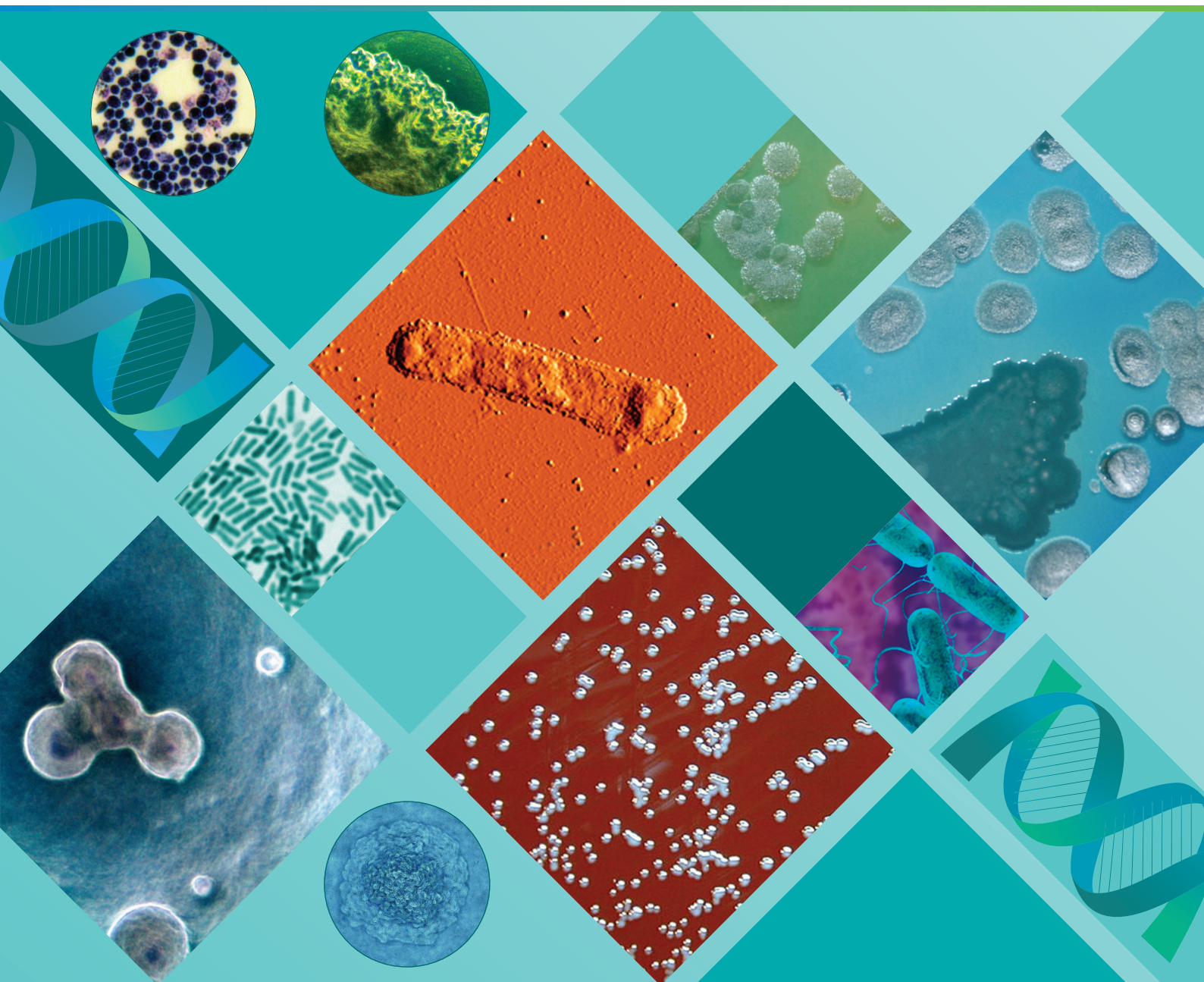


БАКТЕРИОЛОГИЯ

Bacteriology



2016 • ТОМ 1 • №1

БАКТЕРИОЛОГИЯ

Научно - практический журнал

Главный редактор

И.А.Дятлов, член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор
(Россия)

Заместитель главного редактора

А.П.Шепелин, д.б.н.
(Россия)

Ответственный секретарь

И.Г.Говорунов, к.б.н.
(Россия)

Редколлегия

Адъяасүрэн Зэвиймядагийн, к.м.н. (Монголия)
А.В.Алешкин, д.б.н. (Россия)
А.П.Анисимов, д.м.н., проф. (Россия)
И.А.Базиков, д.м.н., проф. (Россия)
С.В.Балахонов, д.м.н., проф. (Россия)
В.А.Горбунов, к.м.н. (Белоруссия)
В.А.Давидянц, д.б.н., проф. (Армения)
С.В.Дентовская, д.м.н. (Россия)
Л.В.Домотенко, к.х.н. (Россия)
Г.Ш.Исаева, д.м.н. (Россия)
Л.А.Кафтырева, д.м.н., проф. (Россия)
Л.В.Коломбет, д.б.н. (Россия)
А.Н.Куличенко, д.м.н., проф. (Россия)

Курбанов Шаир Халыг Оглы, к.м.н. (Азербайджан)
В.В.Кутырев, академик РАН, д.м.н., проф. (Россия)
И.Х.Маматкулов, д.м.н., проф. (Узбекистан)
Т.В.Мека-Меченко, д.м.н. (Казахстан)
Н.В.Рудаков, д.м.н., проф. (Россия)
Э.А.Светоч, д.в.н., проф. (Россия)
В.В.Фирстова, д.б.н. (Россия)
Г.Г.Харсеева, д.м.н., проф. (Россия)
М.В.Храмов, к.м.н. (Россия)
В.Н.Царев, д.м.н., проф. (Россия)
Л.Н.Черноусова, д.б.н., проф. (Россия)
И.Г.Шемякин, д.б.н., проф. (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

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

От главного редактора	5
-----------------------------	---

Микробиология

Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии <i>И.А.Дятлов</i>	7
Генетическое профилирование актуальных для региона г.-к. Сочи возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций <i>А.Н.Куличенко, А.С.Волынкина, Я.В.Лисицкая, Е.С.Котенев, И.В.Кузнецова, А.Т.Подколзин, Е.В.Зайцева, Н.В.Паркина, В.Г.Оробей</i>	16
Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации <i>А.В.Алешкин, Э.А.Светоч, Н.В.Воложанцев, И.А.Киселева, Е.О.Рубальский, О.Н.Ершова, Л.И.Новикова</i>	22
Актуальные аспекты описания новых риккетсий на примере предковой группы <i>Н.В.Рудаков</i>	32
Антимикробная активность нейтрального анолита в сравнении с другими дезинфектантами и разработка экспресс-метода ее тестирования <i>И.Х.Маматкулов, М.С.Мадаминов</i>	37
Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред <i>А.П.Шепелин</i>	42
Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника <i>Л.В.Домотенко, А.П.Шепелин, Т.П.Морозова</i>	48
Комбинация свойств микроорганизмов – новый подход к созданию биопрепаратов для растениеводства <i>Л.В.Коломбет, И.А.Дунайцев, С.К.Жиглецова</i>	54
Новый подход к высокочувствительной детекции летального токсина сибирской язвы на основе двойной амплификации сигнала <i>А.В.Козырь, М.А.Дронина, А.Е.Хлынцева, И.Г.Шемякин, А.В.Колесников</i>	62
Филогеография штаммов <i>Brucella melitensis</i> на основе анализа SNP полных геномов <i>С.В.Писаренко, Д.А.Ковалев, А.А.Хачатурова, А.С.Волынкина, Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко</i>	73

Эпидемиология

Эпидемиологическая эффективность применения бактериофагов для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах <i>В.Г.Акимкин, А.В.Алимов, В.С.Поляков</i>	80
MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями <i>С.В.Балахонов, Л.В.Миროнова, М.В.Афанасьев, Е.С.Куликалова, А.С.Остяк</i>	88
Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы <i>С.В.Борисевич, Э.А.Яковлев</i>	96

Вакцинология

Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета <i>В.В.Фирстова, О.В.Калмантаева, А.А.Горбатов, Е.А.Тюрин</i>	102
--	-----

Профессиональное образование

Современная нормативная база, регламентирующая профессиональную подготовку в формате непрерывного медицинского образования (НМО), необходимую для работы по специальностям «Бактериология», «Вирусология» и «Паразитология» <i>А.Р.Мавзютов</i>	109
--	-----

Правила для авторов	114
---------------------------	-----

BACTERIOLOGY

Scientific and Practical Journal

Editor-in-Chief

I.A.Dyatlov, Corr. Member of RAS
(Russia)

Deputy Editor-in-Chief

A.P.Shepelin, PhD
(Russia)

Executive Secretary

I.G.Govorunov, PhD
(Russia)

Editorial Board

Ad"yaasyren Zeviimyadagiin, PhD (Mongolia)

A.V.Aleshkin, PhD (Russia)

A.P.Anisimov, PhD, prof. (Russia)

S.V.Balakhonov, PhD, prof. (Russia)

I.A.Bazikov, PhD, prof. (Russia)

L.N.Chernousova, PhD, prof. (Russia)

V.A.Davidyants, PhD, prof. (Armenia)

S.V.Dentovskaya, PhD (Russia)

L.V.Domotenko, PhD (Russia)

V.V.Firstova, PhD (Russia)

V.A.Gorbunov, PhD (Republic of Belarus)

G.Sh.Isaeva, PhD (Russia)

L.A.Kaftyreva, PhD, prof. (Russia)

G.G.Kharseeva, PhD, prof. (Russia)

M.V.Khramov, PhD (Russia)

L.V.Kolombet, PhD (Russia)

A.N.Kulichenko, PhD, prof. (Russia)

S.Kurbanov, PhD (Azerbaijan)

V.V.Kutyrev, academician of RAS (Russia)

I.Kh.Mamatkulov, PhD, prof. (Uzbekistan)

T.V.Meka-Mechenko, PhD (Kazakhstan)

N.V.Rudakov, PhD, prof. (Russia)

I.G.Shemyakin, PhD, prof. (Russia)

E.A.Svetoch, PhD, prof. (Russia)

V.N.Tsarev, PhD, 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	5
--------------------------------------	---

Microbiology

Role of the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology in solving current problems of medical microbiology <i>I.A.Dyatlov</i>	7
Genetic profiling of actual for the Sochi region casual agents of natural focal and gastrointeral infections <i>A.N.Kulichenko, A.S.Volynkina, Ya.V.Lisitskaya, E.S.Kotenev, I.V.Kuznetzova, A.T.Podkolzin, E.V.Zaytseva, N.V.Parkina, V.G.Orobey</i>	16
Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation <i>A.V.Aleshkin, E.A.Svetoch, N.V.Volozantsev, I.A.Kiseleva, E.O.Rubalsky, O.N.Ershova, L.I.Novikova</i>	22
Actual aspects of the description of new rickettsia on instance of ancestral group <i>N.V.Rudakov</i>	32
Antimicrobial activity of neutral anolyte vs some other disinfectans; developing an express-assay to assess it <i>I.Kh.Mamatkulov, M.S.Madaminov</i>	37
Nutrient media: current status & trends in design, production and application <i>A.P.Shepelin</i>	42
Nutrient media for the main representatives of intestinal normal flora <i>L.V.Domotenko, A.P.Shepelin, T.P.Morozova</i>	48
Combined properties of microorganisms – new approach to designing bioformulations for plant growing <i>L.V.Kolombet, I.A.Dunaitsev, S.K.Zhigletsova</i>	54
New approach to ultrasensitive detection of anthrax lethal toxin based on the double signal amplification <i>A.V.Kozyr, M.A.Dronina, A.E.Khlyntseva, I.G.Shemyakin, A.V.Kolesnikov</i>	62
Phylogeography of <i>Brucella melitensis</i> strains based on the whole-genome SNP analysis <i>S.V.Pisarenko, D.A.Kovalev, A.A.Khachaturova, A.S.Volynkina, D.V.Rusanova, A.N.Kulichenko</i>	73

Epidemiology

Epidemiological efficiency of the use of bacteriophages for prevention of acute respiratory bacterial infections in organized groups <i>V.G.Akimkin, A.V.Alimov, V.S.Polyakov</i>	80
MALDI-ToF mass-spectrometric detection of pathogen specific belonging in improvement of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases <i>S.V.Balakhonov, L.V.Mironova, M.V.Afanas'ev, E.S.Kulikaloa, A.S.Ostyak</i>	88
Ecological and epidemiological features of the causative agent of Q fever in the Russian Federation and European countries <i>S.V.Borisevich, E.A.Yakovlev</i>	96

Vaccinology

Specific cellular reactions reflected antitularemia postvaccinal immunity <i>V.V.Firstova, O.V.Kalmantaeva, A.A.Gorbatov, E.A.Turin</i>	102
--	-----

Professional education

A current legal base for regular medical education on specialties such as bacteriology, virology and parasitology <i>A.R.Mavzyutov</i>	109
Instructions for Authors	114

Уважаемые коллеги!

Медицинская микробиология возникла раньше других ветвей микробиологической науки в силу высокой социальной значимости, связанной с инфекционными заболеваниями людей. В соответствии с этим медицинская микробиология получила наиболее интенсивное развитие как в отношении методологии выявления и идентификации возбудителей, так и в приборном обеспечении, позволяющем решать на высоком уровне фундаментальные и прикладные задачи, стоящие перед отраслью. Наиболее значимыми разделами современной медицинской микробиологии являются бактериология, вирусология, микоплазматология, риккетсиология, микология. Большинство из данных направлений хорошо представлены в российской научной печати, однако именно бактериология нуждается в настоящее время в представлении своих достижений и проблем в отдельном научном издании. Это связано, прежде всего, с некоторым отступлением от классических микробиологических методов в сторону аппаратных индикационных и идентификационных процедур, когда конечной целью является не выделение культуры, а установление наличия в образце возбудителя генодиагностическими или иммунохимическими методами. Много проблем накопилось также в системе подготовки в стране бактериологов, способных работать на современном уровне.



Основными тенденциями современной медицинской бактериологии являются совершенствование процессов выделения возбудителей инфекций и их коллекционирование, генетический анализ патогенов с помощью методов генотипирования и полногеномного секвенирования для определения их происхождения, наличия факторов вирулентности и резистентности, выявление диагностически значимых антигенов, иммунохимические исследования компонентов клеток для создания новых генно-инженерных вакцин. Появление патогенов с усиленной вирулентностью и контагиозностью в природе, возможное искусственное создание возбудителей на основе общедоступной информации и технологий делают необходимым оснащение надзорных органов более чувствительными и специфичными средствами их выявления и идентификации, основанными прежде всего на эффективных культуральных и молекулярно-биологических методах. Решение данной задачи ложится на научные центры и институты, владеющие высокотехнологичными методами исследования, квалифицированными кадрами и возможностью работать в условиях максимальной биологической защиты. Настоятельно необходимо также широко внедрять разработанные методики и препараты в практику работы сети лабораторий Роспотребнадзора и лечебно-профилактических учреждений различной подчиненности.

В последние годы, благодаря реализации целого ряда государственных программ, были достигнуты существенные успехи в области создания средств изолирования живых патогенов, биодетекции и иммунопрофилактики. Интенсивная работа в данном направлении продолжается, что заставляет широко и в оперативном режиме информировать ученых и практиков, работающих в области бактериологии, о происходящих событиях и новых достижениях. Новый журнал, издаваемый в печатном и электронном виде, во многом поможет решать данную задачу.

Организатором выпуска журнала «Бактериология» является ФБУН ГНЦ ГМБ Роспотребнадзора (п. Оболенск Московской области), имеющий большие традиции в области медицинской бактериологии. Центр имеет самое развитое в стране производство микробиологических питательных сред – более 70 наименований, 130 тонн сухих сред в год, занимает 50% рынка этих медицинских изделий в России. Кроме того, Центр выпускает иммунохроматографические и латексные тесты, мультиплексные ПЦР-тест-системы и другие зарегистрированные препараты, состоящие полностью из отечественных комплектующих. Приоритетным направлением прикладных разра-

боток центра является выполнение программы импортозамещения по целому ряду медицинских изделий, что требует, в том числе, и межотраслевого взаимодействия.

Разработки в области использования высокотехнологичных методов исследования, таких как клеточный сортинг, масс-спектрометрия, полногеномное секвенирование, протеомные подходы и другие, чрезвычайно востребованы сейчас при расшифровке вспышек инфекционных болезней, так как существенно повышают эффективность диагностики и позволяют пополнять коллекции живых культур для решения в дальнейшем задач молекулярной эпидемиологии.

Журнал не будет ограничиваться освещением только медицинских проблем в бактериологии, так, большой раздел современной микробиологии, связанный с изучением биологически активных компонентов микробных клеток непатогенных и условно патогенных бактерий, имеет выраженное фундаментальное значение и может использоваться как для медицинских целей (например, создание антимикробных средств), так и для решения биотехнологических задач. Развитие концепции «микробиома» макроорганизма также ставит задачу, прежде всего перед бактериологами, по выявлению симбиотических взаимоотношений между прокариотами, влиянию этих процессов на общее состояние организма человека и возникновение соматических заболеваний.

Мы выражаем надежду, что новый научно-практический журнал «Бактериология» будет способствовать развитию данного направления, донося в оперативном режиме информацию о последних достижениях в области медицинской микробиологии до исследователей и работников практических лабораторий.



*И.А.Дятлов
Директор ФБУН «Государственный научный
центр прикладной микробиологии и биотехнологии»
Роспотребнадзора, член-корреспондент РАН,
доктор медицинских наук, профессор*

Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии

И.А.Дятлов

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

В статье представлены материалы о Государственном научном центре прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора как научной организации, осуществляющей исследования в области медицинской микробиологии и биотехнологии с акцентом на развитие бактериологических методов выделения патогенных микроорганизмов, на широкое использование простых быстрых тестов на основе гено- и иммунодиагностики, а также высокотехнологичных аппаратных методов индикации и идентификации.

Ключевые слова: медицинская микробиология, биотехнология, технологии индикации и идентификации патогенов, борьба с лекарственной устойчивостью, создание вакцин

Для цитирования: Дятлов И.А. Роль Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии в решении современных проблем медицинской микробиологии. Бактериология. 2016; 1(1): 7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15

Role of the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology in solving current problems of medical microbiology

I.A.Dyatlov

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

The paper presents materials about the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Rosпотребнадзор) as a science institution carrying out research in the field of medical microbiology and biotechnology with focus placed on improving methods to isolate pathogens as well as on wide use of simple rapid assays based on gene- and immune-diagnostics and high technology apparatus approaches to pathogen indication and identification procedures.

Key words: medical microbiology, biotechnology, pathogen indication and identification technologies, drug resistance control, vaccine design

For citation: Dyatlov I.A. Role of the State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology in solving current problems of medical microbiology. Bacteriology. 2016; 1(1): 7–15. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-7-15

Этапы становления ГНЦ ПМБ как научной организации

Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии – таково первоначальное название ГНЦ ПМБ – был создан в соответствии с приказом начальника Главного управления микробиологической промышленности при Совете министров СССР 1 января 1974 г. Деятельность

института осуществлялась в соответствии с Постановлением ЦК КПСС и Совета Министров СССР «О мерах по ускоренному развитию молекулярной биологии и молекулярной генетики и использованию их достижений в народном хозяйстве». Ставилась задача в кратчайшие сроки достичь передового уровня развития молекулярной биологии, молекулярной генетики и других областей естествознания, непосредственно связанных с изучением физико-химических основ жизненных явлений.

Для корреспонденции:

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

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: dyatlov@obolensk.org

Статья поступила 27.05.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Ivan A. Dyatlov, Corresponding Member of RAS, Sc.D (Med), professor, director of State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: dyatlov@obolensk.org

The article was received 27.05.2016, accepted for publication 15.08.2016



Рис. 1. Реконструированный корпус №1 ГНЦ ПМБ, предназначенный для работы с высокопатогенными микроорганизмами при уровне защиты BSL-3 и -4.

Для работы во ВНИИ ПМ из лучших вузов и научно-исследовательских институтов отбирались выпускники и молодые ученые разных специальностей: врачи, ветеринары, физики, химики, микробиологи, биотехнологи, энтомологи. Главной задачей научного центра в то время было создание средств диагностики, лечения и защиты от особо опасных бактериальных инфекций – потенциальных компонентов биологического оружия. Параллельно институт длительное время был головной организацией по разработке микробиологических средств защиты сельскохозяйственных растений от вредителей и болезней.

До 1991 г. научные исследования и разработки велись по заданиям Главмикробиопрома и РАО «Биопрепарат». В то время институт разрабатывал методы получения новых форм микроорганизмов, проводил их лабораторную и производственную оценку, создавал и совершенствовал технологии получения биопрепаратов на основе бактерий и грибов, конструировал новые приборы для научных исследований и контроля технологических процессов. Наиболее значимыми разработками того времени стали: технология промышленного производства ревертазы (Премия Совета министров СССР), опытно-промышленные регламенты производства средств защиты растений (промышленное производство освоено на Бердском биохимическом заводе), совместная с СКБ г. Йошкар-Ола разработка и производство ЯМР-релаксометра для биотехнологического контроля (серебряная медаль ВДНХ).

В июне 1994 г. ВНИИ ПМ был присвоен статус государственного научного центра. Новое название организации – Государственный научный центр прикладной микробиологии (ГНЦ ПМ).

С 1995 г. ГНЦ ПМ сотрудничал с Международным научно-техническим центром (МНТЦ), Американским фондом гражданских исследований и развития, европейскими фондами. В результате этой работы существенно обновилась инфраструктура центра и его приборная база, остановился отток высококвалифицированных кадров, были освоены новые научные направления и методы исследований.

Распоряжением Правительства Российской Федерации от 26 сентября 2005 г. №1514-р на базе ФГУП «ГНЦ ПМ» было создано новое Федеральное бюджетное учреждение



Рис. 2. Реконструированный корпус №8 ГНЦ ПМБ, предназначенный для выпуска микробиологических питательных сред в промышленных масштабах.

науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» в составе Роспотребнадзора. Основной задачей Центра стало проведение фундаментальных и прикладных научных исследований и работ в области эпидемиологии, бактериологии и биотехнологии, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения, включая опытно-промышленное производство биотехнологической продукции. Центр являлся координатором исследований среди научных учреждений Роспотребнадзора по федеральной целевой программе «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы и 2015–2020 годы)». Реализация данной программы позволила не только существенно развить научные исследования в области биологической безопасности, оснастить лаборатории современным оборудованием, но и провести масштабные реконструкции лабораторных корпусов Центра, что повысило его физическую и биологическую защищенность (рис. 1, 2).

На базе института работают Центр индикации и диагностики возбудителей опасных инфекционных болезней Роспотребнадзора для субъектов Центрального федерального округа и референс-центры по мониторингу за туляремией, клостридиозами, боррелиозом, легионеллезом, листериозом, а также Национальный центр верификации диагностической деятельности и Национальный центр, осуществляющий функции государственной коллекции.

Направления исследований ГНЦ ПМБ

Системная биология

Современная медицинская микробиология ставит своими задачами не только выявление патогенных биологических агентов (микроорганизмов и их агрессивных молекул) и разработку методов борьбы с ними, но и определение факторов, влияющих на эволюцию возбудителей инфекций, последствий деятельности человека в экосистемах, возможности прогнозирования развития эпидемиологической ситуации в различных регионах и в мире в целом. В этой связи современная эпидемиология тесно связана с развитием достаточно нового направления в науке – системной биологии. Задачами современной системной биологии явля-

ются исследование и моделирование свойств сложных биологических систем, которые нельзя объяснить суммой свойств, ее составляющих, и направлена она на интеграцию основных видов биологической информации в области геномики, транскриптомики, метаболомики, гликомики, протеомики и других данных для создания интегрированной модели клетки или микробного сообщества. Медицинская микробиология, появившаяся, в силу высокой социальной значимости, раньше других разделов микробиологии, использует в настоящее время практически все эти молекулярно-биологические подходы для решения своих задач. Оснащение лабораторий ГНЦ ПМБ и наличие современных геномных и протеомных технологий позволяют применить системный подход к исследованию взаимоотношений «патоген-хозяин» в многопараметрической системе, используя значительные вычислительные мощности и биоинформационный анализ. В настоящее время для решения подобных задач происходит накопление первичного материала о молекулярных основах вирулентности патогенов, характере иммунологического ответа на презентацию патогена в макроорганизме.

Коллекционная деятельность

Основой для микробиологической деятельности остается изолирование возбудителей, определение их основных свойств и коллекционирование. Коллекции микроорганизмов имеют своей целью сохранение фонда патогенов различными методами и его использование для решения фундаментальных научных проблем в области инфекционных болезней, создания средств диагностики и профилактики, решения задач молекулярной эпидемиологии – определения происхождения штамма. В настоящий момент разрабатывается Федеральный Закон «О национальной коллекции патогенных микроорганизмов», задачей которого является создание единого фонда зарегистрированных в федеральном реестре коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов. Реализация данного закона позволит наладить взаимодействие коллекций различных ведомств и, что самое главное, осуществлять на постоянной основе сбор и анализ штаммов со всей страны для мониторинга ситуации по их распространению, изменчивости вирулентности и устойчи-

вости. ГНЦ ПМБ, на базе которого располагается одна из Государственных коллекций патогенных микроорганизмов, участвует в создании данного ФЗ и ведет научную работу по совершенствованию коллекционной деятельности в направлениях генотипирования, секвенирования штаммов возбудителей инфекций, создания современных методологий длительного хранения фондов микроорганизмов, бактериофагов, гибридных клеточных линий, образцов ДНК, РНК, плазмид, линий эукариотических клеток. (К.б.н. А.Г.Богун – отдел коллекционных культур.)

Современные проблемы биодетекции и диагностика инфекционных поражений человека

Для решения проблем биологической безопасности, ставящей основной своей целью раннее выявление высококонтагиозных возбудителей инфекций, наибольшее значение имеет развитие индикационных процедур. Под термином «индикация патогенных биологических агентов» в настоящее время понимается комплекс специальных организационных и диагностических мероприятий, проводимых с целью подтверждения факта заражения людей патогенными биологическими агентами, направленного использования патогенов или факта их выброса при аварии на биологически опасном объекте, с определением видовой принадлежности возбудителя. Современная система индикации патогенных бактерий, простейших, грибов и вирусов базируется на использовании иммунологических, молекулярно-генетических и культуральных методов. В настоящее время усилия исследователей направлены на разработку нового поколения методов детекции, позволяющих одновременно выявлять множество различных микроорганизмов различных видов/классов, отличать живые патогены от нежизнеспособных, а также пригодных для включения в проточные системы мониторинга в реальном времени.

Культуральные методы

Без выделения культур, их всестороннего изучения и коллекционирования невозможно развитие диагностики, генетической идентификации и генотипирования. Общая схема микробиологических исследований включает в себя: отбор и

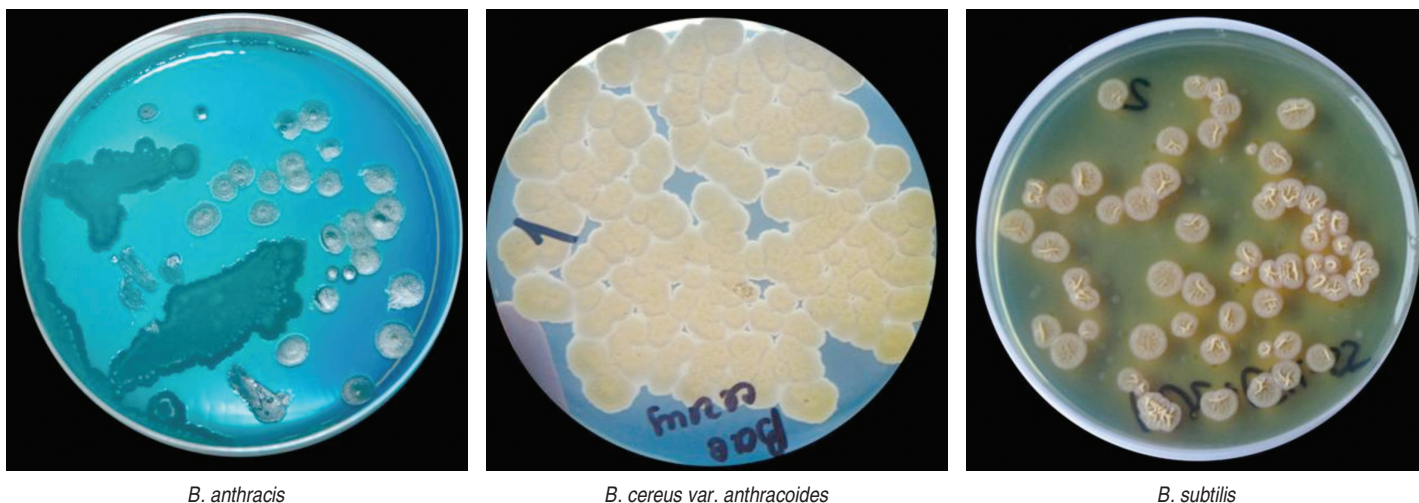


Рис. 3. Среда для дифференциации отдельных видов рода *Bacillus* по морфологии на хромогенных средах с сорбитолом, бромтимоловым синим и антибиотиками. (К.б.н. Л.И.Маринин – лаборатория сибирской язвы.)

подготовку проб, использование транспортных сред для доставки материала в Центры индикации или референс-центры, выделение патогенного агента с помощью биологической пробы или использования элективных и селективных питательных сред. Наиболее перспективными отечественными разработками являются хромогенные питательные среды и среды для выявления антибиотикорезистентности, на что направлены усилия ГНЦ ПМБ, уже выпускающего более 70 наименований сред в объеме более 120 тонн сухих сред в год и занимая более 50% рынка страны (рис. 3). (Д.б.н. А.П.Шепелин – научно-производственные подразделения Центра.)

Биологические пробы

Постановка биопроб для изолирования патогенов, вызвавших заболевания в последние годы, становится все менее востребованным методом. Практика расследования вспышек инфекционных заболеваний в России свидетель-

ствует о необходимости использования данного метода для повышения эффективности диагностической деятельности. Во многих случаях только благодаря использованию биопроб в ГНЦ ПМБ были выделены живые патогены. Для повышения эффективности метода используется снижение антибактериальной резистентности модельных животных с помощью иммуносупрессоров – стероидных гормонов, двухвалентного сернокислого железа, цитостатиков. Также используется методология нескольких путей введения подопытным животным исследуемого материала – подкожное и внутрочерепное введение, внутрибрюшинное и внутричерепное введение, внутрибрюшинное и внутрижелудочное введение. Необходим выбор адекватных модельных животных при подозрении на конкретную инфекцию. Мыши (чума, сибирская язва, туляремия, сальмонеллез, ботулизм), крысы (чума), морские свинки (сибирская язва, чума, бруцеллез, дифтерия, туберкулез, ботулизм), хомяки (сап, мелиоидоз). При выделении энтеропатогенных эшерихий до настоящего времени существует проблема с использованием биопробных животных и отсутствуют модели для изучения вакцин. Кроме того, практикуется одновременное использование нескольких видов животных для постановки биопроб, объединение образцов биоматериалов для сокращения количества используемых животных, концентрирование биоматериала на бактериальных фильтрах перед введением животным. (К.м.н. Борзилов А.И. – лаборатория биологических испытаний.)

Иммунодиагностические методы. ИХ-тесты

Для лабораторий разного уровня, в том числе слабо оснащенных, разработаны эффективные средства диагностики – бесприборные иммуносенсоры (иммунохроматографические (ИХ) тест-системы) на основе собственных парных моноклональных антител. Основная задача внедрения таких тестов – поэтапная замена иммуносупензионных диагностикомов на более чувствительные и удобные. В ГНЦ ПМБ создана технологическая линия по выпуску ИХ-тестов, полностью на основе отечественных комплектующих. ИХ-тесты уже разработаны, зарегистрированы и выпускаются для следующих возбудителей: холерный вибрион O1 группы «Тест-полоска *V. cholerae* O1», холерный токсин «Тест-полоска *V. cholerae* tox+», легионеллы «Тест-полоска *L. pneumophila* 1», листерии «Тест-полоска *Listeria* spp.», чума – выявление антител «ИХТ-F1», чума – выявление клеток, сибирская язва – спорный антиген, сибирская язва – вегетативные клетки, туляремиальный микроб – клетки, возбудитель гриппа – выявление серотипов А, В (рис. 4). (К.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов.)

Аптамеры

Из современных, наиболее быстро развивающихся средств диагностики следует отметить аптамеры – фрагменты ДНК, специфичные к мишеням и отобранные методами высокопроизводительного скрининга *in vitro* из библиотек олигонуклеотидов. Они являются основой инновационных систем детекции патогенов, чувствительность с их использованием сравнима и превышает чувствительность методов детекции на основе антител. Эффективность отбора аптамеров не зави-

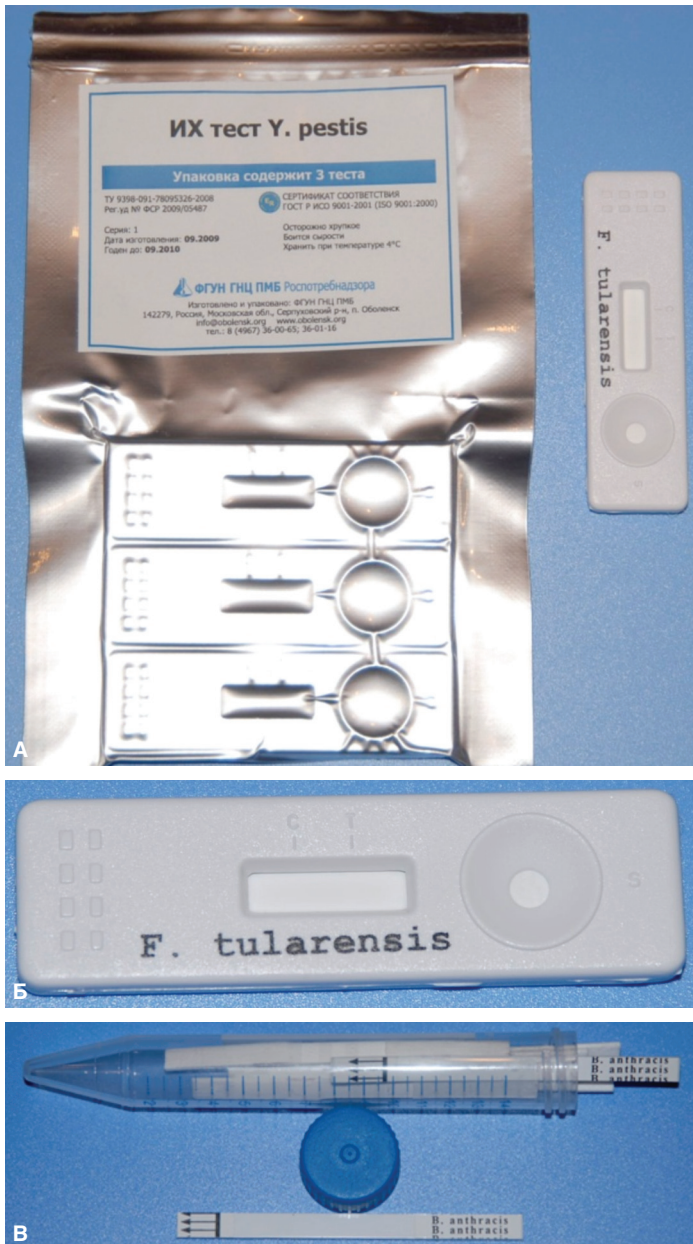


Рис. 4. Иммунохроматографические тесты. А – в блистерах; Б – в хаузенгах; В – в упаковке по 20 полосок.

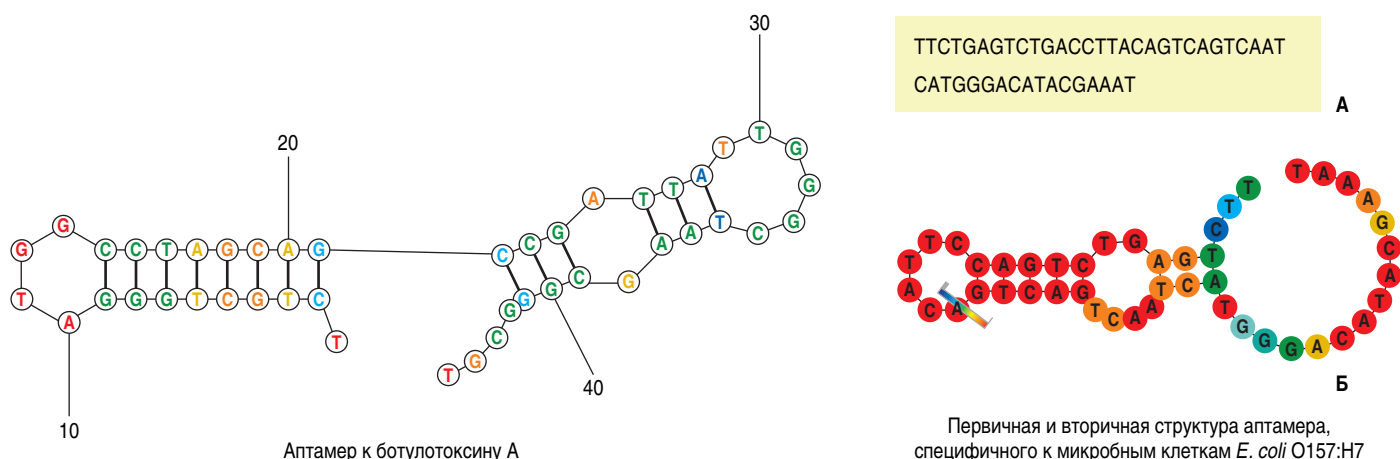


Рис. 5. Структура аптамеров, специфичных к ботулотоксину А и энтеропатогенной кишечной палочке.

сит от степени иммуногенности мишени, они могут храниться в лиофилизированном виде или в органических растворителях при комнатной температуре, легко модифицируются химически. В ФБУН ГНЦ ПМБ впервые в России получены аптамеры к патогенному штамму *E. coli* O157:H7, ботулотоксину и шига-токсину и разработаны тест-системы на их основе (рис. 5). (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин, к.б.н. А.В.Козырь – лаборатория молекулярной биологии.)

Генная диагностика и метагеномика.

Мультиплексные тест-системы, иммуно-ПЦР и LAMP-технология

ПЦР-реакция хорошо себя зарекомендовала при диагностических и индикационных исследованиях, однако существуют возможности повышения ее эффективности в отношении идентификации и дифференциации патогенов. Одним из таких подходов является создание мультиплексных ПЦР-тест-систем. Как примеры их эффективного использования можно назвать разработанные в ГНЦ ПМБ мультиплексные наборы для идентификации шигатоксинпродуцирующих штаммов кишечной палочки (зарегистрированы и выпускаются), тест-систему для одновременного выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в режиме реального времени («MULTI-FLU», зарегистрирован и выпускается), систему ПЦР дифференциации подвидов *Francisella tularensis* с помощью одного праймера (таблица). (К.м.н. А.Н.Мокриевич – отдел особо опасных инфекций.)

Одним из новых современных подходов явилась разработка детекционных процедур на основе использования иммуно-ПЦР, сочетающей в себе методы ПЦР в реальном времени и ELISA. Впечатляющими являются результаты применения данного подхода: используется образец объемом 1 мкл, время реакции до 25 мин, выявляются единичные бактерии и вирусы. Для выпуска данных препаратов в ГНЦ ПМБ создана производственная база по стандартам GMP, разработаны тест-системы для определения ботулинического нейротоксина типа А («ИПЦР-BoNT/A»), летального фактора сибирской язвы («ИПЦР-ЛФ»), протективного антигена сибирской язвы («ИПЦР-ПА»), бактерий *E. coli* O157:H7 («ИПЦР- E.COLI O157:H7»), бактерий *Listeria monocytogenes* («ИПЦР-L.MONOCYTOGENES»), бактерий *Pseudomonas aeruginosa* («ИПЦР-P.AERUGINOSA»). (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин – лаборатория молекулярной биологии.)

Для использования в полевых условиях и, в частности, в работе Специализированных противозидемических бригад (СПЭБ) ГНЦ ПМБ вместе с противочумными институтами разработана и испытана генодиагностическая технология на основе реакции петлевой изотермической амплификации (LAMP) в сочетании с ИХ-тестами для выявления возбудителей I-II групп патогенности. К настоящему времени проведена оптимизация компонентов и условий для экспрессной бесприборной визуализации амплификатов после изотермической амплификации ДНК мишеней *Bacillus anthracis* и *Vibrio cholera*. К 2018 г. планируется регистрация тест-наборов для выявления 8 возбудителей в данной реакции. (К.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии патогенных микроорганизмов.)

Разработки в области гено- и иммунодиагностики послужили основой для создания, совместно с Центральным институтом эпидемиологии и Государственным научным центром «Вектор», образцов биологических ДНК- и белковых чипов для выявления возбудителей ООИ, скомпонованных на основе синдромного подхода и подготовленных к госрегистрации.

Генотипирование для целей молекулярной эпидемиологии

Для дифференциации прокариот могут быть использованы как фенотипические свойства (ферментативная актив-

Таблица. Дизайн праймеров мультиплексной тест-системы для одновременного выявления ДНК возбудителей чумы, сибирской язвы и туляремии в режиме реального времени – «MULTI-FLU»

Возбудитель	Мишень	Последовательность
<i>Y. pestis</i>	Yp_ypo2088_up	cga-gta-ggg-tta-ggt-ggg
	Yp_ypo2088_low	ccg-tcc-aat-gca-tgt-tag-acc-a
	Yp_ypo2088_Pr_up	(ROX)tc-cat-ttc-atg-gcg-gta-ata-tcg-gga-(RTQ2)
<i>B. anthracis</i>	sspE_up	agc-aaa-cgc-aca-atc-aga-ag
	sspE_low	acg-tct-gtt-tca-gtt-gca-aat-tct-gta-cc
	sspE_Pr_up	(FAM)ct-ggt-gct-agc-att-caa-agc-aca-aat-gct-BHQ1
<i>F. tularensis</i>	ISFtu5_up	gcc-gtg-tga-act-tta-ctt-tgg-t
	ISFtu5_low	tcc-tcg-tgt-aca-gag-cga-atc
	ISFtu5_Pr_up2	(R6G)ac-ggt-cgt-tgt-gta-aaa-atc-aac-cac-atc-(RTQ2)

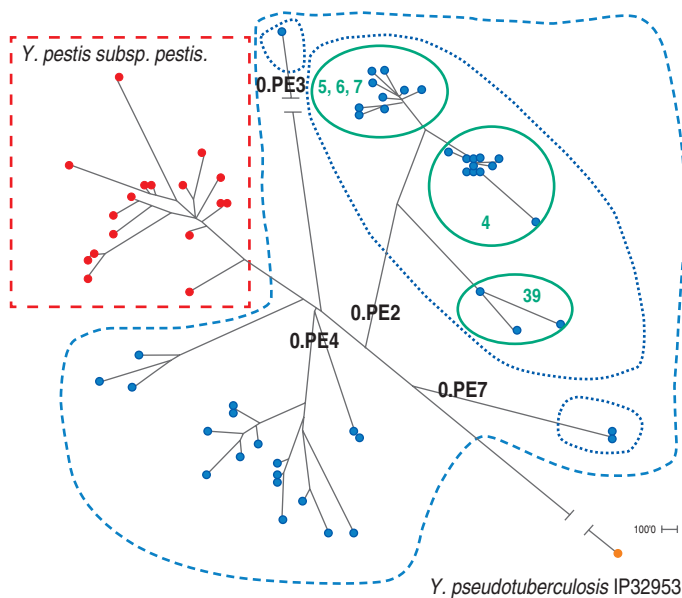


Рис. 6. Филогенетическое древо *Y. pestis* по SNP. Кластеры – *Y. pestis* subsp. *microtus* O.PE7, *Y. pestis* subsp. *microtus* O.PE2, *Y. pestis* subsp. *microtus* O.PE4, *Y. pestis* subsp. *microtus* O.PE3, *Y. pestis* subsp. *microtus* O.PE5 и *Y. pestis* subsp. *pestis*. (К.Б.Н. А.А.Кисличкина – отдел коллекционных культур.)

ность, вирулентность, профиль синтезируемых белков или жирных кислот и т.д.), так и генетическая изменчивость. Среди большого количества разработанных методов наиболее востребованными следует считать два основных подхода – полногеномное секвенирование и масс-спектрометрию. Мультилокусные методы анализа предполагают реализацию методов MLVA-типирования – кластерный анализ по tandemным повторам, DFR-типирования – кластерный анализ по отличающимся участкам ДНК, SNP-типирования на основе сиквенса. Эти методы обладают высокой дискриминационной способностью и филогенетической корректностью, дают возможность отслеживать малейшие изменения в геноме возбудителя в ходе течения эпидемической вспышки и достоверно верифицировать источник заражения.

Проводятся исследования по генотипированию на основе полногеномного секвенирования всех возбудителей особо опасных инфекций и ряда актуальных кишечных инфекций.

Проведены масштабные исследования генотипов чумного микроба для целей систематики (рис. 6). (Д.м.н., профессор А.П.Анисимов.)

Метагеномика

Одним из самых современных подходов к решению задач системной микробиологии и биодетекции стала метагеномика – раздел молекулярной генетики, изучающий метагеном, – генетический материал, получаемый напрямую из образцов среды. Если секвенирование геномов полагается на культивируемые (1% от общего числа микробов) клоны культур, то метагеномика работает с набором всех ДНК, находящихся в среде. Основным отличием при использовании метагеномного подхода является учет некультивируемых микроорганизмов наряду с культивируемыми. С начала 2015 г. ГНЦ ПМБ совместно с другими институтами ведет научные разработки в области выявления опасных инфекционных агентов в сложных биологических смесях, проводя

на первом этапе модельные метагеномные исследования с использованием ряда современных секвенаторов. Данная работа, в которой для повышения эффективности идентификации используется дополнительно магнитоиммосорбция и клеточный сортирование, имеет своей целью создание стандартной индикационной методологии идентификации, которая в будущем может осуществляться в режиме реального времени.

Метагеномный анализ – универсальный подход, позволяющий выявлять в образцах присутствие нуклеиновых кислот, характерных для любых микроорганизмов. Недостатком метагеномного подхода являются высокая стоимость анализа, а также сложности в проведении валидации исследования. Показано, что при проведении экспериментов возможно получение ложноположительных заключений о присутствии в образцах нуклеиновых кислот, характерных для возбудителей особо опасных инфекций [Afshinnekoo E. Geospatial Resolution of Human and Bacterial Diversity with City-Scale Metagenomics // Cell Systems 2015. – Vol. 1. – P. 1-15/ Hall, R.J. Beyond research: a primer for considerations on using viral metagenomics in the field and clinic. // Frontiers in Microbiology. 2015; 6:224. doi:10.3389/fmicb. 2015.00224.]. Еще одна проблема заключается в том, что в образцах, полученных от людей и животных, может содержаться большое количество нуклеиновых кислот, попавших туда из организма хозяина, что приводит к значительному снижению эффективности метагеномного анализа. В связи с этим разрабатываются алгоритмы биоинформационного анализа биологических образцов, исключающие ложноположительные заключения, а также методы проверки эффективности селективного выделения нуклеиновых кислот, относящихся к патогенным биологическим агентам. Проводится проверка эффективности методов, основанных на дифференциальном лизисе эукариотических и бактериальных клеток. В подобных методах сначала происходит лизис эукариотических клеток и удаление эукариотической ДНК. Затем осуществляется лизис бактериальных клеток и выделение бактериальных нуклеиновых кислот. В ходе выполнения работ планируется оценить эффективность подобных методик, применительно к образцам биоматериала, полученного из Республики Гвинея. Дальнейшим этапом проведения исследований будет являться метатранскриптомный анализ. В связи с тем, что геномы большого количества патогенных вирусов кодируются рибонуклеиновыми кислотами, представляется целесообразным проведение анализа тотальных препаратов РНК, выделенных из образцов. Несмотря на то, что по своей сути предлагаемый подход не направлен непосредственно на тотальное изучение транскриптов, характерных для образца, методические подходы, положенные в его основу, нашли широкое распространение в метатранскриптомных исследованиях. Серьезной проблемой, возникающей при изучении тотальной фракции РНК, выделенной из образца, является высокое содержание рибосомальной РНК. Кроме того, при выделении РНК из биологического материала, содержащего эукариотические клетки, значительное количество рибонуклеиновых кислот будут являться матричными РНК, характерными для самих клеток, а не для патогенного биологического агента. Поэтому представляется целесообразным при выделении

фракций вирусной РНК проводить этапы селективного элиминирования фракции рибосомальных и матричных РНК. Конечной целью данных исследований является разработка универсального подхода, позволяющего выявлять в образцах присутствие как ДНК, так и РНК, характерных для патогенных биологических агентов. (К.б.н. А.Г.Богун – отдел коллекционных культур.)

Проблема лекарственной устойчивости и пути ее преодоления.

Бактериофаги

Лавинообразное в последние десятилетия распространение антибиотикоустойчивых и особенно мультирезистентных штаммов патогенных бактерий привело к развитию целого ряда направлений для решения данной проблемы. Среди них – создание пробиотиков на основе бактерий-антагонистов, выделение и синтез пептидов эукариот – дефенсинов, получение бактериоцинов – низкомолекулярных катионных пептидов бактерий, использование небелковых субстанций бактерий в виде органических кислот, альдегидов, перекисей, создание новых веществ с помощью комбинаторной химии для воздействия на новую бактериальную мишень, изучение дормантных патогенов для выработки мер борьбы с некультивируемыми антибиотикочувствительными формами, появление концепции социомикробиологии, предполагающей выявление и разрыв коммуникативных связей клеток при борьбе с биопленками. В этом спектре методов борьбы с антибиотикорезистентностью бактериофаги занимают особое место в силу своих уникальных свойств как живых объектов и большого научного и клинического материала, полученного при их применении.

Основными исследовательскими задачами в данной сфере являются: создание постоянно пополняемых коллекций литических бактериофагов, активных против возбудителей бактериальных инфекций, выявление диагностических бактериофагов и их характеристика (спектр литической активности, характер взаимодействия с бактериальной клеткой, морфология, безопасность, фармакокинетика, эффективность в экспериментах на лабораторных животных), изучение геномов литических бактериофагов (секвенирование, биоинформационный анализ), филогенетический анализ, выявление, клонирование и экспрессия генов фаговых литических ферментов, изучение взаимодействия фагов с бактериальной клеткой на уровне первичных рецепторов (капсульные полисахариды), разработка препаратов бактериофагов для использования в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности.

Основой для реализации фагового направления явилась собранная в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ «Оболensk») на базе ФБУН ГНЦ ПМБ представительная коллекция бактериофагов, активных против возбудителей пищевых и госпитальных инфекций: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* серотипов *Enteritidis*, *Typhimurium*, *Infantis*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* и других, а также против возбудителей особо опасных бактериальных инфекций. (Д.в.н. профессор Э.А.Светоч – отдел молекулярной микробиологии.)

Наличие охарактеризованной коллекции родственных вирулентных стафилококковых TWORD-подобных бактериофагов в ГНЦ ПМБ позволило получить, исследовать и запатентовать высоковирулентный бактериофаг SA18 с расширенным спектром активности в отношении *S. aureus*, эффективно лизирующим 100% исследованных штаммов MRSA и MSSA. Это стало возможным при исследовании биологических и генетических особенностей TWORD-подобных бактериофагов. (К.б.н. И.В.Абаев – лаборатория антимикробных препаратов.)

Некоторые из созданных уникальных бактериофагов, например, высокоспецифичный сибиреязвенный «Оболensk R-1», имеют не только высокий терапевтический потенциал, но и используется для диагностики прямыми методами и в реакции нарастания титра фага при исследовании сложных смесей, включающих в себя споры или вегетативные клетки возбудителя. (Д.м.н., профессор И.А.Дятлов.) Созданный и запатентованный ГНЦ ПМБ бактериофаг EcD4 против STEC-штамма серотипа O104:H4 обладает большим литическим спектром активности против целого ряда серовариантов *E. coli*, в том числе, наиболее распространенных высокопатогенных штаммов O157:H7. (Д.в.н. профессор Э.А.Светоч – отдел молекулярной микробиологии. К.м.н. Н.В.Воложанцев – лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов.)

Одними из наиболее перспективных научных направлений при исследовании фагов являются работы по получению и изучению фаговых литических ферментов (эндолизин или пептидогликангидролаз), специфически лизирующих бактериальную клетку. Целый ряд эндолизин, проявляющих более широкий спектр литической активности, чем бактериофаги гены которых клонированы в ГНЦ ПМБ, и созданы соответствующие штаммы – продуценты, имеющие выраженные биотехнологические перспективы. В основном это относится к эндолизинам против *Staphylococcus aureus*, которые достаточно хорошо охарактеризованы на молекулярном уровне по двум каталитическим доменам (СНАР и амидаза) и испытаны на большом количестве штаммов. Также выполнен ряд работ по эндолизинам в отношении *Salmonella enteritidis*. Изучение механизма деполимеризации полисахаридов бактерий позволит эффективно бороться с микробными биопленками как одним из механизмов устойчивости бактерий к антибиотикам и фагам. Подобные исследования, связанные с изучением механизма деполимеризации полисахаридов бактерий специфическими бактериофагами и их ферментами, ведутся ГНЦ ПМБ в сотрудничестве с целым рядом других институтов (ИОХ РАН и ИБХ РАН). (К.м.н. Н.В.Воложанцев – лаборатория молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов. К.б.н. И.В.Абаев – лаборатория антимикробных препаратов.)

При терапевтическом использовании бактериофагов возникает ряд проблем, связанных с иммунными реакциями, быстрым высвобождением токсинов при лизисе и трудностями в определении эффективной дозы. Возможная иммунгенность фагов и их лизин может быть снижена с использованием технологий «деиммунизации» белков, заключающейся в модификации Т-клеточных эпитопов. Избежать быстрого высвобождения токсинов при лизисе можно при конструировании рекомбинантных эндолизин-дефицитных

бактериофагов, убивающих клетки, но не лизирующих их, а также при одновременном использовании холинов, перфорирующих клеточную стенку. Важным направлением исследований в этой области является конструирование рекомбинантных фагов, избирательно лизирующих только антибиотикорезистентные штаммы бактерий.

В содружестве МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского и ГНЦ ПМБ разработан и прошел государственную регистрацию специализированный продукт диетического профилактического питания «Фудфаг», используемый с целью снижения риска развития спорадических случаев и вспышек Foodborne infections, вызванных *Escherichia coli* (11 серотипов), *Salmonella enterica* (3 серотипа), *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*. Этими же разработчиками создан коктейль бактериофагов против нозокомиальных инфекций, вызываемых лекарственно-устойчивыми штаммами *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* с клинически доказанной лечебной и профилактической эффективностью. Кроме того, в ГНЦ ПМБ получен ряд высокоспецифичных диагностических фагов – сибиреязвенный, стафилококковый, эшерихиозные.

Одним из важных направлений в данной сфере является поиск новых бета-лактамаз и их ингибиторов. Основную роль в развитии резистентности грампозитивных бактерий играют ферменты бета-лактамазы. Наибольшую опасность представляют в настоящее время металло-бета-лактамазы, имеющие атомы цинка в активном центре, из них наиболее активна NDM-1, имеется 16 вариантов этого фермента у *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Providencia rettgeri*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter Iwoffii* и др. NDM-1 обладают высокой каталитической активностью и разрушают структуру всех бета-лактамных антибиотиков, быстро распространяются среди бактерий из-за плазмидной локализации генов. К настоящему времени разработан перспективный ингибитор карбпенемазы, успешно испытанный на штаммах коллекции ГНЦ ПМБ. Ведутся работы по созданию биочипов для выявления основных видов бета-лактамаз. Основная задача разработок по ингибиторам – лечение панрезистентных инфекций, использование ингибитора как компонента препаратов резерва (при биоугрозах), замена импортных препаратов на отечественные. (К.б.н. Н.К.Фурсова – лаборатория антимикробных препаратов.)

Несмотря на высокую угрозу антибиотикорезистентности в мире, эра антибиотиков еще далеко не завершилась, новые направления не дали до настоящего времени надежной замены этим лекарственным средствам, и когда они будут созданы, прогнозировать сложно. В связи с этим, наряду с новыми разработками необходима стратегия использования антибиотиков, сводящая к минимуму возможность появления резистентных штаммов. Это научные и прикладные разработки по оптимальному использованию антибактериальных агентов в медицине и производстве пищевых продуктов, создание комбинированных схем лечения и т.д. Все эти действия могут стать эффективными при разработке и реализации Национального плана по борьбе с устойчивостью к противомикробным препаратам.

Гуманизированные антитела

Еще одним из современных подходов к лечению инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы, не поддающихся иной терапии, а также купированию токсических состояний, является получение и использование гуманизированных антител. Хорошо известны гетерологичные иммуноглобулины для лечения бешенства, энцефалита, сибирской язвы, однако они имеют ряд негативных свойств, связанных с реактогенностью. В ГНЦ ПМБ реализуется новый подход к получению таких средств, основанный на выделении у вакцинированных людей иммунокомпетентных антигенспецифических В-лимфоцитов, иммортализации вирусом Эпштейна-Барр, активации в присутствии Т-лимфоцитов, электрослиянии с гетерогридомой человек/мышь (принципиально новые клоны, появившиеся в последнее время) с помощью проточного электропоратора, селекции слитых клонов, отбора антигенспецифических клонов с помощью клеточного сортирования с дальнейшей наработкой антител и проверкой их специфичности, переклонированием экспрессионного вектора в клетки CHO. Предприняты исследования по масштабированию процессов наработки гуманизированных антител в отношении сибиреязвенного токсина и вируса клещевого энцефалита. (Д.б.н., профессор И.Г.Шемякин, к.б.н. А.В.Колесников – лаборатория молекулярной биологии.)

Разработки в области создания новых вакцин

Одним из важных направлений научных разработок ГНЦ ПМБ являются исследования по созданию новых вакцин против особо опасных инфекций, которые постепенно должны заменить традиционные живые. Разработана, прошла успешные клинические испытания чумная химическая микрокапсулированная вакцина для нужд Минобороны России на основе рекомбинантных антигенов (в стадии Госрегистрации), разработан прототип химической вакцины против шигатоксинпродуцирующих эшерихиозов, живые чумная и сибиреязвенная вакцины со сниженной реактогенностью, прототип химической туляремийной вакцины, ряд образцов ДНК вакцин и вакцин против инфекций, передающихся клещами на основе рекомбинантных белков слюны клещей. (Д.м.н. А.П.Анисимов, д.б.н. В.М.Павлов – лаборатория туляремии, к.м.н. С.Ф.Бикетов – отдел иммунобиохимии). В настоящее время большинство работ в этой сфере приостановлены в связи с тем, что из ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 годы)» была изъята часть, касающаяся разработки медицинских иммунобиологических препаратов. Разработан целый ряд современных методов оценки напряженности иммунитета к особо опасным инфекциям бактериальной природы, являющихся основой для определения тактики вакцинации людей против соответствующих заболеваний. (Д.б.н. В.В.Фирстова – сектор иммунологии.)

Таким образом, основными тенденциями развития современной медицинской микробиологии являются следующие. Использование методологических подходов системной биологии к исследованию взаимоотношений патогенных микроорганизмов с организмом хозяина и внешней

средой, взаимодействие системной биологии с эпидемиологией с учетом влияния экологических, социологических и эволюционных факторов. Построение филогеномных сетей на основании современных молекулярно-генетических данных, развитие новых представлений и формирование современной концепции вида у прокариот. Широкое использование средств и методов метагеномики для анализа огромного разнообразия микроорганизмов, обитающих в различных экосистемах и оказывающих разнонаправленное влияние на организм человека. Совершенствование коллекций патогенных микроорганизмов для развития проблем таксономии и геносистематики на основе полногеномного секвенирования и генотипирования. Коллекционная деятельность неразрывно связана с повышением чувствительности культуральных методов выделения возбудителей с помощью внедрения современных хромоген-

ных питательных сред и повышения эффективности метода биопроб. Развитие и широкое внедрение методов генотипирования патогенов для решения задач молекулярной эпидемиологии. Разработка и внедрение индикаторных генодиагностических методов, быстрых тестов на основе моноклональных антител, аппаратных методов масс-спектрометрического анализа, биочиповых и биосенсорных технологий, клеточного сортирования для целей изолирования, идентификации, дифференциации микроорганизмов и оценки их антибиотикорезистентности. Разработка препаратов биологического происхождения, способствующих преодолению микробной устойчивости к традиционным средствам на основе бактериофагов, их ферментов – эндוליзинов, а также гуманизированных антител для купирования токсических состояний и лечения инфекций, не поддающихся иной терапии.

Государственная коллекция патогенных микроорганизмов и клеточных культур

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, член-корреспондент 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 штамм 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.

Список услуг, предоставляемых ГКПМ-Оболенск

п/п	Наименование	Цена
1.	Выдача типовых штаммов микроорганизмов в лиофилизированном состоянии	2500 рублей за ампулу
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 библиотеки, секвенирование, первичный биоинформационный анализ)	от 30 000 рублей за геном
12.	Наработка инактивированной биомассы микроорганизма	по договоренности
13.	Наработка препарата ДНК микроорганизма	по договоренности
14.	Другие исследования	по договоренности

Генетическое профилирование актуальных для региона г.-к. Сочи возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций

А.Н.Куличенко¹, А.С.Волынкина¹, Я.В.Лисицкая¹, Е.С.Котенев¹, И.В.Кузнецова¹,
А.Т.Подколзин², Е.В.Зайцева², Н.В.Паркина², В.Г.Оробей³

¹ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация;

²ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

³Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по г. Сочи, Сочи, Российская Федерация

С целью определения фоновых генотипов актуальных для территории г.-к. Сочи инфекционных болезней проведено исследование и генотипирование изолятов нуклеиновых кислот (НК) возбудителей острых кишечных инфекций – 295 проб и природно-очаговых инфекций (ПОИ) – 30 пулов иксодовых клещей и 290 проб от грызунов, выявленных в регионе в 2015 г. Использованы методы MLST-анализа и прямого секвенирования. Установлено, что наибольший удельный вес в структуре заболеваемости ОКИ имели ротавирусы группы А генотипов G9[P]8 и G4[P]8 и норовирусы II генотипа, варианты: GII.P4 New_Orlean_2009-GII.4 Sydney_2012 и GII.Pe –GII.4 Sydney_2012.

Выявлены и типированы изоляты НК возбудителей ПОИ: на территории Лазаревского района г.-к. Сочи – *Rickettsia helvetica*, в Хостинском районе – боррелии вида *Borrelia lusitaniae* и хантавирус «Адлер» подгруппы II, на территории Адлерского района – боррелии *B. garinii* и хантавирус «Добрава/Белград» генотипа «Сочи». Проведен анализ эпидемического потенциала идентифицированных генотипов.

Ключевые слова: генотипирование, острые кишечные инфекции, природно-очаговые инфекции

Для цитирования: Куличенко А.Н., Волынкина А.С., Лисицкая Я.В., Котенев Е.С., Кузнецова И.В., Подколзин А.Т., Зайцева Е.В., Паркина Н.В., Оробей В.Г. Генетическое профилирование актуальных для региона г.-к. Сочи возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций. Бактериология. 2016; 1(1): 16–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-16-21

Genetic profiling of actual for the Sochi region casual agents of natural focal and gastrointestinal infections

A.N.Kulichenko¹, A.S.Volynkina¹, Ya.V.Lisitskaya¹, E.S.Kotenev¹, I.V.Kuznetzova¹,
A.T.Podkolzin², E.V.Zaytseva², N.V.Parkina², V.G.Orobey³

¹Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;

²Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

³Territorial Department of Rospotrebnadzor in Sochi, Sochi, Russian Federation

In order to determine the “background” genotypes of actual infectious diseases on the territory of Sochi have been performed the testing and genotyping of isolates nucleic acids (NA) of casual agents of acute intestinal infection (295 samples), the natural focal infections (30 pools of ticks), and 290 samples from rodents, collected in the region in 2015. It has been used The MLST-analysis and direct sequencing. It was found that the largest part in the structure of gastrointestinal infections (GI) morbidity contributed rotaviruses group A: genotypes G9 [P] 8 and G4 [P] 8 and noroviruses GII variants: GII.P4 New_Orlean_2009-GII.4 Sydney_2012 and GII.Pe -GII.4 Sydney_2012.

Isolates of nucleic acids of natural focal infections casual agents have been detected and typed: on the territory of the Lazarevsky district of Sochi has been found *Rickettsia helvetica*, in Khosta district – *Borelia lusitaniae* and hantavirus “Adler” sub-group II, on the territory of the Adler district – *B. garinii* and hantavirus “Dobrava / Belgrade” genotype “Sochi”. The analysis of epidemic potential of identified genotypes has been performed.

Key words: genotyping, acute intestinal infections, natural focal infection

For citation: Kulichenko A.N., Volynkina A.S., Lisitskaya Ya.V., Kotenev E.S., Kuznetzova I.V., Podkolzin A.T., Zaytseva E.V., Parkina N.V., Orobey V.G. Genetic profiling of actual for the Sochi region casual agents of natural focal and gastrointestinal infections. Bacteriology. 2016; 1(1): 16–21. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-16-21

Для корреспонденции:

Куличенко Александр Николаевич, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15

Телефон: (8652) 26-0312

E-mail: kulichenko_an@list.ru

Статья поступила 01.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Alexander N. Kulichenko, MD, Professor, Director of Stavropol Research Anti-Plague Institute

Address: 13-15, Sovjetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation

Phone: (8652) 26-03-12

E-mail: kulichenko_an@list.ru

The article was received 01.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

Регион г.-к. Сочи обладает уникальными климатогеографическими и социально-демографическими особенностями и является самым популярным курортом России, крупным культурным центром, важным транспортным узлом. Наличие развитой туристско-рекреационной инфраструктуры, модернизированной в период подготовки к XXII Олимпийским зимним играм, делает г.-к. Сочи удобным местом проведения массовых культурных и спортивных мероприятий, в т.ч. с международным участием. Это существенно увеличивает угрозу возникновения эпидемических ситуаций в регионе и повышает требования к эффективности системы обеспечения эпидемиологической (биологической) безопасности.

Основными эпидемиологическими рисками в регионе г.-к. Сочи являются: наличие активных природных очагов инфекций (ПОИ) – геморрагической лихорадки с почечным синдромом (ГЛПС), иксодового клещевого боррелиоза (ИКБ) и др., возможность заноса инфекции как из различных регионов РФ, так и из-за рубежа, существующая угроза биотерроризма. Ведущую роль в структуре инфекционной заболеваемости г.-к. Сочи (после ОРВИ) играют острые кишечные инфекции (ОКИ): интенсивный показатель в 2015 г. – 1071, по Краснодарскому краю – 454, при этом доля случаев ОКИ с неустановленной этиологией составляет 81,5%.

Качественное проведение эпидемиологического мониторинга за возбудителями инфекционных болезней, прогнозирование возможных осложнений эпидемиологической обстановки, разработка комплекса профилактических и противоэпидемических мероприятий невозможны без эффективной системы идентификации штаммов-патогенов. При этом важное значение для определения происхождения возбудителя инфекционной болезни (случая, вспышки) имеет информация о фоновых генотипах региональных штаммов, циркулирующих на территории в данный период.

В последние годы широкое практическое применение для характеристики микроорганизмов получили методы молекулярно-генетического анализа, обладающие большей дифференцирующей способностью по сравнению с фенотипическими методами типирования. Для большинства возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной природы к настоящему времени разработаны и применяются в практической работе технологии генетического типирования, включающие методы ПЦР-типирования (PCR-RFLP, MLVA и др.), пульс-электрофорез (PFGE), сиквенс-типирование (MLST, секвенирование фрагментов генов) и т.д. Однако выбор и применение методов генетического анализа зависят не только от наличия международных интернет-баз данных по конкретному методу генотипирования, но и сведений об особенностях генотипов штаммов, циркулирующих в исследуемом регионе.

Наибольшее значение для региона г.-к. Сочи в эпидемическом плане имеют природно-очаговые инфекции, часто вызывающие тяжелые формы болезни заболеваний, а также ОКИ, способные приводить к массовым вспышкам. Создание компьютерных баз данных генотипов региональных штаммов, совместимых с существующими интернет-базами данных, представляет собой основу системы молекулярного анализа биологической безопасности территории. Формирование таких систем, включающих данные о генетических профилях актуальных для региона штаммов-патогенов, методическую базу генотипирования и анализа данных, актуально, в первую

очередь, для регионов с высоким риском завоза и распространения инфекций, к которым относится г.-к. Сочи.

Цель работы: генотипирование штаммов возбудителей природно-очаговых и кишечных инфекций, выявленных в регионе г.-к. Сочи в 2015 г., оценка эпидемического потенциала региональных геновариантов.

Материалы и методы

Для определения генетического спектра возбудителей ОКИ проводилось исследование образцов клинического материала (пробы фекалий) от 295 больных, госпитализированных в инфекционные стационары г.-к. Сочи в период с мая по октябрь 2015 г. В этот период отмечалась спорадическая заболеваемость ОКИ. Основными критериями включения материала в исследование было наличие в эпидемиологическом анамнезе данных об инфицировании больных во время пребывания в регионе г.-к. Сочи и достаточная нагрузка целевых НК.

Индикацию нуклеиновых кислот (НК) возбудителей ОКИ в клиническом материале осуществляли методом ПЦР с использованием наборов реагентов «Ампли Сенс ОКИ-скрин-FL» и «Ампли Сенс Enterovirus-FL» (производство «Интерлабсервис», РФ) в соответствии с инструкцией производителя. Пробы фекалий, положительные на наличие возбудителей ОКИ, отбирали для проведения генетической идентификации изолятов.

Генетическую идентификацию изолятов НК ротавирусов осуществляли методом P[G] типирования с использованием специфических TaqMan зондов [1, 2]. Субвидовую характеристику изолятов НК норовирусов GI и GII проводили методом прямого секвенирования фрагментов генов полимераза и нуклеокапсида вируса [3, 4].

С целью генетического типирования возбудителей ПОИ исследовали пулы иксодовых клещей видов *Ixodes ricinus* (24 пробы), *Haemaphysalis inermis* (6 проб) и образцы легкого грызунов и мелких млекопитающих (290 проб), собранные при проведении эпизоотологического обследования территории г.-к. Сочи.

В пробах суспензий иксодовых клещей методом ПЦР осуществляли детекцию НК возбудителей ИКБ, клещевых пятнистых лихорадок (КПЛ), лихорадки Ку, туляремии, вируса Конго-Крымской геморрагической лихорадки (ККГЛ), вируса клещевого энцефалита (КЭ) с использованием наборов реагентов: «АмплиСенс® *Borrelia burgdorferi sensulato-FL*», «АмплиСенс® Риккетсии группы КПЛ-FL», АмплиСенс® *Coxiella burnetii-FL* «АмплиСенс® ССНФV-FL», «АмплиСенс® TBE-FL» (производство «Интерлабсервис», РФ), «Ген *Francisella tularensis* – РФ» (производство ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», РФ). Образцы суспензий легкого грызунов и мелких млекопитающих исследовали методом ПЦР на наличие РНК хантавирусов, в соответствии с протоколом методики [5]. Пробы полевого материала, положительные на наличие ДНК/РНК возбудителей ПОИ, отбирали для проведения генетического типирования.

Для генотипирования хантавирусов использовали метод прямого секвенирования фрагмента L-сегмента генома вируса размером 347 п.н. с последующим филогенетическим анализом [5]. Анализ уровня генетического родства и построение филогенетических деревьев проводили в програм-

ме Mega 5.05. с использованием метода Neighbor joining, по алгоритму Kimura-2. В качестве референсных использовались данные, полученные из базы данных GenBank, нуклеотидные последовательности L-сегмента штаммов хантавирусов: ADLER-VIRUS_Mm/172-11, ADLER-VIRUS_Mm/296-08, ADLER-VIRUS_Mm/554-11, ADLER-VIRUS_Mm/302-08, ADLER-VIRUS_Mm/340-08, ADLER-VIRUS_Mm/98/08, ADLER-VIRUS_Mm/173-11, TULV_Ma/5590-09, TULV_Moravia-5302v, PUUV_CG1820/POR, PUUV_49/CG/2005_Samara, PUUV_94/CG/2005_Samara, ANDV_Chile-9717869, ANDV_CHI-7913, SNV_NM-H10, SNV_NM_R11, HTNV_HV004, HTNV_76-118/POR, AMUR_ApJLCB2011-99, AMUR_H8205, DOBV_Saaremaa_160v-Estonia, DOBV_GRW/Aa_German, DOBV_SK/Aa_Slovakia, DOBV_Ano-Poroia/Af19/1999_Greece, DOBV_Ano-Poroia/Af9/199_Greece, DOBV_Slo/Af-BER_German, SEO_NYC-D15, SEO_NYC-D9, DOBV_Ap/Sochi/79, DOBV_Ap/Sochi/43, DOBV_Ap/Sochi/hu, DOBV_Sochi/6882/hu, DOBV_Sochi/10636/Ap.

Генетическое типирование изолятов возбудителя иксодового клещевого боррелиоза осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 8 консервативных генов «домашнего хозяйства»: *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA* [6]. Секвенированные фрагменты ДНК сравнивали с референсными последовательностями из базы данных *Borrelia* MLST Databases (<http://pubmlst.org/borrelia/>) с проведением филогенетического анализа.

Идентификацию изолятов *Rickettsia sp.* проводили методом прямого секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов 4 генов (*atpA*, *dnaK*, *gltA*, *ompB*) с последующим сравнением с референсными последовательностями генома из базы данных GenBank с использованием алгоритма BLAST [7].

Результаты и обсуждение

Молекулярно-генетический анализ изолятов НК возбудителей ОКИ

На наличие ДНК *Shigella spp.* и *EIEC*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, аденовирусов группы F, РНК астровирусов, ротавирусов группы А, норовирусов 2 генотипа, энтеровирусов методом ПЦР исследовали 295 проб суспензий фекалий больных ОКИ. Возбудители ОКИ были определены в 223 пробах, в т.ч. в 175 пробах выявлен один из перечисленных возбудителей (моноинфекция), в 48 пробах – несколько патогенов (микст-инфекция). Результаты лабораторных исследований представлены в таблице 1.

Пробы, положительные на наличие ДНК *Shigella spp./EIEC* и *Salmonella spp.* исследовали бактериологическим методом. В результате анализа выделены культуры *Salmonella enterica*, серовар london-1, *Salmonella enterica* серовар enteritidis-1.

В результате исследований определено, что наибольшее число случаев заболевания ОКИ в г.-к. Сочи вызвано ротавирусом группы А (выявлен в 66,1% исследованных проб) и норовирусом GII (16,3%). Для проведения молекулярно-генетического типирования отобраны 16 изолятов НК ротавирусов группы А и 8 – норовирусов 2 генотипа.

Установлено, что идентифицированные варианты ротавирусов группы А принадлежали к 5 генотипам: G9[P]8 – 7 изо-

Таблица 1. Частота выявления возбудителей ОКИ в клиническом материале от больных в г.-к. Сочи в 2015 г.

Возбудитель	Количество проб, положительных на наличие РНК/ДНК возбудителей ОКИ					
	Всего		Моноинфекция		Микст-инфекция	
	абс. кол-во	%	абс. кол-во	%	абс. кол-во	%
Ротавирус gr A	195	66,1	149	50,5	46	15,6
Норовирус GII	48	16,3	13	4,4	36	12,2
Астровирус	14	4,7	4	1,4	11	3,7
Аденовирус	6	2,0	2	0,7	4	1,4
Энтеровирус	1	0,3	0	0,0	1	0,3
<i>Salmonella spp.</i>	5	1,7	4	1,4	1	0,3
<i>Shigella spp.</i> + EIEC.	3	1,0	2	0,7	1	0,3
<i>Campylobacter spp.</i>	3	1,0	1	0,3	2	0,7
Патоген не выявлен	72	24,4				

лятов НК (43,8%), G4[P]8 – 5 (31,3%), G9[P]6 – 1 (6,3%), G4[P]6 – 2 (12,5%), G2[P]4 – 1 (6,3%). Таким образом, в 2015 г. в регионе г.-к. Сочи преобладали генотипы G9[P]8 и G4[P]8. Необходимо отметить, что в 2011–2015 гг. в РФ доминировали генотипы ротавирусов G4[P]8 (частота выявления в 2011–2015 гг. варьировала в пределах 36,5–50,5%) и G1[P8] (12–26,7%), доля генотипов G2[P4] составляла 7–8%, G3[P8] – 1–4,4% (в эпидсезон 2012–2013 гг. достигала 23,7%), G9[P8] – 4,4–10% [8].

Среди норовирусов II генотипа в регионе г.-к. Сочи определено 4 генетических варианта: GII.P17-GII.17 – 2 изолята НК (18,2%), GII.P4 New_Orlean_2009-GII.4 Sydney_2012 – 3 (27,3%), GII.Pe-GII.4 Sydney_2012 – 3 (27,3%), GII.P21-GII.3 – 1 (9,1%). Генетические варианты норовирусов GII.P4 New_Orlean_2009-GII.4 Sydney_2012 и GII.Pe-GII.4 Sydney_2012, выявленные в г.-к. Сочи в 2015 г., являются доминирующими в мире с 1990 г. и обладают наибольшим эпидемическим потенциалом. Штаммы с генотипом GII.P17-GII.17 в течение последних 30 лет выявлялись в мире спорадически, а с зимы 2014–2015 гг. широко распространились в странах Азии с вытеснением ранее доминировавшего генотипа GII.4 Sydney_2012. Единичные вспышки, вызванные генотипом вируса GII.P17-GII.17 в 2014–2015 гг., зарегистрированы также в Австралии, Тайване, США, Франции, Гонконге, Дании, ЮАР, Российской Федерации [9].

Молекулярно-генетический анализ изолятов НК возбудителей ПОИ

В результате исследования методом ПЦР 30 пулов иксодовых клещей в 7 пробах обнаружена 16sРНК возбудителя ИКБ, в 10 – ДНК риккетсий группы КПЛ.

При ПЦР-анализе 290 проб суспензий легкого грызунов и мелких млекопитающих на наличие РНК хантавирусов выявлено 3 положительных пробы. Все образцы полевого материала, содержащие идентифицированные НК возбудителей ПОИ, исследовали с целью генотипирования.

Проведен молекулярно-генетический анализ изолятов НК хантавирусов, выявленных в трех пробах суспензий легкого грызунов: № 90 – *Apodemus ponticus* (с. Гумария, Адлерский район), №199, 202 – *Microtus majori* (г. Ачишхо, Хостинский район). Определена нуклеотидная последовательность фрагмента L-сегмента генома вируса размером 347 п.о. При филогенетическом анализе секвенированных последовательностей генома вируса установлено, что в исследуемых об-

разцах содержатся варианты, относящиеся к двум видам хантавирусов: «Добрава/Белград» и «Адлер». В образце №90 идентифицирован хантавирус «Добрава/Белград» генотипа «Сочи», идентифицированный изолят имеет 3% различий в нуклеотидной последовательности с ранее выявленными в регионе г.-к. Сочи штаммами данного генотипа.

В образцах №199 и 202 идентифицирован хантавирус «Адлер». На филогенетическом древе, построенном по фрагменту L-сегмента генома, в пределах кластера, включающего штаммы хантавируса «Адлер», выделяются 3 подгруппы (I, II и III), коррелирующие с местом выделения: штаммы подгруппы I были выявлены в окрестностях г. Туапсе в 2009 г. и Лазаревском районе г.к. Сочи (р. Макопсе – 2008 г., а. Наджиги – 2011 г.), штаммы подгруппы II изолированы в с. Марьино Лазаревского р-на г.-к. Сочи в 2009 г. и 2011 г., штаммы подгруппы III выделялись в Адлерском районе г.-к. Сочи (Красная поляна – 2008 г., с. Маклюково – 2011 г.) [10]. Исследуемые в данной работе изоляты РНК №199 и 202 кластеризовались со штаммами подгруппы II (референсный изолят ADLEV-VIRUS_Mm/173-11) (рис. 1). Отличия нуклеотидной последовательности от ранее охарактеризованных изолятов подгруппы II хантавируса «Адлер» составили 3–9%.

Выявленные генетические варианты хантавирусов характерны для территории г.к. Сочи, хантавирусы «Добрава/Белград» генотипа «Сочи» определяются на территории г.к. Сочи с 2001 г., хантавирус «Адлер» был впервые идентифицирован в 2008 г., циркуляция изолятов генетической подгруппы II вируса «Адлер» ранее установлена на территории Лазаревского р-на [10, 11]. Для хантавирусов характерна высокая степень генетической гетерогенности, нуклеотидные различия в пределах геновидов могут достигать 18% [10]. Установленные различия нуклеотидных последовательностей, исследуемых в данной работе изолятов РНК и ранее описанных штаммов, позволяют говорить о наличии на территории г.-к. Сочи микропопуляций хантавируса, в которых циркулируют генетически близкие варианты.

Проведено мультилокусное сиквенс-типирование изолятов возбудителя иксодового клещевого боррелиоза, выявленных в четырех пробах суспензий иксодовых клещей: №156 – *I. ricinus* (Агурские водопады, Хостинский р-н), №158 – *H. inermis* (Агурские водопады, Хостинский р-н), №177, 179 – *I. ricinus* (Адлерский р-н).

Определена нуклеотидная последовательность фрагментов 8 генов: *clpA*, *clpX*, *nifS*, *pepX*, *pyrG*, *recG*, *rplB*, *uvrA*. Данные сиквенса сравнивали с референсными последовательностями из базы данных *Borrelia* MLST Databases (<http://pubmlst.org/borrelia/>). Исследуемые изоляты принадлежали к двум видам

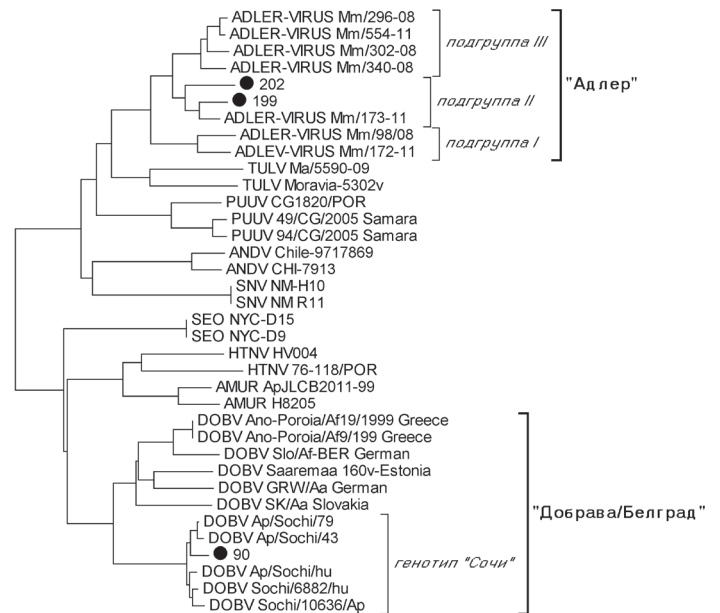


Рис. 1. Филогенетическое древо, построенное по фрагменту L-сегмента генома хантавирусов (347 п.о.).

боррелий: *B. garinii* (изоляты №177 и 179) и *B. lusitaniae* (изоляты №156 и 158). В результате MLST типирования выявлены новые аллельные варианты MLST локусов *clpA*, *rplB*, *uvrA* и 3 новых сиквенс-типа боррелий, не представленных в базе данных (табл. 2). Вариант *B. garinii* №177 относится к сиквенс-типу 251, характерному для штаммов *B. garinii*, выявленных в Германии (1994 г., 2008 г.) и Латвии (2007 г.). Сиквенс-типы *B. garinii* и *B. lusitaniae* в образцах №179, 156 и 158 описаны впервые. Изолят НК *B. garinii* №179 наиболее генетически близок сиквенс-типам 244, 262, 576. Варианты *B. garinii*, принадлежащие к сиквенс-типу 244, ранее были выявлены в Великобритании (2008 г.), Германии (1992 г. и 2011 г.) и России (г. Екатеринбург, 2014 г.), штаммы сиквенс-типов 576 и 262 выделены в Германии в 1992 г. и 2009 г.

Выявленный вариант *B. lusitaniae* №156 обладает наибольшим генетическим родством со штаммами, принадлежащими к сиквенс-типу 153, описанными в Сербии в 2013 г., *B. lusitaniae* №158 наиболее близок к штаммам, относящимся к сиквенс-типам: 148 (Сербия, 2013 г.), 218 (Латвия, 2007 г.) и 630 (Сербия, 2010 г. и 2013 г.)

Боррелии вида *B. garinii* патогенны для человека и широко распространены в РФ. Штаммы данного вида, выявленные в Сибири и на Урале, обладают большим генетическим родством с вариантами из Китая, изоляты, выявленные на территории европейской части России, генетически близки к штаммам из стран Европы, что свидетельствует о существовании локальных популяций *B. garinii*. Изоляты *B. lusitaniae* ранее

Таблица 2. MLST-профилирование исследованных изолятов НК боррелий комплекса *B. Burgdorferii* s.l.

Номер изолята НК	MLST-локусы							ST	Наиболее близкие ST	
	<i>clpA</i>	<i>clpX</i>	<i>nifS</i>	<i>pepX</i>	<i>pyrG</i>	<i>recG</i>	<i>rplB</i>			<i>uvrA</i>
156	Описан впервые (близок к аллели 101)	97	94	12	18	40	Описан впервые (близок к аллели 48)	27	Описан впервые	153
158	189	21	20	27	18	118	74	Описан впервые (близок к аллели 172)	Описан впервые	148, 218, 630
177	95	74	34	96	89	78	77	85	251	–
179	42	34	34	38	37	111	80	39	Описан впервые	244, 262, 576



Рис. 2. Места выделения изолятов возбудителей природно-очаговых инфекций, циркулировавших на территории г.-к. Сочи в 2015 г.

выявлялись только в странах Европы (Португалия, Сербия, Австрия, Латвия) и регионах европейской части РФ, патогенность для человека данных видов боррелий не доказана.

Популяция боррелий комплекса *B. burgdorferi* s.l. в регионе г.-к. Сочи является частью европейской популяции данного возбудителя, о чем свидетельствует генетическое родство выявленных в г.к. Сочи изолятов со штаммами из стран Европы, а также циркуляция в данном регионе *B. lusitaniae* – эндемичного вида боррелий для европейских стран.

С использованием MLST генотипированы изоляты НК *Rickettsia* sp., идентифицированные в 5 пробах суспензий клещей: №160, 167 – *I. ricinus* (а. Калеж, Лазаревский р-н), №168 – *H. inermis* (а. Калеж, Лазаревский р-н), №169 – *I. ricinus* (а. Наджиго, Лазаревский р-н), №178 – *I. ricinus* (Адлерский р-н). Определены нуклеотидные последовательности 4 генов (*atpA*, *dnaK*, *gltA*, *ompB*). Сравнение секвенированных последовательностей с данными из базы GenBank с использованием алгоритма BLAST показало их идентичность ДНК *R. helvetica*. Этот вид риккетсий был выделен ранее из клещей *I. ricinus* и *Dermacentor reticulatus*, на территории стран Европы: Франции – 1997 г., Хорватии – 2007 г., Швеции – 2006 г. [12–14]. Доказана роль *R. helvetica* в инфекционной патологии человека: ДНК возбудителя выявляли в органах и тканях больных с «неспецифическими» лихорадками, в т.ч. с перимиеокардитом, менингеальными симптомами [12].

Территориальная приуроченность генетических вариантов возбудителей ПОИ на территории г.-к. Сочи представлена на рис. 2. На территории Лазаревского района г.-к. Сочи установлена циркуляция *R. helvetica*, в Хостинском районе выявлены боррелии вида *B. lusitaniae* и хантавирус «Адлер» подгруппы II, на территории Адлерского района обнаружены боррелии *B. garinii* и хантавирус «Добрава/Белград» генотипа «Сочи».

Таким образом, в результате проведенной работы впервые осуществлена комплексная молекулярно-генетическая характеристика изолятов НК возбудителей ОКИ и ПОИ, циркулирующих в регионе г.-к. Сочи. На основании результатов генетической идентификации изолятов возбудителей ОКИ и ПОИ проведена оценка их эпидемиологической значимости и определены особенности региональных популяций возбудителей ОКИ и ПОИ. Варианты норовирусов генотипов GII.4_Sydney_2012 и GII.17, выявленные в регионе г.-к. Сочи в 2015 г., обладают наибольшим эпидемическим потенциалом и наиболее часто являются этиологическими фактора-

ми крупных вспышек норовирусной инфекции. Соотношение генетических вариантов ротавирусов в популяции г. Сочи (2015 г.) отличается от других регионов РФ.

В районе г.-к. Сочи продолжается циркуляция хантавирусов «Адлер» и «Добрава-Сочи», являющихся эндемичными для этой территории. Заболевание, вызванное вирусом генотипа «Добрава-Сочи», отличается тяжелым течением. Идентифицированные изоляты НК возбудителей иксодового клещевого боррелиоза и риккетсиозов, циркулирующие в регионе г.-к. Сочи, наиболее генетически близки к европейским штаммам.

Продолжение начатых исследований позволит уточнить характеристику фоновых генетических вариантов возбудителей ПОИ и ОКИ на этой территории, оценить динамику и направленность вероятных изменений. Полученные данные будут использованы при эпидемиологическом анализе возможных случаев (вспышек) инфекционных болезней для определения источника и путей распространения инфекции.

Финансирование. Работа выполнена за счет базового финансирования ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Литература

- Podkolzin AT, Fenske EB, Abramycheva NYu, Shipulin GA, Sagalova OI, Mazepa VN, et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. *J Infect Dis.* 2009 Nov 1;200 Suppl 1:S228-33. doi: 10.1086/605054.
- Veselova O, Podkolzin A, Petukhov D, Kuleshov K, Shipulin G. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. *International Journal of Clinical Medicine.* 2014;5:407-13. doi: 10.4236/ijcm.2014.57055.
- Gonin P, Couillard M, d'Halewyn MA. Genetic diversity and molecular Epidemiology of Norwalk-like viruses. *J Infect Dis.* 2000 Sep;182(3):691-7. <http://dx.doi.org/10.1086/315780>
- Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods.* 2004 Mar 15;116(2):109-17.
- Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis.* 2006 May;12(5):838-40. doi:10.3201/eid1205.051487.
- Margos G, Gatewood AG, Aanensen DM, Hanincová K, Terekhova D, Vollmer SA, et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(25):8730-8735. doi:10.1073/pnas.0800323105.
- Torina A, Fernández de Mera IG, Alongi A, Mangold AJ, Blanda V, Scarlata F, et al. *Rickettsia conorii* Indian tick typhus strain and *R. slovaca* in humans, sicily. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(6):1008-10. doi:10.3201/eid1806.110966.
- Подколзин АТ, Петухов ДН, Веселова ОА, Коновалова ТА, Чернявская ОП, Морозова НС. и др. Позитивные и проблемные аспекты применения ротавирусных вакцин. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2013;1(68):80-9.
- Graaf M, Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill.* 2015;20(26):pii: 21178. doi: http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178
- Tkachenko EA, Witkowski PT, Radosa L, Dzagurova TK, Okulova NM, Yunicheva YV, et al. Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia. *Infect Genet Evol.* 2015 Jan;29:156-63. doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.018.

11. Dzagurova TK, Witkowski PT, Tkachenko EA, Klempa B, Morozov VG, Auste B, et al. Isolation of sochi virus from a fatal case of hantavirus disease with fulminant clinical course. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 1;54(1):e1-4. doi: 10.1093/cid/cir746
12. Nilsson K, Elfving K, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in Patient with Meningitis, Sweden, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(3):490-2. doi: 10.3201/eid1603.090184.
13. Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerging Infectious Diseases*. 2000;6(4):389-92.
14. Dobec M, Golubic D, Punda-Polic V, Kaepfeli F, Sievers M. *Rickettsia helvetica* in Dermacentorreticulatus Ticks. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(1):98-100. doi: 10.3201/eid1501.080815.

References

1. Podkolzin AT, Fenske EB, Abramychcheva NYu, Shipulin GA, Sagalova OI, Mazepa VN, et al. Hospital-based surveillance of rotavirus and other viral agents of diarrhea in children and adults in Russia, 2005-2007. *J Infect Dis*. 2009 Nov 1; 200 Suppl 1:S228-33. doi: 10.1086/605054.
2. Veselova O, Podkolzin A, Petukhov D, Kuleshov K, Shipulin G. Rotavirus Group A Surveillance and Genotype Distribution in Russian Federation in Seasons 2012-2013. *International Journal of Clinical Medicine*. 2014;5:407-13. doi: 10.4236/ijcm.2014.57055.
3. Gonin P, Couillard M, d'Halewyn MA. Genetic diversity and molecular Epidemiology of Norwalk-like viruses. *J Infect Dis*. 2000 Sep;182(3):691-7. <<http://dx.doi.org/10.1086/315780>>
4. Vinje J, Hamidjaja RA, Sobsey MD. Development and application of a capsid VP1 (region D) based reverse transcription PCR assay for genotyping of genogroup I and II noroviruses. *J Virol Methods*. 2004 Mar 15;116(2):109-17.
5. Klempa B, Fichet-Calvet E, Lecompte E, Auste B, Aniskin V, Meisel H, et al. Hantavirus in African wood mouse, Guinea. *Emerg Infect Dis*. 2006 May;12(5):838-40. doi:10.3201/eid1205.051487.
6. Margos G, Gatewood AG, Aanensen DM, Hanincová K, Terekhova D, Vollmer SA, et al. MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(25):8730-8735. doi:10.1073/pnas.0800323105.
7. Torina A, Fernández de Mera IG, Alongi A, Mangold AJ, Blanda V, Scarlata F, et al. *Rickettsia conorii* Indian tick typhus strain and *R. slovaca* in humans, sicily. *Emerg Infect Dis*. 2012;18(6):1008-10. doi:10.3201/eid1806.110966.
8. Podkolzin AT, Petukhov DN, Veselova OA, Konovalova TA, Chernyavskaya OP, Morozova NS, et al. Positive and problem aspects of rotavirus vaccines application. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*. 2013;1(68):80-9. (In Russian).
9. Graaf M, Beek J, Vennema H, Podkolzin AT, Hewitt J, Bucardo F, et al. Emergence of a novel GII.17 norovirus – End of the GII.4 era? *Euro Surveill*. 2015;20(26): pii:21178. doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.26.21178>
10. Tkachenko EA, Witkowski PT, Radosa L, Dzagurova TK, Okulova NM, Yunicheva YV, et al. Adler hantavirus, a new genetic variant of Tula virus identified in Major's pine voles (*Microtus majori*) sampled in southern European Russia. *Infect Genet Evol*. 2015 Jan;29:156-63. doi: 10.1016/j.meegid.2014.11.018.
11. Dzagurova TK, Witkowski PT, Tkachenko EA, Klempa B, Morozov VG, Auste B, et al. Isolation of sochi virus from a fatal case of hantavirus disease with fulminant clinical course. *Clin Infect Dis*. 2012 Jan 1;54(1):e1-4. doi: 10.1093/cid/cir746
12. Nilsson K, Elfving K, Pålsson C. *Rickettsia helvetica* in Patient with Meningitis, Sweden, 2006. *Emerging Infectious Diseases*. 2010;16(3):490-2. doi: 10.3201/eid1603.090184.
13. Fournier PE, Grunnenberger F, Jaulhac B, Gastinger G, Raoult D. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. *Emerging Infectious Diseases*. 2000;6(4):389-92.
14. Dobec M, Golubic D, Punda-Polic V, Kaepfeli F, Sievers M. *Rickettsia helvetica* in Dermacentorreticulatus Ticks. *Emerging Infectious Diseases*. 2009;15(1):98-100. doi: 10.3201/eid1501.080815.

Информация о соавторах:

Волынкина Анна Сергеевна, научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312

Лисицкая Яна Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312

Котенев Егор Сергеевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312

Кузнецова Ирина Владимировна, научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355000, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (8652) 26-0312

Подколзин Александр Тихонович, доктор медицинских наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций отделения молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495) 672-1201

Зайцева Екатерина Викторовна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций отделения молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495)672-1201

Паркина Наталья Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики и эпидемиологии кишечных инфекций отделения молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а
Телефон: (495)672-1201

Оробей Владимир Григорьевич, начальник территориального отдела Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в г.-к. Сочи
Адрес: 354000, Краснодарский край, город-курорт Сочи, ул. Роз, 27
Телефон: (8622) 64-7948

Information about co-authors:

Anna S. Volynkina, Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute
Address: 13-15, Sovjetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0312

Yana V. Lisitskaya – PhD, Senior Researcher, Laboratory of Natural Focal Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute
Address: 13-15, Sovjetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-0312

Egor S. Kotenev – PhD, Head of the Laboratory of Natural Focal Infections, Stavropol Research Anti-Plague Institute;
Address: 13-15, Sovjetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-03-12

Irina V. Kuznetsova – Researcher, Laboratory of Biochemistry, Stavropol Research Anti-Plague Institute
Address: 13-15, Sovjetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation
Phone: (8652) 26-03-12

Alexander T. Podkolzin – MD, Head of Laboratory of Molecular Diagnostic and Epidemiology of Intestinal Infections, Molecular Diagnostic and Epidemiology Department, Central Research Institute of Epidemiology
Address: 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495)672-1201

Ekaterina V. Zaytseva – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostic and Epidemiology of Intestinal Infections, Molecular Diagnostic and Epidemiology Department, Central Research Institute of Epidemiology
Address: 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495) 672-1201

Natalia V. Parkina – Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostic and Epidemiology of Intestinal Infections, Molecular Diagnostic and Epidemiology Department, Central Research Institute of Epidemiology
Address: 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation
Phone: (495) 672-1201

Vladimir G. Orobei – Head of Territorial Department of Rospotrebnadzor for Krasnodar territory in Sochi
Address: 27, Roz St., Sochi, Krasnodar territory, 354000, Russian Federation
Phone: (8622) 64-7948

Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации

А.В.Алешкин¹, Э.А.Светоч², Н.В.Воложанцев², И.А.Киселева¹,
Е.О.Рубальский¹, О.Н.Ершова³, Л.И.Новикова¹

¹ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

²ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;

³ФГАУ Научно-исследовательский институт нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко Минздрава РФ, Москва, Российская Федерация

Впервые в РФ на основе оригинальных вирулентных штаммов бактериофагов, активных в отношении возбудителей инфекций, передающихся пищевым путем, связанных с оказанием медицинской помощи и ряда других, созданы новые категории средств, разработана технология их получения, внедрены процедуры оценки безопасности бактериофагов, включающие микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические тесты, а также испытания на лабораторных животных и ограниченные клинические исследования. Профилактическое использование разработанных фагосодержащих продуктов в медицинской, пищевой, парфюмерно-косметической и других отраслях народного хозяйства РФ позволит снизить риск развития спорадических случаев и вспышек социально-значимых инфекционных заболеваний бактериальной этиологии.

Ключевые слова: бактериофаги, фагобиотики, инфекции, передающиеся пищевым путем, инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи (ИСМП), кожные инфекции, специализированный продукт диетического профилактического питания, дезинфекция лечебно-профилактических учреждений (ЛПУ), биопроектирование, технологические вспомогательные средства, дезодорант

Для цитирования: Алешкин А.В., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Киселева И.А., Рубальский Е.О., Ершова О.Н., Новикова Л.И. Инновационные направления использования бактериофагов в сфере санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Бактериология. 2016; 1(1): 22–31. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-22-31

Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation

A.V.Aleshkin¹, E.A.Svetoch², N.V.Volozantsev², I.A.Kiseleva¹, E.O.Rubalsky¹, O.N.Ershova³, L.I.Novikova¹

¹G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation;

²State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

³N.N. Burdenko Research Institute for Neurosurgery, Moscow, Russian Federation

For the first time in the Russian Federation, based on the original virulent bacteriophage strains active against foodborne infectious agents, hospital acquired diseases and a number of others, new categories of drugs have been created, technologies for their production, procedures for evaluation of dangers of bacteriophages, including microbiological, biochemical and molecular genetic tests have been established, and laboratory animal tests and limited clinical trials have been conducted. Prophylactic application of the newly designed phage-based products in healthcare, production of food and cosmetics and other branches of the Russian economy will allow to reduce the risks of emergence of sporadic cases as well as massive outbreaks of socially significant infectious diseases of bacterial origin.

Key words: bacteriophages, phagebiotics, foodborne infections, hospital acquired infections (HAIs), skin infections, probiotic dietary supplement, decontamination of healthcare facilities, bioprocessing, processing aids, deodorant

For citation: Aleshkin A.V., Svetoch E.A., Volozantsev N.V., Kiseleva I.A., Rubalsky E.O., Ershova O.N., Novikova L.I. Innovative directions for using bacteriophages in the sphere of sanitary and epidemiological welfare of the Russian Federation. Bacteriology. 2016; 1(1): 22–31. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-22-31

Для корреспонденции:

Алешкин Андрей Владимирович, доктор биологических наук, руководитель лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора

Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10

Телефон: (495) 452-1816

E-mail: ava@gabri.ru

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Andrey V. Aleshkin, Dr. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology

Address: 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation

Phone: (495) 452-1816

E-mail: ava@gabri.ru

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

Проблема инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), является одной из важнейших для современного здравоохранения, принимая во внимание растущую резистентность штаммов-возбудителей ИСМП к большинству доступных антибиотиков и дезинфектантов, их устойчивость к ультрафиолетовому облучению и высушиванию, способность к образованию биопленок и широкое распространение в условиях внутрибольничной среды [1]. Применение химических и физических средств деконтаминации в пищевой отрасли также не решает проблему возможного накопления в пище возбудителей кишечных инфекций, снижая уровень экологической чистоты продукции и провоцируя появление новой категории патогенов – штаммов условно-патогенных бактерий, резистентных к антибиотикам [2]. Основные группы веществ, используемых в повседневной гигиенической практике для нивелирования запаха пота, относятся к разряду бактериостатиков. Ежедневное использование этих составов может вызывать ятрогенный дисбактериоз, провоцировать формирование резистентных штаммов микроорганизмов, а также местные и системные аллергические реакции [3]. Таким образом, существует острая проблема поиска и разработки новых, альтернативных существующим, антибактериальных агентов, и бактериофаги являются одним из возможных путей достижения необходимого результата в перечисленных выше отраслях народного хозяйства.

Учитывая остроту проблемы распространения антибиотикоустойчивых возбудителей инфекций, решением Ученого Совета Роспотребнадзора от 21 июня 2011 г. рекомендовано научно-исследовательским организациям совместно с фармпроизводителями направить усилия на разработку препаратов на основе бактериофагов, эффективных при осуществлении мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации.

В рамках данного решения перспективными на сегодняшний день представляются следующие направления использования бактериофагов: 1) бактериофаг-опосредованный биоконтроль – мероприятия по уничтожению бактерий, поражающих сельскохозяйственные растения и животных, на этапе, предшествующем их попаданию на перерабатывающие заводы (овощи, фрукты до сбора урожая; мясной и молочный скот, домашняя птица до забоя); 2) фаговый био-процессинг – деконтаминация и продление сроков годности овощей, фруктов, мяса, рыбы и т.д. в процессе их заводской переработки перед упаковкой полуфабрикатов и готовой к употреблению продукции; 3) превентивное применение специализированных продуктов диетического профилактического питания на основе бактериофагов для снижения риска развития спорадических случаев и эпидемических вспышек кишечных и нозокомиальных инфекций; 4) высокотехнологичная медицинская помощь, построенная на инновационном алгоритме подбора штаммового состава бактериофагов с учетом быстрого изменения циркулирующих штаммов-возбудителей и формирования антифагового иммунитета, новых лекарственных форм и методов фаготерапии; 5) косметика и средства личной гигиены; 6) фагопосредованная биодезинфекция помещений, оборудования и инструментария пищевых производств и лечебно-

профилактических учреждений; 7) фагоидентификация потенциально опасных микроорганизмов [4].

Целью исследований лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского в рамках отраслевой научно-исследовательской программы «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (2011–2015 гг., дополнение к программе от 25.06.2012 г.) послужила разработка новых классов продуктов на основе бактериофагов, относящихся ко второй, третьей, четвертой, пятой и шестой группе направлений. В задачи исследования вошли: создание коллекции производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении бактерий-мишеней, разработка рецептур и пилотных технологий продуктов, доказательство безопасности бактериофагов как с молекулярно-генетической точки зрения, так и в испытаниях на лабораторных животных, а также оценка эффективности продуктов в доклинических, ограниченных клинических испытаниях и на крупных перерабатывающих предприятиях пищевой отрасли.

Материалы и методы

Отсутствие в Российской Федерации прецедента по конструированию, регистрации и применению новых категорий фагосодержащих средств поставило перед нами задачу по созданию собственного алгоритма разработки таких продуктов (рис. 1) – от идентификации бактерий-мишеней и выделения вирулентных штаммов бактериофагов, специфически лизирующих эти патогенные микроорганизмы, отработки технологии получения высокоактивных стерильных фаголизатов, проверки их безопасности на молекулярно-генетическом уровне и создания готовых форм фаговых коктейлей через подтверждение их безвредности и эффективности в опытах на животных и в рамках ограниченных клинических испытаний до государственной регистрации новых или «адаптированных» под циркулирующие бактериальные штаммы уже существующих бактериофаговых препаратов (или фагосодержащих продуктов) [5].

Результаты и обсуждение

На сегодняшний день нами разработаны два фагосодержащих специализированных продукта диетического профилактического питания. Первый – на основе коктейля бактериофагов против так называемых в англоязычной литературе Food-borne infections (FBI). В ходе разработки нами были отобраны и изучены 7 производственно-перспективных штаммов бактериофагов, активных в отношении наиболее значимых видов бактерий – возбудителей инфекций, передаваемых пищевым путем, которые составили основу специализированного профилактического продукта (табл. 1) [7]. Вирулентные штаммы фагов отбирались на основании их фенотипической и молекулярно-генетической характеристики. Основными биологическими свойствами, которые служили критериями отбора, были спектр литической активности, высокая урожайность на штамме-хозяине и устойчивость к негативным физическим и химическим факторам

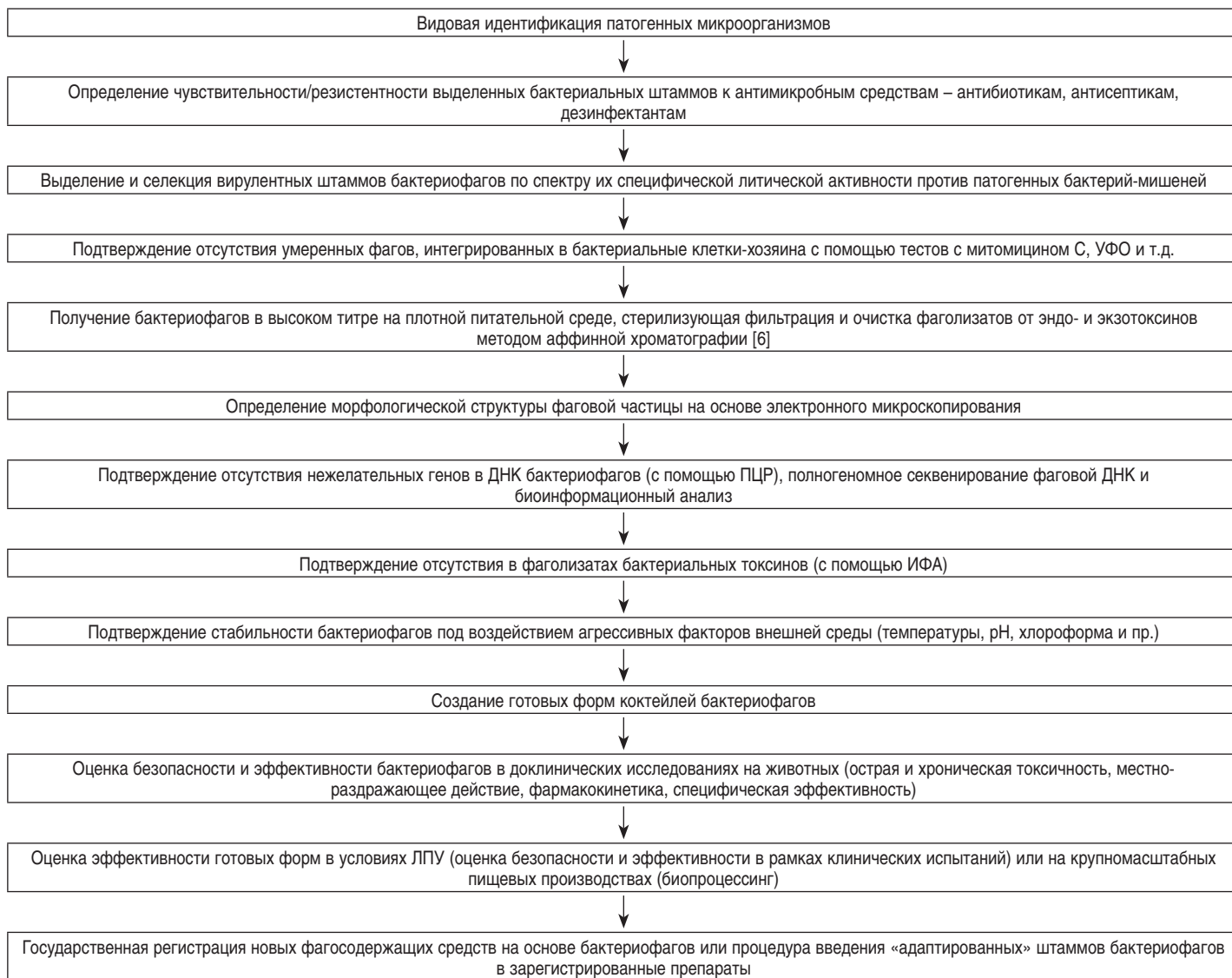


Рис. 1. Алгоритм создания нового или «адаптированного» бактериофагового препарата и/или фагосодержащего продукта (специализированного продукта диетического профилактического питания, дезодоранта, технологического вспомогательного средства и др.).

Таблица 1. Характеристика коктейля бактериофагов «Фудфаг»

Фаг	CH1	ECD7	V18	SE40	ST11	SI3	Lm1
Бактерия-хозяин	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i> O104:H4	<i>E. coli</i> O157:H7	<i>S. Enteritidis</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>S. Infantis</i>	<i>L. monocytogenes</i>
Источник и место выделения	гнойная рана, Челябинск	куриные экскременты, Московская обл.	сточные воды коровника, Московская обл.	почва, Московская обл.	куриные экскременты, Калужская обл.	экскременты крупного рогатого скота, Московская обл.	экскременты овец, Астраханская обл.
Спектр литической активности (%/штаммы бактерий)	94% (в т.ч. MRSA-штаммы)	100% <i>E. coli</i> O104:H4, O104:H12, O157:H7 и др., 70% <i>Sh. sonnei</i> и <i>Sh. flexneri</i>	100% <i>E. coli</i> O157:H7, O157:H-	85% <i>S. Enteritidis</i>	100% <i>S. Typhimurium</i>	64% <i>S. Infantis</i>	92% <i>L. monocytogenes</i>
Отношение к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Температурная устойчивость	55°C	60°C	60°C	80°C	75°C	65°C	60°C
Устойчивость к pH среды	5,2–8,0	5,2–9,6	7,0–9,6	5,2–9,6	3,6–8,0	5,2–8,0	7,0–8,0
Урожайность (титр), БОЕ/мл	10 ¹⁰ –10 ¹¹	10 ¹⁰ –10 ¹¹	10 ¹⁰ –10 ¹¹	10 ¹¹ –10 ¹²	10 ¹¹ –10 ¹²	10 ¹¹ –10 ¹²	10 ⁹ –10 ¹⁰
Размер ДНК, тпн	18	167	129	29	82	84	35

Таблица 2. Результаты ПЦР-анализа	
Праймеры для амплификации	K12-R (59-ATCCTGCGCACC AATCAACAA-39), K12IS-L (59-CGCGATGGAAGATGCTCTGTA-39). Длина ампликона 969 пн.
Сутки эксперимента	1 (до инфицирования) 6
Опытная группа	
Контрольная группа	
Обозначения: 1–5 – образцы, K– и K+ – отрицательный и положительный контроли, L – маркер длин ДНК, 1 kb	

внешней среды (в том числе в условиях длительного космического полета [8]). Результаты, полученные при секвенировании ДНК бактериофагов, показали, что их размеры колеблются от 18 (CH1) до 167 (EcD7) тысяч пар нуклеотидов. По данным биоинформационного анализа ДНК бактериофагов, геномы всех 7 штаммов не содержат гены интеграз, репрессоров транскрипции и других генов, характерных для умеренных бактериофагов. Не были обнаружены также и известные локусы патогенности, кодирующие бактериальные токсины штаммов-хозяев, антибиотикорезистентности и прочие нежелательные гены [9].

В рамках формирования доказательной базы в плане профилактической эффективности специализированного продукта «Фудфаг» мы апробировали на 40 лабораторных животных, а затем на 45 здоровых добровольцах следующий алгоритм применения специализированного продукта: контрольные группы в обоих исследованиях заражались непатогенным штаммом *Escherichia coli* K12 C600, опытные группы подвергались такому же заражению на фоне профилактического приема специализированного продукта «Фудфаг» до, во время и спустя сутки после периода инфицирования. С целью повышения достоверности проведенного эксперимента данные микробиологического исследования подтверждали молекулярно-генетическим методом (табл. 2): до заражения испытуемых штамм *E.coli* K12 C600 по данным ПЦР отсутствовал во всех образцах фекалий, в то время как на 6-е сутки эксперимента этот штамм присутствовал у членов контрольной группы вплоть до 5-го разведения фекалий и не был обнаружен в образцах от людей и животных из опытных групп. В результате проведенных пострегистрационных испытаний на экспериментальной модели эшерихиоза у лабораторных животных и ограниченной группе добровольцев была подтверждена эффективность предложенного алгоритма использования специализированного продукта «Фудфаг» в качестве средства специфической фагопрофилактики кишечной инфекции, вызванной непатогенной кишечной палочкой [10].

Разработанный специализированный продукт диетического профилактического питания «Фудфаг», произведенный по запатентованной технологии [6], прошел экспертизу ФГБУ «НИИ питания», а также государственную регистрацию в Федеральной службе по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, и может применяться в качестве средства фагопрофилактики декретированных контингентов работников предприятий различных отраслей с целью снижения риска развития sporadic случаев и вспышек FDI, вызванных *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus* (Свидетельство о государственной регистрации RU.77.99.19.004.E.001234.02.13 от 20.02.2013 на специализированный продукт диетического (профилактического) питания «Фудфаг» и Свидетельство о государственной регистрации RU.77.99.19.004.E.002820.02.15 от 10.02.2015 на специализированный продукт диетического профилактического питания «Фудфаг»).

Второй специализированный продукт диетического профилактического питания, разработанный МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского совместно с ГНЦ прикладной микробиологии (Оболенск), включает в себя коктейль бактериофагов против нозокомиальных инфекций, вызываемых лекарственно-устойчивыми штаммами *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Staphylococcus aureus* [11]. Фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика отобранных для специализированного продукта штаммов бактериофагов представлена в табл. 3.

Безопасность коктейля бактериофагов против возбудителей госпитальных инфекций была подтверждена результатами изучения его острой и хронической токсичности на белых беспородных мышах: препарат не вызывал у экспериментальных животных признаков острой и хронической интоксикации; при гистологическом изучении паренхиматозных органов мышей, получавших коктейль бактериофагов, каких-либо поражений в них не выявлено. Профилактическая эффективность фагосодержащего продукта была доказана

Фаг	SCH1	SCH111	KPV15	KPV811	PA5	PA10	AP22	AM24
Бактерия-хозяин	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>
Источник и место выделения	Клинический материал, Челябинск	Клинический материал, Москва	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Сточные воды, Московская обл.	Клинический материал, Москва	Клинический материал, Москва
Спектр литической активности (%/штаммы бактерий)	Суммарно 95% штаммов <i>S. aureus</i> (в т.ч. MRSA-штаммы)		Суммарно 92,5% штаммов <i>K. pneumoniae</i> (в т.ч. панрезистентных)		Суммарно 76% штаммов <i>P. aeruginosa</i> (в т.ч. антибиотикорезистентных)		Суммарно 56,25% штаммов <i>A. baumannii</i> (в т.ч. антибиотикорезистентных)	
Отношение к хлороформу	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив	Устойчив
Температурная устойчивость	-20–55°C	-20–55°C	-20–60°C	-20–65°C	-20–60°C	-20–65°C	-20–65°C	-20–60°C
Размер ДНК, пн	18 023	18 018	167 034	42 641	66 182	91 212	46 387	97 139
Урожайность (титр), БОЕ/мл	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰	10 ¹⁰

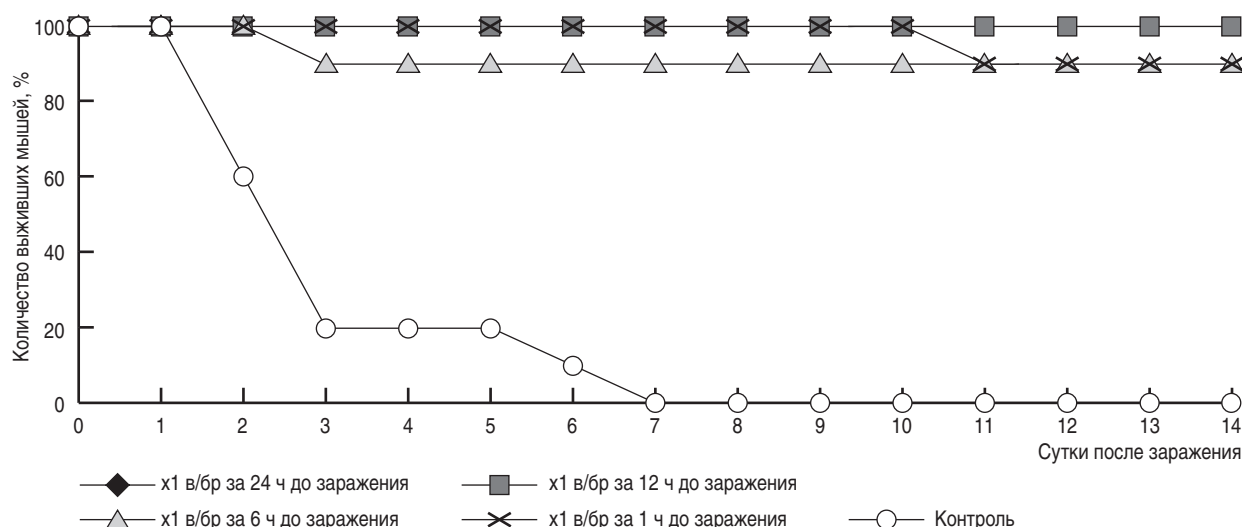


Рис. 2. Эффективность профилактики острой клебсиеллезной инфекции у беспородных белых мышей, получавших парентерально коктейль бактериофагов против патогенных штаммов с МЛУ, вызывающих ИСМП (разовая доза фага ~1 × 10⁸ БОЕ/мышь), за 1, 6, 12 и 24 ч до подкожного заражения культурой штамма *K. pneumoniae* B2580.

в опытах по профилактике экспериментальной острой клебсиеллезной инфекции у мышей. Однократное внутрибрюшинное введение коктейля бактериофагов против возбудителей госпитальных инфекций за 12–24 ч до инфицирования мышей культурой штамма *K. pneumoniae* B2580 защищало от гибели 100% животных. При однократном применении исследуемого препарата за 1 и 6 ч до инфицирования выживало 90% мышей (рис. 2) [12].

В одной из хирургических клиник Москвы в период регистрации эпидемиологического неблагополучия 42 пациента, находящиеся на продленной ИВЛ в отделении нейрореанимации (ОРИТ) в 2014–2015 г., получали коктейль бактериофагов против возбудителей ИСМП *per os* по 20 мл, в том числе 6 пациентов повторно от 3 до 5 раз. Из проб эндотрахеального аспирата, крови, мочи и кала пациентов выделяли грамотрицательные патогены (*A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*) в доле до 87,5%. Эффективная санация через сутки после проведенного 3-дневного курса была подтверждена в 54–62,5% случаях. Фармакокинетические исследования указывали на системный механизм действия бактериофагов, проникавших через ЖКТ во все системы организма: для идентификации бактериофагов, входящих в разработанный коктейль, в крови пациентов и здоровых доброволь-

цев через сутки после окончания приема фагосодержащего продукта использовали метод ПЦР со специфическими праймерами, определение фагов в кале, моче и ЭТА проводили как с помощью спот-теста на штамме-хозяине, так и с помощью метода Грация (рис. 3, табл. 4) [13].

Полученные в рамках ограниченных клинических испытаний результаты подтвердили наши предположения, что при разработке средств профилактики и лечения ИСМП на основе бактериофагов нельзя придерживаться классического пайп-лайна разработки лечебно-профилактических продуктов (ЛПП) – стратегии фиксированного штаммового состава бактериофагового коктейля. Влияние антибиотиков и дезинфектантов на патогенные микроорганизмы в замкнутой экологической нише ЛПУ ускоряет эволюционный процесс в направлении формирования все новых штаммов, в том числе обладающих множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Снижение эффективности бактериофага возникает также при его повторном применении у одного и того же пациента за счет образования специфических антител к данному штамму фага. Антифаговый иммунитет после однократного применения коктейля бактериофагов конкретного штаммового состава детектировали с помощью сконструированной ИФА тест-системы по наличию титра специфических

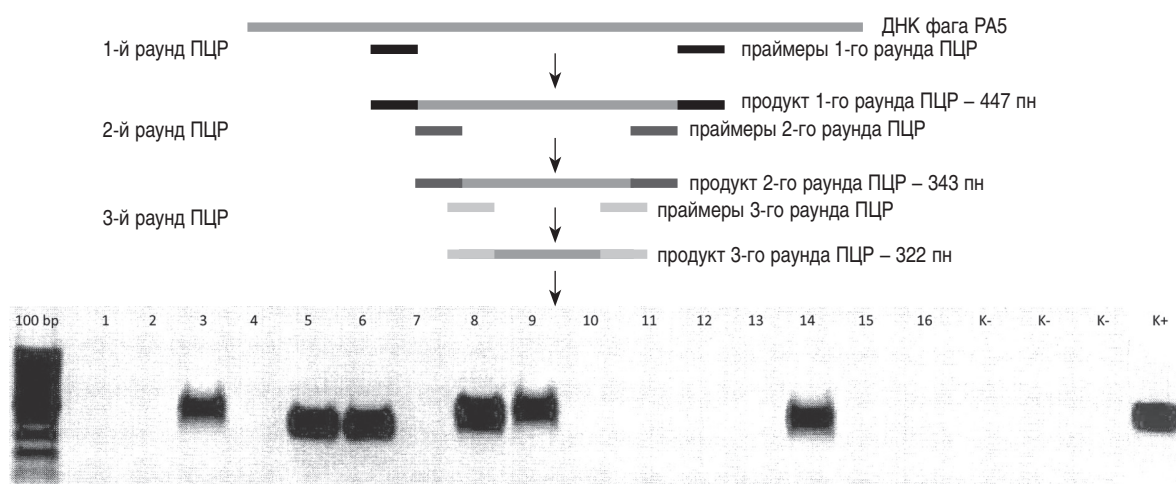


Рис. 3. Двойная вложенная (double-nested) ПЦР для обнаружения ДНК бактериофага PA5 в крови 10 больных и двух здоровых добровольцев. Обозначения дорожек горизонтального электрофореза продуктов (ампликонов) 3-го раунда ПЦР: 100 bp – маркер длин ДНК; 1–2 – образцы крови здоровых доноров до приема фага PA5; 3–4 – образцы крови здоровых доноров на третий день приема фага PA5 *per os* (выделение ДНК из 300 мкл цельной крови); 5–6 – образцы крови здоровых доноров на третий день приема фага PA5 *per os* (выделение ДНК из 500 мкл цельной крови); 7–16 – образцы крови 10 пациентов через сутки после окончания внутрижелудочного (зондового) введения коктейля бактериофагов против госпитальных инфекций, включающего фаг PA 5 (выделение ДНК из 300 мкл цельной крови); К– – три отрицательных контроля, на каждый раунд (ПЦР реакционная смесь); К+ – положительный контроль (ДНК фага *Pseudomonas aeruginosa* PA5).

Таблица 4. Определение бактериофагов в клиническом материале (через сутки после 3-дневного курса фаготерапии)

Номер пациента	PA 5	PA 10	KPV 15	KPV 811	AP 22	AM 24	SCH1/SCH111	Вид материала
1	2×10^3 (*)	$2,5 \times 10^3$	–	–	+++	+	–	Кал
2	+++(**)	+++	+	+++	+++	+	–	Кал
3	4×10^4	3×10^5	–	–	–	–	–	ЭТА
	–	10^3	–	–	–	–	–	Кал
4	+	3×10^3	+	–	++	–	++++	Кал
5	–	–	–	+	–	–	–	Моча
	–	–	–	–	++	+	–	Кал
6	+++	+++	++	+	+++	++	–	Кал
	2×10^2	++++	2×10^2	+++	+++	–	–	Моча
7	5×10^4	4×10^5	–	–	–	–	–	ЭТА
	$1,8 \times 10^3$	10^3	–	–	++	+	–	Кал
8	–	+++	+	10^4	–	–	–	Моча
	–	–	–	–	++	–	–	Кал
9	–	–	–	–	3×10^8	–	–	Моча
	$1,7 \times 10^3$	$2,5 \times 10^3$	++	–	+++	++	–	Кал
10	+++	+++	++	–	+++	+++	–	Кал

(*) – числа обозначают титр бактериофага по методу Грация в БОЕ/мл; (**) «++++» – абсолютно чистая зона лизиса на чувствительном штамме-хозяине методом спот-теста, меньшее количество «+» отражает не абсолютный лизис, связанный с недостаточной концентрацией бактериофага в данном образце, «минус» – отсутствие бактериофага в данном образце.

IgG-антител от 1/16 до 1/4096 (у пациентов, не принимавших коктейль бактериофагов, титр антител отсутствовал). Спустя трое суток после начала повторного назначения тех же штаммов бактериофагов титр антифаговых IgG-антител нарастал у пациентов с исходными значениями 1/16 до 1/256 (у больных с титрами до повторного приема равными и выше 1/1024 – титр оставался неизменным). Направлением для использования бактериофаговых препаратов в ОРИТ будет закрепление видового состава коктейля с последующим подбором (или обязательной сменой на новые, в случае повторного применения у одного и того же пациента) фаговых штаммов, активных в отношении актуальных для ЛПУ в каждый момент времени патогенов, из имеющейся фено- и генотипически охарактеризованной коллекции бактериофагов (рис. 4).

Развивая тему высокотехнологичной медицинской помощи, построенной на представленном выше инновационном алгоритме подбора штаммового состава бактериофагов, нами была разработана новая лекарственная форма – суп-

позиторная, позволяющая повысить эффективность проводимой фаготерапии за счет исключения отрицательного воздействия кислой среды желудка на титр бактериофагов в составе препарата [14]. Однократное и многократное применение препарата у кроликов не вызывало признаков острой и хронической интоксикации. В процессе фармакокинетических испытаний концентрация фаговых частиц в кале, моче и крови кроликов, определяемая как с помощью ПЦР, так и методом Грация, достигала максимума (10^4 – 10^6 БОЕ/мл) через 4,5–6 ч после однократного ректального введения суппозитория, причем бактериофаги меньшего (по данным электронной микроскопии) размера, быстрее (за 3 ч) проникали из просвета прямой кишки животных в кровь и далее в мочу. Все штаммы бактериофагов определялись в организме кроликов в незначительных количествах спустя 24 ч после введения суппозитория. Формирование антифагового иммунитета на 23-й день после однократного применения суппозитория детектировали с помощью ИФА

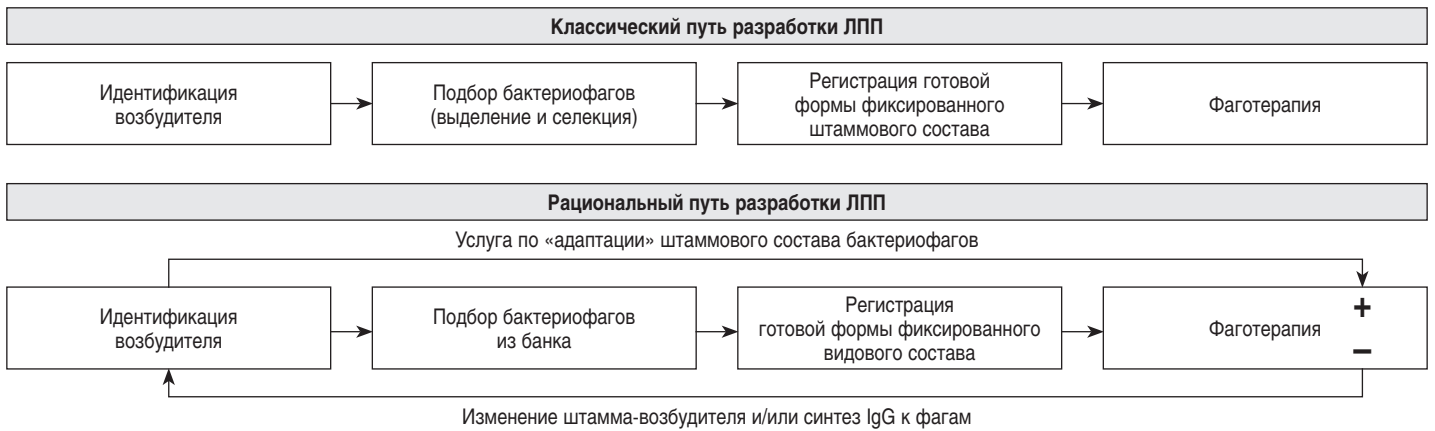


Рис. 4. Выбор модели внедрения фаготерапии ИСМП в клиническую практику.

по наличию значительного титра специфических IgG-антител (среднее значение оптической плотности лунок, содержащих сыворотку животных после приема бактериофага, было в 3 раза выше, чем у интактных) и *in vitro*: инкубация сыворотки интактных испытуемых с фаголизатом практически не снижала титр фага (с учетом разведения фага в 1000 раз согласно методике проведения реакции нейтрализации), в то время как сыворотка иммунизированного животного практически полностью блокировала литическую активность фаговых частиц. Фармакокинетические кривые титра фагов в кале, моче и крови по форме полностью повторяли друг друга, что свидетельствовало, наряду с образованием специфических антител к фаговым частицам, о системном механизме действия бактериофагов, проникавших после введения *per rectum* в органы кровообращения, печень, желчный пузырь, почки, мочевого пузыря, тонкий и толстый кишечник лабораторных животных (рис. 5) [15].

Еще одним инновационным на сегодняшний день направлением использования бактериофагов представляется косметика. Изменение состава микробиоты кожи подмышечных впадин может вызывать у людей дискомфортные состояния – запах и повышенное потоотделение, приводящие к ухудшению качества жизни. Согласно цели исследо-

вания, проведенного в МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского, нами разрабатывается безопасное и эффективное профилактическое средство на основе бактериофагов в форме дезодоранта, нормализующего микробиоценоз кожных покровов подмышечных впадин человека. Установлено, что у большинства обследованных лиц с дискомфортными состояниями в области подмышечных впадин отмечается средняя и высокая степень обсемененности, которая варьировала в интервале 6–7 lg КОЕ/мл. Выявлено, что микробиота кожи подмышечных впадин у этой категории лиц представляет собой гетерогенный консорциум, в котором преобладают микроорганизмы рода *Corynebacterium*, и в равном процентном соотношении – *C. tuberculostearicum* и *C. ureicelivorans*. Второй по частоте встречаемости была группа микроорганизмов рода *Staphylococcus*. Идентифицированы микроорганизмы нескольких видов этого рода с преобладанием *S. hominis* и *S. epidermidis*. С учетом микробиологического, геномного и биоинформационного анализов фагикандидаты, активные в отношении штаммов, выделенных у лиц с дискомфортными состояниями, перспективны для включения в профилактическое средство, разрабатываемое с целью нормализации микробиоценоза кожных покровов подмышечных впадин человека [16].

В рамках программы научных исследований, утвержденной Роспотребнадзором на 2011–2015 гг., нами разработаны 6 средств фаг-опосредованного биопроцессинга для деконтаминации и продления срока годности молока, мясного фарша, куриных полуфабрикатов и рыбы (табл. 5) [17].

Для обеззараживания сырых колбас в натуральной оболочке на основе измельченной мякоти свинины (т.н. купат) создано и прошло апробацию в условиях крупномасштабного мясоперерабатывающего производства в г. Москве вспомогательное технологическое средство, содержащее коли, сальмонеллезные и листериозные бактериофаги. Применение инновационного метода биодеконтаминации 100 кг партии фарша при производстве купат позволило добиться полной элиминации *E. coli* в обработанной продукции в течение 24 ч, в то время как контрольные образцы, приготовленные из той же партии исходно контаминированного кишечной палочкой фарша, были забракованы контрольной лабораторией предприятия (табл. 6).

На базе одного из рыбноводческих хозяйств Республики Карелия в процессе переработки потрошенных тушек свеже-

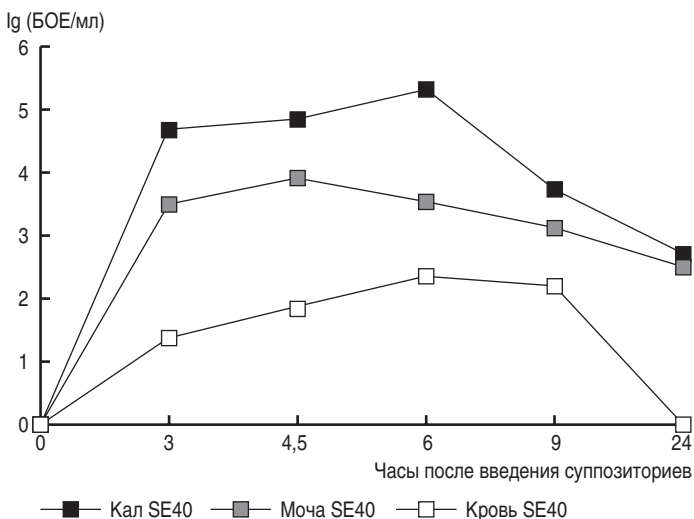


Рис. 5. Динамика титра бактериофага SE40 в образцах кала, мочи и крови кроликов после однократного введения суппозитория.

Таблица 5. Разработанные средства фаг-опосредованного биопроцессинга

Вспомогательные технологические средства на основе бактериофагов						
Спектр литической активности фагов	Деконтаминация					Продление срока годности <i>A. hydrophila</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i> , <i>R. ornithinolytic</i> , <i>C. freundii</i>
	<i>E. coli</i> O104:H4, O157:H7, <i>Sh. sonnei</i> и <i>Sh. flexneri</i>	<i>E. coli</i> , <i>S. Enteritidis</i> , <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Infantis</i> , <i>L. monocytogenes</i>	MRSA, STEC	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	
Вид деконтаминируемого продукта	Говяжий фарш	Купаты	Молоко	Куриный окорок	Охлажденная рыба	Охлажденная рыба

Таблица 6. Деконтаминация купат с помощью бактериофагов

Параметры ТР ТС 021/2011	1-е сутки		2-е сутки		3-и сутки		4-е сутки		5-е сутки		6-е сутки		7-е сутки	
	1*	2*	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>E. coli</i> , КОЕ/0,0001г	10 ²	10 ²	10 ³	Роста не обнаружено	10 ³	Роста не обнаружено	10 ⁴	Роста не обнаружено	10 ⁴	Роста не обнаружено	10 ⁵	Роста не обнаружено	10 ⁶	Роста не обнаружено
Органолептические свойства	Свежее мясо		Свежее мясо		Свежее мясо		Свежее мясо		Запах протухшего мяса		Запах протухшего мяса		Свежее мясо	

*1 – купата, не обработанная бактериофагом (из контрольной партии); 2 – купата, обработанная бактериофагом (из опытной партии).

выловленной радужной форели было использовано средство биоконсервации на основе коктейля бактериофагов, активных в отношении *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida*, *Routella ornithinolytica*, *Citrobacter freundii* являющихся, по нашим данным, ведущими микроорганизмами из прижизненной микрофлоры гидробионтов данного региона, вызывающими порчу. Ежедневный контроль микробиологических и органолептических параметров обработанных бактериофагами образцов охлажденной рыбы подтвердил возможность продления срока годности свежевывловленной форели на 5 суток при полном сохранении экологической чистоты и пищевой ценности продукции (рис. 6).

Проведенные исследования свидетельствуют, что эффективные концентрации бактериофага различаются в зависимости от вида деконтаминируемого продукта. Так, собственные данные согласуются с результатами исследований американской корпорации Intralytix и голландской Mircleos – в жидких пищевых продуктах (молоко и сырный рассол) распространение фаговых частиц происходит равномерно и свободно. Более сложными, с точки зрения фагового биопроцессинга, являются продукты с неровной поверхностью, обладающие большой площадью (рыба, мясо и морепродукты), что физически ограничивает доставку фаговых частиц ко всем бактериальным клеткам-мишеням. Экспериментально подобранная нами универсальная (с точки зрения достижения максимального эффекта деконтаминации пищевых продуктов) концентрация фаговых частиц во вспомогательных технологических средствах согласуется с литературными данными и составляет не менее 10⁸ БОЕ/мл или см² [18].

Таким образом, впервые в РФ разработаны специализированные продукты диетического профилактического питания, средства дезинфекции инструментария и помещений ЛПУ, деконтаминации пищевых полуфабрикатов, личной гигиены (дезодорант), а также новая лекарственная форма – суппозитории, на основе бактериофагов, снижающих риск

развития нозокомиальных, кишечных и кожных инфекционных заболеваний, процедуры оценки их безопасности и эффективности, а также алгоритмы энтерального профилактического приема, дезинфекции, деконтаминации и личной гигиены с использованием разработанных продуктов.

Проведенные исследования и разработанная нормативно-технологическая документация позволят сформировать теоретические предпосылки для создания в РФ новых категорий продуктов на основе бактериофагов – специализированных продуктов диетического профилактического питания, биодезинфектантов, биоконсервантов, биодезодорантов и суппозиторной лекарственной формы.

Профилактическое использование разработанных продуктов на основе бактериофагов позволит снизить риск развития спорадических случаев и вспышек нозокомиальных и кишечных инфекционных заболеваний.

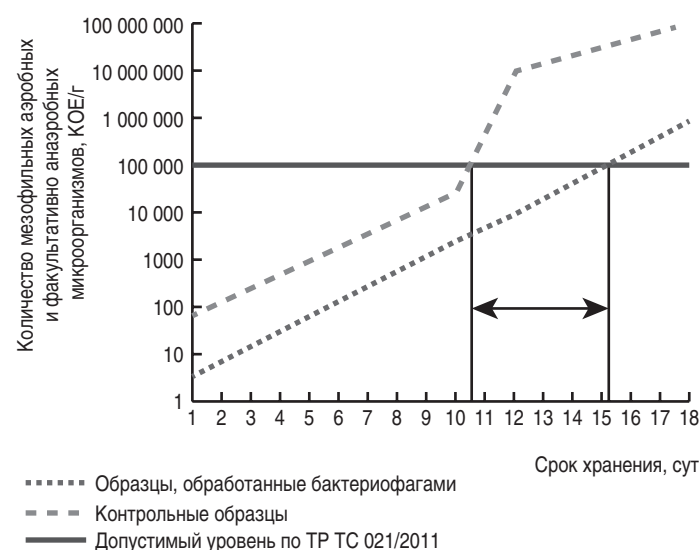


Рис. 6. Продление срока годности охлажденной радужной форели на 5 суток за счет применения фаг-опосредованного биопроцессинга.

Литература

- Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubal'sky E, Kiseleva I, Bochkareva S, Afanas'ev S. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook, 01-02 September 2015, St Hilda's College, Oxford, UK, P.17 Режим доступа: <http://lpmhealthcare.com/wp-content/uploads/2015/08/PHG15-Book.pdf>.
- Алешкин АВ, Зейгарник МВ. Возможности применения бактериофагов в качестве пробиотических средств деконтаминации в области питания. Вопросы диетологии. 2012;2(4):24-34.
- Борисова ОЮ, Алешкин АВ, Гадуа НТ, Бочкарева СС, Ефимов БА, Чернова ВА, и др. Количественный и качественный состав микробиоты подмышечных впадин у практически здоровых лиц. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015;2:17-24.
- Aleshkin AV, Afanas'ev SS, Volozhantsev NV, Svetoch EA. Bacteriophages as probiotics and decontaminating agents for food products. In book: Bacteriophages: biology, applications and role in health and disease /Editors, Clark Denton and Richard J. Crosby. New York, Published by Nova Science Publishers, Inc.; 2013.- P. 94-109, 169 p.
- Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Verevkin VV, Krasilnikova VM, Bannov VA, et al. Bacteriophage cocktail in prophylaxis against food-borne infections. In book: Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to echnological Developments, A. Mendez-Vilas (Ed.), Publisher: BrownWalker Press, 2013 - P. 100-104, 274 p.
- Патент 2525141 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, А61К 35/76 / Способ получения бактериофага / Киселева И.А., Алешкин А.В., Верёвкин В.В., Светоч Э.А., Афанасьев С.С., Рубальский Е.О., Рубальская Е.Е., Рубальский М.О., Ефимова О.Г., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. Заявитель и патентообладатель: Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) (RU). – № 2013126187/10; заяв. 07.06.2013; опубл. 10.08.2014; Бюл.22. – 5 с.
- Патент 2518303 Российская Федерация, МПК С12N 7/00, А61К 35/76, А61К 39/295, А61Р 31/04. Композиция антибактериальная, штамм бактериофага *E.coli*, используемый для такой композиции / Дятлов И.А., Алешкин В.А., Алешкин А.В., Афанасьев С.С., Светоч Э.А., Воложанцев Н.В., Васильев Д.А., Золотухин С.Н., Амерханова А.М., Киселева И.А., Веревкин В.В., Красильникова В.М., Мякина В.П., Баннов В.А., Рубальский М.О. Заявители и патентообладатели: Федеральное бюджетное учреждение науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека (ФБУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) (RU), Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ПМБ) (RU). –№ 2012127139/10; заяв. 29.06.2012; опубл. 10.06.2014, Бюл. 1. – 7 с.
- Алешкин АВ, Рубальский ЕО, Попова АВ, Богун АГ, Евстигнеев ВИ, Пчелинцев СЮ, и др. Бактериофаги в условиях длительного космического полета. Астраханский медицинский журнал. 2014;9(3):62-71.
- Aleshkin AV, Rubalskii EO, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Svetoch EA, Kiseleva IA, et al. Effectiveness of phage-based probiotic dietary supplement in the prevention of *E.coli* traveler's diarrhea: a small-scale study. In book: "Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens", Ed.: A. Méndez-Vilas, BrownWalker Press, 2015, P.81-84, 151 p.
- Aleshkin AV. Rubalskii EO, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Svetoch EA, Kiseleva IA, et al. A small-scale experiment of using phage-based probiotic dietary supplement for prevention of *E. coli* traveler's diarrhea. Bacteriophage. 2015; 5 Iss. 3:e1074329-1-e1074329-6. DOI:10.1080/21597081.2015.1074329. Режим доступа: <http://dx.doi.org/10.1080/21597081.2015.1074329>, Режим доступа через PubMed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458758>.
- Заявка на изобретение №2015109073 от 16.03.2015 «Композиция антибактериальная для профилактики и лечения госпитальных инфекций (варианты), штаммы бактериофагов, используемые для получения такой композиции».
- Aleshkin A, Ershova O, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E. Phagebiotics in prevention and treatment of healthcare-associated infections. Abstracts. Bacteriophage 2016 19th–21st January 2016, London, UK, EuroSciCon Ltd. – P. 14. Режим доступа: <http://lifescienceevents.com/wp-content/uploads/PhageAbstracts2016-6.pdf>
- Алешкин АВ, Ершова ОН, Селькова ЕП, Гренкова ТА, Киселева ИА, Борисова ОЮ, и др. Бактериофаги в профилактике инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи: алгоритм подбора и механизм системного действия. Журнал МедиАль. 2016;1:29. Режим доступа: http://www.medial-journal.ru/uploads/objects/rf_journal_article/1/189/pdf/tezisy_1-2016.pdf
- Заявка на изобретение №2016110068 от 21.03.2016 «Антибактериальная композиция в виде суппозитория и способ ее приготовления».
- Aleshkin V, Kiseleva I, Bochkareva S, Borisova O, Rubalsky E, Anurova M. Preclinical trials on phage-based suppositories. Abstract Book of the 4th World Congress on Targeting Infectious Diseases "Phage Therapy 2016", Paris, France, June 2-3, 2016. – P.45.
- Борисова ОЮ, Алешкин АВ, Гадуа НТ, Бочкарева СС, Ефимов БА, Чернова ВА, и др. Микробиота кожи подмышечных впадин у лиц с микробиологическими изменениями. Лечение и профилактика. 2014;4:33-8.
- Алешкин АВ, Ларина ЮВ, Воложанцев НВ, Зейгарник МВ, Киселева ИА, Верёвкин ВВ, и др. Опыт деконтаминации пищевых полуфабрикатов с помощью бактериофагов. Вопросы диетологии. 2015;5(1):24-30.
- Алешкин АВ, Зулькарнеев ЭР, Ларина ЮВ, Рубальский ОВ, Киселева ИА, Рубальский ЕО, и др. Биодеконтаминация и продление сроков годности мясных и рыбных полуфабрикатов с помощью бактериофагов. Астраханский медицинский журнал. 2015;10(4):40-9.

References

- Aleshkin A, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubal'sky E, Kiseleva I, Bochkareva S, Afanas'ev S. Phage-based cocktail for control of hospital-acquired pathogens. Phages 2015 Bacteriophage in Medicine, Food and Biotechnology: Conference handbook, 01-02 September 2015, St Hilda's College, Oxford, UK, P.17 Available at: <http://lpmhealthcare.com/wp-content/uploads/2015/08/PHG15-Book.pdf>.
- Aleshkin AV, Zeygarnik MV. Possibilities of using bacteriophages as probiotic medications for decontamination in nutrition. Vopr. dietol. (Nutrition). 2012; 2(4):24-34. (In Russian).
- Borisova OYu, Aleshkin AV, Gadua NT, Bochkareva SS, Efimov BA, Chernova VA, et al. Quantitative and qualitative composition of axilla microbiota in practically healthy individuals. Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology. 2015;2:17-24. (In Russian).
- Aleshkin AV, Afanas'ev SS, Volozhantsev NV, Svetoch EA. Bacteriophages as probiotics and decontaminating agents for food products. In book: Bacteriophages: biology, applications and role in health and disease /Editors, Clark Denton and Richard J. Crosby. New York, Published by Nova Science Publishers, Inc.; 2013.- P. 94-109, 169 p.
- Aleshkin AV, Volozhantsev NV, Svetoch EA, Verevkin VV, Krasilnikova VM, Bannov VA, et al. Bacteriophage cocktail in prophylaxis against food-borne infections. In book: Worldwide Research Efforts in the Fighting against Microbial Pathogens: From Basic Research to echnological Developments, A. Mendez-Vilas (Ed.), Publisher: BrownWalker Press, 2013 - P. 100-104, 274 p.

6. Patent 2525141 Russian Federation, MPK S12N 7/00, A61K 35/76, / Sposob polucheniya bakteriofaga / Kiseleva I.A., Aleshkin A.V., Verevkin V.V., Svetoch E.A., Afanas'ev S.S., Rubal'skii E.O., Rubal'skaya E.E., Rubal'skii M.O., Efimova O.G., Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N. G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. (RU). – № 2013126187/10; zayav. 07.06.2013; opubl. 10.08.2014; Byul.22. – 5 s. (In Russian).
7. Patent 2518303 Russian Federation, MPK S12N 7/00, A61K 35/76, A61K 39/295, A61P 31/04. Kompozitsiya antibakterial'naya, shtamm bakteriofaga E.coli, ispol'zuemyi dlya takoi kompozitsii / Dyatlov I.A., Aleshkin V.A., Aleshkin A.V., Afanas'ev S.S., Svetoch E.A., Volozhantsev N.V., Vasil'ev D.A., Zolotukhin S.N., Amerkhanova A.M., Kiseleva I.A., Verevkin V.V., Krasil'nikova V.M., Myakinina V.P., Bannov V.A., Rubal'skii M.O. G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology. (RU), State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology (RU). –№ 2012127139/10; zayav. 29.06.2012; opubl. 10.06.2014, Byul. 1. – 7 s. (In Russian).
8. Aleshkin AV, Rubalsky EO, Popova AV, Bogun AG, Evstigneev VI, Pchelintsev SYu, et al. Bacteriophages under the prolong spaceflight. Astrakhan Medical Journal. 2014;9(3):62-71. (In Russian).
9. Aleshkin AV, Rubalskii EO, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Svetoch EA, Kiseleva IA, et al. Effectiveness of phage-based probiotic dietary supplement in the prevention of E.coli traveler's diarrhea: a small-scale study. In book: "Multidisciplinary Approaches for Studying and Combating Microbial Pathogens", Ed.: A. Méndez-Vilas, BrownWalker Press, 2015, P.81-84, 151 p.
10. Aleshkin AV. Rubalskii EO, Volozhantsev NV, Verevkin VV, Svetoch EA, Kiseleva IA, et al. A small-scale experiment of using phage-based probiotic dietary supplement for prevention of E. coli traveler's diarrhea. Bacteriophage. 2015; 5 Iss. 3:e1074329-1-e1074329-6. DOI:10.1080/21597081.2015.1074329. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/21597081.2015.1074329>, Available PubMed at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26458758>.
11. Zayavka na izobretenie №2015109073 ot 16.03.2015 «Kompozitsiya antibakterial'naya dlya profilaktiki i lecheniya gospital'nykh infektsii (varianty), shtammy bakteriofagov, ispol'zuemye dlya polucheniya takoi kompozitsii».
12. Aleshkin A, Ershova O, Volozhantsev N, Popova A, Svetoch E, Rubalsky E. Phagebiotics in prevention and treatment of healthcare-associated infections. Abstracts. Bacteriophage 2016 19th-21st January 2016, London, UK, EuroSciCon Ltd. – P. 14. Available at: <http://lifescienceevents.com/wp-content/uploads/PhageAbstracts2016-6.pdf>
13. Aleshkin AV, Ershova ON, Sel'kova EP, Grenkova TA, Kiseleva IA, Borisova OYu, i dr. Bakteriofagi v profilaktike infektsii, svyazannykh s okazaniem meditsinskoj pomoshchi: algoritm podbora i mekhanizm sistemnogo deistviya. Zhurnal Medial'. 2016;1:29. Available at: http://www.medial-journal.ru/uploads/objects/rf_journal_article/1/189/pdf/tezisy_1-2016.pdf
14. Zayavka na izobretenie №2016110068 ot 21.03.2016 «Antibakterial'naya kompozitsiya v vide suppozitoriya i sposob ee prigotovleniya».
15. Aleshkin V, Kiseleva I, Bochkareva S, Borisova O, Rubalsky E, Anurova M. Preclinical trials on phage-based suppositories. Abstract Book of the 4th World Congress on Targeting Infectious Diseases "Phage Therapy 2016", Paris, France, June 2-3, 2016. – P.45.
16. Borisova OY, Aleshkin AV, Gadua NT, Bochkareva SS, Efimov BA, Chernova VA, et al. Axillar microbiota in patients with microecological disturbances. Disease treatment and prevention. 2014;4:33-8. (In Russian).
17. Aleshkin AV, Larina YuV, Volozhantsev NV, Zeygarnik MV, Kiseleva IA, Verevkin VV, et al. An experience of decontamination of semi-processed foods using bacteriophages. Vopr. dietol. (Nutrition). 2015;5(1):24-30. (In Russian).
18. Aleshkin AV, Zul'karneev ER, Larina YuV, Rubalsky OV, Kiseleva IA., Rubalskii EO, et al. Bio-decontamination and extending shelf-life of meat and fish pre-processed foods with bacteriophages. Astrakhan Medical Journal. 2015;10(4):40-9. (In Russian).

Информация о соавторах:

Светоч Эдуард Арсеньевич, доктор ветеринарных наук, профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область
 Телефон: (4967) 36-0079

Воложанцев Николай Валентинович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной диагностики и генно-инженерных препаратов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, п. Оболенск, Серпуховский район, Московская область
 Телефон: (4967) 36-0079

Киселева Ирина Анатольевна, научный сотрудник лаборатории клинической микробиологии и биотехнологии бактериофагов, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора
 Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10
 Телефон: (495) 452-1816

Рубальский Евгений Олегович, специалист по инновационной работе Центра поддержки технологий и инноваций, ГБОУ ВПО «Астраханский государственный медицинский университет», младший научный сотрудник лаборатории прикладной иммунохимии, ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора
 Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10
 Телефон: (961) 798-3753

Ершова Ольга Николаевна, доктор медицинских наук, доцент, заместитель главного врача по эпидемиологической работе ФГАУ НИИ нейрохирургии им. академика Н.Н.Бурденко Минздрава России
 Адрес: 125047, Москва, ул. 4-я Тверская Ямская, 16
 Телефон: (499) 972-8570

Новикова Лидия Ивановна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией иммунобиологических препаратов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
 Адрес: 125212, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10
 Телефон: (495) 452-3803

Information about co-authors:

Edward A. Svetoch, Dr. Sci. (Vet.), Professor, Head of Molecular Microbiology Department, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology
 Address: Obolensk, 142279, Russia
 Phone: (4967) 36-0079

Nikolai V. Volozhantsev, Cand. Sci. (Biol.), Head of Laboratory of Molecular Diagnostics and Genetically Engineered Preparations, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology
 Address: Obolensk, 142279, Russia
 Phone: (4967) 36-0079

Irina A. Kiseleva, Research Associate, Laboratory of Clinical Microbiology and Biotechnology of Bacteriophages, G.N. Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
 Address: 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation
 Phone: (495) 452-1816

Evgenii O. Rubalskii, Specialist in Innovations, Technology and Innovation Support Center, Astrakhan State Medical University, Junior Research Associate, Laboratory of Applied Immunochemistry, G.N.Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
 Address: 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation
 Phone: (961) 798-3753

Olga N. Ershova, Deputy Chief of the Epidemiological work Neurosurgery Institute
 Address: 16, 4th Tverskaya-Yamskaya St., Moscow, 125047, Russian Federation
 Phone: (499) 972-8570

Lidiya I. Novikova, PhD, Head of laboratory of immunobiological preparates, G.N.Gabrichevsky Moscow Research Institute for Epidemiology and Microbiology
 Address: 10, Admiral Makarov St., Moscow, 125212, Russian Federation
 Phone: (495) 452-3803

Актуальные аспекты описания новых риккетсий на примере предковой группы

Н.В.Рудаков^{1,2}

¹ФБУН Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, Омск, Российская Федерация;

²ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет, Омск, Российская Федерация

В последние годы существенно расширились представления о риккетсиях группы предшественников. Нами впервые изучена представительница этой группы *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, описаны ее фенотипические и генотипические характеристики, выделен ряд штаммов этой новой риккетсии. Симбиотическая теория происхождения митохондрий и других органелл стала классикой современной биологии. Проведен анализ состояния изучения *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* и других риккетсий предковой группы в связи с оценкой роли представителей *Rickettsiales* в эволюции прокариотических и эукариотических форм жизни.

Ключевые слова: риккетсии группы предшественников, *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, эволюция прокариотов и митохондрии

Для цитирования: Рудаков Н.В. Актуальные аспекты описания новых риккетсий на примере предковой группы. Бактериология. 2016; 1(1): 32–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-32-36

Actual aspects of the description of new rickettsia on instance of ancestral group

N.V.Rudakov^{1,2}

¹Omsk Research Institute of natural focal infections, Omsk, Russian Federation;

²Omsk State Medical University, Omsk, Russian Federation

Greatly expanded representation of the ancestor group of Rickettsia in recent years. We firstly studied representative of this group – *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, described its phenotypic and genotypic characteristics, isolated a number of new strains of Rickettsia. Symbiotic theory of the origin of mitochondria and other organelles become a classic of modern biology. The study of *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* and other rickettsiae of ancestral group in connection with the assessment of the role of representatives of Rickettsiales in the evolution of prokaryotic and eukaryotic life forms were analyzed.

Keywords: rickettsiae of ancestor group, *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, mitochondria and prokaryotes evolution

For citation: Rudakov N.V. Actual aspects of the description of new rickettsia on instance of ancestral group. Bacteriology. 2016; 1(1): 32–36. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-32-36

В последние годы отмечается увеличение числа новых генотипов риккетсий, что связано с совершенствованием методов их культивирования и идентификации.

Выделение риккетсий из образцов с использованием точных культур (преимущественно «shell vial» техники) является важным для описания новых видов, поскольку позволяет проводить генетический анализ, изучение физиологических особенностей, совершенствовать диагностические подходы, определить чувствительность к антибиотикам [1].

В настоящее время для классификации риккетсий наибольшее значение имеют методы геносистематики. Ad hoc

committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology считает, что для этих целей необходимо определение нуклеотидных последовательностей не менее пяти генов, включая кодирующие основные белки [2].

Применительно к риккетсиям для этих целей предлагается изучать панбактериальные гены, кодирующие 16S rRNA и цитратсинтазу (*glcA*), *Rickettsia*-специфические *Omp A* и *Omp B* гены и ген *D*, кодирующие поверхностные, высокомолекулярные белки rOmp A (190 кД) и rOmp B (120 кД), PS120 (термостабильный цитоплазмальный белок) соответственно. Конкретные критерии к описанию новых риккетсий на уров-

Для корреспонденции:

Рудаков Николай Викторович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФБУН Омский научно-исследовательский институт природно-очаговых инфекций Роспотребнадзора, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии ГБОУ ВПО Омский государственный медицинский университет

Адрес: 644080, Омск, проспект Мира, 7

Телефон: (3812) 65-0633

E-mail: rickettsia@mail.ru

Статья поступила 27.05.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Nikolai V. Rudakov, Sc.D. (Med), professor, director of Omsk Research Institute of natural focal infections (Rospotrebnadzor), head of the department of microbiology, virology and immunology of Omsk State Medical University

Address: 7, prospekt Mira, Omsk, 644080, Russian Federation

Phone: (3812) 65-0633

E-mail: rickettsia@mail.ru

The article was received 27.05.2016, accepted for publication 15.08.2016

не рода, вида и группы приведены в работе Fournier P.-E. et al. (2003) [3]. Эти критерии могут быть использованы для официального описания новых видов риккетсий только при наличии изученных изолятов [4].

Традиционно в составе рода *Rickettsia* выделяли две группы – сыпного тифа (СТ) и клещевой пятнистой лихорадки (КПЛ). В дополнение к этому предложено создать новую, так называемую предковую (ancestral) группу, предшествующую разделению риккетсий на группы СТ и КПЛ, включая *R. canadensis*, *R. bellii* и *AB bacterium* [5]. В дальнейшем на основе анализа полноразмерных геномов из группы КПЛ предложено выделить четвертую – промежуточную (или переходную) группу, включающую *R. akari*, *R. australis* и *R. felis* [6, 7].

Целью работы являлся анализ состояния изучения *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* и других риккетсий предковой группы в связи с оценкой роли представителей *Rickettsiales* в эволюции прокариотических и эукариотических форм жизни.

С использованием методов молекулярно-биологического анализа в клещах *I. persulcatus*, собранных в России, описан новый генотип риккетсий – *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, названный в честь видного отечественного риккетсиолога – академика Ирины Владимировны Тарасевич и отнесенный нами к группе предшественников [8]. Полученные последовательности нуклеотидов составили 1322 п.о. для гена 16 S рибосомальной РНК и 1196 п.о. для гена цитратсинтазы (*gltA*). При сравнении их с имеющимися в Genbank, они показали свою уникальность и имели наибольший процент гомологии с *Rickettsia canadensis* – 98% соответствия по гену 16 S рибосомальной РНК и 96% гомологии по гену *gltA* (номера Genbank AF 503168 и AF 503167 соответственно). Для гена *gltA* установлено 38 различий в нуклеотидах с *Rickettsia canadensis*, по гену 16 S рибосомальной РНК – 19 различий. По действующим критериям таксономии риккетсий, данный генотип не принадлежит к группам КПЛ и СТ и не может быть отнесен ни к одному из известных видов рода *Rickettsia* [3].

Проведенный филогенетический анализ генов 16 S рибосомальной РНК и *gltA* известных видов риккетсий показал, что *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* вместе с *R. canadensis* и новыми «риккетсиями насекомых» *Adalia bipunctata* (AB) *Bacterium*, *Adalia decempunctata* (AD) *Bacterium*, *Pea Aphid rickettsia* образуют отдельный кластер в пределах рода *Rickettsia* [8].

Считается, что изучение гена *ompA* ориентировано и наиболее оправдано при изучении риккетсий группы КПЛ [9]. При этом применение гена *gltA* наиболее эффективно для риккетсий группы СТ, *R. helvetica*, кластера *R. australis* – *R. akari*, а также кластера *R. canadensis*. Так, Fournier P.-E. et al. (1998), применяя обширный набор праймеров, не смогли амплифицировать фрагменты гена *ompA* у *R. australis*, *R. helvetica*, *R. akari*, *R. bellii* [10]. По этим же причинам при описании *Candidatus R. tarasevichiae* первоначально не были определены нуклеотидные последовательности гена *ompA*.

В 2011 г. из иксодовых клещей на северо-востоке Китая выделена ДНК риккетсий и описана последовательность *ompA Rickettsia sp. H820* (JF 714220). По данным Т.П. Микрюковой и соавт. (2012), пробы ДНК из клещей *I. persulcatus* и образцов органов птиц из Томской области, которые клас-

chiae, а по гену *ompA* оказались в одной ветви с последовательностью *Rickettsia sp. H820* [11]. Аналогичные данные были получены в дальнейшем китайскими исследователями при исследовании проб ДНК из клещей *I. persulcatus* и биоматериалов от пациентов после присасывания клещей в северо-восточной провинции Mudanjiang, а также нами при исследовании снятых с пациентов клещей *I. persulcatus* в Омской области (GenBank: RP 98901.1) [12].

К настоящему времени в базе данных GenBank представлено 12 нуклеотидных последовательностей фрагментов гена *ompA Candidatus Rickettsia tarasevichiae* размером от 311 до 591 п.о., преимущественно из Китая (10 последовательностей), а также из России (наши данные) и Эстонии (КТ 119436.1). Следовательно, с достаточной вероятностью можно предположить наличие фрагментов гена, аналогичного гену *ompA* риккетсий группы КПЛ, у *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, что требует дополнительного изучения на штаммах, выделенных в различных частях ареала *I. persulcatus*.

R. canadensis (штамм 2678) была изолирована из клещей *Haemaphysalis leporispolustris* в Канаде (Онтарио) в 1963 г. [13]. Позднее антитела к *R. canadensis* были выявлены у четырех пациентов с клиникой пятнистой лихорадки Скалистых гор в США: в Техасе и Северной Каролине [14]. Эта риккетсия также является ответственной за случаи острого церебрального васкулита в Северной Америке [15, 16].

В связи с этим можно предположить, что *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* может оказаться патогеном и быть ответственным за случаи инфекций с клинической картиной, не типичной для известных клещевых инфекций, которые регистрируют в ареале клещей *I. persulcatus*. По данным ИФА, у больных с клиникой клещевого риккетсиоза (КР) из эндемичных территорий Алтайского края IgM-антитела к *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* выявлены у 10,8 ± 3,8% больных, IgG-антитела – в 4,6% случаев. IgM антитела к *Rickettsia tarasevichiae* выявлены у лихорадящих больных после присасывания иксодовых клещей и на севере Омской области, не эндемичном по КР, но на территориях которого доказана инфицированность таежных клещей этой риккетсией [17].

К указанным данным о возможности инфицирования населения Сибири *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* следует добавить данные китайских исследователей [12]. Ими при обследовании в 2012 г. в северо-восточной провинции Mudanjiang 251 пациента, находящегося на стационарном лечении после присасывания иксодовых клещей, выявлена ДНК *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* при ПЦР-секвенировании проб биологического материала (кровь, кожные биоптаты) от пяти человек (в том числе в одном случае при летальном исходе с неясной причиной).

С использованием культуры клеток Vero впервые изолированы штаммы *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, изучены особенности их культивирования, описаны ее фенотипические и генотипические характеристики [18].

К настоящему времени описано еще как минимум два представителя группы предшественников, близкородственные *R. canadensis* (и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*) – *Rickettsia monteiroi* sp. nov. и *Candidatus «Rickettsia kingi»* [19, 20].

Rickettsia monteiroi sp. nov. изолирована на культуре клеток Vero из клещей *Amblyomma incisum*, собранных с расти-

тельности в штате Сан-Паулу в Бразилии в 2004–2006 гг. С помощью ПЦР получены фрагменты длиной 1089 (ген *gltA*), 457 (ген 17 кДа белка, *htrA*), 1362 (ген 16 S рибосомальной РНК, *rrs*), 443 нуклеотидов (ген белка-автотранспортера, *sca 1*), продукта к гену поверхностного мембранного белка 190 кДа (*ompA*) не получено. Молекулярно-биологический анализ фрагментов генов показал, что по фрагменту гена *gltA* наибольшая гомология (96,1%) отмечена с *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, далее – с *R. canadensis* (95,8%). По фрагменту гена 16 S рибосомальной РНК наибольшее сходство (99,1%) отмечено с *Rickettsia bellii*, по генам *htrA* и *sca 1* – с *R. canadensis* (89,8 и 95,2% соответственно), указанные фрагменты у *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* не были описаны. Авторами показано отсутствие выраженных перекрестных реакций с *Rickettsia bellii*, *Rickettsia monteiroi*, *R. rickettsii* и *R. canadensis* в опытах с сыворотками крови инфицированных соответствующими видами риккетсий морских свинок. Авторы относят описанный ими новый вид *Rickettsia monteiroi* sp. nov. к группе «*canadensis*» вместе с *R. canadensis* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* [19].

Candidatus «Rickettsia kingi» была выявлена в клещах *Ixodes kingi*, снятых с *Thomomys talpoides* в Saskatchewan (Канада) в 2011 г. с помощью ПЦР-секвенирования, без изоляции риккетсии [20]. Наибольшая гомология установлена по гену *ompA* с *Rickettsia* sp. H820 (у *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* фрагменты этого гена описаны не были) – 94,5%, по гену *gltA* – с *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* (99,1%), по гену белка 17 кДа – с *R. canadensis* (94,9%), по гену 16 S рибосомальной РНК – с риккетсиальным эндосимбионтом каменного жука, *Coccotrypes dactyliperda* (99,3%), с риккетсиями группы КПЛ – 99,1–98,9%, *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* – 98,8% и с *R. canadensis* – 98,4%. По данным авторов, *Candidatus «Rickettsia kingi»* не принадлежит к группам КПЛ и сыпного тифа и образует сестринский таксон по отношению к *R. canadensis* и *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. Из риккетсий этой группы фрагменты гена *ompA* выявлены у *R. canadensis*, *Rickettsia* sp. H820 (относится к *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*), *Candidatus «Rickettsia kingi»*, не выявлены у *Rickettsia monteiroi*. Требуется более подробное молекулярно-биологическое описание *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* на штаммах по всем генам, использованным для описания других близкородственных риккетсий.

Вместе с тем, предковая группа, с учетом эволюционного родства риккетсий и предка митохондрий эукариотических клеток (митохондриона) представляет с позиций эволюции наибольший интерес. Симбиотическая теория происхождения митохондрий и других органелл стала классикой современной биологии. Биологическая роль бактерий-эндосимбионтов становится более определенной с учетом результатов генетических исследований, свидетельствующих об эволюционном родстве риккетсий и митохондрий эукариотов, наличии у них общего предка – внутриклеточного эндосимбионта [21, 22]. Приобретение предшественником эукариотической клетки бактериального (риккетсиального) эндосимбионта, давшего начало митохондриям, сыграло определяющую роль в развитии эукариотического мира. Одновременно с этим эволюционировали и прокариоты-эндосимбионты. Многочисленные данные указывают, что таксономический

источник происхождения митохондрий – порядок *Rickettsiales* [23].

В последние годы описаны новые представители *Rickettsiales* – микроорганизмы родов *Pelagibacter* и *Midichloria*, которые могут пролить свет на более ранние этапы эволюции риккетсий и других альфа-протеобактерий.

Midichloria впервые описана в 2004 г. как IricES1, симбионт клещей *Ixodes ricinus* [24]. Эндосимбионты клеток яичников самок этих клещей, в отличие от известных внутриклеточных микроорганизмов, паразитируют в митохондриях. Описан один вид – *Midichloria mitochondrii*, хотя при молекулярном скрининге обнаружены родственные бактерии в других видах клещей, а также в других кровососущих членистоногих.

Геном размером 1.2 Мб, очень похожий на геномы других представителей *Rickettsiales*, с двумя примечательными исключениями: геном *Midichloria mitochondrii* содержит гены для синтеза жгутика и цитохромоксидазы *cbb3* типа. Секвенирование генома *Midichloria mitochondrii* позволило осуществить обновленную реконструкцию свободноживущего митохондриального предка. Это была подвижная бактерия, способная выжить в условиях микроаэрофилии. Обе эти характеристики сыграли важную роль в начале симбиоза между эукариотической клеткой и митохондрией.

Pelagibacter ubique, единственный представитель рода *Pelagibacter* – альфа-протеобактерий порядка *Rickettsiales* по некоторым оценкам – самая многочисленная бактерия в мире. Относится к числу альфа-протеобактерий клада SAR11. Изначально была обнаружена молекулярно-биологическими методами в пробах воды Саргассова моря в 1990 г. Эта океаническая бактерия получила название *Pelagibacter*; распространена по всему Земному шару, обнаруживается в бактериопланктоне. С диаметром клетки около 0,12–0,20 нм она является одним из мельчайших известных одноклеточных самореплицирующихся организмов [25, 26].

Использование метода молекулярных часов позволило оценить дивергенцию различных групп порядка *Rickettsiales*. Общий предок был, предположительно, свободно живущим, как самый ранний дивергировавший род порядка *Pelagibacter*. Около 525–775 миллионов лет назад осуществлен переход к жизни внутри клеток, а затем разделение на эндосимбионтов протистов (*Holospira*) и клады, которые в первую очередь поражают членистоногих [27].

По результатам молекулярных исследований геномов митохондриальная ветвь была помещена в *Rickettsiales* как сестринская ветвь к семействам *Anaplasmataceae* и *Rickettsiaceae*; *Pelagibacter* предшествует разделению указанных ветвей. Гены *Pelagibacter* могут служить в качестве полезных дополнений в дальнейших эволюционных исследованиях митохондриальных генов, в том числе тех, которые перенесены в эукариотическое ядро [28].

Заключение

В последние годы существенно расширились представления о риккетсиях группы предшественников. Нами впервые изучена представительница этой группы *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*, описаны ее фенотипические и генотипические характеристики, выделен ряд штаммов этой новой риккетсии.

В целом, изучение *Candidatus Rickettsia tarasevichiae* и близкородственных риккетсий «предковой» группы находится на начальном этапе. Проблемы с изоляцией и накоплением этих риккетсий на культурах эукариотических клеток обусловило их преимущественное изучение на первичных пробах ДНК из клещей, что делает сложным полноценное описание их фенотипических и генотипических характеристик. Описанные новые виды (кандидаты в новые виды) риккетсий предковой группы не сопоставлены по одним и тем же критериям и генам. С учетом их существенных отличий от риккетсий групп СТ и КПЛ необходима разработка более совершенных критериев их геносистематики.

Их изучение будет способствовать более полному изучению эволюции порядка *Rickettsiales*, включая ее митохондриальную ветвь, имеющую существенное значение для изучения эволюции живой природы в целом.

Литература

- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to the diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2715-27.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1043-7.
- Fournier P.-E, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5456-65.
- Raoult D, Fournier P.-E, Ereemeeva M, Graves S, Kelly PJ, Oteo JA, et al. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 063:1-12.
- Stochard DR, Fuerst PA. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of Rickettsia using 16S rRNA gene sequences. *Syst Appl Microbiol.* 1995; 18:798-804.
- Fuxelius H.-H, Darby A, Min CK, Cho NH, Andersson SG. The genomic and metabolic diversity of Rickettsia. *Res Microbiol.* 2007;158(10):745-53
- Gillespie JJ, Beier MS, Sayeedur RM, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: In-sight from *Rickettsia felis*. *PLoS One.* 2007;2(3):e266.
- Shpynov S, Fournier PE, Rudakov N, Raoult D. "Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*" in *Ixodes persulcatus* ticks collected in Russia. *Ann NY Acad Sci.* 2003;990 (June):162-72.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):694-7.
- Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *Int J Syst Bacteriol.* 1998;48:839-49.
- Микрюкова ТП, Карташов МЮ, Протопопова ЕВ, Коновалова ЮВ, Тупота НЛ, Чаусов ЕВ, и др. Генетические варианты риккетсий группы клещевой пятнистой лихорадки из различных эпидемически активных очагов. IV Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням. М., 2012.
- Jia N, Zheng YC, Yiang JF, Ma L, Cao WC. Human infection with Candidatus *Rickettsia tarasevichiae*. *N Engl J Med.* 2013;369:1178-80.
- McKiel JA, Bell EJ, Lackman DB. *Rickettsia canada*: a new member of the typhus group of rickettsiae isolated from *Haemaphysalis leporispolustris* ticks in Canada. *Can J Microbiol.* 1967;13:503-10.
- Bozeman FM, Elisberg BL, Humphries JW, Runcik K, Palmer Jr. DB. Serologic evidence of *Rickettsia canada* infection of man. *J Infect Dis.* 1970;121:367-71.
- Wenzel RP, Hayden FG, Gröschel DHM, Salata RA, Young WS, Greenlee JE, et al. Acute febrile cerebrovasculitis: a syndrome of unknown, perhaps rickettsial, cause. *Ann Intern Med.* 1986;104:606-15.
- Hechemy KE, Fox JA, Groschel DH, Hayden FG, Wenzel RP. Immunoblot studies to analyze antibody to the *Rickettsia typhi* group antigen in sera from patients with acute febrile cerebrovasculitis. *J Clin Microbiol.* 1991; 29(11):2559-65.
- Абрамова НВ, Рудаков НВ, Пеньевская НА, Седых НН, Кумпан ЛВ, Самойленко ИЕ, и др. Апробация иммуноферментного анализа для серологической диагностики инфекций, вызываемых риккетсиями группы клещевой пятнистой лихорадки. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2010; 1(50):17-22.
- Рудаков НВ, Шпынов СН, Самойленко ИЕ, Кумпан ЛВ, Коломеец АН, Абрамова НВ, и др. Актуальные аспекты изучения *Candidatus Rickettsia tarasevichiae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2015;6:14-9.
- Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabo MP, Catroxo MH, et al. *Rickettsia monteiroi* sp. nov. infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77:5207-11.
- Anstead CA, Chilton NB. Detection of a novel *Rickettsia* (*Alphaproteobacteria: Rickettsiales*) in rotund ticks (*Ixodes kingi*) from Saskatchewan, Canada. *Ticks Tick Borne Dis.* 2013;4:202-6.
- Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. *J Bacteriol.* 1994;176:1-6.
- Емельянов ВВ. Эволюционное родство риккетсий и митохондрий эукариота. *Вестник ПамН.* 2000;3:3-7.
- Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, Carini P, Yoder RJ, et al. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR 11 clade. *Sci Rep.* 2011;1(13). DOI: 10.103/ srep00013.
- Beninati T, Lo N, Sacchi L, Genchi C, Noda H, Bandi C. A novel alpha-proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):2596-602.
- Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade». *Nature.* 2002;418:630-3.
- Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. *Nature.* 2002;420:806-10.
- Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biology.* 2009;7(6). doi: 10.1186/1741-7007-7-6.
- Williams KP, Sorbal BW, Dickerman AW. A robust species tree for the alphaproteobacteria. *Journal of Bacteriology.* 2007;13(189):4578-86.

References

- La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to the diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997; 35:2715-27.
- Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PA, Kämpfer P, Maiden MC, et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52:1043-7.
- Fournier P.-E, Dumler JS, Greub G, Zhang J, Wu Y, Raoult D. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New Rickettsia Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5456-65.
- Raoult D, Fournier P.-E, Ereemeeva M, Graves S, Kelly PJ, Oteo JA, et al. Naming of rickettsiae and rickettsial diseases. *Ann NY Acad Sci.* 2005; 063:1-12.
- Stochard DR, Fuerst PA. Evolutionary analysis of spotted fever and typhus groups of Rickettsia using 16S rRNA gene sequences. *Syst Appl Microbiol.* 1995; 18:798-804.
- Fuxelius H.-H, Darby A, Min CK, Cho NH, Andersson SG. The genomic and metabolic diversity of Rickettsia. *Res Microbiol.* 2007;158(10):745-53
- Gillespie JJ, Beier MS, Sayeedur RM, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: In-sight from *Rickettsia felis*. *PLoS One.* 2007;2(3):e266.

8. Shpynov S, Fournier PE, Rudakov N, Raoult D. "Candidatus Rickettsia tarasevichiae" in Ixodes persulcatus ticks collected in Russia. Ann NY Acad Sci. 2003;990 (June):162-72.
9. Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin Microbiol Rev. 1997;10(4):694-7.
10. Fournier PE, Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. Int J Syst Bacteriol. 1998;48:839-49.
11. Mikryukova TP, Kartashov MYu, Protopopova EV, Konovalova YuV, Tupota NL, Chausov EV, et al. Geneticheskie varianty rickettsii gruppy kleshchevoi pyatnistoi likhoradki iz razlichnykh epidemicheskii aktivnykh ochagov. Proceedings of 4th Annual Congress on infectious diseases. Moscow, 2012. (In Russian).
12. Jia N, Zheng YC, Yang JF, Ma L, Cao WC. Human infection with Candidatus Rickettsia tarasevichiae. N Engl J Med. 2013;369:1178-80.
13. McKiel JA, Bell EJ, Lackman DB. Rickettsia canada: a new member of the typhus group of rickettsiae isolated from Haemaphysalis leporispolustris ticks in Canada. Can J Microbiol. 1967;13:503-10.
14. Bozeman FM, Elisberg BL, Humphries JW, Runcik K, Palmer Jr. DB. Serologic evidence of Rickettsia canada infection of man. J Infect Dis. 1970;121:367-71.
15. Wenzel RP, Hayden FG, Gröschel DHM, Salata RA, Young WS, Greenlee JE, et al. Acute febrile cerebrovasculitis: a syndrome of unknown, perhaps rickettsial, cause. Ann Intern Med. 1986;104:606-15.
16. Hechemy KE, Fox JA, Groschel DH, Hayden FG, Wenzel RP. Immunoblot studies to analyze antibody to the Rickettsia typhi group antigen in sera from patients with acute febrile cerebrovasculitis. J Clin Microbiol. 1991;29(11):2559-65.
17. Abramova NV, Rudakov NV, Penyevskaya NA, Sedih NN, Kumpan LV, Samoylenko IE, et al. Approbation of enzyme-linked immunosorbent assay for serologic diagnostics of the infections caused spotted fever group Rickettsiae. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2010;1(50):17-22. (In Russian).
18. Rudakov NV, Shpynov SN, Samoylenko IE, Kumpan LV, Kolomeets AN, Abramova NV, et al. Actual aspects of studying Candidatus Rickettsia tarasevichiae. Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items. 2015;6:14-9. (In Russian).
19. Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabo MP, Catroxo MH, et al. Rickettsia monteiroi sp. nov. infecting the tick Amblyomma incisum in Brazil. Appl Environ Microbiol. 2011;77:5207-11.
20. Anstead CA, Chilton NB. Detection of a novel Rickettsia (Alphaproteobacteria: Rickettsiales) in rotund ticks (Ixodes kingi) from Saskatchewan, Canada. Ticks Tick Borne Dis. 2013;4:202-6.
21. Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The winds of (evolutionary) change: Breathing new life into microbiology. J Bacteriol. 1994;176:1-6.
22. Emel'yanov VV. Evolyutsionnoe rodstvo rickettsii i mitokondrii eukariota. Annals of the Russian academy of medical sciences. 2000;3:3-7. (In Russian).
23. Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, Carini P, Yoder RJ, et al. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR 11 clade. Sci Rep. 2011;1(13). DOI: 10.1038/srep00013.
24. Beninati T, Lo N, Sacchi L, Genchi C, Noda H, Bandi C. A novel alpha-proteobacterium resides in the mitochondria of ovarian cells of the tick Ixodes ricinus. Appl Environ Microbiol. 2004;70(5):2596-602.
25. Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Giovannoni SJ. Cultivation of the ubiquitous SAR11 marine bacterioplankton clade. Nature. 2002;418:630-3.
26. Morris RM, Rappé MS, Connon SA, Vergin KL, Siebold WA, Carlson CA, et al. SAR11 clade dominates ocean surface bacterioplankton communities. Nature. 2002;420:806-10.
27. Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. BMC Biology. 2009;7(6). doi: 10.1186/1741-7007-7-6.
28. Williams KP, Sorbal BW, Dickerman AW. A robust species tree for the alphaproteobacteria. Journal of Bacteriology. 2007;13(189):4578-86.

Издательство «Династия»

выпускает научно-практический журнал Национальной ассоциации диетологов и нутрициологов
«Вопросы диетологии»

Главный редактор

член-корреспондент РАН, профессор **Б.С.Каганов**
Председатель Национальной Ассоциации диетологов и нутрициологов

Заместители главного редактора

член-корреспондент РАН, профессор **Д.Б.Никитюк**
директор ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи

член-корреспондент РАН, профессор **И.В.Медведева**
ректор Тюменской государственной медицинской академии

профессор **Х.Х.Шарафетдинов**
заведующий отделением болезней обмена веществ ФИЦ питания, биотехнологии и безопасности пищи

Журнал ориентирован на широкую аудиторию специалистов в области здравоохранения – диетологов, нутрициологов, терапевтов, педиатров, семейных врачей, гастроэнтерологов, кардиологов, эндокринологов, реаниматологов, гигиенистов, реабилитологов, спортивных врачей, организаторов здравоохранения, преподавателей ВУЗов и научных работников.

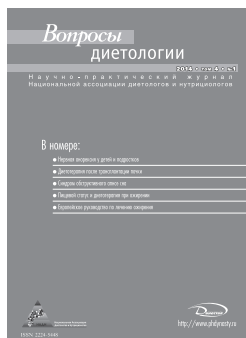
В журнале публикуются оригинальные статьи, обзоры, лекции, клинические наблюдения, посвященные современным аспектам клинической диетологии – здоровому, лечебному и профилактическому питанию, рациональной модификации рационов для различных групп населения (лиц, занимающихся спортом и профессиональных спортсменов, пожилых людей и др.), организации питания в стационарах, нутритивной поддержке лиц, находящихся в критическом состоянии.

Журнал индексируется в Ulrich's Periodicals Directory и в Российском индексе научного цитирования.
Журнал включен в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, Издательство «Династия». тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: red@mm-agency.ru

По вопросам подписки обращаться: тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: podpiska@mm-agency.ru

Отдел рекламы: тел.: (495) 517-7055, тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: reklama@mm-agency.ru



www.phdynasty.ru

Антимикробная активность нейтрального анолита в сравнении с другими дезинфектантами и разработка экспресс-метода ее тестирования

И.Х.Маматкулов, М.С.Мадаминов

Научно-исследовательский институт эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний, Ташкент, Республика Узбекистан

Работа посвящена созданию методики определения вирулицидной активности дезинфекционных средств в отношении вируса гепатита В на основе тестирования HBsAg с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Показана высокая активность нейтрального анолита в отношении вируса гепатита В (HBsAg), возбудителей внутрибольничных инфекций и шигеллезов *in vitro*. Сделан вывод о том, что для дезинфекции в очагах и для профилактики вирусного гепатита В и бактериальных инфекций необходимо использовать электрохимически активированные растворы (ЭХАР (НА, гипохлорид натрия, АНК)) и жавелион, нецелесообразно применение септабика и полисепта, так как они недостаточно активны и в водных растворах могут образовывать аммиак.

Ключевые слова: вирус гепатита В, возбудители внутрибольничных инфекций, шигеллезы, дезинфицирующие средства

Для цитирования: Маматкулов И.Х., Мадаминов М.С. Антимикробная активность нейтрального анолита в сравнении с другими дезинфектантами и разработка экспресс-метода ее тестирования. Бактериология. 2016; 1(1): 37–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-37-41

Antimicrobial activity of neutral anolyte vs some other disinfectants; developing an express-assay to assess it

I.Kh.Mamatkulov, M.S.Madaminov

Research Institute of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases, Tashkent, Republic of Uzbekistan

The research deals with developing a method to assess virulicidal activity of disinfectants against hepatitis B virus by testing HBsAg in IFA. Neutral anolyte was shown to be active against HBsAg, nosocomial causative agents and *Shigella in vitro*. It has been concluded that to disinfect loci as well as to prevent virus-associated hepatitis B and bacterial infections ECHAS (NA, sodium hypochloride, etc.) and JAVELION should be used while formulations such as SEPTABIK and POLYSEPT are of low value because of their low activity and ability to produce ammonia in aqua solutions.

Key words: hepatitis B virus, nosocomial causative agents, shigella infection, disinfectants

For citation: Mamatkulov I.Kh., Madaminov M.S. Antimicrobial activity of neutral anolyte vs some other disinfectants; developing an express-assay to assess it. Bacteriology. 2016; 1(1): 37–41. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-37-41

Одна из наиболее актуальных проблем современной медицинской науки и практического здравоохранения – профилактика внутрибольничных инфекций. Их возбудителями служат в основном условно-патогенные микроорганизмы, полирезистентные к антибиотикам и устойчивые к традиционным дезинфектантам, и вирусы. Этим свойствам возбудителей внутрибольничных инфекций уделяется недостаточное внимание, что часто приводит к формирова-

нию госпитальных штаммов [1–3]. Высокая частота внутрибольничных инфекций обуславливает необходимость повышения эффективности деконтаминации объектов внешней среды стационара, надежной стерилизации хирургического инструментария, шовного и перевязочного материала, антимикробной обработки рук и зева персонала. Однако имеющиеся средства не всегда позволяют достичь желаемого результата, зачастую они дороги, неудобны в обращении и

Для корреспонденции:

Маматкулов Ибрагим Хамидович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией бруцеллёза, руководитель инновационного проекта Научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний

Адрес: 100133, Ташкент, Учтепинский район, ул. Заковат, 2
Телефон: (0371) 243-4401
E-mail: bibinor@list.ru

Статья поступила 10.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Ibrahim K. Mamatkulov, Sc.D. (Med.), Head of the Laboratory of brucellosis, Head of the innovative project of the Research Institute of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases of Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan

Address: 2, Zakovat Str., Uchtepinsky distr., Tashkent, 100133, Republic of Uzbekistan
Phone: (0371) 243-4401
E-mail: bibinor@list.ru

The article was received 10.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

не обладают достаточно широким спектром антимикробного действия. Кроме того, практически все они импортного производства. Вместе с тем отсутствуют доступные средства скрининга активности дезинфекционных средств, что существенно снижает эффективность проводимых профилактических мероприятий [4, 5].

Поэтому поиск новых доступных и достаточно эффективных дезинфекционных препаратов и разработка методов их контроля являются весьма актуальными. В свете сказанного весьма перспективным представляется применение электрохимически активированных растворов (ЭХАР), получаемых на отечественных установках типа «СТЭЛ». Бактерицидные свойства нейтрального анолита (НА) и его влияние на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы описаны рядом исследователей. Имеются сообщения о выраженном действии ЭХАР на все группы патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), включая микобактерии туберкулеза, а также на вирусы гепатита и ВИЧ. Однако сведения об активности НА в отношении гепатита В и других возбудителей недостаточны и противоречивы, что и обусловило целесообразность выполнения настоящего исследования [5].

Целью работы явились изучение дезинфекционной активности НА в отношении вируса гепатита В и возбудителей ОКЗ в сравнении с другими дезинфектантами и разработка эффективных методов их контроля.

Известно, что многие инфекционные агенты, и в первую очередь госпитальные штаммы микроорганизмов, характеризуются полирезистентностью к антибиотикам и устойчивостью ко многим широко применяемым антисептикам и дезинфицирующим средствам. Поэтому используемые в медицинских учреждениях традиционные пути профилактики раневых инфекций в настоящее время либо трудно выполнимы, либо малоэффективны. Учитывая эти свойства госпитальных культур, необходимо систематически тестировать уровень бактерицидной активности используемых в стационаре антимикробных агентов, чтобы вовремя выводить из употребления средства, утратившие свою активность, и внедрять новые и достаточно действенные препараты. Перспективным в этом направлении представляется применение ЭХАР, в частности НА, вырабатываемого на отечественной установке «СТЭЛ-1». Выбор нами этого агента среди других ЭХАР обусловлен следующими аргументами: НА, наряду с высокой антимикробной активностью, не оказывает раздражающего воздействия на слизистые оболочки, не лизирует эритроциты, доступен и дешев. Он представляет собой бесцветную прозрачную жидкость с легким запахом хлора, содержит высокоактивные кислородные соединения хлора, свободные радикалы, озон, которые и придают ему антимикробные и моющие свойства. Получаемый с помощью вышеуказанной установки НА оценивается по концентрации активного хлора, в исходном растворе препарата она составляет 350 ± 50 мг/л, при этом его рН равен $6,0 \pm 1,0$, а ОВП – 700 ± 100 мВ. Нами проведено изучение антимикробной активности НА в сравнении с другими антимикробными препаратами в отношении основных представителей гноеродной микрофлоры и в отношении HBsAg в опытах *in vitro*.

Изучение антибактериальной активности НА

В таблице 1 представлены результаты изучения антимикробной активности НА в сравнении с другими антимикробными средствами, используемыми в практических условиях. Как видно из этой таблицы, НА существенно превосходил все другие испытанные антимикробные препараты. Так, фурацилин (1 : 5000) в отношении данных тест-культур был практически неактивен, как и использованный в качестве контроля физиологический раствор. Растворы H_2O_2 (3%), хлоргексидина и диоксида были более активны, но проявляли антимикробное действие лишь при значительной экспозиции (30 мин и более), и лишь НА практически незамедлительно (экспозиция не более 5 мин) оказывал свою бактерицидную активность против всех испытанных микроорганизмов.

В таблице 2 даны результаты изучения воздействия НА на гноеродные микроорганизмы.

Из таблицы следует, что аэробные микроорганизмы, как грамотрицательные, так и грамположительные, быстро погибают при содержании активного хлора 50 мг/л (экспозиция 1–5 мин), что позволяет разводить исходный раствор до 8 раз с сохранением его активности. Разведенный в 16 и 32 раза раствор НА (25 и 12,5 мг/л активного хлора) для проявления своего бактерицидного действия требовал увеличения экспозиции до 1 и 3 ч соответственно. В отношении *Candida albicans* экспозиция 3 ч была эффективной только при концентрации активного хлора не ниже 25 мг/л. Анаэробные бактерии (*Bacteroides fragilis*) оказались более чувствительны к активному хлору. Разведение исходного раствора в 16 раз (25 мг/л активного хлора) давало быстрый антимикробный эффект, а разведение в 32 раза требовало часовой экспозиции. При понижении концентрации активного хлора ниже 6 мг/л раствор не подавлял микробного роста.

Действие дезинфектанта «Септабик» и хлорамина на возбудителей шигеллезов

Одним из наиболее эффективных противоэпидемических мероприятий на сегодняшний день остается дезинфекция. В настоящее время, кроме традиционных дезинфекционных средств, выбор препаратов для дезинфекции пополнился зарубежной продукцией. Учитывая, что происходит изменение биологических свойств возбудителей инфекционных заболеваний, формируются полирезистентные, госпитальные штаммы. Мы считаем целесообразным изучение импортных дезинфекционных средств в условиях каждого конкретного

Таблица 1. Результаты изучения антимикробной активности нейтрального анолита в сравнении с другими антисептиками

Раствор	Микроорганизмы								
	<i>S. aureus</i>			<i>E. coli</i>			<i>Ps. aeruginosa</i>		
	Экспозиция, мин			Экспозиция, мин			Экспозиция, мин		
	5	30	60	5	30	60	5	30	60
НА	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Фурацилин	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H_2O_2	+	–	–	+	–	–	+	–	–
Хлоргексидин	+	–	–	+	–	–	+	–	–
Диоксидин	+	–	–	+	–	–	+	–	–
Физ. раствор	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Условные обозначения: + наличие микробного роста; – отсутствие микробного роста.

Таблица 2. Влияние нейтрального анолита на клинические штаммы некоторых условно-патогенных микроорганизмов

Микроорганизмы	Экспозиция	Кратность разведения нейтрального анолита/концентрация активного хлора (мг/л)							
		Исх/400	2/200	4/100	8/50	16/25	32/12,5	64/6	128/3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>Escherichia coli</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>S. epidermidis</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>Streptococcus faecalis</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
<i>Candida albicans</i>	5 мин	0	0	0	0	+	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	+	+	+
<i>Bacteroides fragilis</i>	5 мин	0	0	0	0	0	+	+	+
	1 ч	0	0	0	0	0	0	+	+
	3 ч	0	0	0	0	0	0	0	+

Условные обозначения: + наличие микробного роста; 0 – отсутствие микробного роста.

Таблица 3. Антимикробная активность септабика и хлорамина в отношении клинических штаммов шигелл (n = 23)

Дезинфектант	Экспозиция, сутки			
	1-е	3-е	5-е	7-е
	Количество чувствительных культур, %			
Септабик, 0,1%	0	0	0	0
Хлорамин	100	100	100	100

региона, имеющего свои климатогеографические, эпидемиологические и другие особенности. Нами изучена эффективность нового зарубежного дезинфектанта «Септабик» в отношении 23 штаммов шигелл Григорьева-Шига, выделенных из кала больных тяжелыми формами бактериальной дизентерии.

Исследование проводили классическим бактериологическим методом «батистовых тест-объектов». Использовали дезинфектант Септабик в рекомендуемой концентрации – 0,1% раствор. Для контроля использовали раствор хлорамина с содержанием активного хлора 26–28%. Учет результатов проводили, начиная с 24–48 ч инкубации при 37°C. Окончательные бактериоцидные (не бактериостатические) результаты дезинфектанта устанавливали на 7-е сутки, что указано в таблице 3.

Полученные данные (см. табл. 3) показывают, что в рекомендуемой концентрации дезинфектант «Септабик» неэффективен в отношении всех изученных штаммов шигелл дизентерии 1 (Григорьева-Шига) и не может быть использован в очаге дизентерии, обусловленном данным сероваром.

Разработка экспресс-метода определения вирулицидной активности дезинфектантов и оценка его эффективности

Актуальность проблемы вирусных гепатитов обуславливается, наряду с другими факторами, еще и тем, что среди регистрируемых нозологических форм болезни увеличивается число внутрибольничных гепатитов В и С. Вместе с тем трудоемкость вирусологических исследований препятствует

изучению действия на вирусы различных противовирусных препаратов, химических веществ и дезинфектантов.

Развитие рыночных отношений вызвало наплыв в Республику Узбекистан огромного количества различных противовирусных препаратов и дезинфектантов. Их эффективность оценивается по рекламным материалам или прилагаемым инструкциям. Известно, что климатогеографические условия значительно влияют на биологические свойства возбудителей инфекционных заболеваний. Это положение должно учитываться странами – как изготовителями антибактериальных и противовирусных препаратов, так и их потребителями, т.е. эффективность этих средств должна изучаться на возбудителях инфекционных заболеваний того региона, куда экспортируются эти препараты.

Антимикробную эффективность дезинфектантов традиционно определяют бактериологическим методом. Этот классический способ незаменим, однако трудоемок и длителен. Мы попытались устранить эти недостатки, учитывая то, что HBsAg – частица вируса гепатита В – в различной степени может инактивироваться химически активными веществами, и это можно достаточно легко определить с помощью метода иммуноферментного анализа (ИФА). Нами разработаны критерии эффективности дезинфектантов на основе использования вышеназванного метода. При этом мы приняли HBsAg в качестве косвенного показателя персистенции вируса гепатита В, подобно тому, как по наличию HBsAg в сыворотке крови человека судим о присутствии инфекционного начала, т.е. вируса гепатита В.

В исследовании использованы отечественные ЭХАР (НА, АНК (анолит + католит), гипохлорид натрия) и ряд зарубежных дезинфектантов (септабик, жавелион, полисепт). Инактивацию HBsAg определяли методом ИФА. Из дезинфектантов готовили разведение: 6-, 3-, 2-, 1-, 0,5-, 0,2-, 0,1- и 0,05%-ные растворы (1–8 лунки). ЭХАР не разводили, и они содержали в своем составе 350 мг/л активного хлора, соответствующего 0,15%-ному раствору. Для экспозиции были выбраны два режима: 15 и 30 минут, что соответствует на

Таблица 4. Вирулицидная активность ЭХАР и некоторых других дезинфектантов в отношении HBsAg при использовании метода ИФА

Дезинфектант	Разведение, %	Экспозиция, мин	
		15	30
Наличие вирулицидной активности			
НА	0,15	+	+
НКА	0,15	+	+
Гипохлорид натрия	0,15	+	+
Септабик	6	+	+
	3	+	+
	2	+	+
	1	+	+
	0,5	–	+
	0,2	–	+
	0,1	–	–
Жавелион	0,05	–	–
	6	+	+
	3	+	+
	2	+	+
	1	+	+
	0,5	–	+
	0,2	–	+
Полисепт	0,1	–	+
	0,05	–	–
	6	+	+
	3	+	+
	2	–	–
	1	–	–
	0,5	–	–
Физиологический раствор	0,2	–	–
	0,1	–	–
	0,05	–	–
	100	–	–

Условные обозначения: + наличие вирулицидной активности; – отсутствие вирулицидной активности.

тест-системе ИФА ряду лунок АВ, CD, EF, нейтральный анолит – GH. В контроле вместо дезинфектанта использовали физиологический раствор (ряд С, лунки 10, 11, 12).

Результаты исследования (табл. 4) показали, что для инактивации HBsAg при 15-минутной экспозиции септабиком и жавелионом необходима концентрация 1%-ного раствора, а при 30-минутной – 0,2%-ного септабика и 0,1%-ного жавелиона. Иначе вел себя полисепт, который инактивировал HBsAg в обоих режимах экспозиции только в 3%-ном растворе.

Во всех пробах наблюдений с тремя видами ЭХАР в двух режимах экспозиции отмечалась инактивация HBsAg при концентрации активного хлора 350 ± 50 мг/л (рисунок).

При проведении исследований установлено, что предлагаемая методика проста, доступна и позволяет в течение

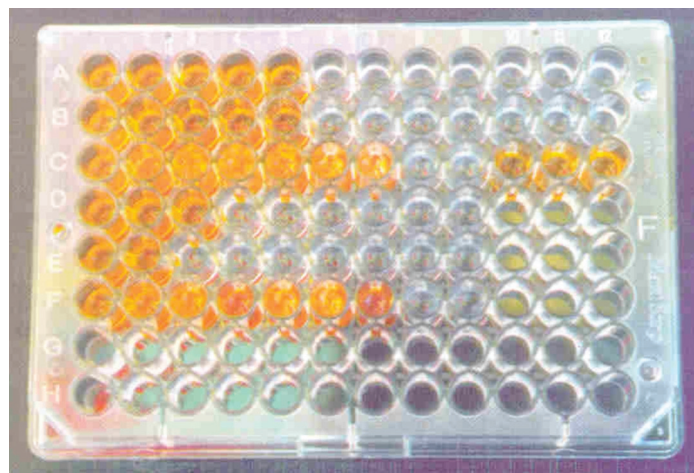


Рисунок. Оценка вирулицидной активности дезинфектантов по инактивации HBsAg методом ИФА.

2–3 ч определить вирулицидную активность дезинфицирующих средств, где индикатором может служить HBsAg.

В связи с появлением в литературе сведений о действии дезинфектантов нового поколения ЭХАР на всю группу патогенных и УПМ, включая микобактерии туберкулеза, а также на вирусы гепатита и ВИЧ, нами изучены количественные характеристики вирулицидных свойств НА и хлорамина на коммерческий HBsAg методом иммунорадиометрического анализа (ИРМА). Использованы 1%, 3% и 5% растворы хлорамина и НА. Контролем служил физиологический раствор. Соотношение испытуемых дезинфектантов и физиологического раствора составило 1 : 1. Время экспозиции при воздействии дезинфекционных средств на HBsAg колебалось от 3 мин до 5 ч. Нижней границей учета положительных результатов наличия HBsAg считали концентрацию 915 имп/сек.

Полученные данные представлены в таблицах 5 и 6.

Как видно из таблиц 5 и 6, НА обладает более выраженными вирулицидными свойствами, чем растворы хлорамина. В 3% или 5% растворе хлорамина HBsAg инактивируется через 180 мин, а в НА – через 10–15 мин, т.е. в 15–12 раз быстрее. Однако мы рекомендуем выдерживать экспозицию 30 мин, в результате которой концентрация HBsAg снижается до минимума.

Следует отметить, что используемые для дезинфекции химические вещества, как правило, одинаково вредны как для микробных, так и для соматических клеток человека. В отличие от них ЭХАР, получаемые на установках «СТЭЛ»,

Таблица 5. Действие 1%, 3%, 5% раствора хлорамина на HBsAg (имп/с)

Испытуемый раствор	Время экспозиции, мин				
	30	60	120	180	240
Физиологический раствор	1418 ± 56	1420 ± 66	1414 ± 48	1420 ± 54	1415 ± 62
Раствор хлорамина:					
1%	1410 ± 65	1394 ± 72	1188 ± 51	986 ± 38	878 ± 44
3%	1350 ± 51	1287 ± 64	985 ± 44	835 ± 39	765 ± 32
5%	1157 ± 78	1060 ± 52	945 ± 36	772 ± 32	689 ± 27

Таблица 6. Действие нейтрального анолита на HBsAg (имп/с)

Раствор	Время экспозиции, мин										
	3	5	10	15	20	30	60	120	180	240	300
Нейтральный анолит	928 ± 62	920 ± 83	897 ± 20	607 ± 18	315 ± 16	300 ± 21	302 ± 11	300 ± 11	301 ± 14	300 ± 10	301 ± 12

экологически безопасны. Производительность установки – 40 л/ч, для получения такого количества раствора НА расходуется не более 300 г поваренной соли. Кроме того, при его использовании отпадает необходимость в приготовлении маточных и осветленных растворов, как при применении хлорамина.

Из полученных результатов следует, что для дезинфекции в очагах бактериальных инфекций необходимо использовать ЭХАР (НА, гипохлорид натрия, АНК) и жавелион. Нецелесообразно применение септабика и полисепта, так как они недостаточно активны и в водных растворах могут образовывать аммиак. ЭХАР – НА, АНК гипохлорид натрия эффективны также и в профилактике внутрибольничного заражения гепатитом В.

Предлагаемая методика тестирования вирулицидной активности методом ИФА позволяет за 2–3 ч определить эффективность дезинфицирующих средств, что дает возможность избежать трудоемких традиционных вирусологических исследований.

Таким образом, НА характеризуется выраженными антимикробными свойствами, охватывающими широкий спектр болезнетворных бактерий, а также грибы и вирусы. Высокая его антимикробная активность, не уступающая таковой других дезинфекционных средств, в частности, хлорамина, а также доступность этого агента и экологическая безопасность обуславливают целесообразность его широкого внедрения в медицинскую практику.

Выводы

1. Разработана методика определения вирулицидной активности дезинфекционных средств в отношении вируса гепатита В на основе тестирования HBsAg с помощью ИФА.

2. Изучена и установлена высокая активность НА в отношении вируса гепатита В (HBsAg), возбудителей внутрибольничных инфекций и шигеллезов *in vitro*.

3. Для дезинфекции в очагах и для профилактики вирусного гепатита В и бактериальных инфекций необходимо использовать ЭХАР (НА, гипохлорид натрия, АНК) и жавелион. Нецелесообразно применение септабика и полисепта, так как они недостаточно активны и в водных растворах могут образовывать аммиак.

Литература

1. Ковалева ЕП, Семина НА, Храпунова ИА, Матвеев СИ. Артифициальный механизм передачи возбудителей вирусных гепатитов. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2000;2:40-3.
2. Миртазаев ОМ, Закиров ММ, Мирзабаев ДС, Елисеева ТС. Профилактика внутрибольничного заражения вирусным гепатитом В. Инфекция, иммунитет и фармакология. 2000;3:36-9.
3. Семина НА, Ковалева ЕП, Генчиков ЛА. Эпидемиология и профилактика внутрибольничных инфекций на современном этапе. Эпидемиология и инфекционные болезни. 1997;6:4-8.
4. Маматкулов ИХ. Роль грамотрицательных бактерий в возникновении ВБИ в родовспомогательных учреждениях и совершенствование мер их профилактики. Диссертация. Ташкент, 1998.
5. Эрматов АЭ. Сравнительная оценка действия некоторых дезинфектантов на HBsAg и возбудителей бактериальных инфекций. Диссертация. Ташкент, 2006.

References

1. Kovaleva EP, Semina NA, Khrapunova IA, Matveev SI. Artifitsial'nyi mekhanizm peredachi vozbuditelei virusnykh gepatitov. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. 2000;2:40-3. (In Russian).
2. Mirtazaev OM, Zakirov MM, Mirzabaev DS, Eliseeva TS. Profilaktika vnutribol'nichnogo zarazheniya virusnym gepatitom V. Infektsiya, immunitet i farmakologiya. 2000;3:36-9. (In Russian).
3. Semina NA, Kovaleva EP, Genchikov LA. Epidemiologiya i profilaktika vnutribol'nichnykh infektsii na sovremennom etape. Epidemiologiya i infeksionnyye bolezni. 1997;6:4-8. (In Russian).
4. Mamatkulov IKh. Rol' gramotritsatel'nykh bakterii v vozniknovenii VBI v rodovspomogatel'nykh uchrezhdeniyakh i sovershenstvovanie mer ikh profilaktiki. Dissertation. Tashkent, 1998. (In Russian).
5. Ermamatov AE. Sravnitel'naya otsenka deistviya nekotorykh dezinfektantov na HBsAg i vozbuditelei bakterial'nykh infektsii. Dissertation. Tashkent, 2006. (In Russian).

Информация о соавторе:

Мадаминов Максудбек Сабурович, кандидат медицинских наук, заведующий национальной коллекции микроорганизмов Научно-исследовательского института эпидемиологии, микробиологии и инфекционных заболеваний
Адрес: 100133, Ташкент, Учтепинский район, ул. Заковат, 2
Телефон: (0371) 243-3605

Information about co-author:

Maksudbek S. Madaminov, Ph.D. Head of the National Collection of Microorganisms, Research Institute of Epidemiology, Microbiology and Infectious Diseases of Ministry of Health of the Republic of Uzbekistan
Address: 2, Zakovat Str., Uchtepinsky distr., Tashkent, 100133, Republic of Uzbekistan
Phone: (0371) 243-3605

Издательство «Династия»

выпускает научно-практический журнал Национального научного общества инфекционистов

«Инфекционные болезни»

Главный редактор

академик РАН, профессор **В.И.Покровский**
директор Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора,
председатель правления Национального научного общества инфекционистов

Заместитель главного редактора

академик РАН, профессор **В.В.Малеев**
заместитель директора по научной и клинической работе Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора

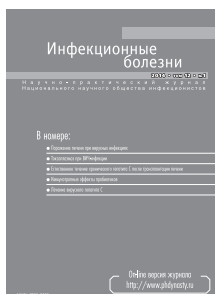
Журнал ориентирован на широкий круг специалистов – инфекционистов, терапевтов, участковых и семейных врачей, педиатров, научных работников, преподавателей ВУЗов, организаторов здравоохранения. На страницах журнала обсуждаются проблемы этиологии, патогенеза, клинических проявлений инфекционных заболеваний, новых средств и методов их диагностики, профилактики и лечения (включая антибактериальную и противовирусную терапию, использование иммуноглобулинов и интерферонов, а также интенсивную терапию неотложных состояний).

Журнал индексируется в реферативной базе данных Scopus, Ulrich's Periodicals Directory и в Российском индексе научного цитирования.
Журнал включен в Перечень ведущих научных журналов и изданий ВАК.

Адрес: 119019, Москва, Г-19, а/я 229, Издательство «Династия». тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: red@mm-agency.ru

По вопросам подписки обращаться: тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: podpiska@mm-agency.ru

Отдел рекламы: тел.: (495) 517-7055, тел./факс: (495) 660-6004, e-mail: reklama@mm-agency.ru



www.phdynasty.ru

Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред

А.П.Шепелин

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

Отечественной промышленностью выпускается достаточно большой набор питательных сред для клинической и санитарной микробиологии. Проводятся исследования по разработке состава и технологии производства питательных сред для микроорганизмов со сложными питательными потребностями, хромогенных и транспортных питательных сред, а также готовых к применению в чашках Петри.

Ключевые слова: медицинские изделия, питательные среды, энтеробактерии, санитарная и клиническая микробиология, агар Эндо

Для цитирования: Шепелин А.П. Современное состояние и тенденции в разработке, производстве и применении питательных сред. Бактериология. 2016; 1(1): 42–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47

Nutrient media: current status & trends in design, production and application

A.P.Shepelin

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

Patriotic industry produces a large set of culture media for clinical and sanitary microbiology. Research on the development and composition of culture media production technologies for micro-organisms with complex nutritional needs of chromogenic culture media and transport, as well as ready to use in Petri dishes.

Key words: medical products, culture media, enterobacteria, sanitary and clinical microbiology, agar Endo

For citation: Shepelin A.P. Nutrient media: current status & trends in design, production and application. Bacteriology. 2016; 1(1): 42–47. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-42-47

Среди методов микробиологической диагностики культуральный метод занимает особое место, являясь «золотым стандартом» лабораторной диагностики, поскольку именно обнаружение возбудителя заболевания при культивировании на питательных средах является убедительным доказательством инфекционной природы болезни.

Количество питательных сред (с учетом модификаций), по различным источникам, превышает 5 тыс. прописей. Перечень питательных сред, необходимых в работе микробиологической лаборатории, определяется, в первую очередь, ее спецификой, оснащением и финансовыми возможностями. В бактериологической практике чаще

всего используют сухие питательные среды, которые производятся в промышленных масштабах. Сухие среды могут храниться в течение длительного времени, удобны при транспортировке и имеют относительно стандартный состав [1, 2].

Питательные среды для диагностики инфекционных болезней в соответствии с ФЗ-323 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» относятся к медицинским изделиям. Положения ряда статей указанного закона устанавливают основные правила допуска к обороту и ключевых этапов жизненного цикла, а также применения и эксплуатации медицинских изделий. Первоначальным этапом допуска на рынок медицинских изделий является государ-

Для корреспонденции:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной работе ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Адрес: Московская область, Серпуховский район, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
E-mail: shepelin@obolensk.org

Статья поступила 01.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0020
E-mail: shepelin@obolensk.org

The article was received 01.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

ственная регистрация препаратов, которая в соответствии с Постановлением Правительства №1416 от 27.12.2012 г. осуществляется Росздравнадзором [3, 4]. В соответствии со ст. 38 указанного Закона при лабораторной диагностике инфекционных болезней можно использовать только зарегистрированные медицинские изделия. В случае использования фальсифицированных, контрафактных, недоброкачественных медицинских изделий в соответствии с ФЗ-532 от 31.12.2014 г. наступает административная и уголовная ответственность.

Питательные среды широко используются в различных областях – в клинической и санитарной микробиологии, при производственном контроле пищевых продуктов, в фармацевтической промышленности, изучении объектов окружающей среды. Во всех ли случаях необходима государственная регистрация питательных сред в качестве медицинского изделия? В соответствии со ст. 38 ФЗ-323 назначение препарата определяется производителем, и если препарат не предназначен для целей, указанных в данной статье, то он не является медицинским изделием, что было указано в нескольких письмах и разъяснениях Росздравнадзора. В результате полученных ответов можно суммировать, что питательные среды, предназначенные для научных исследований, для санитарно-эпидемиологических исследований, а также питательные среды для микробиологического контроля образцов пищевых продуктов, кормов для животных, фармацевтических и косметических продуктов, образцов окружающей среды не подлежат государственной регистрации в Росздравнадзоре в качестве медицинских изделий.

Для определения пригодности питательных сред с целью проведения бактериологических исследований в практических лабораториях проводят контроль их качества, выполняя перечень оперативных процедур, включающих этап проверки биологических (ростовых) свойств питательных сред.

Входной контроль питательных сред предусматривает определение достаточности приведенных в сопроводительной документации характеристик питательных сред, необходимых для получения надежных и воспроизводимых результатов микробиологических испытаний. Он предназначен для выявления нарушений технологии приготовления, приводящих к снижению ростовых и (или) дифференцирующих свойств готовой питательной среды путем оценки принципиальной способности основного тестового штамма расти на контролируемой питательной среде, а также наличия характерных дифференцирующих признаков для специфических сред. Эталонные (референтные) штаммы обычно получают из национальных и международных коллекций, включая государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск»

Для проведения входного контроля качества питательных сред существует несколько нормативных документов. Общие требования к контролю качества питательных сред изложены в ГОСТ Р ЕН 12322-2010 [5]. Основным документом в лабораториях клинической и санитарной микробиологии является МУК 4.2.2316-08 [6]. В последнее время в лабораториях клинической микробиологии предложено использовать клинические рекомендации [7]. Для микробиологических лабораторий пищевой промышленности ис-

пользуются ГОСТ 11133-1-2009, ГОСТ 11133-2-2009 [8]. Методы контроля качества питательных сред для фармацевтической промышленности изложены в Государственной фармакопее.

Основные отечественные производители питательных сред обеспечивают до 50% рынка в Российской Федерации. В бактериологической практике хорошо известны отечественные питательные среды общего назначения (питательный агар и питательный бульон), среды для выделения энтеробактерий (агар Эндо, среда Левина, висмут сульфит агар, бактоагар Плоскирева, Мак Конки агар, XLD-агар, RVS-бульон и др.) (таблица), среды для воздушно-капельных инфекций (коринебакагар, коринетоксагар, бордетелагар), питательные среды для особо опасных инфекций (Ft-агар, агар щелочной, пептон основной, легионелбакагар и др.).

Широкое применение в клинической микробиологии нашли отечественные питательные среды для выделения возбудителей гнойных бактериальных менингитов, гонококков, стафилококков, определения дисбиотических состояний. В отдельную группу выделены питательные среды для контроля стерильности и микробной обсемененности нестерильных лекарственных средств, которые могут использоваться и в клинической, и в санитарной микробиологии (тиогликолевая среда, агар Сабуро, маннитол-солевой агар, агар Симмонса, селенитовый бульон и др.).

ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора является одним из ведущих производителей питательных сред в России. Научные исследования в области разработки питательных сред в ФБУН ГНЦ ПМБ начинались в 80-е годы. В основу разработок была заложена идея производства питательных сред на основе панкреатического гидролизата рыбной муки, технология производства которого была разработана в 1990–1991 гг. [9].

Панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ) представляет собой мелкодисперсный порошок светло-желтого

Таблица. Основные питательные среды, используемые для выделения энтеробактерий

Базовые и накопительные питательные среды, (селективные)	Дифференциально-диагностические питательные среды	Питательные среды для определения биохимической характеристики выделенной культуры
Питательный бульон	Агар Эндо	Среды Гисса
Питательный агар	Среда Левина	Агар Клиггера
Среда Эйкмана с глюкозой	Висмут-сульфит агар	Среда Ресселя
Среды Эйкмана с лактозой	Агар Плоскирева	Железо-глюкозо-лактозный агар с мочевиной (типа Олькеницкого)
Магниева среда	SS-агар	Ацетатный агар
RVS-бульон	XLD-агар	Цитратный агар Симмонса
Бульон Мосселя	Агар МакКонки	
Бульон МакКонки	Агар с бриллиантовым зеленым, лактозой и сахарозой (БФЛС-ГРМ-агар)	
SDS-бульон (типа Кода)	Сорбитол <i>E.coli</i> 0 ₁₅₇ :H7 агар	
Среда Кесслера-ГРМ	Лактозный ТТХ агар с тергитолом	
Агар Мосселя	Хромагар	

цвета с содержанием аминного азота не менее 3,0%, общего азота не менее 9%, свободных аминокислот не менее 20% и содержанием хлоридов не более 25%. Сходство биохимического, аминокислотного и минерального состава гидролизатов ПГРМ и других пептонов позволило сделать вывод о возможности широкого использования ПГРМ в составе различных дифференциально-диагностических питательных сред.

В настоящее время номенклатура выпускаемых препаратов в ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора составляет около 100 наименований. Большинство питательных сред прошли все этапы государственных испытаний, зарегистрированы в качестве медицинских изделий Росздравнадзором и разрешены для применения в практическом здравоохранении.

Среди присутствующих на отечественном рынке импортных питательных сред значительную часть составляют питательные среды для микроорганизмов со сложными питательными потребностями, готовые к применению в чашках Петри, транспортные среды, хромогенные, дифференциально-диагностические среды в картриджах для бактериологических анализаторов и др. [10–12].

Для оценки качества питательных сред различных производителей были проведены сравнительные исследования питательных сред отечественного производства и иностранных производителей (HiMedia (Индия), Merck (Германия) и Pronadisa (Испания)). Были изучены специфическая активность и дифференциально-диагностические свойства питательных сред ГРМ-агара, среды Эндо, SS-агара, агара Сабуро и тиогликолевой среды на расширенном наборе тест-штаммов и изучена выявляемость патогенных энтеробактерий из клинического материала. Результаты сравнительных испытаний среды Эндо различных производителей на музейных тест-штаммах и клиническом материале от больных показали, что питательная среда Эндо производства ФБУН ГНЦ ПМБ не только не уступает, но и в ряде случаев превосходит импортные аналоги. Было установлено, что морфология, размер и количество колоний большинства энтеробактерий, вырастающих на среде Эндо производства Merck, Pronadisa, Hi Media и ФБУН ГНЦ ПМБ, имеют незначительные отличия и соответствуют заявленным производителями характеристикам [13]. Лактозоположительные энтеробактерии вырастали на среде в виде колоний розового или малинового цвета, колонии лактозоотрицательных бактерий образовывали бесцветные или бледно-розовые колонии (рис. 1).

Сотрудники ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора имеют большой опыт работы по созданию прописей бактериологических питательных сред, разработке технологии производства питательных сред, организации производства, сертификации продукции.

В настоящее время в ФБУН ГНЦ ПМБ завершены исследования по разработке состава и технологии производства ряда питательных сред, которые находятся на различных этапах государственной регистрации:

- 1) агар Мюллера-Хинтон для определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (рис. 2);
- 2) агар Байрд-Паркера – питательный агар для селективного выделения и учета стафилококков в пищевых продуктах и фармацевтическом материале (рис. 4);

3) агар Фогеля-Джонсона для выявления патогенных мантиположительных стафилококков (рис. 5);

4) триптон-соевый агар для культивирования широкого круга микроорганизмов;

5) цетримидный агар для выделения и дифференциации *Pseudomonas aeruginosa* из различного материала;

6) триптон-желчный агар для обнаружения и подсчета бактерий *E. coli* и других колиформных бактерий в воде методом мембранной фильтрации;

7) агар Мосселя для селективного выделения и учета всех видов энтеробактерий (рис. 3);

8) бульон Мосселя для селективного накопления энтеробактерий.

В последнее время в Российской Федерации остро стоит вопрос об организации производства питательных сред для культивирования высокотребовательных микроорганизмов, обладающих сложными питательными потребностями, таких, как [14]:

- 1) агар с сердечно-мозговой вытяжкой (Brain-heart infusion agar);
- 2) основа колумбийского агара для высокотребовательных микроорганизмов;
- 3) двухфазная питательная среда для гемокультур;
- 4) основа кровяного агара;
- 5) желчно-эскулиновый агар для энтерококков;
- 6) среды для стрептококков;
- 7) Шедлер агар для анаэробов.

Несмотря на широкое внедрение в бактериологическую практику методов генодиагностики и геноиндикации, бактериологический метод остается «золотым стандартом» в диагностике большинства инфекций, основной недостаток которого – длительность исследования. В целях ускорения исследования, значительного сокращения объема рутинной работы в современной лабораторной практике в последние годы применяют хромогенные дифференциальные питательные среды.

Хромогенные питательные среды основаны на обнаружении специфичных ферментов микроорганизмов, для идентификации которых в состав среды вносят хромогенный субстрат – вещество, при расщеплении которого образуются окрашенные продукты. Использование хромогенных питательных сред позволяет в течение 17–20 ч одноэтапно выделить и идентифицировать микроорганизмы, имеющие важное значение для клинической и санитарной микробиологии: *E. coli* и колиформные бактерии, энтерогеморрагические эшерихии, сальмонеллы, энтерококки, стафилококки, клостридии, псевдомонады и др.

В ФБУН ГНЦ ПМБ разработана хромогенная питательная среда для обнаружения колиформных бактерий и *E. coli* сухая (Хромагар), рекомендуемая к использованию в практике санитарной и клинической микробиологии. Хромагар обеспечивает эффективное накопление, рост и межродовую дифференциацию энтеробактерий, ингибируя рост сопутствующей микрофлоры. Избирательное выявление высокоспецифичных ферментов микроорганизмов позволяет одновременно дифференцировать колиформные бактерии и кишечные патогены и сокращает время исследования. Внесенный в Хромагар IPTG как индуктор галактозидазы способствует более яркому окрашиванию колоний по сравнению с зарубежными аналогами (рис. 6).

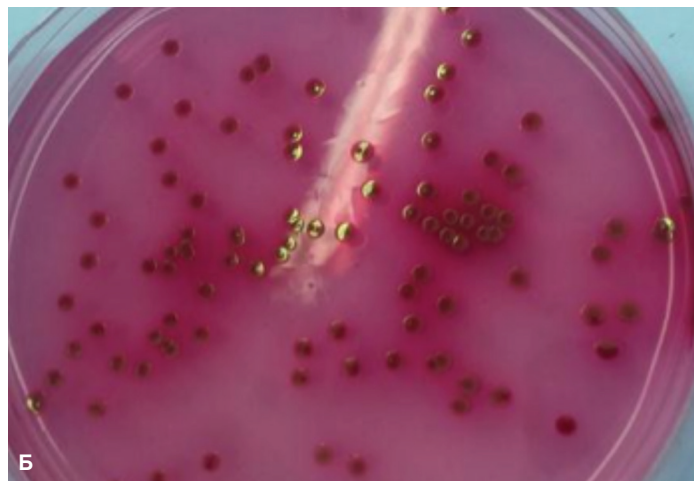
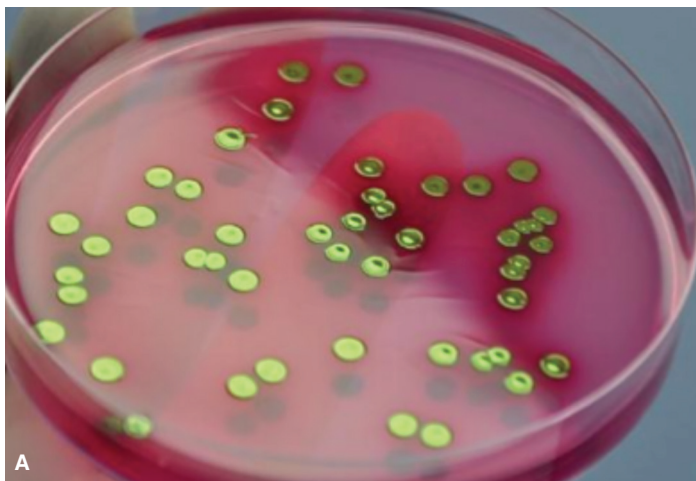


Рис. 1. А – среда Эндо-ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ; Б – среда Эндо производства Pronadisa.

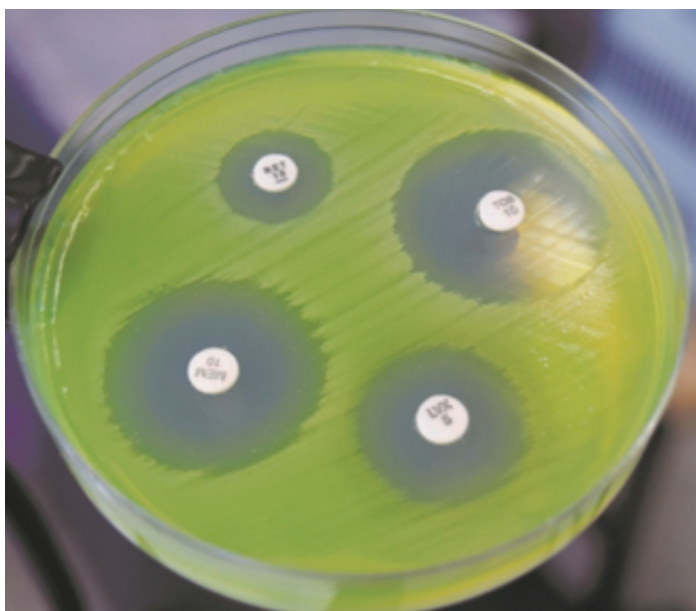


Рис. 2. Агар Мюллера-Хинтон.

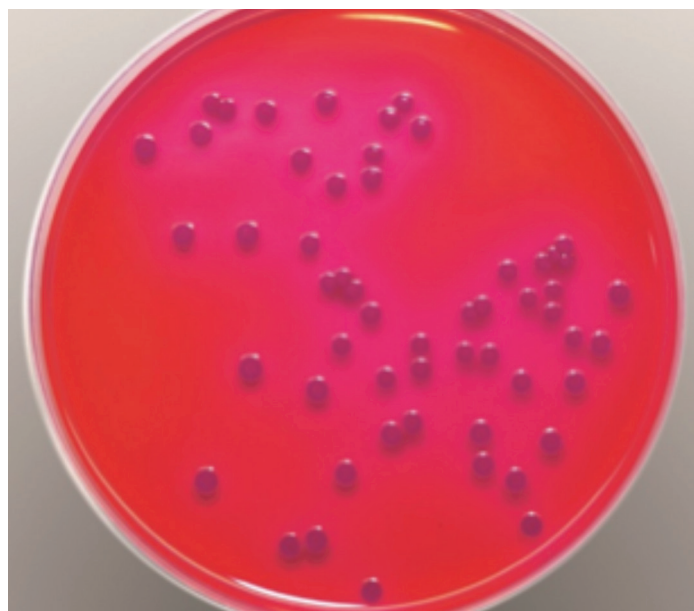


Рис. 3. Агар Моссея.

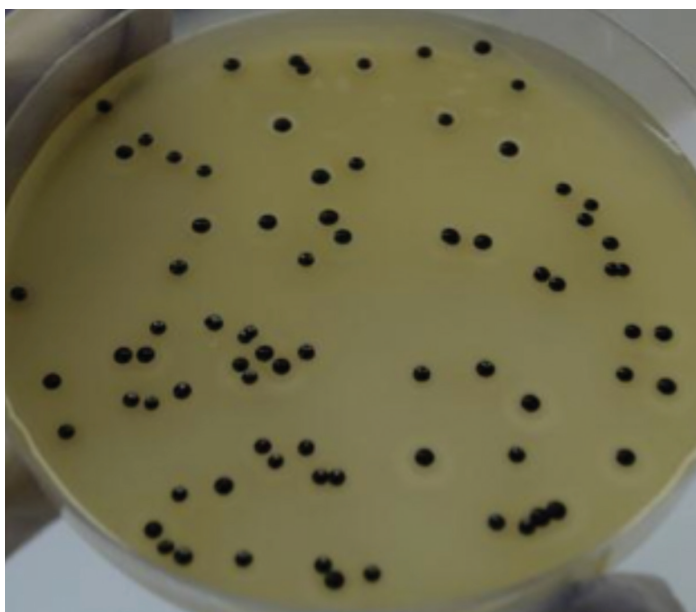


Рис. 4. Агар Байрд-Паркера.

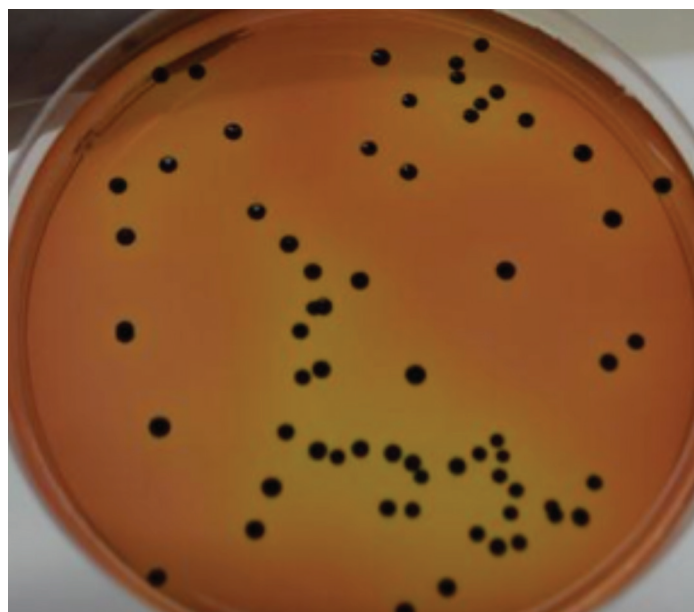


Рис. 5. Агар Фогеля-Джонсона.

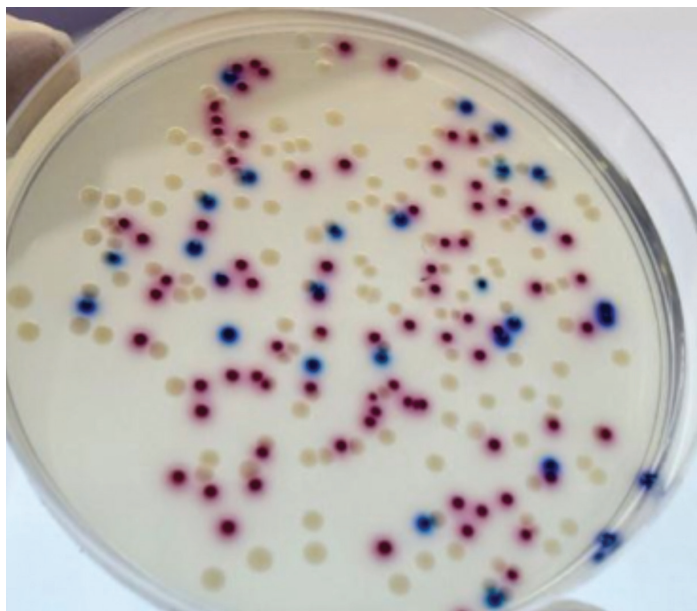


Рис. 6. Хромогенная питательная среда для обнаружения колиформных бактерий и *E. coli* сухая (Хромагар).

Наиболее востребованы следующие хромогенные питательные среды:

- 1) хромогенный агар для *E. coli* O₁₅₇;
- 2) хромогенный агар для энтерококков;
- 3) основа хромогенного агара для листерий;
- 4) хромогенный бульон для колиформных бактерий и *E. coli*;
- 5) хромогенный агар для выделения метициллинустойчивых *S. aureus* (MRSA агар);
- 6) хромогенный агар для грибов рода *Candida*;
- 7) хромогенный агар для определения энтеробактерий, продуцирующих β-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС);
- 8) хромогенный агар для выделения, подсчета микроорганизмов в моче и прямой идентификации *E. coli*, *Enterococcus*, группы KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*) и *Proteus* в один этап.

Эффективность микробиологической диагностики инфекционных заболеваний зависит не только от выбранного метода исследования и его характеристик, но и от качества проведения преаналитического этапа исследования, включающего взятие и транспортировку клинического материала в лабораторию для анализа. Даже незначительные ошибки на этом этапе исследований неизбежно ведут к искажению окончательных результатов, не позволяя получить достоверные данные. По сведениям многих авторов, на преаналитический этап приходится от 57 до 68% всех диагностических ошибок, которые ведут к необходимости проведения повторных исследований, но, что еще более серьезно, – к неправильной постановке диагноза. Для повышения качества лабораторных исследований в первую очередь необходимо повысить качество сбора проб биологического материала и транспортирования его в лабораторию.

Одним из возможных путей предотвращения ошибок преаналитического этапа является использование надлежащих транспортных систем, содержащих транспортные питательные среды. Использование для транспортировки анали-

та (гноя, кишечное содержимое и т.п.) обычных питательных сред является, зачастую, серьезной ошибкой, поскольку в них идет быстрое размножение менее требовательных сапрофитных микроорганизмов.

Промышленный выпуск транспортных сред осуществлен в Европе еще в 1975 г. В России промышленное производство транспортных сред до сих пор отсутствует. К числу основных транспортных сред относятся среда Кэри Блэйер, среда Эймса, среда Эймса с углем, среда Стюарта и специальные транспортные среды для отдельных видов микроорганизмов. Перечисленные среды не являются питательными, содержат фосфатный буферный раствор и тиогликолят натрия, предназначены для сбора и транспортировки только бактериологических проб. Транспортная среда, с одной стороны, обеспечивает сохранение жизнеспособности микроорганизмов, и, в то же время, обязана ограничивать их размножение. Среда Стюарта предназначена для сохранения и транспортировки широкого спектра патогенных микроорганизмов. Наиболее требовательные микроорганизмы сохраняются в данной среде около суток, прочие – до нескольких дней. Транспортная среда Кэри Блэйер представляет собой модификацию транспортной среды Стюарта, предназначенную специально для фекальных и ректальных образцов. Данная среда является стандартной для транспортировки анаэробов.

Необходимы специальные транспортные среды для отдельных видов микроорганизмов, таких как вибрионы, кампилобактерии и др., для сохранения и транспортировки которых не подходит ни одна из перечисленных сред.

Транспортные среды обычно укомплектованы тампонами-аппликаторами для сбора проб культур бактерий, которые после взятия пробы помещаются в пробирку с транспортной средой.

В ФБУН ГНЦ ПМБ с 2014 г. внедрена система менеджмента качества (СМК) в соответствии с требованиями ГОСТ ИСО 13485-2011. В учреждении ежегодно проводятся инспекционный контроль на соответствие требованиям СМК и мероприятия по усовершенствованию системы СМК с учетом расширения производства. Система СМК применяется на всех этапах: начиная от разработки новых изделий, входного контроля сырья, непосредственно стадий производства и заканчивая этапом реагирования на возможные рекламации уже готовой продукции. В зависимости от сложности выполняемой процедуры для каждого этапа разработаны стандартные операционные процедуры (СОП), инструкции, методики или, для некоторых стадий, подробные выписки из технических условий. Внедрение системы менеджмента качества, соответствующей международным стандартам ИСО, является необходимым условием успешной работы организации, которая предназначена для повышения конкурентоспособности организации на национальном и мировом рынках.

Заключение

Отечественной промышленностью выпускается достаточно большой набор питательных сред для клинической и санитарной микробиологии. Проводятся исследования по разработке состава и технологии производства питательных сред для микроорганизмов со сложными питатель-

ными потребностями, хромогенных и транспортных питательных сред, а также готовых к применению в чашках Петри. Представленные данные по обоснованию номенклатуры питательных сред и транспортных систем позволят в полном объеме удовлетворить потребности клинической и санитарной микробиологии в питательных средах отечественного производства и отказаться от импортных поставок, не снижая при этом качества микробиологических исследований.

Литература

1. Поляк МС, Сухаревич ВИ, Сухаревич МЭ. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии. СПб.: ЭЛСИ-СПб, 2008.
2. Галынкин ВА, Заикина НА, Кочеровец ВИ, Курбанова ИЗ. Под ред. Галынкина ВА, Кочеровца ВИ. Питательные среды для микробиологического контроля качества лекарственных средств и пищевых продуктов. Справочник. СПб.: Проспект науки, 2006.
3. Федеральный закон №323 от 01.11.2011 «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации».
4. Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 №1416 «Об утверждении порядка государственной регистрации медицинских изделий».
5. ГОСТ Р EN 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики in vitro. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. М., 2011.
6. Методические указания 4.2.2316-08. Методы контроля бактериологических питательных сред. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008.
7. Меньшиков ВВ, Козлов РС, Поляк МС, Михайлова ВС, Иноземцева ЛО, Шуляк БФ, и др. Стандартизованная технология «Внутрилабораторный контроль качества питательных сред для клинических микробиологических исследований». Проблемы стандартизации в здравоохранении. 2013;9-10: 43-77.
8. ГОСТ ISO/TS 11133-1-2014 Микробиология пищевых продуктов и кормов для животных. Руководящие указания по приготовлению и производству питательных сред. Часть 1. Общие руководящие указания по обеспечению качества приготовления питательных сред в лаборатории.
9. Шепелин А.П., Дятлов И.А. Роль и место микробиологии в решении вопросов модернизации здравоохранения. Протвино: А-ПРИНТ ЗАО, 2012.
10. Microbiology Manual, MERCK, LPRO UBA, 1996.
11. The Oxoid Manual of Cultur Media Ingredients and other Laboratories Services. 4th, 2004.
12. Hi Media Laboratories Pvt Limited., LBS Marg, Mumbai. India, 2003.
13. Шепелин АП, Марчихина ИИ, Полосенко ОВ, Складан ГЕ. Сравнительная оценка дифференциально-диагностических свойств питательной среды

Эндо различных производителей. Клиническая лабораторная диагностика. 2013;5:47-50.

14. Шепелин АП, Домотенко ЛВ, Дятлов ИА, Миронов АЮ, Алешкин ВА. Современные подходы к проблеме импортозамещения в области производства питательных сред. Клиническая лабораторная диагностика. 2015; 60(6):63-5.

References

1. Polyak MS, Sukharevich VI, Sukharevich ME. Pitatel'nye sredy dlya meditsinskoi i sanitarnoi mikrobiologii. Saint Petersburg: "ELSI-SPb" Publ., 2008. (In Russian).
2. Galynkin VA, Zaikina NA, Kocherovets VI, Kurbanova IZ. Ed by Galynkin VA, Kocherovets VI. Pitatel'nye sredy dlya mikrobiologicheskogo kontrolya kachestva lekarstvennykh sredstv i pishchevykh produktov. Saint Petersburg: "Prospekt nauki" Publ., 2006. (In Russian).
3. Federal Law of Russian Federation №323 ot 01.11.2011 «Ob osnovakh okhrany zdorov'ya grazhdan v Rossiiskoi Federatsii». (In Russian).
4. Resolution of Russian Federation 27.12.2012 №1416 «Ob utverzhdenii poryadka gosudarstvennoi registratsii meditsinskikh izdelii». (In Russian).
5. GOST R EN 12322-2010. Izdeliya meditsinskie dlya diagnostiki in vitro. Pitatel'nye sredy dlya mikrobiologii. Kriterii funktsional'nykh kharakteristik pitatel'nykh sred. Moscow, 2011. (In Russian).
6. Guidelines 4.2.2316-08. Metody kontrolya bakteriologicheskikh pitatel'nykh sred. Moscow, 2008. (In Russian).
7. Menshikov VV, Kozlov RS, Polyak MS, Mikhailova VS, Inozemtseva LO, Shuljak BF, et al. Standardized technologies "Internal quality control of culture media for bacteriological research" (DRAFT). Health care standardization problems. 2013; 9-10:43-77. (In Russian).
8. GOST ISO/TS 11133-1-2014 Mikrobiologiya pishchevykh produktov i kormov dlya zhivotnykh. Rukovodyashchie ukazaniya po prigotovleniyu i proizvodstvu pitatel'nykh sred. Part 1. Obshchie rukovodyashchie ukazaniya po obespecheniyu kachestva prigotovleniya pitatel'nykh sred v laboratorii. (In Russian).
9. Shepelin A.P., Dyatlov I.A. Rol' i mesto mikrobiologii v reshenii voprosov modernizatsii zdravookhraneniya. Protvino: "A-PRINT"Publ., 2012. (In Russian).
10. Microbiology Manual, MERCK, LPRO UBA, 1996.
11. The Oxoid Manual of Cultur Media Ingredients and other Laboratories Services. 4th, 2004.
12. Hi Media Laboratories Pvt Limited., LBS Marg, Mumbai. India, 2003.
13. Shepelin AP, Martchikhina II, Polosenko OV, Skladan GYe. The comparative evaluation of differential diagnostic characteristics of endo growth medium of different manufacturers. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2013;5:47-50. (In Russian).
14. Shepelin AP, Domotenko LV, Diatlov IA, Mironov AYu, Aleshkin VA. The actual approaches to problem of import substitution in th field of production growth medium. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2015;60(6):63-5. (In Russian).

Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника

Л.В.Домотенко, А.П.Шепелин, Т.П.Морозова

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

Приведен аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы по питательным средам для выделения бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков. Особое внимание уделено сухим питательным средам – Бифидум-среде, Лактобакагару, Энтерококкагару.

Ключевые слова: питательные среды, бифидобактерии, лактобациллы, энтерококки, микробиота, Бифидум-среда, Лактобакагар, Энтерококкагар

Для цитирования: Домотенко Л.В., Шепелин А.П., Морозова Т.П. Питательные среды для основных представителей нормофлоры кишечника. Бактериология. 2016; 1(1): 48–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-48-53

Nutrient media for the main representatives of intestinal normal flora

L.V.Domotenko, A.P.Shepelin, T.P.Morozova

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

National and foreign scientific periodicals focused on nutrient media for the isolation of bifidobacteria, lactobacilli and enterococci are reviewed. Particular attention is paid to the dry nutrient media – Bifidum-medium, Lactobacagar, Enterococccagar.

Key words: nutrient media, bifidobacteria, lactobacilli, enterococci, microbiota, Bifidum-medium, Lactobacagar, Enterococccagar

For citation: Domotenko L.V., Shepelin A.P., Morozova T.P. Nutrient media for the main representatives of intestinal normal flora. Bacteriology. 2016; 1(1): 48–53. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-48-53

До недавнего времени формирование представления о микрофлоре (нормофлоре, микробиоте) кишечника базировалось только на результатах классических микробиологических методов, основанных на выделении микроорганизмов из фекалий или кишечного материала и последующего их анализа [1]. Такой подход обеспечил хорошую основу знаний о качественном и количественном составе микрофлоры. В современных условиях использование методов молекулярной микробиологии способствовало развитию знаний о кишечной микробиоте [2].

Благодаря масштабным исследованиям, проводимым в рамках проекта «Микробиом человека» (Human Microbiome Project), ученые смогли составить комплексное представление о многообразии микрофлоры организма человека. По результатам генетического анализа установлено, что в цело-

веческом организме обитают свыше 10 тысяч видов различных микроорганизмов, а самой колонизированной частью человеческого тела является кишечник: концентрация бактерий варьируется от 10–1000 клеток на грамм в верхней части кишечника до 10^{12} в толстой кишке.

Согласно первым опубликованным данным проекта, ученым удалось установить, что состав микрофлоры подчиняется определенным закономерностям, и разделить микробную популяцию кишечника у людей на три типа, независимо от пола, возраста, национальности и особенностей питания [3].

Несмотря на успехи в изучении кишечной микрофлоры, достигнутые с использованием молекулярно-генетических методов, метагеномного анализа, только при сочетании использования с культуральными методами можно составить полную картину кишечной микробиоты, выделить ее

Для корреспонденции:

Домотенко Любовь Викторовна, кандидат химических наук, заведующая лабораторией разработки питательных сред ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

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

Телефон: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Love V. Domotenko, Ph.D., Head of the laboratory of culture media development, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

Phone: (4967) 36-0003

E-mail: domotenko@obolensk.org

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

основных представителей. Культуральный метод с использованием питательных сред до сих пор признается полезным инструментом для углубленного изучения физиологии конкретного изолированного микроорганизма и широко используется в рутинной практике для обнаружения как возбудителей кишечных инфекций, так и основных представителей микрофлоры кишечника.

Согласно сложившимся представлениям, основными представителями микрофлоры кишечника человека являются бифидобактерии, бактериоды, лактобациллы, кишечная палочка и энтерококки, требующие для выделения специальных питательных сред [4, 5]. В данной статье будут рассмотрены питательные среды для выделения только трех представителей – бифидобактерий, лактобацилл и энтерококков.

Питательные среды для бифидобактерий

Бифидобактерии представляют собой анаэробные грамположительные бактерии, которые доминируют в кишечной микрофлоре здоровых людей [6]. Бифидобактериям принадлежит ведущая роль в нормализации микробиоты кишечника, белкового и минерального обмена, синтезе биологически активных веществ, в том числе витаминов. Дефицит бифидобактерий является одним из патогенетических факторов длительных кишечных нарушений у детей и взрослых, ведущих к формированию хронических расстройств пищеварения. Перечисленные свойства бифидобактерий позволяют рассматривать их как эффективный био корректор и основу для создания препаратов пробиотического действия и функциональных продуктов питания. Существует мнение о положительной роли бифидобактерий в стимулировании иммунитета.

Для выделения бифидобактерий из фекалий, обнаружения и подсчета их в пробиотических препаратах и молочнокислых продуктах широко применяется целый ряд питательных сред [7, 8]. Разработан ряд селективных сред для выделения бифидобактерий, содержащих антибиотики (канамицин, налидиксовую кислоту, параамицин и полимиксин В) и/или пропионовую кислоту в качестве селективных агентов [9, 10]. Однако анализ некоторых часто используемых селективных сред выявил, что ни один из селективных агентов не был полностью избирательным и что они, как правило, обладали ингибирующим действием в отношении некоторых бифидобактерий [11].

Долгое время в РФ основной средой для выделения бифидобактерий из фекалий и подсчета бифидобактерий в пробиотиках и молочнокислых продуктах являлась среда лабораторного изготовления – печеночно-цистиновая среда Блаурокка [12]. Однако широкое использование антибиотиков в рационе животных приводит к накоплению токсичных метаболитов в печени, что негативно влияет на качество и стандартности питательной среды, изготовленной из печеночного перевара.

Этих недостатков лишена сухая неселективная питательная среда, предназначенная для выделения и культивирования бифидобактерий – Бифидум-среда, обеспечивающая типичный рост всех видов бифидобактерий в виде «гвоздиков», «комет», «штрихов», «шариков» и др. (рис. 1).

В ряде публикаций описано применение Бифидум-среды для научных и диагностических целей [13, 14]. В статье

Е.И.Маградзе и соавт. представлены результаты испытаний питательной среды [14]. Первый этап посвящен изучению биологических свойств Бифидум-среды с использованием 21 музейного штамма пяти видов бифидобактерий. На втором этапе Бифидум-среду испытывали при контроле пробиотического препарата «Бифидумбактерин» различных фирм-изготовителей и различных форм выпуска (в порошке или в таблетках). Третий этап включал исследование образцов клинического материала. Результаты испытания качества питательной среды, оцененного по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ) и активности кислотообразования, на первом и втором этапах сопоставимы с результатами, полученными на контрольных средах. В ходе третьего этапа исследован фекальный материал от 28 пациентов, среди которых 19 новорожденных, 7 детей в возрасте от 1,5 до 2 лет и двое взрослых (16 и 60 лет). Как показали результаты исследований, у 9 новорожденных роста бифидобактерий не было обнаружено ни в Бифидум-среде, ни в контрольной среде. Рост бифидобактерий отмечен на обеих средах через 48 ч инкубирования. У 13 пациентов концентрация бифидобактерий на Бифидум-среде была на 1–2 порядка выше, чем на контрольной среде. Содержание бифидобактерий в группе обследованных лиц составило 8,15 lg КОЕ/г при посеве фекалий в Бифидум-среду и 6,68 lg КОЕ/г при посеве в контрольную среду.

Поскольку Бифидум-среда не является селективной средой, все микроорганизмы растут на ней. Однако характер роста их различен. Так, энтерококки и лактобациллы растут на среде аналогично бифидобактериям: в виде «тяжей», «комет». При культивировании кишечной палочки и *E. aerogenes* происходит диффузное помутнение среды с газообразованием. Золотистый стафилококк растет в виде диффузного помутнения в верхней части столбика среды с отрастающими вниз отдельно расположенными колониями в виде «гвоздиков». В процессе роста *P. vulgaris* наблюдается диф-

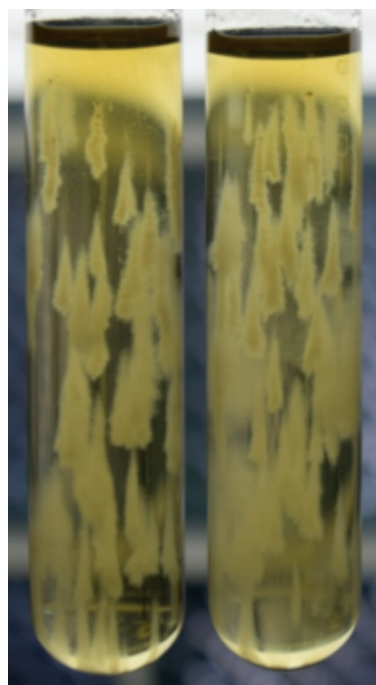


Рис. 1. Рост *B. adolescentis* ATCC 15705 в Бифидум-среде.

фузное помутнение среды. Штамм *P. aeruginosa* 27/99 растет на Бифидум-среде в виде диффузного помутнения в верхней части столбика среды.

Питательные среды для лактобацилл

Лактобациллы (*Lactobacillus spp.*) представляют собой неспорообразующие грамположительные палочки, широко распространенные в природе [15]. Они являются одними из основных представителей нормофлоры желудочно-кишечного тракта и вульво-вагинальной области человека и многих теплокровных животных. Лактобациллы играют важную роль в хлебопечении, особенно при приготовлении ржаного хлеба. Консервирующее действие их используют для предохранения многих продуктов от порчи – при квашении овощей и фруктов, силосовании кормов и др. С помощью лактобацилл получают кисломолочные продукты для детского и диетического питания. В редких случаях лактобактерии могут быть возбудителями инфекционной патологии [16].

Для обнаружения и количественного учета лактобактерий в клиническом материале, молочных и других продуктах используют различные методы [17]. Но основное место в выделении и подсчете лактобактерий занимают питательные среды [18]. Поскольку представители рода *Lactobacillus* не растут на простых средах, для них требуются питательные среды сложного состава, содержащие различные пептоны, дрожжевой и мясной экстракты. В мировой микробиологической практике наибольшее признание получила среда de Man, Rogosa, Sharpe, которая выпускается в виде MRS агар и MRS бульона (MPC в русской транскрипции). Существует ряд модификаций этой среды, улучшающих, по мнению разработчиков, их ростовые свойства и селективность. В России получили распространение агаризованная среда MPC-4 для выделения лактобактерий, полужидкая среда MPC-2, используемая при работе с чистыми культурами, а также аналог MRS агар и среды MPC-4 – питательная среда для выделения и культивирования лактобацилл, сухая (Лактобакагар) (рис. 2).

В исследовании Домотенко Л.В. и соавт. проведен сравнительный анализ трех питательных сред: *Lactobacillus* MRS-agar (HiMedia), Лактобакагар (ФБУН ГНЦПМБ) и среды MPC-4 (НИЦФ) [19]. Первые две среды представляли собой сухие порошки, а MPC-4 представлен в виде студня, готового к применению, во флаконах. Сравнительные испытания питательных сред проводили с использованием 12 музейных штаммов лактобактерий и 8 штаммов микробов-ассоциантов.

Как показали результаты исследований, все штаммы лактобактерий вырастали при посеве из разведения 10^{-6} через 48 ч инкубации при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в виде типичных колоний, размером более 1 мм. Штаммы *L. plantarum* 8P-A3 и *L. plantarum* ATCC 8014 формировали на всех трех питательных средах круглые гладкие колонии белого цвета диаметром от 1,8 до 2,5 мм. Аналогичный рост наблюдали для штаммов *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* ATCC 11842 и *L. leichmanii* B-1921. Образующие ими колонии были белыми гладкими круглыми и незначительно различались диаметром – 1,6–2,5 мм. Колонии *L. buchneri* ATCC 4005 на всех трех средах имели подобную морфологию, но были несколько мельче – 1,0–2,0 мм в диаметре. Рост штаммов *L. casei* ATCC 7469 и *L. casei* ATCC 9595 был

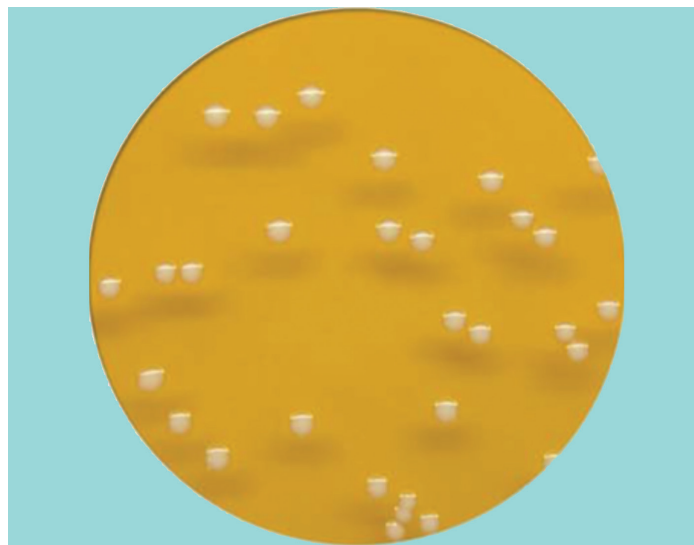


Рис. 2. Колонии *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 11842 на Лактобакагаре.

типичным на всех трех средах: в виде белых гладких круглых колоний, диаметром 1,6–2,5 мм для *L. casei* ATCC 7469 и 2,0–4,5 мм для *L. casei* ATCC 9595. Морфология колоний *L. brevis* ATCC 367 отличалась от колоний предыдущих штаммов. Штамм *L. brevis* ATCC 367 рос в виде сероватых колоний диаметром 1,6–1,8 мм.

Штаммы *L. fermentum* B-1566 и *L. acidophilus* B-1660 формировали на всех исследованных средах мелкие колонии. Причем, колонии *L. fermentum* B-1566 были сероватого цвета, а колонии *L. acidophilus* B-1660 – полупрозрачными.

Следует отметить, что среди колоний в S-форме встречались колонии в R-форме и гладкие колонии с неровными краями. Особенно это характерно для штаммов *L. brevis* ATCC 367, *L. fermentum* B-1566 и *L. acidophilus* B-1660. Появление таких колоний, по-видимому, связано с высокой концентрацией на поверхности среды ингибиторов, входящих в состав сред.

Лактококки также росли на всех трех питательных средах, образуя белые гладкие круглые колонии.

Благодаря наличию в составе среды ацетата натрия, испытываемые питательные среды обладают селективными свойствами. На Лактобакагаре, так же как и на обеих контрольных средах, наблюдалось подавление роста музейных штаммов *E. coli* 3912/41 (055:K59), *E. coli* 675, *P. aeruginosa* 27/99, *K. pneumoniae* 3534/51 из разведения 10^{-2} . При этом на контрольной среде – ГРМ-агаре перечисленные штаммы росли сливным газоном. Рост энтерококков на всех средах через 24 ч культивирования также отсутствовал. Но уже через 48 ч инкубации штаммы *E. faecalis* ATCC 29212 и *E. faecium* 7177 вырастали из разведения 10^{-6} в виде полупрозрачных колоний. Наряду с энтерококками на всех средах наблюдался рост штамма *Candida albicans* NCTC 885-653 в виде белых круглых колоний. *Lactobacilli* MRS-agar, несмотря на высокое значение pH, равное 6,4, проявлял хорошие селективные свойства. Обращает на себя внимание слабое подавление роста стафилококка на среде MPC-4.

Селективные и ростовые свойства Лактобакагара также изучены в клинических испытаниях при исследовании фека-

лий от 97 пациентов. Как показали результаты испытаний, в 9 образцах лактобациллы не выявлены ни на Лактобакагаре, ни на контрольной среде MPC-4 лабораторного изготовления. При анализе одного образца обнаружены единичные колонии плесневых грибов, выросшие на обеих средах, и при анализе двух образцов на Лактобакагаре отмечены колонии дрожжей и плесневых грибов. Кроме того, выявлено значимое превышение количества лактобацилл на Лактобакагаре по сравнению с контрольной средой. Содержание лактобацилл в исследованных образцах составило 6,01 lg КОЕ/г при посеве фекалий на Лактобакагар и 5,7 lg КОЕ/г на контрольной среде. Выросшие на обеих средах лактобациллы не различались друг от друга ни по морфологии колоний, ни по морфологии клеток при микроскопическом исследовании.

Лактобакагар был использован также для подсчета живых йогуртных (*Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*), мезофильных (*Lactococcus lactis*) и пробиотических культур (*L. acidophilus*, *L. rhamnosus*) в коммерческих йогуртах в период их срока годности. Всего проанализировано 10 образцов йогуртов разных производителей. Все йогурты, взятые в исследование, содержали живые молочнокислые бактерии, которые выросли на Лактобакагаре в виде белых полупрозрачных колоний в S-форме. Величины КОЕ практически не отличались от заявленных производителем, за исключением Чудо-йогурта. В работе удалось выделить и идентифицировать с помощью время-пролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией, используя MALDI Biotyper Microflex (Bruker Daltonics), следующие культуры: *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*, *Lactococcus lactis*, *L. acidophilus* и *L. rhamnosus*. Лишь один из основных представителей йогуртных культур – *S. thermophilus* – не удалось выделить на Лактобакагаре из-за селективных свойств питательной среды.

Таким образом, в ходе проведенных испытаний отмечены хорошие ростовые свойства Лактобакагара, позволяющие активно расти и размножаться штаммам лактобацилл, используемым как в научных исследованиях, так и в производстве молочнокислых препаратов. При этом Лактобакагар не уступал *Lactobacillus* MRS agar и среде MPC-4 при работе с музейными штаммами лактобактерий и при анализе клинического материала. Лактобакагар обладал ингибирующей способностью в отношении штаммов эшерихий, псевдомонад, клебсиелл, а в отличие от контрольной среды MPC-4 – и в отношении стафилококков. Вместе с тем, на Лактобакагаре, так же как и на *Lactobacillus* MRS agar и среде MPC-4, растут энтерококки и дрожжеподобные грибы. Поэтому при использовании Лактобакагара необходима бактериоскопия мазков всех подозрительных колоний и/или другие методы для идентификации.

Питательные среды для энтерококков

Энтерококки – грамположительные кокки, часто представлены парами или короткими цепочками [20]. Энтерококки широко распространены в природе. У людей, как и у животных, они обитают в кишечнике, женском генитальном тракте, реже в уретре мужчин, могут колонизировать слизистые оболочки полости рта и кожу, особенно в условиях стационаров. Некоторые штаммы данных микроорганизмов, приоб-

рета ряд признаков патогенности, могут вызывать серьезные инфекционные заболевания, а другие штаммы служат необходимым компонентом нормальной микробиоты. Ключевым критерием для дифференцирования энтерококков, полезных для человека, от энтерококков патогенных является наличие или отсутствие у штамма энтерококков набора генов патогенности.

Более 100 модификаций селективных сред описано в литературе для выделения энтерококков из различных образцов [21, 22]. Выбор питательной среды осуществляется с учетом типа образца (твердый или жидкий), метода выращивания и степени обсемененности другими микроорганизмами. Селективность питательных сред достигается введением азиды, эскулина, канамицина, ацетата таллия и др. Для анализа пищевых продуктов используется Citrate azide Tween carbonate agar, Kanamycin esculin azide agar, KF-streptococcus agar, m-Enterococcus agar, хромогенный Chromocult enterococci agar, Bile esculin agar. В клинической литературе цитируется, в основном, Enterococcosel и m-Enterococcus agar. Ни одна среда не является полностью селективной и пригодной для всех штаммов энтерококков. Селективные среды для энтерококков следует использовать только после или одновременно проверяя их селективность (ложный положительный результат) и производительность (ложный отрицательный результат) с использованием соответствующих тест-штаммов.

Отечественная питательная среда Энтерококкагар, аналог m-Enterococcus агара, хорошо зарекомендовала себя при выделении энтерококков из клинического материала [23, 24]. Энтерококкагар дополнительно позволяет дифференцировать *E. faecalis* и *E. faecium* по способности восстанавливать трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), входящий в состав среды. При этом колонии *E. faecalis*, обладающего восстанавливающими свойствами, приобретают бордовую окраску. Из-за отсутствия восстанавливающих свойств *E. faecium* формирует колонии без окрашивания или сиреневато-розовые со светлым ободком (рис. 3).

Последнее десятилетие отмечено широким использованием современных технологий и расширением представлений о кишечной микрофлоре человека. Вместе с тем, развитие персонализированной медицины требует не только знаний о микрофлоре, но и выделения собственных микро-

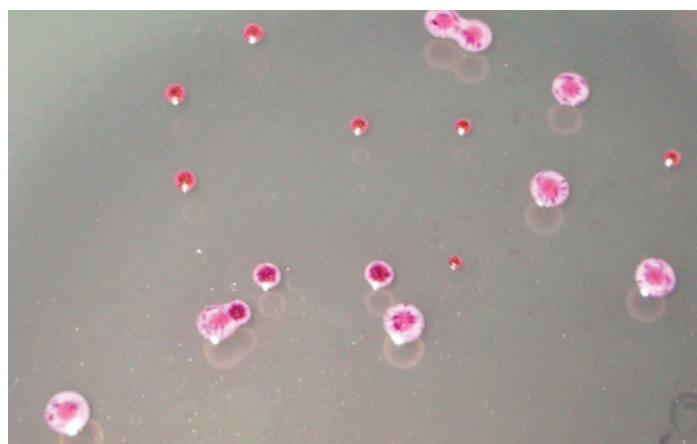


Рис. 3. Колонии *E. faecalis* ATCC 19433 (бордовые) и *E. faecium* ATCC 19434 (розовые со светлым ободком) на Энтерококкагаре.

организмов человека для создания, например, персонализированных пробиотиков. А это можно выполнить только при помощи питательных сред.

Литература

- O'Sullivan DJ. Methods for analysis of Intestinal Microflora. Current issues in intestinal microbiology. 2000;1(2):39-50.
- Namsolleck P, Thiel R, Lawson P, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, et al. Blaut molecular methods for the analysis of gut microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease. 2004;16:71-85.
- Jones N. Gut study divides people into three types. Nature. doi:10.1038/news.2011.249.
- Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004-2003. Утвержден Приказом МЗ РФ от 09.06.2003 № 231.
- Определение дисбиотических изменений желудочно-кишечного тракта по маркерам содержимого кишечника. Федеральные клинические рекомендации. Н. Новгород: Изд-во «Ремедиум Приволжье», 2016.
- Gorvitovskaia A, Holmes SP, Huse SM. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. Microbiome. 2016;4:15. doi: 10.1186/s40168-016-0160-7.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. Annals of Microbiology. 2000;50:117-31.
- Терновская ЛН, Калинина ТЭ, Суханова СМ, Гапон МН. Питательная среда для выделения и культивирования бифидобактерий. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011;6:124-5.
- Methods for the Official Control of Probiotics Used as Feed Additives, Final Report SMT4-CT98-2235, v. 2. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2002, pp. 157.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2005;22:495-512.
- Beerens H. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as selective agent. Applied and Environment Microbiol. 1991;57: 2418-9.
- Silvi S, Rumney CJ, Rowland IR. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. J Appl Bacteriol. 1996;81:561-4.
- Определение количества бифидобактерий в кисломолочных продуктах. Методические указания. МУК 4.2.999-00. М.: Федеральный центр Госсанэпиднадзора Минздрава России, 2000.
- Маградзе ЕИ, Шубина ИВ, Семакина СА, Марков ВН. Зависимость динамики роста бактерий вида *Escherichia coli* от параметров предварительного совместного культивирования с бактериями вида *Bifidobacterium bifidum*. Вестник Удмуртского университета. 2005;10:57-64.
- Домотенко ЛВ, Шепелин АП. Бифидум-среда для выделения и культивирования бифидобактерий. Инфекция и иммунитет. 2014;4(3):279-83.
- Бондаренко ВМ. Молекулярно-генетические и молекулярно-биологические исследования представителей родов *Bifidobacterium* и *Lactobacillus*. Вестник РАМН. 2006;1:18-24.
- Vahabnezhad E, Mochon AB, Wozniak LJ, Ziring DA. Lactobacillus bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. J Clin Gastroenterol. 2013;47(5):437-9.
- Припутневич ТВ, Мелкумян АР, Анкирская АС, Трофимов ДЮ, Муравьева ВВ, Завьялова МГ. Использование современных лабораторных технологий в видовой идентификации лактобактерий при оценке состояния микробиоты влагалища у женщин репродуктивного возраста. Акушерство и гинекология. 2013;1:76-80.
- Домотенко ЛВ, Шепелин АП, Детушев КВ. Сравнительные испытания Лактобакагара и MRS агара. Человек и его здоровье. 2014;4:5-10.
- Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 2009;155:1749-57.

- Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. Int J Food Microbiol. 2003;88:147-64.
- Weiss A, Domig KJ, Kneifel W. Selective Media for Enumeration of Probiotic Enterococci. Food Technology and Biotechnology. 2005;43(2):147-55.
- Мироненко ЛГ, Перетятко ЕФ. Биологические свойства музейных штаммов микроорганизмов рода *Enterococcus*. Микробиология. 2014;4(4):204-6.
- Андрянова ИВ, Вахрушев СГ, Каширцева ИА, Казакова ОЭ. Исследование состава микробиоты носоглотки детей с хроническим аденоидитом с использованием метода масс-спектрометрии по микробным маркерам. Российская ринология. 2014;22(1):16-9.

References

- O'Sullivan DJ. Methods for analysis of Intestinal Microflora. Current issues in intestinal microbiology. 2000;1(2):39-50.
- Namsolleck P, Thiel R, Lawson P, Holmstrom K, Rajilic M, Vaughan EE, et al. Blaut molecular methods for the analysis of gut microbiota. Microbial Ecology in Health and Disease. 2004;16:71-85.
- Jones N. Gut study divides people into three types. Nature. doi:10.1038/news.2011.249.
- Protokol vedeniya bol'nykh. Disbakterioz kishechnika. Otrasl'evoi standart OST 91500.11.0004-2003. Utverzhden Prikazom MZ RF ot 09.06.2003 № 231. (In Russian).
- Federal clinical recommendations. "Opredelenie disbioticheskikh izmenenii zheludochno-kishechnogo trakta po markeram sodержimogo kishechnika". N. Novgorod: "Remedium Privolzh'e" Publ., 2016. (In Russian).
- Gorvitovskaia A, Holmes SP, Huse SM. Interpreting *Prevotella* and *Bacteroides* as biomarkers of diet and lifestyle. Microbiome. 2016;4:15. doi: 10.1186/s40168-016-0160-7.
- Biavati B, Vescovo M, Torriani S, Bottazzi V. Bifidobacteria: history, ecology, physiology and applications. Annals of Microbiology. 2000;50:117-31.
- Ternovskaya LN, Kalinina TE, Sukhanova SM, Gapon MN. Nutrient medium for isolation and cultivation of bifidobacteria. Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology. 2011;6:124-5. (In Russian).
- Methods for the Official Control of Probiotics Used as Feed Additives, Final Report SMT4-CT98-2235, v. 2. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities. 2002, pp. 157.
- Picard C, Fioramonti J, Francois A, Robinson T, Neant F, Matuchansky C. Review article: bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. Alimentary Pharmacology and Therapeutics. 2005;22:495-512.
- Beerens H. Detection of bifidobacteria by using propionic acid as selective agent. Applied and Environment Microbiol. 1991;57: 2418-9.
- Silvi S, Rumney CJ, Rowland IR. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. J Appl Bacteriol. 1996;81:561-4.
- Methodological guidelines "Opredelenie kolichestva bifidobakterii v kislomolochnykh produktakh. MUK 4.2.999-00". Moscow, 2000. (In Russian).
- Magradze EI, Shubina IV, Semakina SA, Markov VN. The dynamics dependence of *Escherichia coli* bacteria growth on conditions of the preliminary joint cultivation with *Bifidobacterium bifidum* bacteria. The Bulletin of Udmurt University. 2005;10:57-64. (In Russian).
- Domotenko LV, Shepelin AP. Bifidum-medium for isolation and cultivation of bifidobacteria. Russian Journal of Infection and Immunity. 2014;4(3):279-83. (In Russian).
- Bondarenko VM. Molecular-and-genetic and molecular-and-biological studies of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* representatives. Annals of the Russian academy of medical sciences. 2006;1:18-24. (In Russian).
- Vahabnezhad E, Mochon AB, Wozniak LJ, Ziring DA. Lactobacillus bacteremia associated with probiotic use in a pediatric patient with ulcerative colitis. J Clin Gastroenterol. 2013;47(5):437-9.

18. Priputnevich TV, Melkumyan AR, Ankirskaya AS, Trofimov DYu, Muraveva VV, Zavyalova MG. Use of modern laboratory technologies in specific identification of lacto bacteria for macrobiotic vaginas assessment in reproductive age women. *Obstetrics and Gynecology*. 2013;1:76-80. (In Russian).
19. Domotenko LV, Shepelin AP, Detushev KV. Comparative trials of Lactobacagar and MRS agar. *Man and his health*. 2014;4:5-10. (In Russian).
20. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009;155:1749-57.
21. Domig KJ, Mayer HK, Kneifel W. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp.: 1. Media for isolation and enumeration. *Int J Food Microbiol*. 2003;88:147-64.
22. Weiss A, Domig KJ, Kneifel W. Selective Media for Enumeration of Probiotic Enterococci. *Food Technology and Biotechnology*. 2005;43(2):147-55.
23. Mironenko LG, Peretyatko EG. Biologicheskie svoystva muzeinykh shtammov mikroorganizmov roda *Enterococcus*. *Mikrobiologiya*. 2014;4(4):204-6.
24. Andrianova IV, Vakhrushev SG, Kashirtseva IA, Kazakova OE. Research of children's nasopharynx chronic adenoiditis microbiota composition with the use of method mass spectrometric by microbial markers. *Rossiyskaya rinologiya*. 2014;22(1):16-9. (In Russian).

Информация о соавторах:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, доктор биологических наук, заместитель директора по научно-производственной деятельности ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0020

Морозова Татьяна Павловна, научный сотрудник ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Information about co-authors:

Anatoly P. Shepelin, Sc.D. (Bio.), Deputy Director for science and production, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
 Address: SRCAMB, 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0020

Tatiana P. Morozova, Researcher, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rospotrebnadzor
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Боксы ламинарные микробиологической безопасности серии ЛБ



Назначение

Ламинарные боксы предназначены для лабораторной практики в медицинских, фармацевтических, микробиологических и других учреждениях с высокими требованиями к чистоте воздуха в локальной антибактериальной зоне. Боксы по степени антибактериальной защиты относятся к **классу II (тип A2)**: защита продукта, оператора и окружающей среды.

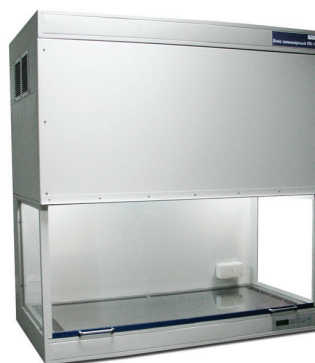
Область применения

Согласно требованиям СП 1.3.2322-08, СП 1.3.2518-09 и СП 1.3.1285-03 боксы могут применяться для оснащения учреждений, работающих с микроорганизмами III - IV групп патогенности (вирусологические и бактериологические лаборатории).

Классификация

Серия ЛБ включает в себя ламинарные боксы ЛБ-1 (ЛБ-1К) и ЛБ-2 (ЛБ-2К), отличающиеся габаритами рабочей зоны и способом управления.

РУ № ФСР 2012/13215 от 19.03.2012 г.



Бокс ламинарный ЛБ-1К



Бокс ламинарный ЛБ-1



Модель	ЛБ - 1	ЛБ - 2	ЛБ - 1К	ЛБ - 2К
Управление	Аналоговое	Аналоговое	Контроллер (шильд - панель)	Контроллер (шильд - панель)
Внешние размеры (ВхШхГ), мм	1270x1200x670	1270x1800x670	1270x1200x670	1270x1800x670
Размеры рабочей зоны (ВхШхГ), мм	630x1160x570	630x1760x570	630x1160x570	630x1760x570
Вес, кг	120	160	120	160
Электропитание, В/Гц	220/50	220/50	220/50	220/50

ООО фирма «Проинтех» 142290 Московская обл. г. Пущино, ул. Строителей д.5.
 Сайт www.pit-bio.ru. Электронная почта vth@mail.ru.
 Т./ф. +7(4967) 73-50-43. М./т. +7(916) 980-79-03.

Комбинация свойств микроорганизмов – новый подход к созданию биопрепаратов для растениеводства

Л.В.Коломбет, И.А.Дунайцев, С.К.Жиглецова

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

В результате скрининга микроорганизмов, обладающих способностью высвобождать фосфор и подавлять рост фитопатогенов, выбраны штамм *Pseudomonas sp.*181a и №16 *Trichoderma asperellum* GJS 03-35, сочетание которых в биопреparate эффективно снижает заболеваемость пшеницы фузариозом колоса, увеличивает урожайность, снижает содержание микотоксина дезоксиниваленола в зерне. Проведены вегетационные лабораторные и полевые испытания экспериментальных образцов биопрепаратов, доказывающие, что совместное применение штаммов №16 *T. asperellum* и *Pseudomonas sp.*181a может быть признано перспективным биологическим средством для борьбы с фузариозом колоса пшеницы и для улучшения фосфорного питания, способствующим оздоровлению ризосферной зоны растений.

Ключевые слова: биопрепараты, фосфатрастворяющие микроорганизмы (ФРМ), фунгициды, фузариоз, комбинированный биопрепарат, вегетационные лабораторные и полевые испытания

Для цитирования: Коломбет Л.В., Дунайцев И.А., Жиглецова С.К. Комбинация свойств микроорганизмов – новый подход к созданию биопрепаратов для растениеводства. Бактериология. 2016; 1(1): 54–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61

Combined properties of microorganisms – new approach to designing bioformulations for plant growing

L.V.Kolombet, I.A.Dunaitsev, S.K.Zhigletsova

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

Screening of microorganisms releasing phosphorus and inhibiting the growth of phytopathogens has resulted in selecting strains *Pseudomonas sp.*181a and No. 16 *Trichoderma asperellum* GJS 03-35 which when combined as a single bioformulation decrease efficiently wheat fusarium head blight, increase productivity wheat, and decrease desoxynivalenol mycotoxin content in grain. Experimental bioformulations have been tested both in laboratory and field conditions. It has been proved that the concurrent application of strains No.16 *T. asperellum* and *Pseudomonas sp.*181 is a promising remedy to control wheat fusarium head blight and to stimulate phosphorus nutrition for sanitation of plant rhizosphere.

Key words: biocontrol agents, fungicides, phosphate solubilization microorganisms (PSM), fusarium head blight, the combined biological product, vegetative laboratory and field tests

For citation: Kolombet L.V., Dunaitsev I.A., Zhigletsova S.K. Combined properties of microorganisms – new approach to designing bioformulations for plant growing. Bacteriology. 2016; 1(1): 54–61. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-54-61

В конце 60-х годов прошлого столетия казалось, что появление на рынке новых, высокоэффективных химических пестицидов решит все проблемы, связанные с защитой растений. Тем не менее, «как гром среди ясного неба» грянула весть о том, что некоторые «суперхимикаты» становятся неэффективными, поскольку возбудители болезней, адаптируясь к ним, приобретают резистентность. Это приводило к увеличению применяемых доз пестицидов, что, в конечном счете,

было бесперспективно и наносило сокрушительный удар по окружающей среде. Начались поиски альтернативных методов защиты растений от болезней и вредителей. В этом не было особой новизны, просто «химический период» продолжался слишком долго, что затормозило развитие иных подходов.

Средства защиты растений от болезней и вредителей, а также подходы к повышению плодородия почв сегодня тесно связаны с применением микроорганизмов, способных про-

Для корреспонденции:

Коломбет Любовь Васильевна, доктор биологических наук, заведующая научной частью ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии

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

Статья поступила 01.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Love V. Kolombet, Sc.D. (Bio.), scientific secretary, head of science department, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

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

The article was received 01.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

дуцировать фитогормоны, антибиотики, ферменты, а также метаболиты, участвующие в балансе минералов, необходимых для питания и поддержания системного иммунитета растения [1, 2]. Одним из необходимых растениям минералов является, в частности фосфор, и стоит проблема перевода его из нерастворимой формы в растворимое биодоступное состояние, в том числе с помощью микроорганизмов [3].

Если в качестве микроорганизмов, растворяющих фосфатную руду собственными метаболитами, будут использованы антагонисты патогенов сельскохозяйственных культур, то одновременно может осуществляться борьба и с болезнями растений.

Продовольственная и экологическая безопасность РФ обеспечивается эффективными мерами по повышению урожайности сельскохозяйственных культур при сохранении биоразнообразия окружающей нас природы. Пшеница, являясь одной из основных зерновых культур, поражается грибами рода *Fusarium* (фузариоз зерна) [4], что приводит к значительным потерям урожая, кроме того, зерно оказывается зараженным микотоксинами [5], представляющими серьезную опасность для теплокровных животных и человека [6, 7]. Биологические средства для борьбы с заболеваниями растений и улучшения плодородия почв могут быть созданы на основании разработки инновационной технологии совмещения двух полезных функций в составе одного препарата.

Целью исследования явилась разработка подходов к созданию биологического препарата, способного подавлять рост фитопатогенов и одновременно повышать в почве доступность фосфора, необходимого для поддержания жизнедеятельности растений.

Материалы и методы

Объектами исследования явилась коллекция фосфатрастворяющих микроорганизмов (ФРМ) родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Klebsiella* и мицелиальные грибы, в основном, родов *Aspergillus* и *Penicillium*, выделенные из различных экологических ниш в процессе 15 экспедиций в различные регионы РФ и СНГ, в количестве 640 высокоактивных изолятов [8–10]. Динамику выхода фосфора в раствор и окисления глюкозы изучали под действием штамма *Pseudomonas fluorescens* P469 [11] и штамма *Burkholderia cepacia* E-37, являющегося одним из самых активных фосфатрастворяющих (ФР) штаммов [12], который был любезно передан в ГНЦПМБ д-ром R.D. Rogers (INL, Айдахо, США) [9]. Исследовали продуцент препарата Микол – штамм №16 *Trichoderma asperellum* GJS 03-35 [13] и продуцент препарата Бактофит – *Bacillus subtilis* ИПМ 215 [14]. В качестве тест-объектов использовали три фитопатогенных вида грибов рода *Fusarium* из коллекции ФБУН ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск) и Всероссийского института защиты растений (Санкт-Петербург) [15].

Предварительный скрининг высвобождающих фосфаты микроорганизмов проводили на плотной питательной среде по наличию зон просветления в агаре, содержащем суспензию трикальцийфосфата (ТКФ) и в жидких минеральных средах с использованием различных источников углерода [16].

Оценку эффективности совместного действия штаммов №16 *T. asperellum* и *Pseudomonas sp.* 181a выполняли на проростках пшеницы методом «рулонов», согласно ГОСТ 12044-93. Химические фунгициды *Максим экстрим* (1,5 л/т), *Витал ТТ* и *Фликур* использовали как контроли и эталоны сравнения. Фитотоксичность штаммов для проростков пшеницы изучали, как описано [17].

Методика приготовления образцов биопрепаратов и проведения лабораторного и полевого вегетационных опытов описана в [18, 19].

Результаты и обсуждение

В процессе скрининга коллекции выявили, что культуры микроорганизмов, обладающие фосфатрастворяющей способностью, относились к различным таксономическим группам: около четверти из них составляли грамположительные бациллы и кокки, более 20% – дрожжевые культуры, остальные – ФРМ-грамотрицательные бактерии. Более 50 перспективных ФРМ идентифицировали по культурально-морфологическим и биохимическим признакам. Наиболее активными ФРМ оказались представители родов *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Azotobacter*.

Общепринято, что основным механизмом растворения минеральных фосфатов микроорганизмами является действие органических кислот, которые образуются из углеродного субстрата [3]. Образование органических кислот приводит к снижению pH среды, и фосфор переходит в водорастворимое состояние из минеральных фосфатов путем замещения иона кальция на ионы водорода.

Механизм высвобождения фосфатов из модельного фосфорсодержащего сырья (ТКФ) изучали на штамме *Burkholderia cepacia* E-37. Оказалось, что повышение концентрации глюкозы увеличивает растворимость фосфора за счет образования кислых продуктов: максимумы растворенного фосфора совпадают с минимумами pH при всех трех исследованных концентрациях глюкозы (0,15%; 0,3% и 0,6%). При этом величина перешедшего в раствор фосфора и время достижения максимума увеличиваются прямо пропорционально концентрации глюкозы. Аналогичные зависимости наблюдали при изучении ФР-свойств и у выделенных наиболее активных изолятов. При использовании вместо глюкозы других углеводов в тех же условиях наблюдали более низкий выход фосфора в раствор, что согласуется с данными других исследователей [20].

Газохроматографический анализ, проведенный для штамма *B. cepacia* E-37 и 96 активных ФРМ, подтвердил, что основными продуктами метаболизма, осуществляющими растворение фосфатов, являются органические кислоты. У штамма *B. cepacia* E-37 и наиболее активных выделенных изолятов обнаружили, в основном, глюконовую и кетоглюконовую кислоты одновременно. Эти результаты подтверждают имеющиеся в литературе сведения о том, что глюконовая и кетоглюконовая кислоты являются наиболее распространенными медиаторами процесса высвобождения фосфатов под действием микроорганизмов [12, 21].

Динамика выхода фосфора в раствор и окисления глюкозы под действием штамма *Pseudomonas fluorescens* P469 представлена на рисунке 1. Штамм *P. fluorescens* P469

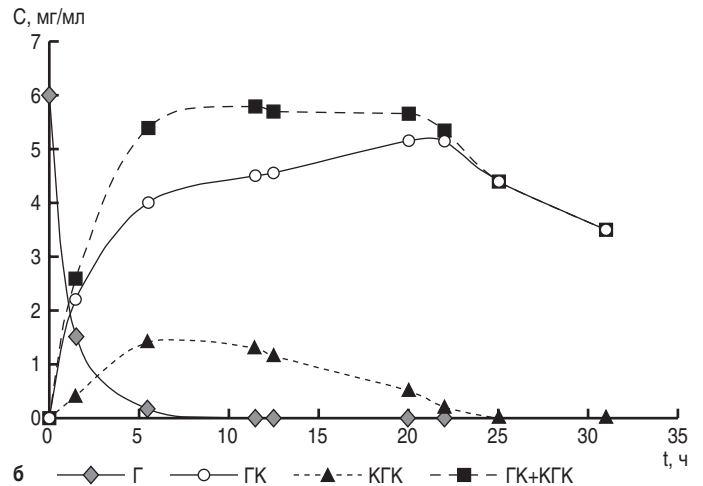
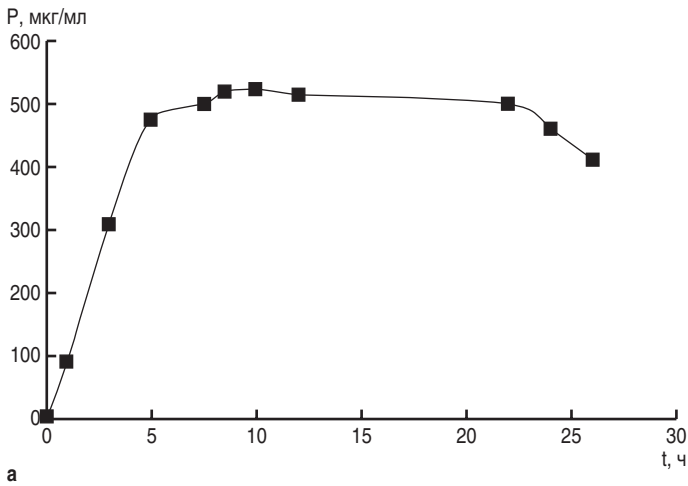


Рис. 1. Динамика растворения фосфатов (а) и содержания глюкозы (Г), глюконовой (ГК), кетоглюконовой (КГК) и суммы этих кислот (ГК+КГК) (б) в среде при культивировании штамма *P. fluorescens* P469.

запатентован в качестве продуцента препарата против болезней растений, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями.

Оказалось, что динамика накопления фосфора в среде под действием штамма *P. fluorescens* P469 такая же, как и для *B. seraciac* E-37, и практически совпадает с накоплением суммы глюконовых кислот.

Таким образом, наиболее активные ФРМ, такие как *P. fluorescens* P469, *Pseudomonas sp.* 181a [22], *Acinetobacter sp.* 305 [23], а также *B. seraciac* E-37 почти стехиометрически окисляют глюкозу последовательно до соответствующих кислот, что подтверждает предположение Голдштейна [12] о том, что наиболее эффективный механизм высвобождения фосфора из нерастворимого минерального сырья реализуется бактериями через образование глюконовой и кетоглюконовой (и иногда дикетоглюконовой) кислот в результате прямого, практически полного, окисления глюкозы и последующего растворения ТКФ.

В процессе скрининга фосфатрастворяющие свойства впервые обнаружили у грибного штамма *Trichoderma aspe-*

rellum, хотя у представителей других видов этого рода они были описаны ранее [24].

Динамика перехода фосфора в раствор из ТКФ под действием штамма № 16 *T. asperellum* GJS 03-35 в зависимости от состава среды представлена на рисунке 2а. В опыте варьировали исходную концентрацию углеводов (глюкозы и сахарозы): 10, 20 и 30 г/л, а исходные концентрации остальных компонентов не изменяли. Растворение ТКФ под действием штамма № 16 *T. asperellum* GJS 03-35 наблюдали только в средах, содержащих глюкозу и аммонийный азот. Одновременно с определением содержания фосфора в растворе измеряли pH (рис. 2б).

Очевидно, растворение ТКФ под действием штамма №16 *T. asperellum* GJS 03-35 происходит за счет снижения pH. Способность грибов рода *Trichoderma* растворять ТКФ, по литературным данным, значительно варьирует [25–27]. Наиболее активно растворяют фосфаты грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus* [28].

Таким образом, штамм №16 *T. asperellum* GJS 03-35, при концентрации глюкозы 10 г/л переводящий в раствор макси-

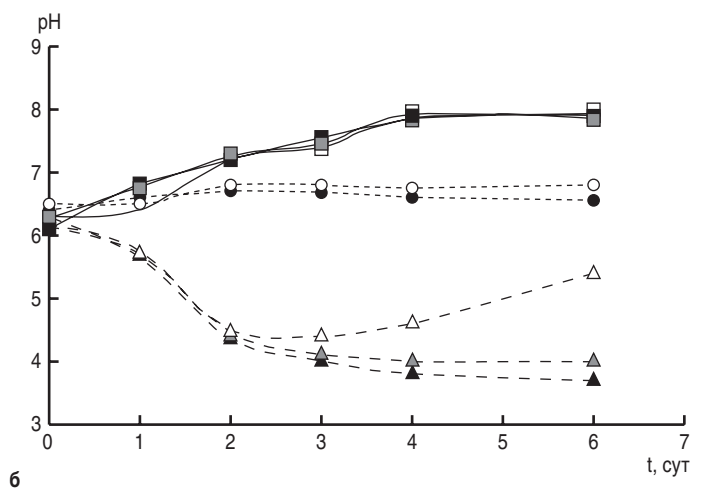
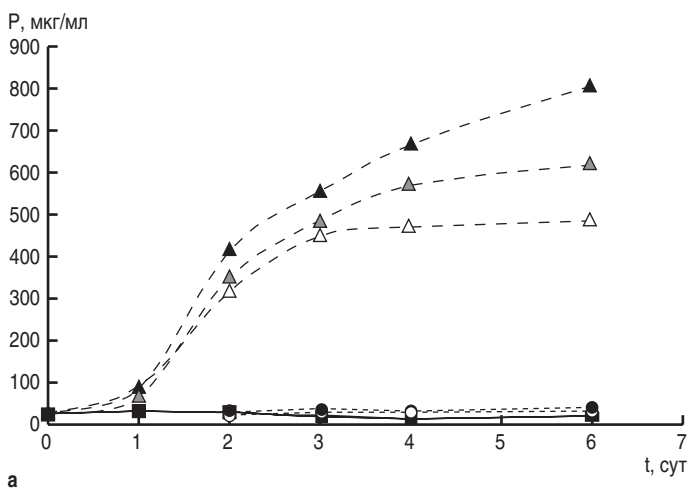


Рис. 2. Динамика перехода фосфора в растворимое состояние из $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (а) и изменение pH в процессе растворения ТКФ (б) под действием штамма №16 *T. asperellum* GJS 03-35 в зависимости от состава среды.

мально 425 мкг/мл фосфора (рис. 2а), проявляет довольно высокую ФР-активность по сравнению с другими грибами рода *Trichoderma* при сходных условиях.

Проведенные исследования механизма растворения фосфатов показали, что процесс высвобождения фосфора из минерального сырья под действием микроорганизмов обусловлен участием органических кислот (прежде всего, глюконовой и кетоглюконовой) и другими факторами, основным из которых является, по-видимому, выброс протонов при поглощении клетками иона аммония. Природа этого явления до конца не выяснена так же, как и для многих других микроорганизмов, для которых не наблюдается соответствия уровня продукции кислот и количества растворенного фосфора.

Изучение фосфатсольюбилизирующих свойств микроорганизмов позволило выбрать в качестве перспективных для создания препаратов следующие изоляты природного происхождения: *Acinetobacter sp.* 305, *Pseudomonas sp.* 181a, *P. chlororaphis* Vsk 26a, *P. fluorescens* 469, *B. subtilis* ИПМ 215, №16 *T. asperellum* GJS 03-35, которые относятся к родам, представители которых способны производить широкий спектр антибиотических средств, гормонов, сурфактантов и метаболитов, имеющих перспективу практического использования в борьбе с болезнями растений и в частности с возбудителями заболеваний грибной природы.

Идея использования микроорганизмов, проявляющих антагонистические свойства по отношению к патогенам растений и одновременно высвобождающих фосфаты из минерального сырья, высказывалась и ранее [29], однако практического воплощения эта идея до сих пор не получила.

В связи с этим оценили способность выбранных бактериальных штаммов, активно растворяющих фосфаты, ингибировать возбудителей фузариоза зерновых культур.

Из 116 изолятов ФРМ 21 проявили антагонистическую активность к трем видам грибов рода *Fusarium*: *F. culmorum*; *F. sporotrichioides* и *F. graminearum* (таблица).

Высокая доля бактерий-антагонистов (37%), очевидно, обусловлена тем, что большинство фосфатрастворяющих видов микроорганизмов выделили из ризосферной зоны растений и бедных по питательным веществам экологических ниш (эрозионные минеральные породы, скалы, пещерные наслоения), где конкуренция среди микроорганизмов очень высока. Наиболее высокую активность против всех трех патогенов растений (на уровне активности штамма *B. subtilis* ИПМ 215) показали бактерии рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, а также штамм №16 *T. asperellum* GJS 03-35.

Однако все активные бактерии (и грибной штамм) – антагонисты фитопатогенов имели сравнительно низкую фосфатрастворяющую активность – менее 40% от максимальной [16].

Таким образом, найти микроорганизм, одновременно обладающий максимально высокой ФР-активностью и высокой активностью в отношении фитопатогенов, не удалось. Поэтому для создания биопрепарата, обладающего высокой ФР- и фунгицидной активностью, подобрали комбинацию двух микроорганизмов, каждый из которых имел высокий уровень одного из вышеуказанных свойств.

С целью создания эффективной смеси микроорганизмов с повышенной ФР- и антифитопатогенной активностью использовали штамм №16 *Trichoderma asperellum* GLS 03-35, на основе которого разработан препарат Микол [13]. Поскольку штамм №16 *T. asperellum* GLS 03-35 обладает высокой антагонистической активностью и средними ФР-свойствами, то представляло интерес найти совместимый с ним бактериальный штамм с высокими ФР-свойствами, обладающий также и антагонистической активностью.

Оказалось, что штамм №16 *T. asperellum* GLS 03-35 подавляет рост некоторых активных ФРМ (Kav 179 и Vsk 35)

Таблица. Антагонистическая активность фосфатрастворяющих микроорганизмов по отношению к фитопатогенам, вызывающим фузариоз колоса зерновых культур

Обозначение штамма	Вид микроорганизма	Возбудитель ФК		
		<i>F. graminearum</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>F. sporotrichioides</i>
Hor 7	<i>Pseudomonas sp.</i>	++	++	++
Lev 16	<i>Candida lambica</i>	+	+	+
Kav 56a	Не идентифицирован	++	++	++
Kav 88b	<i>Bacillus sp.</i>	+++	++	++
Kav 170	<i>Pantoea agglomerans</i>	+	+	+
Kav 171	<i>Klebsiella oxytoca</i>	++	++	+
Kav 179	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
Kav 203	Не идентифицирован	++	+	++
Kav 220	<i>Enterobacter cloacae</i>	++	++	++
Kav 243	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
Kav 305	<i>Acinetobacter sp.</i>	++	+++	+++
Kri 163	<i>Bacillus sp.</i>	++	++	++
Kri 181a	<i>Pseudomonas sp.</i>	+++	++	++
Kri 201	<i>Enterobacter cloacae</i>	+	+	+
Krm 132	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	++
Lhv 716	<i>Bacillus megaterium</i>	+++	+++	++
Lhv 97	<i>Bacillus sp.</i>	+++	+++	++
Lhv 98a	<i>Bacillus megaterium</i>	+++	+++	+++
Vsk 26a1	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++
Vsk 26a3	<i>Pseudomonas sp.</i>	+++	++	++
Vsk 35	<i>Bacillus sp.</i>	+++	++	+++
ИПМ 215	<i>Bacillus subtilis</i>	+++	+++	+++
№16	<i>T. asperellum</i>	+++	+++	+++

Примечание: + наличие зоны угнетения роста мицелия гриба в месте соприкосновения с бактериальным штрихом; ++ обширная зона угнетения роста мицелия гриба не только в месте соприкосновения с бактериальным штрихом, но и в сопредельной области; +++ наличие зоны лизиса между штаммами.



Рис. 3. Оценка совместимости ФРМ-антагонистов фитопатогенов со штаммом №16 *Trichoderma asperellum* GJS 03-35.

(рис. 3). Четыре штамма ФРМ (Lhv 71b, Vsk 26a1, Vsk 26a3, Krm 132), наоборот, подавляли или значительно угнетали рост гриба. Не оказывали значительного угнетающего действия на *T. asperellum* и не подавлялись ею семь исследованных ФРМ – Hor 7, Kav 56a, Kav 170, Kav 220, Kav 305, Krl 181, Lev 16.

Скрининг на фитотоксичность для растений выявил один изолят, достоверно стимулирующий рост проростков пшеницы – а именно, штамм *Pseudomonas sp.* 181a (Krl 181a).

Поскольку штамм *Pseudomonas sp.* 181a обладает ФР-активностью на уровне максимальных значений [12], его выбрали для совместного использования со штаммом №16 *T. asperellum* GJS 03-35 с целью изучения возмож-

ности создания на их основе комплексного препарата для повышения урожайности пшеницы и борьбы с фузариозами. В лабораторных условиях приготовили экспериментальные образцы на основе грибного и бактериального штаммов. Анализ эффективности комбинаций оценили по морфометрическим показателям проростков пшеницы (длина coleoptили и семядольного листа, длина и количество первичных корней) после обработки экспериментальными образцами. Оказалось, что комбинация №16 *T. asperellum*, 1 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 3,0 л/т; и №16 *T. asperellum*, 2 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 1,5 л/т обладает достоверно выраженным ростстимулирующим эффектом (рис. 4).

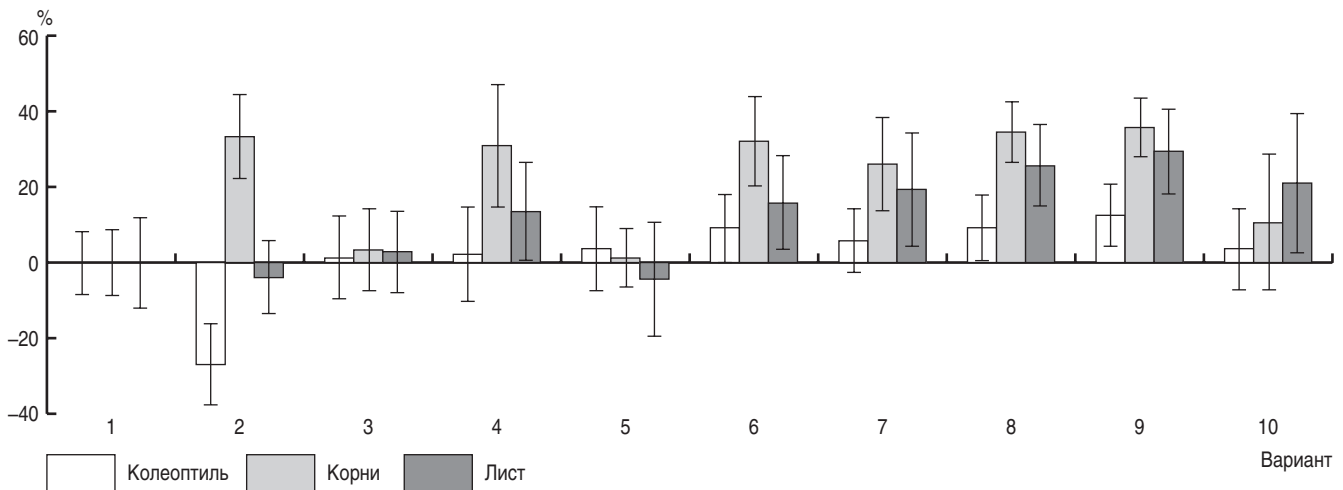


Рис. 4. Относительный рострегулирующий эффект протравителей на проростки семян пшеницы: 1 – контроль; 2 – максим экстрим, 1,5 л/т; 3 – №16 *T. asperellum*, 1 л/т; 4 – №16 *T. asperellum*, 2 л/т; 5 – *Pseudomonas sp.* 181a, 1,5 л/т; 6 – *Pseudomonas sp.* 181a, 3,0 л/т; 7 – №16 *T. asperellum*, 1 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 1,5 л/т; 8 – №16 *T. asperellum*, 1 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 3,0 л/т; 9 – №16 *T. asperellum*, 2 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 1,5 л/т; 10 – №16 *T. asperellum*, 2 л/т + *Pseudomonas sp.* 181a, 3,0 л/т.

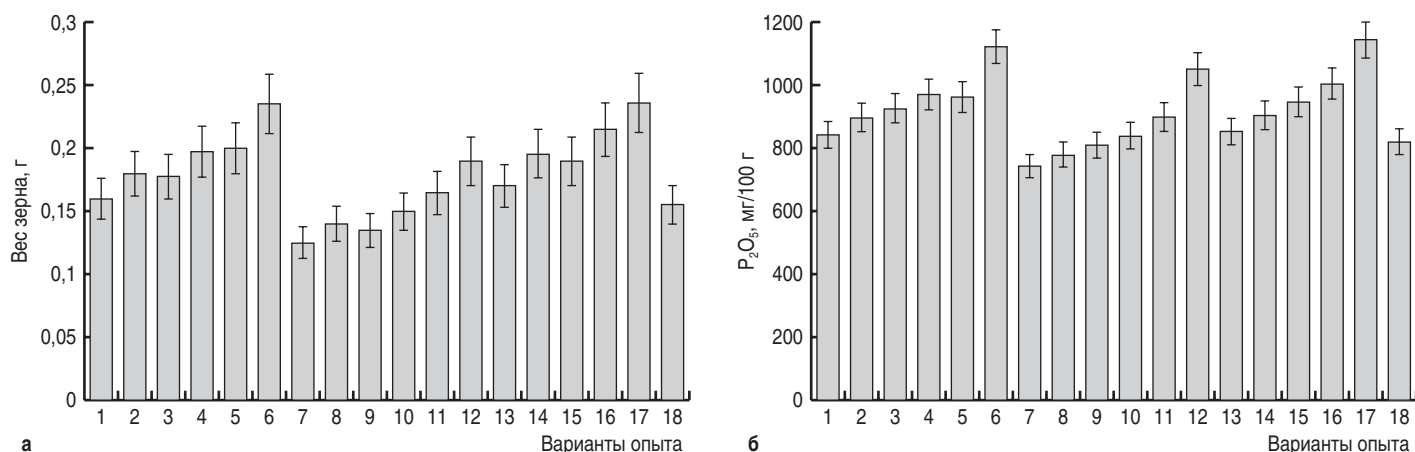


Рис. 5. Характеристика урожая пшеницы (в расчете на одно растение) в лабораторном эксперименте: а – вес зерен; б – содержание фосфора (P₂O₅).

Варианты опыта: 1-5, 7-11 и 13-16 в почву внесена фосфоритная руда; 6, 12 и 17 внесен суперфосфат; 1-6 – инфицирование *F. graminearum* семян пшеницы; 7-12 – инфицирование *F. graminearum* колосьев пшеницы; 13-18 – инфицирования нет; 2, 8, 14 – обработка семян *T. asperellum*; 3, 9, 15 – внесение в почву *Pseudomonas sp. 181a*; 4, 10, 16 – обработка семян *T. asperellum* и внесение в почву *Pseudomonas sp. 181a*, а также обработка колосьев во время цветения *T. asperellum*; 5, 11 – обработка семян *T. asperellum* и внесение в почву *Pseudomonas sp. 181a*, а также обработка колосьев во время цветения *T. asperellum*; 6 и 12 – обработка химическими фунгицидами: семян – препаратом Виал ТТ и колосьев – препаратом фоликур; вариант 18 – контроль без обработок и добавок.

Одной из основных характеристик эффективности применения препаратов является урожайность. В лабораторных вегетационных испытаниях на пшенице оценили массу зерна с одного растения (рис. 5а) и накопление фосфора в зерне (рис. 5б).

Оказалось, совместное применение экспериментальных образцов биопрепарата в лабораторных экспериментах привело к аддитивному эффекту по признаку урожайности. Кроме того, комплексная предпосевная обработка биопрепаратами обеспечила накопление фосфора в зерне до уровня 80–86% от содержания фосфора в вариантах с применением двойного суперфосфата.

В лабораторных экспериментах наблюдали снижение степени развития болезни и содержания микотоксина дезоксиневаленола в зерне после обработки комплексным биопрепаратом по сравнению с другими вариантами обработки.

Таким образом, по результатам лабораторных испытаний совместное применение *T. asperellum* и *Pseudomonas sp. 181a* может быть признано перспективным средством для борьбы с фузариозом колоса пшеницы и улучшения фосфорного питания.

Вегетационные полевые испытания проводили на опытном поле отдела селекции и семеноводства ГНУ «Рязанский НИИ сельского хозяйства» на яровой пшенице [17].

В целом, при искусственном заражении колосьев совместная обработка биопрепаратами позволила снизить заболеваемость пшеницы фузариозом колоса, потери зерна от развития *F. graminearum* почти в 3 раза, улучшить показатели качества зерна (содержание белка).

Таким образом, по результатам лабораторных и полевых испытаний совместное применение штаммов №16 *T. asperellum* и *Pseudomonas sp. 181a* может быть признано перспективным биологическим средством для борьбы с фузариозом колоса пшеницы и для улучшения фосфорного питания, способствующим оздоровлению ризосферной зоны растений.

В целом проведенные исследования показали, что использование биологических средств, предусматривающих целевое применение почвенных микроорганизмов, может позволить не только поднять плодородие почв, повысить количество и качество продовольствия, но и сохранить среду обитания человека за счет отказа или снижения доз используемых химических удобрений и пестицидов.

Исследование выполнили в рамках Отраслевой программы Роспотребнадзора «Научные исследования и разработки с целью обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия и снижения инфекционной заболеваемости в Российской Федерации» (на 2011–2015 гг.).

Литература

1. Глик Б, Пастернак Дж. Молекулярная биотехнология. Принципы и применение. М.: Мир, 2002.
2. Kim BH, Gadd GM. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge University Press, 2008.
3. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 1999;17:319-39.
4. Miller JD, Apsimon JW, Blackwell BA, Greenhalgh R, Taylor A. Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2001; pp. 310-320.
5. Levitin M. Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals grain and food in Russia. An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 2004; pp. 195-199.
6. Forsyth OM, Yoshizawa T, Morooka N, Tuite J. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. Appl Environ Microbiol. 1977;34:547-52.
7. Miller JD, Richardson SN, McMullin DR, Falardeau J. Literature review on deoxynivalenol, zearalenone, T-2/H-T2 toxins, fumonisins and the fungi that produce them in Canada with a commentary on *Alternaria alternata* toxins in grains and the potential for *Aspergillus flavus* to become a problem in Ontario corn. Carleton University, Ottawa, 2013; 233 p.
8. Dunaytsev IA, Zhigletsova SK, Klykova MV, Kondrashenko TN, Aitov RS, Boyko AS, et al. Screening phosphate solubilizing microorganisms and quantitative

- evaluation of their efficacy. Proceedings of 3rd International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum. Uberlandia (Brazil), 2006: pp. 240-241.
9. Dunaytsev IA, Zhigletsova SK, Aitov RS, Klykova MV, Kondrashenko TN, Baranov AM, et al. SRCAMB collection of phosphate solubilizing microorganisms as a long-term bioresource. Proceedings of the 12th International Conference on culture collections. 26 September–01 October 2010. Florianopolis, Brazil: 19-20.
 10. Дунайцев ИА. Выделение фосфатсольбилизирующих микроорганизмов и изучение возможности их использования в промышленности и сельском хозяйстве. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03. Оболенск, 2010.
 11. Патент 2235771 Российская Федерация, МПК C12N1/20, A01N63/00. Штамм *Pseudomonas fluorescens* P469 для получения препарата против болезней растений, вызываемых фитопатогенными грибами и бактериями. Асланян Е.М., Галкина Н.Н., Добрица А.П., Коломбет Л.В., Корецкая Н.Г., Кочетков В.В.; заявитель и патентообладатель ФГУП «Государственный научный центр прикладной микробиологии». – №2002112565/13; заявл. 13.05.2002; опубл. 20.04.2004, Бюл. № 25. 8 с.
 12. Goldstein AH. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. Development in Plant and Soil Sciences. 2007; 102:91-6.
 13. Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Дербышев ВВ, Ежов ДВ, Косарева НИ, Быстрова ЕВ. Микофунгицид – препарат на основе *Trichoderma viride* для борьбы с болезнями растений. Прикладная биохимия и микробиология. 2001;37(1):110-4.
 14. Патент 2019966 Российская Федерация, МПК A01N63/00. Препарат для защиты растений от болезней. Галкина Н.Н., Тур А.И., Жиглецова С.К., Дорогойченко Н.И.; заявитель и патентообладатель Всесоюзный научно-исследовательский институт прикладной микробиологии – №5013323/13; заявл. 24.07.91; опубл. 30.09.94, Бюл. № 18. 7 с.
 15. Zhigletsova SK, Dunaytsev IA, Kolombet LV, Klykova MV, Kondrashenko TN, Starshov AA, et al. Development of microbiological phosphate fertilizer with fungicidal activity. Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety. 2012;6(2):100-8. Available at: <http://www.science-journals.eu>.
 16. Дунайцев ИА, Коломбет ЛВ, Жиглецова СК, Быстрова ЕВ, Бесаева СГ, Клыккова МВ, и др. Фосфатмобилизирующие микроорганизмы – антагонисты фитопатогенов. Микология и фитопатология. 2008;42(3):264-9.
 17. Старшов АА, Коломбет ЛВ, Дунайцев ИА, Жиглецова СК, Клыккова МВ, Кондрашенко ТН, и др. Использование фосфатрастворяющих и фунгицидных свойств микроорганизмов для улучшения фосфорного питания и защиты зерновых культур от фузариоза колоса. Современная микология в России. Т. 3. Материалы 3-го Съезда микологов России, 10-12 октября 2012 г. М.: Национальная академия микологии, 2012; 354-355.
 18. Жиглецова СК, Дунайцев ИА, Бесаева СГ. Возможности применения микроорганизмов для решения задач экологической и продовольственной безопасности. Агрохимия. 2010;6:83-96.
 19. Жиглецова СК, Старшов АА, Клыккова МВ, Кондрашенко ТН, Антошина ОА, Дунайцев ИА, и др. Совместное использование микроорганизмов с фосфатрастворяющими и фунгицидными свойствами для повышения урожайности и защиты зерновых культур от фузариозов. Агрохимия. 2015;7:49-57.
 20. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. Soil Biol Biochem. 1992;24:389-95.
 21. Hwangbo H, Park RD, Kim YW, Rim YS, Park KH, Kim TH. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. Current Microbiology. 2003;47:87-92.
 22. Патент 2451069 Российская Федерация. Фосфатрастворяющий штамм *Pseudomonas species* 181a с фунгицидными свойствами. Дунайцев И.А., Клыккова М.В., Кондрашенко Т.Н., Сомов А.Н., Старшов А.А., Аитов Р.С., Дятлов И.А.; опубл. 20.05.2012.
 23. Патент 2451068 Российская Федерация. Фосфатрастворяющий штамм *Acinetobacter species* с фунгицидными свойствами. Дунайцев И.А., Клыккова М.В., Кондрашенко Т.Н., Жиглецова С.К., Старшов А.А., Бойко А.С., Дятлов И.А. опубл. 20.05.2012.
 24. Altomare C, Norvell WA, Björkman T, Harman GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. Appl Environ Microbiol. 1999;65:2926-33.
 25. Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. Asian J Biochem Pharm Res. 2012;2:237-44.
 26. Sunantapongsuk V, Nakapraves P, Piriyaipin S, Manoch L. Protease production and phosphate solubilization from potential biological control agents *Trichoderma viride* and *Azomonas agilis* from vetiver rhizosphere. Int. Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok (Thailand) 16–20 October 2006. Thailand, 2006, pp. 1-4.
 27. Kapri A, Tewari L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. Brazilian J Microbiol. 2010;41(3):253-61.
 28. Whitelaw MA. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. Advances in Agronomy. 1999;69:99-151.
 29. Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva J. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. Appl Microbiol Biotechnol. 2006;71:137-44.

References

1. Glik B, Pasternak Dzh. Molekulyarnaya biotekhnologiya. Printsipy i primeneniye. Moscow: "Mir" Publ., 2002. (In Russian).
2. Kim BH, Gadd GM. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge University Press, 2008.
3. Rodríguez H, Fraga R. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. Biotechnology Advances. 1999;17:319-39.
4. Miller JD, Apsimon JW, Blackwell BA, Greenhalgh R, Taylor A. Deoxynivalenol: A 25 year perspective on a trichothecene of agricultural importance. Fusarium: Paul E. Nelson Memorial Symposium. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2001; pp. 310-320.
5. Levitin M. Toxigenic fungi and mycotoxins in cereals grain and food in Russia. An overview on toxigenic fungi and mycotoxins in Europe. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Acad. Publ., 2004; pp. 195-199.
6. Forsyth OM, Yoshizawa T, Morooka N, Tuite J. Emetic and refusal activity of deoxynivalenol to swine. Appl Environ Microbiol. 1977;34:547-52.
7. Miller JD, Richardson SN, McMullin DR, Falardeau J. Literature review on deoxynivalenol, zearalenone, T-2/H-T2 toxins, fumonisins and the fungi that produce them in Canada with a commentary on *Alternaria alternata* toxins in grains and the potential for *Aspergillus flavus* to become a problem in Ontario corn. Carleton University, Ottawa, 2013; 233 p.
8. Dunaytsev IA, Zhigletsova SK, Klykova MV, Kondrashenko TN, Aitov RS, Boyko AS, et al. Screening phosphate solubilizing microorganisms and quantitative evaluation of their efficacy. Proceedings of 3rd International Symposium on Phosphorus Dynamics in the Soil-Plant Continuum. Uberlandia (Brazil), 2006; pp. 240-241.
9. Dunaytsev IA, Zhigletsova SK, Aitov RS, Klykova MV, Kondrashenko TN, Baranov AM, et al. SRCAMB collection of phosphate solubilizing microorganisms as a long-term bioresource. Proceedings of the 12th International Conference on culture collections. 26 September–01 October 2010. Florianopolis, Brazil. pp. 19-20.
10. Dunaytsev IA. Vydeleniye fosfatsolyubiliziruyushchikh mikroorganizmov i izucheniye vozmozhnosti ikh ispol'zovaniya v promyshlennosti i sel'skom khozyaistve. Dissertation. Obolensk, 2010. (In Russian).
11. Patent 2235771 Russian Federation, МПК C12N1/20, A01N63/00. Shtamm *Pseudomonas fluorescens* P469 dlya polucheniya preparata protiv boleznei rastenii, vyzvaemykh fitopatogennymi gribami i bakteriyami. Aslanyan EM,

- Galkina NN, Dobritsa AP, Kolombet LV, Koretskaya NG, Kochetkov VV.; State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology. – №2002112565/13; zayavl. 13.05.2002; opubl. 20.04.2004, Byul. №25. (In Russian).
12. Goldstein AH. Future trends in research on microbial phosphate solubilization: one hundred years of insolubility. *Development in Plant and Soil Sciences*. 2007;102:91-6.
 13. Kolombet LV, Zhigletsova SK, Derbyshev VV, Ezhov DV, Kosareva NI, Bystrova EV. Studies of mycofungicid, a preparation based on *Trichoderma viride*, for plant infection control. *Applied Biochemistry and Microbiology*. 2001;37(1):110-4. (In Russian).
 14. Patent 2019966 Russian Federation, MPK A01N63/00. Preparat dlya zashchity rastenii ot boleznei. Galkina NN, Tur AI, Zhigletsova SK, Dorogoichenko NI.; State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology – №5013323/13; zayavl. 24.07. 91; opubl. 30.09. 94, Byul. №18. (In Russian).
 15. Zhigletsova SK, Dunaitsev IA, Kolombet LV, Klykova MV, Kondrashenko TN, Starshov AA, et al. Development of microbiological phosphate fertilizer with fungicidal activity. *Journal of International Scientific Publications: Ecology & Safety*. 2012;6(2):100-8. Available at: <http://www.science-journals.eu>.
 16. Dunaitsev IA, Kolombet LV, Zhigletsova SK, Bysirova EV, Besaeva SC, Klykova MV, et al. Phosphate releasing microorganisms with antagonistic activity against phytopathogenic microorganisms. *Mycology and Phytopathology*. 2008;42(3): 264-9. (In Russian).
 17. Starshov AA, Kolombet LV, Dunaitsev IA, Zhigletsova SK, Klykova MV, Kondrashenko TN, et al. Ispol'zovanie fosfatrastvoryayushchikh i fungitsidnykh svoystv mikroorganizmov dlya uluchsheniya fosfornogo pitaniya i zashchity zernovykh kul'tur ot fuzarioza kolosa. *Sovremennaya mikologiya v Rossii*. Proceedings of the 3rd Congress of mycologists, 10–12 Oct 2012. Moscow: Natsional'naya akademiya mikologii, 2012; pp. 354-355. (In Russian).
 18. Zhigletsova SK, Dunaitsev IA, Besaeva SG. Possibility of application of microorganisms for solving problems of ecological and food safety. *Agricultural Chemistry*. 2010;6:83-96. (In Russian).
 19. Zhigletsova SK, Starshov AA, Klykova MV, Kondrashenko TN, Antoshina OA, Dunaitsev IA, et al. The Combined application of microorganisms with phosphate solubilizing and fungicidal properties to increase yields and protect crops from fusariosis. *Agricultural Chemistry*. 2015;7:49-57. (In Russian).
 20. Illmer P, Schinner F. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem*. 1992;24:389-95.
 21. Hwangbo H, Park RD, Kim YW, Rim YS, Park KH, Kim TH. 2-Ketogluconic acid production and phosphate solubilization by *Enterobacter intermedius*. *Current Microbiology*. 2003;47:87-92.
 22. Patent 2451069 Russian Federation. Fosfatrastvoryayushchii shtamm *Pseudomonas* species 181a s fungitsidnymi svoystvami. Dunaitsev IA, Klykova MV, Kondrashenko TN, Somov AN, Starshov AA, Aitov RS, Dyatlov IA; opubl. 20.05.2012. (In Russian).
 23. Patent 2451068 Russian Federation. Fosfatrastvoryayushchii shtamm *Acinetobacter* species s fungitsidnymi svoystvami. Dunaitsev IA, Klykova MV, Kondrashenko TN, Zhigletsova SK, Starshov AA, Boiko AS, Dyatlov IA. opubl. 20.05.2012. (In Russian).
 24. Altomare C, Norvell WA, Björkman T, Harman GE. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth-promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:2926-33.
 25. Mahamuni SV, Wani PV, Patil AS. Isolation of phosphate solubilizing fungi from rhizosphere of sugarcane & sugar beet using TCP & RP solubilization. *Asian J Biochem Pharm Res*. 2012;2:237-44.
 26. Sunantapongsuk V, Nakapraves P, Piriyaipin S, Manoch L. Protease production and phosphate solubilization from potential biological control agents *Trichoderma viride* and *Azomonas agilis* from vetiver rhizosphere. *Int. Workshop on Sustained Management of the Soil-Rhizosphere System for Efficient Crop Production and Fertilizer Use, Bangkok (Thailand) 16–20 October 2006*. Thailand, 2006, pp. 1-4.
 27. Kapri A, Tewari L. Phosphate solubilization potential and phosphatase activity of rhizospheric *Trichoderma* spp. *Brazilian J Microbiol*. 2010;41(3):253-61.
 28. Whitelaw MA. Growth Promotion of Plants Inoculated with Phosphate-Solubilizing Fungi. *Advances in Agronomy*. 1999;69:99-151.
 29. Vassilev N, Vassileva M, Nikolaeva J. Simultaneous P-solubilizing and biocontrol activity of microorganisms: potentials and future trends. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;71:137-44.

Информация о соавторах:

Дунайцев Игорь Анатольевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Жиглецова Светлана Константиновна, кандидат химических наук, старший научный сотрудник отдела биологических технологий ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Information about co-authors:

Igor A. Dunaitsev, PhD, leading researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Svetlana K. Zhigletsova, PhD, senior researcher, Department of Biological Technology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-0003

Новый подход к высокочувствительной детекции летального токсина сибирской язвы на основе двойной амплификации сигнала

А.В.Козырь¹, М.А.Дроница², А.Е.Хлынцева¹, И.Г.Шемякин¹, А.В.Колесников^{1,3}

¹ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора, Оболенск, Российская Федерация

²ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН, Москва, Российская Федерация;

³ООО «Институт инженерной иммунологии», Московская область, п. Любучаны, Российская Федерация

Сибирская язва является особо опасной инфекцией животных и человека. Ранняя диагностика сибиреязвенной инфекции затруднена, поскольку первые симптомы заболевания являются неспецифическими и напоминают респираторные инфекции. Между тем, накопление в крови больного летального токсина приводит к высокой смертности заболевших даже при условии интенсивной антибиотикотерапии и стерилизации организма от возбудителя. Для предотвращения смертности от системной сибирской язвы необходимы новые методы ранней диагностики инфекции, способные детектировать низкие концентрации летального токсина в крови инфицированных. Нами разработан высокочувствительный метод детекции летального токсина, основанный на двухступенчатой амплификации сигнала с использованием сайт-специфической протеолитической активности летального фактора – эффекторного компонента летального токсина. Достигнутая чувствительность детекции летального фактора в плазме крови достигает 1 пикограмма на миллилитр образца крови, что позволяет использовать метод двойной амплификации для ранней клинической диагностики сибирской язвы.

Ключевые слова: детекция, летальный токсин, протеаза, амплификация, рекомбинантные белки, магнитная сепарация

Для цитирования: Козырь А.В., Дроница М.А., Хлынцева А.Е., Шемякин И.Г., Колесников А.В. Новый подход к высокочувствительной детекции летального токсина сибирской язвы на основе двойной амплификации сигнала. Бактериология. 2016; 1(1): 62–72. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-62-72

New approach to ultrasensitive detection of anthrax lethal toxin based on the double signal amplification

A.V.Kozyr¹, M.A.Dronina², A.E.Khlyntseva¹, I.G.Shemyakin¹, A.V.Kolesnikov^{1,3}

¹Institute of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation;

²M.M.Shemyakin & Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation;

³Lubychany Institute of Immunological Engineering, Lubychany Moscow Region, Russian Federation

Bacillus anthracis is Category A hazardous biological agent that causes anthrax. Systemic anthrax is highly lethal disease, which early symptoms are non-specific and flu-like. Lack of early distinct clinical manifestations greatly impedes timely anthrax diagnostics, and in the absence of early initiated treatment, accumulation of anthrax lethal toxin leads to poor prognosis even though the organism is already sterilized from the pathogen by massive antibiotic administration. New highly sensitive tools for specific early detection of lethal toxin are required for prevention of death due to systemic anthrax. Here we report development of highly sensitive detection technique, utilizing site-specific proteolytic activity of anthrax lethal factor along with two-step signal amplification. When coupled with the chemiluminescent signal readout, the assay sensitivity mounts up to 1 pictogram per mil of lethal factor present in blood samples. The developed double signal amplification technique can be adapted for early clinical diagnostics of systemic anthrax.

Key words: detection, lethal toxin, protease, amplification, recombinant proteins, magnetic separation

For citation: Kozyr A.V., Dronina M.A., Khlyntseva A.E., Shemyakin I.G., Kolesnikov A.V. New approach to ultrasensitive detection of anthrax lethal toxin based on the double signal amplification. Bacteriology. 2016; 1(1): 62–72. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-62-72

Для корреспонденции:

Козырь Арина Владимировна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: AVKozyr@gmail.com

Статья поступила 25.05.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Arina V. Kozyr, PhD (biol.), senior researcher, Laboratory of Molecular Biology, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: AVKozyr@gmail.com

The article was received 25.05.2016, accepted for publication 15.08.2016

Сибирская язва – особо опасное инфекционное заболевание животных и человека. Возбудитель сибирской язвы, грамположительная палочка *Bacillus anthracis*, в неблагоприятных условиях формирует споры, устойчивые к экстремальным воздействиям, например, к кратковременному автоклавированию или облучению ультрафиолетом, и способные сохраняться в почве многие десятилетия. Высокая степень устойчивости спор патогена к внешним воздействиям и их способность существовать в неактивном состоянии многие годы крайне затрудняют полную элиминацию заболевания, поэтому основным методом борьбы со вспышками инфекции является мониторинг опасных районов, своевременное выявление и уничтожение больных животных и, в особенности, обсемененных спорами продуктов животноводства.

Главный фактор вирулентности *B. anthracis* – экзотоксин (рис. 1), состоящий из рецепторной субъединицы (протективный антиген, ПА) и двух эффекторных субъединиц – летального и отечного факторов (ЛФ и ОФ соответственно). На ранней стадии инфекции токсины сибирской язвы блокируют различные компоненты иммунного ответа организма-хозяина. При системной сибирской язве (легочной или кишечной формах) накопление токсинов в крови в ходе развития инфекции часто вызывает смертельный исход. На данный момент единственным эффективным средством против сибирской язвы является интенсивная антибиотикотерапия. Однако, начиная с определенной концентрации токсина в крови больного, применение антибиотиков становится неэффективным. Смерть наступает даже на фоне достижения полной стерилизации крови от патогена [1, 2]. Необходимо отметить, что, несмотря на то, что понимание центральной роли токсина в смертности от сибирской язвы достигнуто давно, специфические терапевтические средства, обеспечивающие его нейтрализацию, до сих пор не разработаны. Отчасти это вызвано тем, что механизм летального действия сибиреязвенного токсина до конца не изучен, несмотря на то, что ряд мишеней для ЛФ описан более 10 лет назад [3]. Затрудняет нейтрализацию токсина и внутриклеточная локализация ЛФ – антитела, предотвращающие транслокацию летального фактора внутрь клеток [4], эффективны только против свободного токсина, находящегося в крови. Низкомолекулярные ингибиторы металлопротеазной активности ЛФ, пригодные для использования в терапии, не разработаны [5]. Активный центр токсичной металлопротеазы представляет из себя сложную динамическую структуру, обеспечивающую высокую степень дискриминации между близкими по структуре субстратами [6]. Механизм дискриминации, а также механизм протеолиза под действием ЛФ до конца не изучены [7–9]. Это затрудняет разработку специфических низкомолекулярных ингибиторов ЛФ, которые должны обладать высокой степенью инертности по отношению к физиологически важным металлопротеазам в организме человека и животных [10].

В современных условиях принципиальным аспектом успешной терапии сибирской язвы является максимально ранняя диагностика патогена, позволяющая начать терапию до момента накопления критической концентрации токсина в организме. Ранняя диагностика системной сибирской язвы крайне затруднена в силу отсутствия специфических симп-

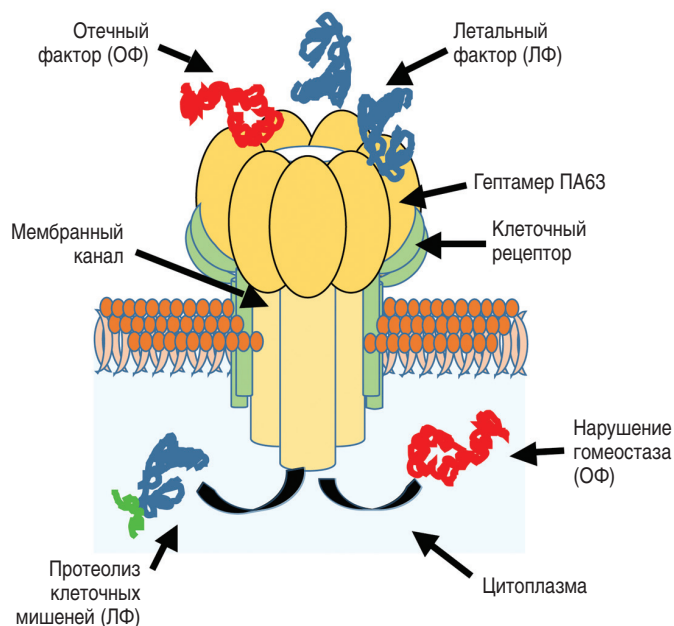


Рис. 1. Структура экзотоксина летального фактора *B. anthracis*.

томов: на начальных стадиях заболевание проявляет себя как острая респираторная инфекция или грипп [1]. Прямая диагностика ДНК возбудителя в крови методом ПЦР сопряжена с необходимостью выделения возбудителя, поскольку прямое определение патогена в образцах крови при его низких концентрациях может быть неэффективно в связи с присутствием различных ингибиторов ПЦР [11, 12]. Немаловажным является и то, что ПЦР не обеспечивает специфическую детекцию летального токсина и не дает представления о степени интоксикации. Последнее может быть критичным для принятия решения о назначении антибиотикотерапии или о необходимости немедленного проведения интенсивной терапии, связанной с критическим накоплением токсина, даже при условии удовлетворительного состояния пациента на момент проведения анализа [1, 2].

Несмотря на развитие высокочувствительных лабораторных методов детекции активности ЛФ, клинический анализ летального токсина *B. anthracis* по-прежнему затруднен, в частности, присутствие токсина не удалось выявить прямым методом в недавнем случае легочной сибиреязвенной инфекции у британского военнослужащего, несмотря на выраженные клинические признаки и детекцию антител против компонентов токсина *post factum* [13].

Ранее мы проводили исследование субстратной специфичности летального фактора *B. anthracis* и механизма селективности этой протеазы [9]. На основании данных, полученных в этом исследовании, нами разработан новый метод высокочувствительной и специфической детекции наличия летального токсина в крови инфицированных *B. anthracis*.

Материалы и методы

Реактивы и материалы

Если не указано иное, реактивы, использованные в данной работе, были приобретены в Sigma Chemical Co (США). Штамм *E. coli* BL21(DE3) приобретен в компании Novagen (США), штамм DH12S – в компании Invitrogen (США).

Ферменты для молекулярного клонирования были приобретены в компании Thermo/Fermentas (США). В работе использовали парамагнитные частицы Neutravidin-Coated Sera-Mag Magnetic Beads производства компании Thermo Scientific (США), Talon Magnetic Beads производства компании Clontech (США) и магнитный сепарационный штатив производства компании Invitrogen (США). Хромогенные, флуоресцентные и люминогенные субстраты бета-галактозидазы и щелочной фосфатазы были приобретены в компаниях Thermo/Pierce, Invitrogen, Life Technologies (США). Олигонуклеотиды были синтезированы компаниями Евроген и Синтол (Россия). Вода, использованная для проведения экспериментов, была получена на установке Millipore Integral 3 (Millipore, США) и имела сопротивление 18 МΩ. Воду дополнительно стерилизовали автоклавированием в течение 30 минут при температуре 121°C и давлении 1 атм. Буфер для проведения всех экспериментов по определению активности летального фактора *B. anthracis* (Буфер А) содержал 30 мМ трис-НСl, рН 7.4 и 70 мМ хлорида натрия.

Конструирование, продукция, очистка и модификация биотином слитных репортерных белков

Конструирование репортера на основе бета-галактозидазы проводили в два этапа. Полноразмерный ген, кодирующий бета-галактозидазу (β -gal), амплифицировали при помощи ПЦП с геномной ДНК *E. coli*, используя олигонуклеотиды B-GalForNde (СТТАТАТТСТСАТГАССАТГАТТАСГАТТАССТГГС) и B-GalRevXho (ТСТТААСТСГАГАТСГГАТ АСГГГТAAACTTTCTTACGGCGACSTTTTТGACACCAGACCA ACTGGT). Продукт амплификации клонировали в плазмидный вектор рЕТ22b(+) по сайтам узнавания Nde I и Xho I. Последовательность, кодирующую пептидную мишень для биотин-лигазы, и сайт разрезания летальным фактором *B. anthracis* вносили при помощи ПЦП с использованием обратных праймеров B-GalRev1 (СГААГАТГТСГТТСАССССГССТТАССТТССАТСГГАТАСГГТAAACTTTCT) и B-GalRev2 (АТАААСТСГАГАССАТССТСГТГССАТТСГАТСТТСТГАССТТГААГАТГТСГТТСАС) и прямого праймера B-GalForNde. Полученный конструкт клонировали по сайтам эндонуклеаз рестрикции Nde I и Xho I в вектор рЕТ22b(+), переваренный теми же эндонуклеазами.

Продукцию цитоплазматического рекомбинантного репортерного конструкта на основе бета-галактозидазы проводили по методике, аналогичной описанной ранее для рекомбинантного летального фактора [9]. Белок, очищенный с применением методов металл-хелатной хроматографии и гель-фильтрации, анализировали денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле и хранили до использования в аликвотах при температуре -80°C .

Конструирование репортера на основе щелочной фосфатазы осуществляли в три этапа. На первом этапе последовательность, кодирующую полипептид щелочной фосфатазы (rhoA) с 9-го по 450-й (С-концевой) аминокислотный остаток зрелого полипептида, амплифицировали при помощи ПЦП с геномной ДНК *E. coli* с использованием олигонуклеотидов rhoAFor (СГАТАССГАТГГААГГТГГСГААААССГТГСТГС ТСАГГГСГАТА) и rhoARevXho (ТААТТТСТСГАГТТТСАС СССАГАСГСГСТТТСАТ). Полученный фрагмент клонировали в вектор рBluescript II SK (-), расщепленный по сайту

Sma I. На втором этапе для повышения каталитической эффективности фермента в последовательность ДНК, кодирующую белок щелочной фосфатазы, были внесены мутации D153G и D330N (нумерация аминокислотных остатков дана в соответствии с последовательностью зрелого полипептида) [14]. Мутагенез осуществляли при помощи набора QuikChange (Stratagene, США), руководствуясь инструкциями производителя. На третьем этапе, после проверки корректности внесенных мутаций при помощи секвенирования ДНК, в полученный конструкт на основе щелочной фосфатазы вносили последовательности, кодирующие N-концевую порцию зрелого полипептида, а также участки, кодирующие пептид для биотинилирования *in vivo* и субстрат летального фактора *B. anthracis*. Конструирование проводили при помощи последовательных стадий ПЦП с использованием олигонуклеотидов rhoA1 (GAGGATAGCGGTCCCGTAAGAAAG TTTACCCGATCCGATGGAAGGTGGC), rhoA2 (CTGAACGAC ATCTTCGAAGCTCAGAAGATCGAATGGCACGAGGATAGCGG TCGCCGTA) и rhoANco (ATTATACCATGGCTCGCACTCGTG AAATGCCTGGTGGCCTGAACGACATCTTCGAAGCTCA) в качестве прямых праймеров и олигонуклеотида rhoARevXho в качестве обратного праймера. Полученный продукт клонировали в вектор рЕТ22b(+) по сайтам эндонуклеаз рестрикции Nco I и Xho I таким образом, чтобы полноразмерный экспрессионный продукт содержал сигнальный пептид pelB для периплазматической локализации слитного белка на основе rhoA.

Продукцию репортера проводили в периплазму *E. coli*. После наращивания клеточной биомассы в течение 3–4 ч ($OD_{600} = 1$) в среде 2xYT, содержащей 0,1% глюкозы и 100 мкг/мл ампициллина, культуральную среду охлаждали на льду до $15-20^{\circ}\text{C}$ и индуцировали продукцию целевого белка добавлением ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Экспрессию репортерного белка проводили в течение 6–8 ч при температуре 20°C и интенсивном встряхивании. Выделение периплазматической фракции проводили методом осмотического шока в соответствии с ранее опубликованным протоколом [15]. Целевой белок очищали из периплазматической фракции с использованием металл-хелатной и гель-фильтрационной хроматографии, анализировали денатурирующим электрофорезом в полиакриламидном геле и хранили при температуре -20°C в буфере А, содержащем 40% глицерина.

Ген, кодирующий биотин-лигазу (BirA), амплифицировали с геномной ДНК *E. coli*, используя олигонуклеотиды BirAForNde (СТТСАТАТГААГГАТААСССГТГССАС) и BirARevXho (ТСТСТСГАГАССАГТТТТТСТГААСТАСГСАС GGATAT). Полученный продукт переваривали эндонуклеазами Nde I и Xho I и лигировали в вектор рЕТ22b(+), расщепленный теми же ферментами.

Экспрессию рекомбинантного белка проводили по стандартной методике, рекомендованной в материалах компании Novagen (США). Биомассу наращивали в среде 2xYT в течение 3–4 ч при 37°C до достижения значения $OD_{600} = 0,8-1$. Синтез белка индуцировали добавлением ИПТГ до концентрации 0,2 мМ и проводили наработку продукта в течение 5 ч при температуре 30°C , затем бактериальную биомассу собирали центрифугированием. Дальнейшие процедуры проводили так же, как описано ранее для рекомбинантного

летального фактора *B. anthracis* [9]. Очищенный белок хранили при температуре -80°C .

Биотинилирование полипептидов проводили, следуя протоколу, представленному в оригинальном исследовании. Эффективность биотинилирования проверяли вестерн-блоттингом, используя окрашивание меченых белков конъюгатом нейтравидин-пероксидаза (Thermo/Pierce, США).

Введение флюоресцентной метки в рекомбинантные белки

Для введения метки в рекомбинантные белки использовали активированное производное красителя BODIPY FL (Invitrogen, США) с максимумами длин волн возбуждения и испускания флюоресценции 503/512 нм. Белок, переведенный в фосфатно-солевой буфер при помощи диализа или колоночной хроматографии, обрабатывали 10-кратным молярным избытком BODIPY FL, активированного N-гидрокси-сукцинимидным эфиром в течение 15–20 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением этаноламина до концентрации 10 мМ. Непрореагировавший краситель удаляли диализом против буфера А. Эффективность мечения оценивали на флюориметре Varioskan Flash (Thermo Scientific, США).

Тестирование каталитической активности репортеров

Каталитическую активность репортера на основе щелочной фосфатазы анализировали с использованием хромогенного субстрата, р-нитрофенилфосфата, используя ранее описанный метод [14]. В качестве контроля использовали коммерчески доступный препарат щелочной фосфатазы с известной удельной активностью (Sigma, США). Для анализа активности бета-галактозидазы использовали коммерчески доступный набор (Thermo/Pierce, США) и рекомендованный производителем протокол. Полученные значения каталитической эффективности ферментов сравнивали с ранее опубликованными данными. На основании результатов тестирования проводили последующие эксперименты по анализу чувствительности хемилюминесцентной детекции и детекции активности летального фактора *B. anthracis*.

Чувствительность детекции откалиброванных репортерных конструкторов оценивали с использованием хемилюминесцентных субстратов. Активность бета-галактозидазы тестировали с использованием люминогенного 1–2 диоксетанового производного NovaBright (Thermo/Pierce, США). Ферментативный репортер титровали в диапазоне концентраций 1 нг/мл–0,1 пг/мл в буфере А. Финальный раствор для детекции состоял из смеси буфера, прилагающегося к набору, и буфера А в пропорции 1 : 1, согласно протоколу производителя. В качестве положительного контроля использовали коммерчески доступную рекомбинантную бета-галактозидазу. Активность щелочной фосфатазы определяли с использованием люминогенного субстрата – LumiGen APS-5 (Lumigen, США). Раствор репортера титровали в диапазоне 1 нг/мл–0,1 пг/мл в буфере А. В качестве положительного контроля использовали щелочную фосфатазу производства Thermo/Pierce, США. Измерения хемилюминесцентного сигнала проводили на мультиридере Varioskan Flash (Thermo Scientific, США).

Расщепление репортерных субстратов летального фактора *B. anthracis*

Биотинилированный репортер в концентрации 5 мкМ в буфере А смешивали с различными количествами летального фактора *B. anthracis* (10 нг/мл–100 фг/мл) в объеме 50 мкл и инкубировали 2 ч при температуре 37°C . По окончании инкубации к реакционной смеси добавляли парамагнитные микрочастицы таким образом, чтобы количество связывающих сайтов на их поверхности превосходило количество молекул биотина, связанных с репортером, в 5–7 раз. Смесь инкубировали 15 мин при интенсивном встряхивании, затем отделяли связавшийся репортер в магнитном поле, а к супернатанту добавляли такое же количество парамагнитных частиц, как и на первой стадии, и процедуру повторяли. Контрольные образцы не содержали летальный фактор, но проходили все стадии обработки. К полученному после повторной магнитной селекции супернатанту добавляли люминогенный субстрат и проводили измерения по методике, описанной в предыдущем разделе.

Иммуоферментный анализ эффективности связывания летального фактора с гептамерами ПА63

Гептамеры мутантного протективного антигена ПА63 и антигена дикого типа в различных концентрациях (от 10 мкг до 1 нг в 100 мкл буфера) иммобилизовали на иммунологическом планшете в буфере А. Свободные валентности планшета блокировали буфером А, содержащим 1% бычьего сывороточного альбумина. Контрольная серия лунок была обработана блокирующим раствором в отсутствие гептамеров протективного антигена. В лунки планшета по 100 мкл наносили раствор, содержащий летальный фактор сибирской язвы в концентрации 50 мкг/мл в течение 1 ч. После трехкратной промывки планшета буфером А связавшийся летальный фактор детектировали специфическими моноклональными антителами (GenWay Biotech Inc., США). Для проявления комплексов использовали конъюгат антител овцы к антителам мыши (Millipore, США) и жидкий колориметрический субстрат на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (Thermo/Pierce, США).

Детекция активности ЛФ в плазме крови лабораторных животных

Препараты плазмы крови в количестве 100 мкл были получены от лабораторных мышей линии BALB/c. Плазму крови отделяли от клеток центрифугированием образцов крови, нанесенных на поверхность раствора Ficoll-Paque (GE Life Sciences, США).

Для специфического ингибирования ЛФ к раствору, содержащему биотинилированный репортер, добавляли ингибитор In-2-LF (EMD Millipore) в концентрации 2 мМ, а затем контрольные образцы, не содержащие ЛФ, содержащие ЛФ в присутствии ингибитора либо содержащие супернатант штамма *B. anthracis* STI-Rif.

Результаты и обсуждение

Схема нового метода детекции активности летального фактора *B. anthracis* приводится на рис. 2. Метод основан на двойной амплификации сигнала, генерируемого при

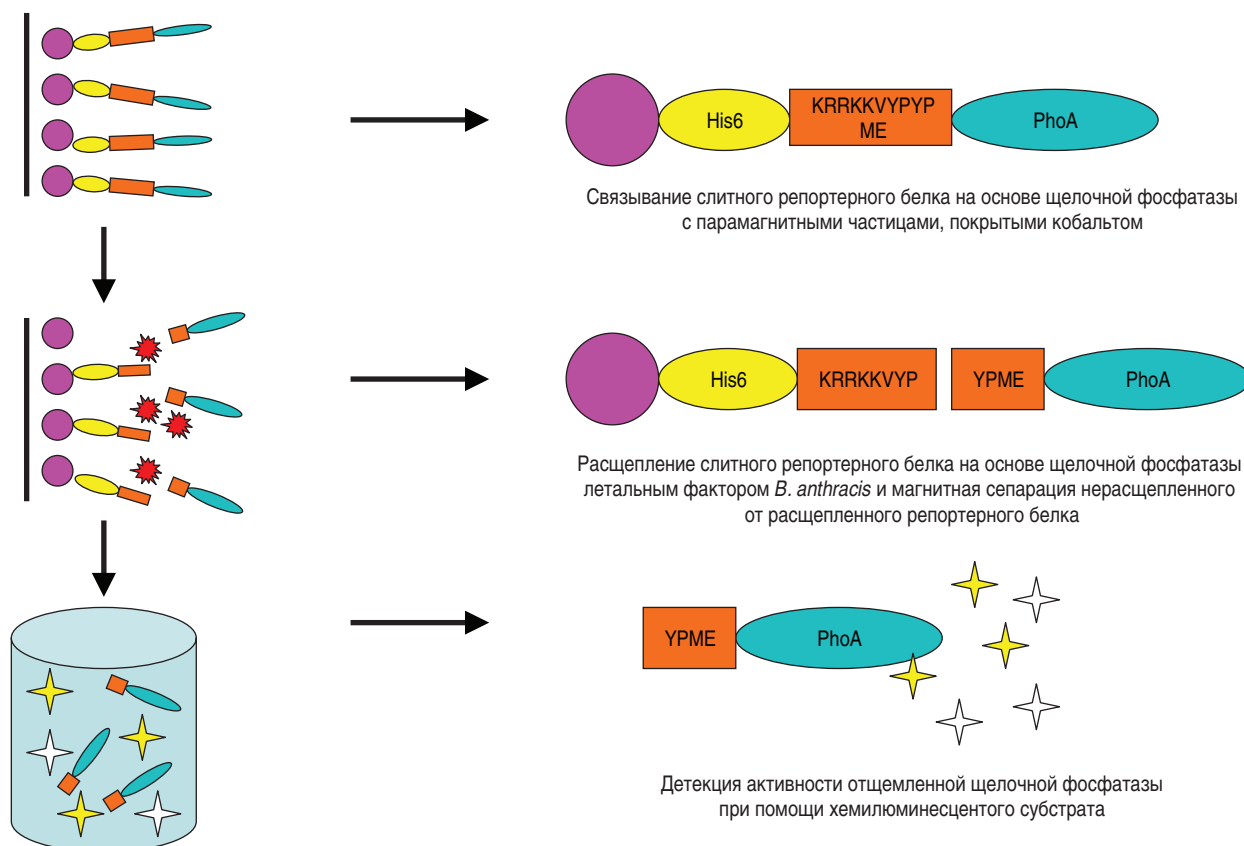


Рис. 2. Схема детекции летального фактора *B. anthracis* с применением рекомбинантного слитного репортерного субстрата.

протеолизе субстрата под действием летального фактора. Центральным элементом технологии является трехкомпонентный белковый конструктор (слитный белок), содержащий мишень для высокоаффинной ориентированной иммобилизации на твердой фазе, участок, несущий наиболее эффективный из известных субстратов летального фактора *B. anthracis* [8, 16], и репортерный фермент, обладающий высокой каталитической эффективностью, используемый в стандартных протоколах иммуноферментного анализа (ИФА). В классическом ИФА реализуется одноступенчатая амплификация сигнала, которую осуществляет иммобилизованный на твердой фазе фермент, конъюгированный с молекулой-зондом, связанной с белком-мишенью. В рамках разработанного метода также проводится иммобилизация белкового конструктора на твердой фазе, однако последующее расщепление субстрата летального фактора в составе конструктора приводит к физическому разделению иммобилизуемого и репортерного компонентов слитного белка. В результате происходит высвобождение отщепленного репортера в раствор, в то

время как интактный белок остается иммобилизованным на твердой фазе.

Основными требованиями к репортерному компоненту слитного белка являются: 1) высокая каталитическая эффективность; 2) возможность адаптации (readout) к стандартным методикам ИФА; 3) наличие флюорогенных и люминогенных субстратов, обеспечивающих высокую чувствительность детекции; 4) возможность продукции репортера в составе слитных белков в *E. coli*. Наиболее полно указанным требованиям удовлетворяют бактериальные бета-галактозидаза и щелочная фосфатаза, представленные в данной работе белками β -gal и *phoA* из *E. coli*. Щелочная фосфатаза была дополнительно модифицирована сайт-направленным мутагенезом для повышения каталитической эффективности [14].

Использование отщепления ферментативно активного репортера за счет активности летального фактора обеспечивает дополнительную амплификацию сигнала от молекулы-мишени. Одна молекула летального фактора способна при благоприятных условиях протекания реакции [9] расщепить несколько сот молекул субстрата, высвобождая эквивалентное количество молекул ферментативного репортера. Иначе говоря, теоретически, 1 пг летального фактора *B. anthracis* может высвобождать в раствор 0,1–0,5 нг репортерного фермента, что превышает предел чувствительности детекции щелочной фосфатазы и бета-галактозидазы для люминогенных субстратов, определенный производителями этих веществ (10^{-18} – 10^{-20} М). Таким образом, данный метод позволяет увеличить чувствительность детекции протеаз по сравнению со стандартным ИФА на 3–4 порядка, что обес-

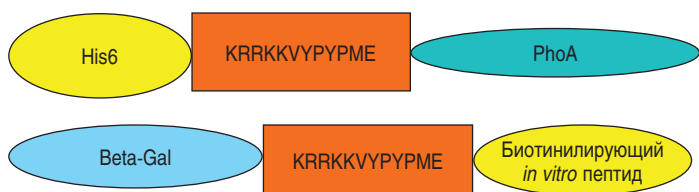


Рис. 3. Структура репортерных субстратов на основе щелочной фосфатазы и бета-галактозидазы для детекции летального фактора *B. anthracis*.

печивает детекцию ЛФ на ранних стадиях сибиреязвенной инфекции.

В качестве последовательностей для ориентированной иммобилизации слитного белка был использован пептид, сайт-специфически биотинилируемый *in vivo* в реакции с участием белка BirA. Биотинилированный пептид связывается с иммобилизованным стрептавидином или авидином с константой 10^{-15} M^{-1} [17]. Анализ литературных данных показал, что в случае щелочной фосфатазы наиболее эффективным с точки зрения сохранения активности фермента является размещение дополнительных пептидных последовательностей после 8–9 аминокислотного остатка зрелого белка. В случае бета-галактозидазы, как N-, так и C-концевые слитные белки являются перmissive с точки зрения активности фермента. Структура слитных репортерных белков показана на рис. 3.

Тестирование эффективности иммобилизации репортерных белков на твердой фазе было направлено на выявление возможной утечки иммобилизованных репортерных белков, а также на анализ полноты модификации репортерных молекул биотином, исключающее попадание нерасщепленных молекул репортера в раствор по окончании реакции протеолиза.

Биотинилированный репортер на основе щелочной фосфатазы инкубировали 2 ч с парамагнитными частицами, несущими нейтравидин, в фосфатно-солевом буфере. Количество мест связывания на поверхности магнитных частиц превышало количество молекул репортера в 10 раз: 25 мкг белка в 0,5 мл буфера А (50 мкг/мл, концентрация 0,4 мкМ) против 1 мкг частиц (расчет произведен на основании данных производителя о емкости парамагнитных частиц). Каждые 15 мин инкубации и по ее окончании проводили двойную магнитную сепарацию расщепленного и интактного репортера (см. Материалы и методы) и отбирали пробы супернатанта, в которых измеряли активность щелочной фосфатазы при помощи люминогенного субстрата. Результаты измерений, приведенные на рис. 4, показывают, что в случае нейтравидин-биотиновой системы полное связывание репортера с твердой фазой происходит менее чем за 30 минут, а утечка щелочной фосфатазы с твердой фазы в последующие 1,5 ч отсутствует.

Сравнительную чувствительность детекции с использованием репортеров на основе бета-галактозидазы и щелочной фосфатазы проводили двумя способами. В первой серии экспериментов репортерные конструкции, взятые в концентрации 50 мкг/мл, расщепляли различными концентрациями летального фактора *B. anthracis* в растворе в течение 2 ч, а затем разделяли расщепленную и интактную фракции с применением парамагнитных частиц, покрытых нейтравидином. Концентрация субстрата летального фактора была рассчитана на основании данных, полученных ранее при изучении предстационарной кинетики протеолиза летального фактора методом остановленного потока [9]. Субстрат в реакционной смеси присутствовал в избытке по отношению к ЛФ, поэтому при малых концентрациях ЛФ расходом субстрата за время инкубации можно пренебречь. Следовательно, скорость реакции не зависит от концентрации летального фактора, а значит, и от того, присутствует ли в реакции ЛФ в полностью растворимой или иммобилизованной форме, поскольку в каждый момент времени после

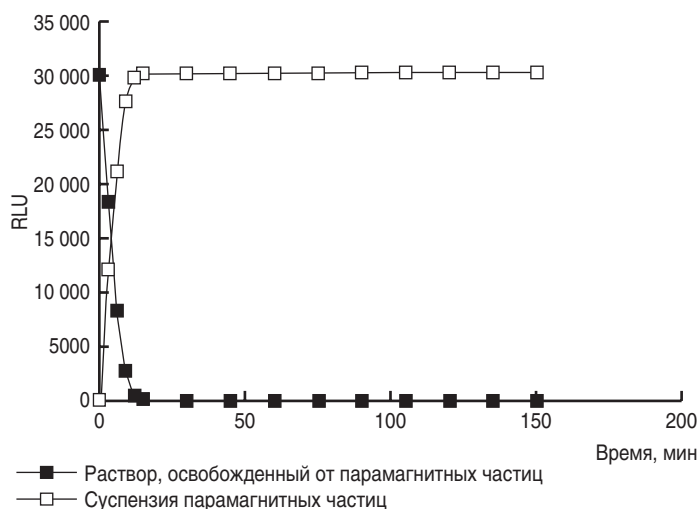


Рис. 4. Результаты эксперимента по проверке отсутствия утечки репортерного субстрата на основе щелочной фосфатазы в раствор с поверхности парамагнитных частиц.

Парамагнитные частицы смешивали с репортерным субстратом на основе щелочной фосфатазы и проводили измерения активности фермента в суспензии парамагнитных частиц с использованием хемилюминесцентного субстрата NovaBright (Invitrogen, США) с интервалом в 15 минут (1 – 15 минут, 2 – 30 минут, 3 – 45 минут, 4 – 60 минут, 5 – 75 минут, 6 – 90 минут, 7 – 105 минут, 8 – 120 минут, 9 – 135 минут). Для измерения активности фосфатазы парамагнитные частицы отделяли от раствора, промывали буфером с применением магнитного штатива и отбирали 50 мкл буферного раствора, затем раствор перемешивали и отбирали 50 мкл суспензии парамагнитных частиц.

диссоциации продуктов реакции молекула ЛФ имеет доступ к новой молекуле субстрата [9].

Во второй серии экспериментов репортерные конструкции иммобилизовали на поверхности парамагнитных частиц таким образом, чтобы насытить все связывающие центры нейтравидина, а затем отмывали от несвязавшейся фракции репортеров и обрабатывали летальным фактором *B. anthracis* в течение 2 ч. Результаты экспериментов приведены на рис. 5. Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность расщепления субстратов в растворе более чем на порядок превышает эффективность расщепления репортерных конструкций, предварительно иммобилизованных на поверхности парамагнитных частиц. Кроме того, было показано, что чувствительность детекции летального фактора *in vitro* с применением репортера на основе щелочной фосфатазы в 4–6 раз превосходит чувствительность бета-галактозидазного репортера в реакции с участием люминогенных субстратов. По данным производителей субстратов, чувствительность детекции бета-галактозидазы выше, чем щелочной фосфатазы. Возможно, щелочная фосфатаза обладает более высокой стабильностью в водных растворах при низких концентрациях белка, поскольку является секретлируемым белком и содержит дисульфидные связи. Однако экспериментальные исследования этого феномена в рамках данной работы не проводились, и дальнейшие эксперименты проводили репортером на основе щелочной фосфатазы. Чувствительность детекции летального фактора с применением репортера на основе щелочной фосфатазы и хемилюминесцентной детекции составила 0,25 пг/мл (рис. 6).

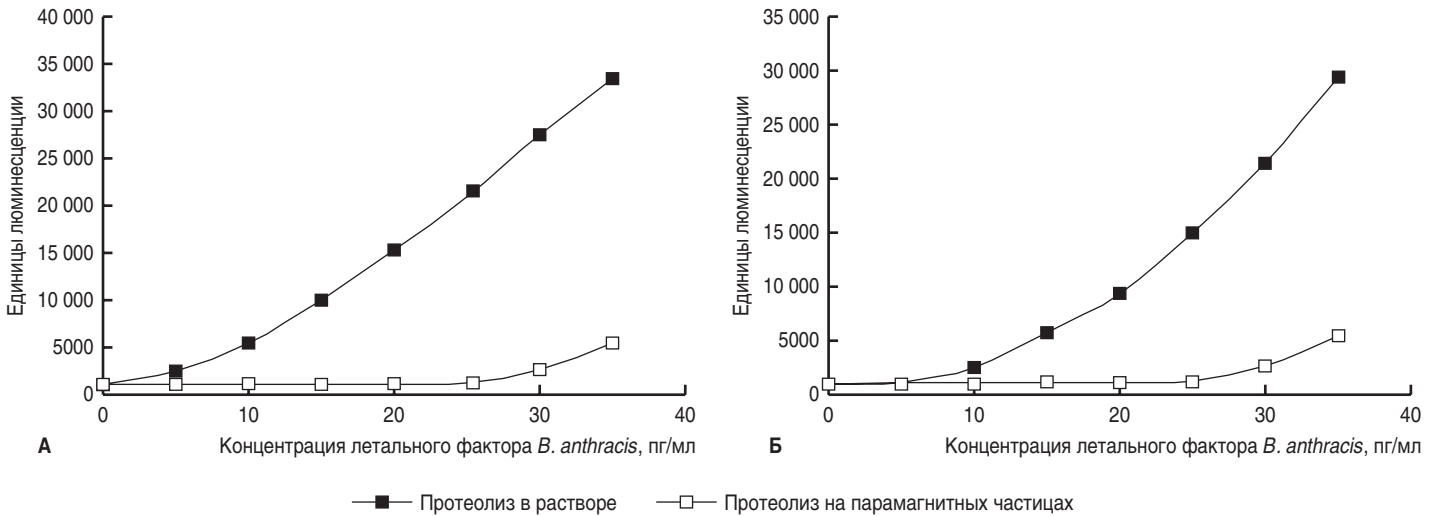


Рис. 5. Сравнение эффективности протеолиза репортерных субстратов на основе щелочной фосфатазы и бета-галактозидазы. Результаты измерения люминесценции при расщеплении слитных репортерных субстратов различными концентрациями летального фактора *B. anthracis*. А – протеолиз репортерного субстрата на основе щелочной фосфатазы в растворе и на твердой фазе (парамагнитных частицах), детекция фосфатазной активности проводилась с использованием хемилюминесцентного субстрата NovaBright (Invitrogen, США); Б – протеолиз репортерного субстрата на основе бета-галактозидазы в растворе и на твердой фазе (парамагнитных частицах), детекция галактозидазной активности проводилась с использованием хемилюминесцентного субстрата Galacton-Star (Invitrogen, США).

Прямая детекция активности летального фактора с применением отщепляемого ферментативного репортера в крови может быть затруднена в связи с присутствием ингибиторов различных компонентов системы детекции, а также примесей эндогенных фосфатаз, концентрация которых в крови может увеличиваться на фоне повышения уровня гибели клеток при заболевании сибирской язвой. Кроме того, эффективность детекции можно повысить за счет увеличения концентрации мишени, выделенной из относительно большого объема образца (несколько миллилитров). Для этого необходимо разработать эффективную методику аффинного выделения летального фактора из образцов. Использование моноклональных антител может быть малоэффективным, поскольку для аффинной адсорбции комплекса антитело–летальный фактор используется, как правило, твердая фаза, несущая белок А или G, адсорбирующий все антитела из плазмы. Использование вместо панспецифичных белков иммобилизованных анти-IgG антител может быть неэффективным ввиду

малой емкости таких сорбентов. Наконец, специфичное к летальному фактору антитело не должно интерферировать с его протеолитической активностью.

Более эффективным для аффинной очистки летального фактора из клинических образцов может быть использование гептамеров протективного антигена – природного рецептора летального фактора. Удобство использования протективного антигена состоит в том, что: 1) летальный фактор не теряет активности в комплексе с гептамерами протективного антигена; 2) используя методы белковой инженерии, к молекулам протективного антигена можно добавить аффинные мишени, обеспечив эффективное извлечение комплекса гептамера протективного антигена с летальным фактором из образца при помощи парамагнитных частиц, покрытых лигандом для металл-хелатной хроматографии; 3) добавление избытка гептамеров протективного антигена к образцу крови блокирует адсорбцию летального фактора на протективном антигене, связанном с клетками, тем самым повышая эффективность детекции. Однако нативные гептамеры протективного антигена будут связываться с клеточными рецепторами, снижая эффективность аффинной очистки летального фактора. Для решения этой проблемы нами был сконструирован мутантный протективный антиген, сохраняющий домен, связывающий летальный фактор интактным [18] и содержащий модифицированный рецептор-связывающий домен со значительно пониженной аффинностью к клеточным рецепторам [19]. Активация мутантного протективного антигена трипсином [20] показала, что его способность к конверсии ПА83-ПА63 и способность формировать гептамеры остались неизменными по сравнению с протективным антигеном дикого типа [21]. Эксперименты по иммобилизации различных количеств мутантных и нативных гептамеров протективного антигена на твердой фазе с последующим формированием комплекса с летальным фактором и анализом степени связывания летального фактора методом ИФА также показали отсутствие суще-

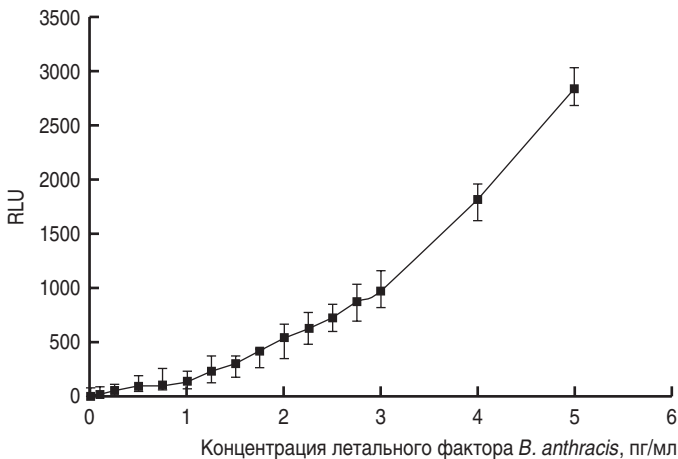


Рис. 6. Определение чувствительности детекции летального фактора *B. anthracis* с применением слитного репортерного субстрата на основе щелочной фосфатазы.

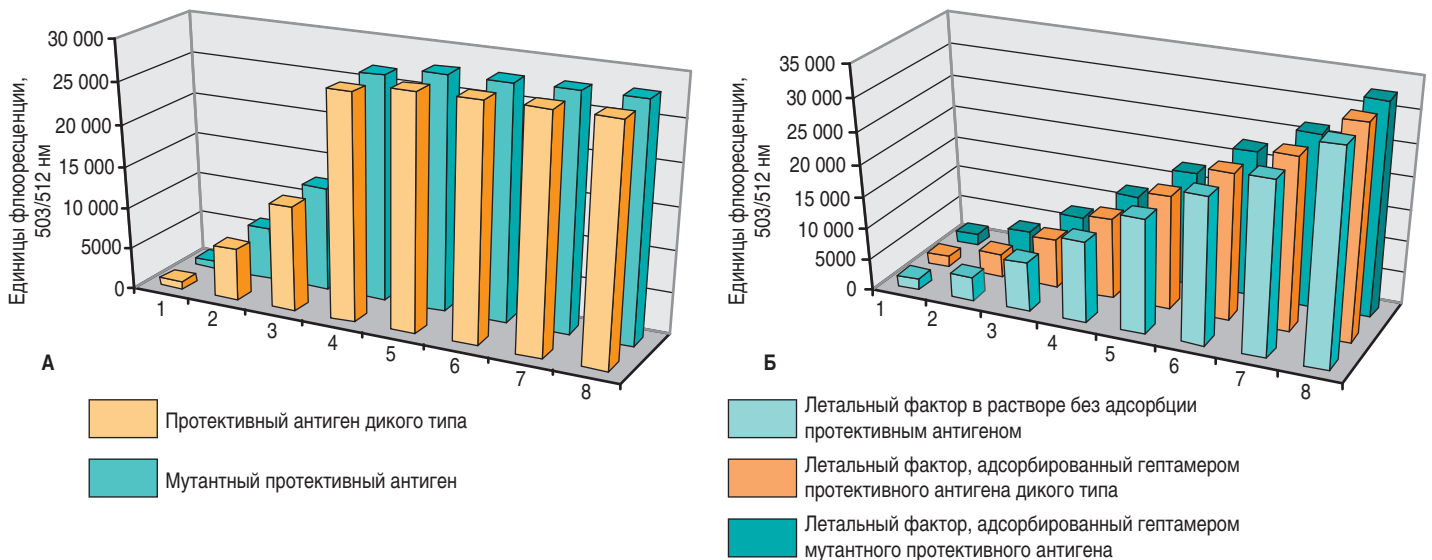


Рис. 7. Адсорбция летального фактора *B. anthracis* из плазмы крови при помощи гептамеров рекомбинантного протективного антигена. Флюоресценцию измеряли в растворе, содержащем парамагнитные частицы с иммобилизованным комплексом «гептамер протективного антигена/летальный фактор, меченный BODIPY FL» при длине волн возбуждения и испускания флюоресценции 503/512 нм. А – емкость гептамеров протективного антигена и несущих их парамагнитных частиц по отношению к летальному фактору *B. anthracis*. Адсорбция летального фактора гептамерами проводилась в растворе, концентрация летального фактора составляла 0,4 мкМ, количество магнитных частиц – 1 мг на точку эксперимента. По оси X представлены различные концентрации гептамеров дикого типа и мутантного протективного антигена: 1 – контроль без протективного антигена; 2 – 10 нМ; 3 – 25 нМ; 4 – 50 нМ; 5 – 75 нМ; 6 – 100 нМ; 7 – 125 нМ; 8 – 150 нМ гептамеров протективного антигена. Б – эффективность связывания иммобилизованными на парамагнитных частицах гептамерами протективного антигена различных концентраций летального фактора *B. anthracis*. Гептамеры протективного антигена наносили на парамагнитные частицы в концентрации 25 нМ. По оси X представлены различные концентрации летального фактора, адсорбированные гептамерами протективного антигена: 1 – 2 пг/мл; 2 – 20 пг/мл; 3 – 200 пг/мл; 4 – 2 нг/мл; 5 – 20 нг/мл; 6 – 200 нг/мл; 7 – 2 мкг/мл; 8 – 20 мкг/мл.

ственных отличий в эффективности связывания летального фактора мутантными гептамерами ПА63 и гептамерами дикого типа. Для проверки полноты аффинной адсорбции летального фактора из крови к образцам стабилизированной плазмы крови были добавлены различные количества летального фактора, меченного флуоресцентным красителем BODIPY FL. В образцы плазмы добавляли частично биотинилированные гептамеры мутантного ПА63, а после инкубации в течение 2 ч парамагнитные частицы, покрытые хелатированными ионами Co^{2+} (Talon Magnetic Beads, Clontech, США). После отделения и отмывки парамагнитных частиц проводили измерение флюоресценции в образцах плазмы и в растворе, содержащем отделенные частицы. Результаты измерений представлены на рисунке 6. Первая серия измерений проводилась с неизменной концентрацией летального фактора и увеличивающимся количеством гептамеров и парамагнитных частиц для определения емкости парамагнитных частиц по отношению к гептамерам (рис. 7а). Вторая серия измерений проводилась с фиксированным количеством гептамеров и парамагнитных частиц и с изменением концентрации летального фактора в диапазоне от 20 мкг/мл до достижения предела чувствительности детекции флюоресцентного сигнала (рис. 7б). Во всем диапазоне чувствительности флюоресцентный сигнал полностью адсорбировался на магнитных частицах в присутствии хелатированных гептамеров и оставался в растворе, если молекулы гептамера ПА63 не содержали последовательности шести гистицинов. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии утечки хелатированных комплексов с поверхности парамагнитных частиц. Таким образом, методика аффинной очистки

летального фактора *B. anthracis* с использованием мутантных гептамеров ПА63 является эффективным методом выделения и концентрирования токсина.

Разработанная система аффинной адсорбции и концентрирования ЛФ была использована для анализа чувствительности детекции токсина в крови. С этой целью образцы плазмы крови мышей, содержащие искусственно внесенный ЛФ в концентрации 100 нг/мл–100 фг/мл, были подвергнуты аффинной экстракции с применением парамагнитных микрочастиц, покрытых хелатированными ионами Co^{2+} (Talon Magnetic Beads, Clontech, США), в присутствии биотинилированных гептамеров ПА63. В плазму добавляли коктейль из протеазных ингибиторов, содержащий ингибиторы всех типов протеаз, кроме металлоферментов, для снижения вероятности неспецифической сорбции на микрочастицах активных эндогенных протеаз. Отмытые микрочастицы с иммобилизованным летальным фактором смешивали с раствором, содержащим 400 нМ репортерного субстрата, и инкубировали 2 ч при 37°C. По окончании инкубации в реакционную смесь добавляли парамагнитные микрочастицы, содержащие иммобилизованный нейтравидин, и инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с периодическим перемешиванием для удаления нерасщепленного репортера и его отщепившегося биотинилированного фрагмента. Супернатант использовали для выявления отщепленного фрагмента репортерного конструктора с использованием люминогенного субстрата щелочной фосфатазы.

В качестве контрольных образцов использовали: 1) образец плазмы крови, не содержащий ЛФ; 2) образец плазмы крови, содержащий ЛФ в концентрации 10–100 нг/мл в при-

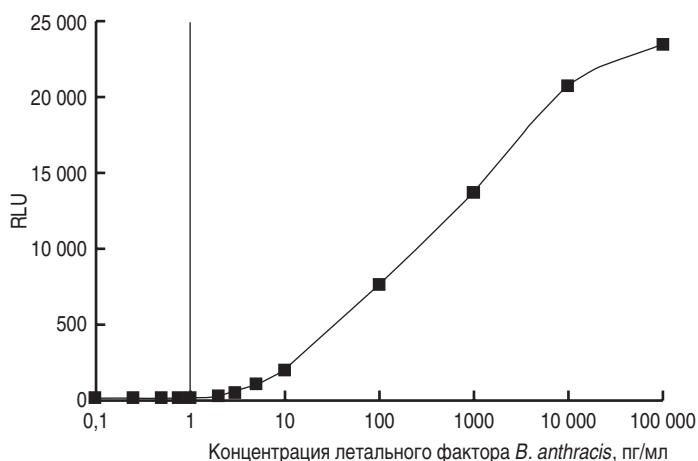


Рис. 8. Анализ чувствительности определения летального фактора *B. anthracis* в искусственно инфицированных образцах крови с помощью разработанного метода.

сутствии специфического ингибитора ЛФ, In-2-LF [8]; 3) образец плазмы крови, смешанный 1 : 1 с супернатантом, полученным при культивировании штамма СЯ, не продуцирующего ЛФ. Контрольные образцы крови обрабатывались так же, как и опытные. Результаты измерений приведены на рисунке 8. Чувствительность детекции летального фактора методом двойной амплификации в образцах крови составляет 2–4 пг/мл, линейный диапазон детекции – от 10 пг/мл до 10 нг/мл. Полученные значения чувствительности позволяют эффективно провести детекцию летального фактора в концентрациях, необходимых для ранней диагностики сибирской язвы [1, 2]. Отсутствие фонового сигнала во всех контролях свидетельствует об устойчивости метода к контаминации как эндогенными протеазами плазмы крови, так и металлозависимыми протеазами (в том числе), секретируемыми *B. anthracis* [22]. Последние, согласно протеомным исследованиям, представлены всего двумя ферментами, в отличие от других бацилл, секретирующих как минимум несколько протеаз [23]; однако при сибиреязвенной инфекции их концентрация в крови может быть достаточно высока, при том, что неспецифическое ингибирование металлопротеаз при проведении теста блокирует и активность ЛФ.

Полученные результаты свидетельствуют о высокой специфичности метода, достигаемой в две ступени – за счет формирования комплекса летальный фактор-гептамер ПА63 и за счет высокой специфичности субстрата летального фактора *B. anthracis*.

Заключение

Нами разработан метод высокочувствительной детекции летального фактора *B. anthracis* в образцах крови, которая дает возможность детектировать присутствие патогена в крови до развития летальной интоксикации. Метод основан на использовании в качестве субстрата для детекции рекомбинантного слитного белка, который содержит аффинную последовательность, обеспечивающую его иммобилизацию на твердой фазе (парамагнитных частицах) и репортерный фермент, за счет которого происходит амплификация сигнала от акта разрезания, разделенные

пептидом, являющимся специфическим субстратом летального фактора *B. anthracis*. Чувствительность детекции летального фактора *B. anthracis* с применением данного метода составила 0,25 пг/мл в модельных экспериментах и 2–4 пг/мл в искусственно инфицированных образцах крови. В последующих работах с использованием данного метода планируется детальное изучение динамики накопления летального фактора в крови инфицированных лабораторных животных и ее корреляции с летальной интоксикацией, а также с ответом на терапию антибиотиками и специфическими моноклональными антителами к компонентам сибиреязвенного токсина.

Разработанный метод двухступенчатой амплификации можно применить для детекции многих протеаз, которым свойственна низкая каталитическая эффективность (например, ботулотоксин, гамма- и бета-секретазы и пр.), или низкие природные концентрации в биологических образцах (многие каспазы, металлопротеазы и др.). Субстраты для подобных протеаз могут быть отобраны с использованием методологии субстратного фагового дисплея [9, 24]. Прямой анализ каталитической активности малых количеств протеаз методом двухступенчатой амплификации может способствовать созданию нового направления как в фундаментальных исследованиях, так и в клинической диагностике.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» по государственному контракту №16.512.11.2110 по теме «Разработка технологий высокочувствительной детекции бактериальных и лекарственно-устойчивых патогенов и токсикоинфекций на основе уникальных биокатализаторов бактерий».

Литература

- Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(10):1019-28.
- Tang S, Moayeri M, Chen Z, Harma H, Zhao J, Hu H, et al. Detection of anthrax toxin by an ultrasensitive immunoassay using europium nanoparticles. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(3):408-13.
- Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science.* 1998;280(5364):734-7.
- Artenstein AW, Opal SM. Novel approaches to the treatment of systemic anthrax. *Clin Infect Dis.* 2012;54(8):1148-61.
- Tonello F, Seveso M, Marin O, Mock M, Montecucco C. Screening inhibitors of anthrax lethal factor. *Nature.* 2002;418:386.
- Dalkas GA, Papakyriakou A, Vlamis-Gardikas A, Spyroulias GA. Insights into the anthrax lethal factor-substrate interaction and selectivity using docking and molecular dynamics simulations. *Protein Sci.* 2009;18(8):1774-85. doi: 10.1002/pro.169.
- Tonello F., Ascenzi P., Montecucco C. The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40075-8.
- Turk BE, Wong TY, Schwarzenbacher R, Jarrell ET, Leppla SH, Collier RJ, et al. The structural basis for substrate and inhibitor selectivity of the anthrax lethal factor. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(1):60-6.

9. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem.* 2009;284(27):17902-13. doi: 10.1074/jbc.M807510200.
10. Shoop WL, Xiong Y, Wiltsie J, Woods A, Guo J, Pivnichny JV, et al. Anthrax lethal factor inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(22):7958-63.
11. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* 1994;39:362-72.
12. Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):345-50.
13. Sykes A, Brooks T, Dusmet M, Nicholson AG, Hansell DM, Wilson R. Inhalational anthrax in a vaccinated soldier. *Eur Respir J.* 2013;42(1):285-7. doi: 10.1183/09031936.00201112.
14. Le Du MH, Lamoure C, Muller BH, Bulgakov OV, Lajeunesse E, Ménez A, et al. Artificial evolution of an enzyme active site: structural studies of three highly active mutants of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Mol Biol.* 2002; 316(4):941-53.
15. Kipriyanov SM. High-level periplasmic expression and purification of scFvs. *Methods Mol Biol.* 2009;562:205-14. doi: 10.1007/978-1-60327-302-2_16.
16. Kuklennyk Z, Boyer AE, Lins RB, Quinn CP, Gallegos-Candela M, Woolfitt A, et al. Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for endopeptidase activity-based quantification of Anthrax lethal factor in serum. *Anal Chem.* 2011 Mar 1;83(5):1760-5. doi: 10.1021/ac1030144.
17. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* 1979;27:1131-9.
18. Brossier F, Weber-Levy M, Mock M, Sirard JC. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect Immun.* 2000;68(4):1781-6.
19. Mechaly A, McCluskey AJ, Collier RJ. Changing the receptor specificity of anthrax toxin. *MBio.* 2012 May 1;3(3). pii: e00088-12. doi: 10.1128/mBio.00088-12.
20. Singh Y, Klimpel KR, Goel S, Swain PK, Leppla SH. Oligomerization of anthrax toxin protective antigen and binding of lethal factor during endocytic uptake into mammalian cells. *Infect Immun.* 1999;67(4):1853-9.
21. Белова ЕВ, Дубилей СА, Кравченко ТВ, Колесников АВ, Захарова МЮ, Шемякин ИГ. Моноклональные антитела к протективному антигену *B. anthracis* способны как нейтрализовать, так и потенцировать действие сибиреязвенного летального токсина *in vitro*. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2004;3:21-6.
22. Chung MC, Popova TG, Millis BA, Mukherjee DV, Zhou W, Liotta LA, et al. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J Biol Chem.* 2006;281:31408-18.
23. Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V, Lereclus D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*;2005;5(14):3696-711.
24. Matthews DJ, Wells JA. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science.* 1993;260(5111):1113-7.
4. Artenstein AW, Opal SM. Novel approaches to the treatment of systemic anthrax. *Clin Infect Dis.* 2012;54(8):1148-61.
5. Tonello F, Seveso M, Marin O, Mock M, Montecucco C. Screening inhibitors of anthrax lethal factor. *Nature.* 2002;418:386.
6. Dalkas GA, Papakyriakou A, Vlamis-Gardikas A, Spyroulias GA. Insights into the anthrax lethal factor-substrate interaction and selectivity using docking and molecular dynamics simulations. *Protein Sci.* 2009;18(8):1774-85. doi: 10.1002/pro.169.
7. Tonello F., Ascenzi P., Montecucco C. The metalloproteolytic activity of the anthrax lethal factor is substrate-inhibited. *J Biol Chem.* 2003;278(41):40075-8.
8. Turk BE, Wong TY, Schwarzenbacher R, Jarrell ET, Leppla SH, Collier RJ, et al. The structural basis for substrate and inhibitor selectivity of the anthrax lethal factor. *Nat Struct Mol Biol.* 2004;11(1):60-6.
9. Zakharova MY, Kuznetsov NA, Dubiley SA, Kozyr AV, Fedorova OS, Chudakov DM, et al. Substrate recognition of anthrax lethal factor examined by combinatorial and pre-steady-state kinetic approaches. *J Biol Chem.* 2009;284(27):17902-13. doi: 10.1074/jbc.M807510200.
10. Shoop WL, Xiong Y, Wiltsie J, Woods A, Guo J, Pivnichny JV, et al. Anthrax lethal factor inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005;102(22):7958-63.
11. Akane A, Matsubara K, Nakamura H, Takahashi S, Kimura K. Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* 1994;39:362-72.
12. Al-Soud WA, Jonsson LJ, Radstrom P. Identification and characterization of immunoglobulin G in blood as a major inhibitor of diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 2000;38(1):345-50.
13. Sykes A, Brooks T, Dusmet M, Nicholson AG, Hansell DM, Wilson R. Inhalational anthrax in a vaccinated soldier. *Eur Respir J.* 2013;42(1):285-7. doi: 10.1183/09031936.00201112.
14. Le Du MH, Lamoure C, Muller BH, Bulgakov OV, Lajeunesse E, Ménez A, et al. Artificial evolution of an enzyme active site: structural studies of three highly active mutants of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. *J Mol Biol.* 2002; 316(4):941-53.
15. Kipriyanov SM. High-level periplasmic expression and purification of scFvs. *Methods Mol Biol.* 2009;562:205-14. doi: 10.1007/978-1-60327-302-2_16.
16. Kuklennyk Z, Boyer AE, Lins RB, Quinn CP, Gallegos-Candela M, Woolfitt A, et al. Comparison of MALDI-TOF-MS and HPLC-ESI-MS/MS for endopeptidase activity-based quantification of Anthrax lethal factor in serum. *Anal Chem.* 2011 Mar 1; 83(5):1760-5. doi: 10.1021/ac1030144.
17. Guesdon JL, Ternynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem.* 1979;27:1131-9.
18. Brossier F, Weber-Levy M, Mock M, Sirard JC. Role of toxin functional domains in anthrax pathogenesis. *Infect Immun.* 2000;68(4):1781-6.
19. Mechaly A, McCluskey AJ, Collier RJ. Changing the receptor specificity of anthrax toxin. *MBio.* 2012 May 1;3(3). pii: e00088-12. doi: 10.1128/mBio.00088-12.
20. Singh Y, Klimpel KR, Goel S, Swain PK, Leppla SH. Oligomerization of anthrax toxin protective antigen and binding of lethal factor during endocytic uptake into mammalian cells. *Infect Immun.* 1999;67(4):1853-9.
21. Belova EV, Dubiley SA, Kravchenko TB, Kolesnikov AV, Zakharova MYu, Shemyakin IG. Antibodies to different epitopes of the anthrax protective antigen and neutralization and enhancement of the lethal toxin action *in vitro*. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2004;3:21-6. (In Russian).
22. Chung MC, Popova TG, Millis BA, Mukherjee DV, Zhou W, Liotta LA, et al. Secreted neutral metalloproteases of *Bacillus anthracis* as candidate pathogenic factors. *J Biol Chem.* 2006;281:31408-18.
23. Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V, Lereclus D. A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes. *Proteomics*;2005;5(14):3696-711.
24. Matthews DJ, Wells JA. Substrate phage: selection of protease substrates by monovalent phage display. *Science.* 1993;260(5111):1113-7.

References

1. Jernigan DB, Raghunathan PL, Bell BP, Brechner R, Bresnitz EA, Butler JC, et al. Investigation of bioterrorism-related anthrax, United States, 2001: epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(10):1019-28.
2. Tang S, Moayeri M, Chen Z, Harma H, Zhao J, Hu H, et al. Detection of anthrax toxin by an ultrasensitive immunoassay using europium nanoparticles. *Clin Vaccine Immunol.* 2009;16(3):408-13.
3. Duesbery NS, Webb CP, Leppla SH, Gordon VM, Klimpel KR, Copeland TD, et al. Proteolytic inactivation of MAP-kinase-kinase by anthrax lethal factor. *Science.* 1998;280(5364):734-7.

Информация о соавторах:

Дронина Мария Алексеевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории биокатализа Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН
Адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Телефон: (495) 335-0100

Хлынцева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Шемякин Игорь Георгиевич, доктор биологических наук, заместитель директора ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Колесников Александр Владимирович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунопротеомики ООО «Институт инженерной иммунологии», ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболensk, ФБУН ГНЦ ПМБ
Телефон: (4967) 36-0003

Information about co-authors:

María A. Dronina, PhD (biol.), researcher of Biocatalysis Laboratory of academicians M.M.Shemyakina and Yu.A.Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
Address: 16/10, ul. Miklukho-Maklaya, Moscow, 117997, Russian Federation
Phone: (495) 335-0100

Anna E. Hlyntseva, PhD (biol.), researcher of Molecular Biology Laboratory, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Igor G. Shemyakin, Doctor of Science (biol.), Deputy Director of FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Alexander V. Kolesnikov, PhD (bio.), Chief of Immunoproteomika Laboratory of Ltd Company «Institute of Engineering Immunology», Lyubuchany, leading researcher of Molecular Biology Laboratory of FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003

Филогеография штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа SNP полных геномов

С.В.Писаренко, Д.А.Ковалев, А.А.Хачатурова, А.С.Волынкина, Д.В.Русанова, А.Н.Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

В рамках исследования получены полногеномные нуклеотидные последовательности 11 штаммов возбудителя бруцеллеза, выделенных на территории Российской Федерации. Предложена модифицированная методика SNP-анализа полных геномов патогенных микроорганизмов, включающая анализ кодирующих и некодирующих участков генома, что позволяет повысить достоверность полученных результатов, а также выявить ранее не описанные полиморфизмы. Представлены результаты оценки глобального филогеографического разнообразия штаммов *Brucella (B.) melitensis*. Впервые определены наборы единичных нуклеотидных замен, позволяющих дифференцировать разные генотипы возбудителя бруцеллеза. Установлено, что штаммы *B. melitensis*, циркулирующие на юге России, принадлежат к ранее не описанному генотипу. Сформулировано предположение об общности происхождения штаммов возбудителя бруцеллеза, циркулирующих на юге России и в регионах Центральной Азии.

Ключевые слова: *Brucella*, филогеография, геном, SNP

Для цитирования: Писаренко С.В., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Волынкина А.С., Русанова Д.В., Куличенко А.Н. Филогеография штаммов *Brucella melitensis* на основе анализа SNP полных геномов. Бактериология. 2016; 1(1): 73–79. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79

Phylogeography of *Brucella melitensis* strains based on the whole-genome SNP analysis

S.V.Pisarenko, D.A.Kovalev, A.A.Khachaturova, A.S.Volynkina, D.V.Rusanova, A.N.Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Stavropol', Russian Federation

The full genome sequences of eleven strains *B. melitensis* collected from Russian Federation are obtained. We designed a method of whole-genome SNP-analysis of pathogen microorganisms including test of coding and non-coding regions of genome that allows to increase a reliability of results and to discover new polymorphisms. Results of evaluation of global phylogeographical diversity of the isolates *B. melitensis* are showed. Compositions of SNPs for differentiating genotypes of *Brucella* were originally described. We found that strains from the South of Russia are owned to previously unknown genotype. An assumption of a common origin of isolates *B. melitensis* from the South of Russia and the Central Asia is formulated.

Key words: *Brucella*, phylogeography, genome, SNP

For citation: Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Khachaturova A.A., Volynkina A.S., Rusanova D.V., Kulichenko A.N. Phylogeography of *Brucella melitensis* strains based on the whole-genome SNP analysis. Bacteriology. 2016; 1(1): 73–79. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-73-79

Бруцеллез – особо опасное, зоонозное инфекционное заболевание, вызываемое бактериями рода *Brucella*, имеющее медико-социальную и экономическую значимость [1, 2]. Род *Brucella* представлен 10 видами микроорганизмов, классификация которых основана на способности паразитировать преимущественно в организме определенных видов животных, фенотипических и биохимических свойствах [3]. Наибольшую эпидемиологическую значимость имеют виды: *B. melitensis* (поражает мелкий рогатый скот) – вызывает у людей наиболее тяжелые формы заболевания, *B. abortus*

(крупный рогатый скот) и *B. suis* (свиньи, зайцы, олени, мышевидные грызуны).

В последние годы ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации остается напряженной. По данным Федеральной службы по ветеринарному и фитосанитарному надзору в Российской Федерации, отмечается ежегодное увеличение количества больных сельскохозяйственных животных и неблагополучных пунктов по бруцеллезу крупного (КРС) и мелкого (МРС) рогатого скота. Ежегодно в России регистрируется более 340 случаев впервые выявленного бруцел-

Для корреспонденции:

Писаренко Сергей Владимирович, старший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора

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

Телефон: (865-2) 26-0312

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Статья поступила 02.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Sergey V. Pisarenko, senior researcher, Laboratory of Biochemistry FGIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation

Phone: (865-2) 26-0312

E-mail: snipchi@mail.stv.ru

The article was received 02.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

леза у людей. Основная часть выявляемых случаев заболевания бруцеллезом в Российской Федерации – более 85% – приходится на долю Северо-Кавказского, Южного и Сибирского федеральных округов [4].

Важная роль в научном обосновании таксономических и микробиологических особенностей микроорганизмов, процессов их эволюции, а также в решении эпидемиологических задач отводится методам анализа генома. Эффективным

инструментом определения внутривидовых генетических отношений штаммов является исследование единичных нуклеотидных изменений, или SNP (англ. Single Nucleotide Polymorphism) при анализе полногеномных последовательностей. Анализ полных геномов открывает широкие возможности изучения происхождения и глобального распространения возбудителя бруцеллеза.

В настоящее время за рубежом активно проводятся исследования генетического разнообразия штаммов возбудителя бруцеллеза. На основе анализа полногеномных последовательностей по локусам единичных полиморфных нуклеотидов (SNP), локализованных в ортологичных генах штаммов *B. melitensis*, Kim-Kee Tan et al. (2015) составили схему распределения генетических вариантов, изолированных на территории разных континентов [5]. В соответствии с регионом выделения изоляты *B. melitensis* разделены на пять основных генотипов: I – Средиземноморье, II – Азия, III – Африка, IV – Европа, V – Америка.

Имеются сведения о генетических характеристиках изолятов *B. melitensis*, выделенных от людей и животных в России и сопредельных государствах, полученных методом MLVA [6, 7]. В то же время филогеографических исследований штаммов, циркулирующих на территории России, с использованием данных полногеномного секвенирования не проводилось, не определено их филогенетическое родство со штаммами *B. melitensis* из других регионов мира.

Цель исследования – филогеографический анализ штаммов *B. melitensis*, циркулирующих на территории России, оценка возможностей применения полногеномного SNP анализа для идентификации изолятов возбудителя бруцеллеза и определения их происхождения.

Материалы и методы

Штаммы бруцелл получены из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Штамм *B. melitensis* 548 выделен в 1948 г. от плода овцы в Саратовской области. Штаммы *B. melitensis* C-554, C-555 и C-558 выделены в Республике Дагестан от больных в период с 2012 по 2013 гг., *B. melitensis* C-567, C-568 и C-569 – в Республике Калмыкия от больных в 2014 г., *B. melitensis* C-570, C-571, C-572 и C-573 – от больных в Ставропольском крае в 2014 г. Штаммы *B. melitensis* 548, C-567, C-568, C-569, C-572 были отнесены к 1 биовару, *B. melitensis* 570, C-571 и C-573 – 3 биовару.

Подготовка образцов геномной ДНК

Бактерии культивировали на бруцелл-агаре при 37°C в течение 48 ч. Микробную взвесь с концентрацией $1,7 \times 10^9$ м.к./мл обеззараживали путем добавления мертиолята натрия (0,01%) и инкубирования при 56°C в течение 30 минут. Геномную ДНК выделяли с использованием набора «PureLink Genomic DNA Kit» («Life Technologies», США).

Полногеномное секвенирование

Подготовку геномных библиотек проводили с использованием набора «Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit» («Life Technologies», США), моноклональную амплификацию выполняли на микросферах – наборы «Ion OneTouch 200 Template Kit V2 DL» и «Ion OneTouch 400 Template Kit» («Life

Таблица 1. Геномные последовательности штаммов возбудителя бруцеллеза, исследованные методом полногеномного анализа SNP

№ п/п	Штамм	Идентификационный номер геномной сборки в GenBank
1.	<i>B. melitensis</i> 20236	GCA_001431745.1
2.	<i>B. melitensis</i> 548	PRJNA236790
3.	<i>B. melitensis</i> 66/59	GCA_000366865.1
4.	<i>B. melitensis</i> ADMAS-G1	GCA_000444515.1
5.	<i>B. melitensis</i> ATCC 23457	GCA_000022625.1
6.	<i>B. melitensis</i> B115	GCA_000365865.1
7.	<i>B. melitensis</i> BG2 (S27)	GCA_000370625.1
8.	<i>B. melitensis</i> BM IND1	GCA_000685375.1
9.	<i>B. melitensis</i> bv. 1 str. 133	GCA_000298595.1
10.	<i>B. melitensis</i> bv. 1 str. 16M	GCA_000007125.1
11.	<i>B. melitensis</i> bv. 1 str. 16M_1	GCA_000250795.2
12.	<i>B. melitensis</i> bv. 1 str. BCB028	GCA_000292165.2
13.	<i>B. melitensis</i> bv. 1 str. BCB033	GCA_000292085.2
14.	<i>B. melitensis</i> bv. 2 str. 63/9	GCA_000740395.1
15.	<i>B. melitensis</i> bv. 3 str. 128	GCA_000298615.1
16.	<i>B. melitensis</i> bv. 3 str. Ether	GCA_000158735.1
17.	<i>B. melitensis</i> C-554	PRJNA239190
18.	<i>B. melitensis</i> C-555	PRJNA239191
19.	<i>B. melitensis</i> C-558	PRJNA244608
20.	<i>B. melitensis</i> C-567	PRJNA288259
21.	<i>B. melitensis</i> C-568	PRJNA289961
22.	<i>B. melitensis</i> C-569	PRJNA289965
23.	<i>B. melitensis</i> C-570	PRJNA289967
24.	<i>B. melitensis</i> C-571	PRJNA289968
25.	<i>B. melitensis</i> C-572	PRJNA289970
26.	<i>B. melitensis</i> C-573	PRJNA289971
27.	<i>B. melitensis</i> CNGB 1076	GCA_000366625.1
28.	<i>B. melitensis</i> CNGB 1120	GCA_000366885.1
29.	<i>B. melitensis</i> CNGB 290	GCA_000366905.1
30.	<i>B. melitensis</i> F1/06 B10	GCA_000370645.1
31.	<i>B. melitensis</i> F10/05-2	GCA_000366925.1
32.	<i>B. melitensis</i> F10/06-16	GCA_000370665.1
33.	<i>B. melitensis</i> F15/06-7	GCA_000365845.1
34.	<i>B. melitensis</i> F2/06-6	GCA_000366945.1
35.	<i>B. melitensis</i> F3/02	GCA_000366965.1
36.	<i>B. melitensis</i> F5/07-239A	GCA_000366985.1
37.	<i>B. melitensis</i> F6/05-6	GCA_000367005.1
38.	<i>B. melitensis</i> F8/01-155	GCA_000370685.1
39.	<i>B. melitensis</i> F9/05	GCA_000370705.1
40.	<i>B. melitensis</i> Human/CT/US/1995	GCA_000988815.1
41.	<i>B. melitensis</i> M28	GCA_000192725.1
42.	<i>B. melitensis</i> MY1483/09	GCA_000940435.1
43.	<i>B. melitensis</i> NI	GCA_000227645.1
44.	<i>B. melitensis</i> Phil1136/12	GCA_000938035.1
45.	<i>B. melitensis</i> UK14/06	GCA_000370725.1
46.	<i>B. melitensis</i> UK19/04	GCA_000367045.1
47.	<i>B. melitensis</i> UK22/04	GCA_000370745.1
48.	<i>B. melitensis</i> UK22/06	GCA_000366585.1
49.	<i>B. melitensis</i> UK23/06	GCA_000370765.1
50.	<i>B. melitensis</i> UK24/06	GCA_000370785.1
51.	<i>B. melitensis</i> UK29/05	GCA_000370805.1
52.	<i>B. melitensis</i> UK3/06	GCA_000370825.1
53.	<i>B. melitensis</i> UK31/99	GCA_000370845.1
54.	<i>B. melitensis</i> UK37/05	GCA_000370865.1
55.	<i>B. abortus</i> 2308	GCA_000054005.1
56.	<i>B. abortus</i> S19	GCA_000018725.1

Technologies», США), в соответствии с протоколами производителя. Секвенирование геномов проводили с помощью секвенатора «Ion Torrent PGM» и чипов «Ion 316 Chips Kit V2» («Life Technologies», США).

Сборка и аннотация геномов

Оценку качества полученных ридов проводили с помощью программы FastQC v 0.11.3 [8]. Риды, содержащие нуклеотиды с низким качеством прочтения, были отфильтрованы в программе Trimmomatic v0.33 [9]. Сборку геномов проводили с помощью программы Newbler (Roche). Оценку качества сборки геномов выполняли с использованием программы Quast 3.0 [10]. Аннотацию геномных проектов проводили с помощью алгоритма NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP). Полученные нуклеотидные последовательности были депонированы в базу данных DDBJ/EMBL/GenBank.

Поиск SNP

В работе были использованы данные о геномных последовательностях 56 штаммов возбудителя бруцеллеза (табл. 1): 11 последовательностей геномов, определенных в данном исследовании, 43 геномных проекта *B. melitensis*, находящихся в свободном доступе, а также два полных генома штаммов *B. abortus* (группа сравнения). Поиск SNP в геномах осуществляли с помощью web-сервера REALPHY 1.10 [11], используя в качестве референсной последовательности геном штамма *B. melitensis* 16M (GCA_000007125.1).

Филогеографический анализ

Для изучения филогеографического распределения таксонов на основе анализа SNP 54 геномов штаммов *B. melitensis* использовали программный пакет BEAST 2.3.0 [12]. Параметры эволюционной модели были определены с помощью программы jModelTest2 [13]. Байесовский MCMC анализ был проведен с использованием модели General Time Reversible (GTR). Оценку параметров филогенетического дерева проводили в программе Tracer v1.6 [14]. Полученное филогенетическое дерево визуализировали в программе Figtree [15].

Результаты и обсуждение

Геном *Brucella spp.* представлен двумя хромосомами без внехромосомных элементов. Реализация общего механизма, определяющего пластичность бактериального

генома – горизонтального переноса генов, у представителей рода *Brucella* в значительной мере ограничена вследствие специфичной внутриклеточной локализации возбудителя при инфекции. По этой причине геномные изменения, включающие мутации и перегруппировку отдельных генов, играют решающую роль в эволюции возбудителя бруцеллеза.

Полногеномный филогенетический анализ на основе SNP позволяет установить с высокой степенью достоверности филогенетические связи изолятов, выделенных в определенных географических регионах. В опубликованной ранее работе по филогеографическому анализу штаммов возбудителя бруцеллеза [5] для построения филогенетического дерева использовали SNP, локализованные в ортологичных генах. В нашем исследовании при проведении анализа использовались SNP в гомологичных последовательностях ДНК, включая как кодирующие, так и некодирующие участки геномов. При этом информация, содержащаяся в некодирующих участках ДНК, является чрезвычайно ценной для дифференциации штаммов возбудителя бруцеллеза [16]. По нашему мнению, использование в процессе филогенетического анализа комплекса SNP в кодирующих и некодирующих участках геномов позволяет получить более точные сведения о происхождении и разнообразии изучаемых штаммов. Кроме того, в нашей работе не использовались геномные последовательности штаммов *B. melitensis*, для которых не удалось достоверно определить географическое местоположение и время выделения возбудителя, вакцинных и искусственно полученных штаммов, в частности *B. melitensis* bv. 1 str. M5 (GCA_000209575.2), bv. 1 str. M111 (GCA_000209615.2), bv. 1 str. Rev.1 (GCA_000158695.1), M5 (GCA_000348645.1), M5-10 (GCA_000292065.1), M5-90 (GCA_000192885.1), 16M1W (GCA_000250815.2), 16M13W (GCA_000250835.2) [5]. Также из анализа был исключен штамм *B. melitensis* S66 (GCA_000250775.2) по причине некорректной кластеризации с другими штаммами *B. melitensis*.

Мы сравнили геномные последовательности одиннадцати изолятов, полученные в настоящей работе (табл. 2), с геномами 43 штаммов *B. melitensis*, доступными в базах данных на момент проведения исследования. Сравнение всех исследуемых штаммов бруцелл, в том числе штаммов внеш-

Таблица 2. Результаты аннотации секвенированных геномных последовательностей штаммов *B. melitensis*

	<i>Brucella melitensis</i>										
	548	C-554	C-555	C-558	C-567	C-568	C-569	C-570	C-571	C-572	C-573
Контиги (> 500 п.н.)	123	49	49	63	80	63	42	44	41	41	36
N50	47 193	155 834	148 692	97 850	79 247	97 850	178 821	178 775	184 315	204 688	189 366
Длина геномной сборки, п.н.	3 274 707	3 281 496	3 280 974	3 279 898	3 281 445	3 279 896	3 282 433	3 282 488	3 282 125	3 283 069	3 282 507
% покрытия референсного генома	98,908	99,118	99,102	99,065	99,081	99,065	99,119	99,118	99,124	99,143	99,135
GC состав, %	57,27	57,24	57,24	57,25	57,25	57,25	57,25	57,25	57,25	57,25	57,25
Общее число предсказанных генов	3406	3313	3316	3088	3160	3146	3137	3150	3126	3139	3134
Гены с известной функцией, абс. (% от общего числа генов)	3047 (89,46)	2823 (85,20)	2815 (84,89)	2637 (85,39)	2793 (88,24)	2637 (83,74)	2961 (94,33)	2880 (91,4)	2892 (92,31)	2955 (94,07)	2969 (94,58)
tРНК	49	47	49	49	49	49	49	49	47	49	49
pРНК	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

ней группы, позволило определить 14 055 сайтов однонуклеотидных полиморфизмов.

Реконструкцию филогенетического дерева проводили с использованием обнаруженных SNP. Полученное филогенетическое дерево и данные о месте и времени выделения штаммов представлены на рисунке.

В работе были использованы ранее описанные обозначения генотипов [5], в соответствии с которыми все штаммы *B. melitensis*, используемые в исследовании, были представлены пятью генотипами, которые соответствуют известному географическому происхождению изолятов.

B. melitensis Ether (биовар 3) занимает базальную ветвь филогенетического дерева. *B. melitensis* 16 М (биовар 1) и *B. melitensis* 63/9 (биовар 2) дивергировали от штамма *B. melitensis* Ether, что согласуется с результатами более ранних исследований [5, 17]. В соответствии с данными проведенного филогенетического анализа *B. melitensis* Ether и связанные с ним штаммы были обозначены как генотип I, *B. melitensis* 63/9 и родственные ему штаммы – генотип II, а *B. melitensis* 16 М и связанные с ним штаммы –

генотип V. Штаммы африканской группы сформировали генотип III, *B. melitensis* B115 и связанные с ним штаммы – генотип IV [5].

К генотипу I были отнесены пять из 54 штаммов *B. melitensis*, геномные последовательности которых были использованы в исследовании. Три штамма, принадлежащие к генотипу I, были выделены в Италии (bv. 3 str. Ether, F15/06-7 и F5/07-239A), один штамм UK31/99 – в Египте и один штамм Human/CT/US/1995 изолирован в Северной Америке. Сравнение геномных последовательностей штаммов генотипа I с последовательностью референсного генома *B. melitensis* 16М позволило выявить от 2839 до 2951 SNP для каждого штамма. Впервые описано 1264 полиморфизма, которые позволяют дискриминировать штаммы генотипа I от штаммов других генотипов. Сравнение изолятов внутри генотипа I показало наличие 1068 SNP.

Генотип II включает 35 штаммов *B. melitensis*. Штаммы этого генотипа наиболее широко распространены, в том числе в странах Африки, Европы и Азии. Полногеномный SNP анализ изолятов *B. melitensis*, относящихся ко II геноти-

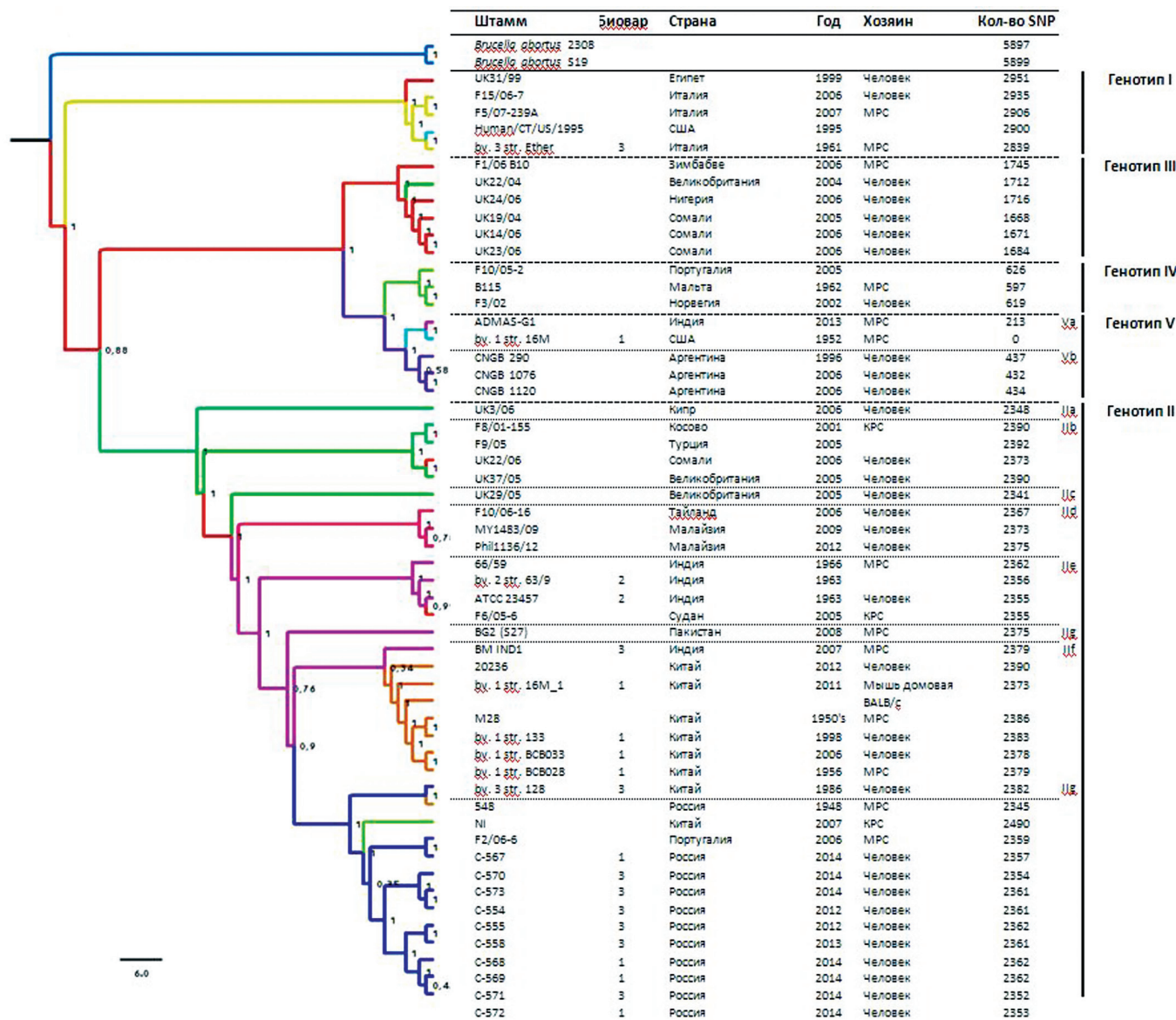


Рисунок. Филогенетическое дерево штаммов *B. melitensis*, построенное на основании полногеномного SNP анализа.

пу, позволил выявить от 2341 до 2490 полиморфизмов по сравнению с референсным геномом *B. melitensis* 16M.

Штаммы генотипа II представлены несколькими кластерами. Кластер IIb включает 4 штамма *B. melitensis*, выделенных в отдаленных друг от друга географических местах: два штамма – из Косово и Великобритании (Европа), один штамм – из Турции (Азия), один штамм – из Сомали (Африка). Анализ SNP выявил наличие 376 SNP, позволяющих дифференцировать штаммы кластера, и 91 специфичный полиморфизм для генотипа IIb. Штамм *B. melitensis* UK29/05, выделенный в Великобритании, не входит в генотип IIb, а занимает внутренний узел филогенетического дерева и обозначен как генотип IIc.

Генотип IIд образуют штаммы, выделенные на территории Юго-Восточной Азии (Таиланд, Малайзия, Филиппины). Нами обнаружен 131 SNP, специфичный для этого кластера, а также 25 полиморфизмов, позволяющих дифференцировать штаммы внутри генотипа. Генотип IIе составили три штамма из Индии и один штамм, выделенный в Судане (Африка). На основе анализа SNP мы обнаружили 64 SNP, специфичных для генотипа IIе. Сравнение геномных последовательностей штаммов внутри генотипа IIе позволило определить наличие 77 SNP. Штамм *B. melitensis* BG2 (S27), выделенный в Пакистане, ранее описанный как один из штаммов генотипа 2f [5], в результате полногеномного филогеографического анализа, проведенного нами, был выделен в отдельный генотип 2g. Описана принадлежность этого штамма к кластеру изолятов, выделенных в Китае. Дальнейшая дивергенция штаммов *B. melitensis* привела к формированию двух кластеров. Штаммы, выделенные в Китае, а также индийский штамм *B. melitensis* BM IND1 образуют генотип IIф. На основе анализа SNP нам не удалось выявить специфичных SNP для штаммов этого генотипа, однако были обнаружены 90 SNP, которые отличают штаммы китайского происхождения, входящие в генотип IIф, от всех других штаммов *B. melitensis*, использованных в нашем исследовании. Анализ SNP штаммов внутри генотипа IIф позволил выявить 315 нуклеотидных полиморфизмов.

Штаммы *B. melitensis* NI и *B. melitensis* F2/06-6 в исследовании [5] образуют одну из ветвей подгенотипа 2f. В нашей работе указанные изоляты вместе со штаммами, выделенными на территории РФ, вероятно, имеющие общее происхождение от представителей генотипа IIг, образуют отдельный кластер, который мы обозначили как ранее не описанный генотип IIh. Он включает 13 из 54 исследуемых штаммов *B. melitensis*. Анализ SNP позволил выявить 20 SNP, специфичных для генотипа IIh, и 591 SNP при сравнении последовательностей штаммов внутри генотипа.

Анализ филогенетического дерева дает возможность предположить общность происхождения штаммов возбудителя бруцеллеза, циркулирующих на Юге России и регионах Центральной Азии. Одно из возможных объяснений генетического сходства указанных изолятов заключается в том, что в относительно недалеком историческом прошлом происходил перенос штаммов возбудителя бруцеллеза при интенсивном перемещении крупного и мелкого рогатого скота между Россией и Китаем. В начале XX века жители на территории современных республик Казахстана, Узбекистана,

Таджикистана, Туркменистана объединяли скот в стада более 1500 голов и вели кочевой образ жизни, что могло способствовать распространению штаммов возбудителя бруцеллеза от северного Китая до южных регионов России. Кроме того, вследствие сходных климатогеографических и социально-экономических особенностей, наличия неблагополучных по бруцеллезу скотопрогонных трасс, указанная территория была благоприятной для устойчивой циркуляции возбудителя бруцеллеза среди диких и сельскохозяйственных животных.

Генотип III включает 6 штаммов, принадлежащих к африканской группе, за исключением штамма UK22/04, выделенного в Великобритании. Штаммы генотипа III имеют от 1668 до 1745 SNP в сравнении с *B. melitensis* 16M. На основании SNP анализа полных геномов удалось идентифицировать 335 SNP, специфичных для штаммов генотипа III. Сравнение последовательностей указанных штаммов показало наличие 1761 SNP, отличающих варианты внутри генотипа.

Генотип IV включает 3 штамма, изолированных в Норвегии, Португалии и на Мальте. Нами выявлены 125 специфичных SNP и 205 полиморфизмов, отличающих штаммы в рамках указанного генотипа.

Генотип V представлен американскими штаммами, выделенными в Аргентине (CNGB1075, CNGB1120 и CNGB290) и США (bv. 1 str. 16M), а также включает штамм ADMAS-G1 из Индии. Генотип V разделен на два кластера: Va – штаммы bv. 1 str. 16M, ADMAS-G1 и Vb – штаммы из Южной Америки (Аргентина). Нами определены 125 специфичных SNP для штаммов кластера Va, однако выявить специфичные SNP для вариантов из Южной Америки не удалось.

Происхождение американских штаммов возбудителя бруцеллеза от европейских предков находит подтверждение в том, что один из изолятов, выделенный в 1995 г. в США, входит в группу I генотипа. Напротив, южноамериканские варианты субгенотипа Vb формируют отдельную ветвь и имеют собственный специфичный набор SNP, отличающий эти штаммы от референсного *B. melitensis* 16M.

Быстрая и точная идентификация бруцелл возможна при использовании амплификационных методов на основе ПЦР. Вследствие высокой гомологии рода *Brucella* решение указанной задачи связано с применением мультилокусного анализа, например типирования методами MLST и MLVA. В то же время, учитывая уникальность SNP-генома каждого штамма, дискриминирующая способность метода полногеномного SNP-анализа, несомненно, выше по сравнению с методами SNP-типирования отдельных локусов, MLVA и др., и потенциально может применяться для уточнения происхождения штаммов бруцелл в ходе эпидемиологических расследований.

Одним из примеров, иллюстрирующих высокую дискриминирующую способность метода в отношении возбудителя бруцеллеза, является точная дифференциация штаммов *B. melitensis* 16M из лабораторий США и Китая. На основании полногеномного SNP-анализа было установлено, что штамм *B. melitensis* 16M_1 из лаборатории в Китае относится к группе азиатских штаммов (генотип II) и имеет существенные генетические отличия от международного референсного штамма *B. melitensis* 16M, выделенного в США в 1952 г. (генотип Va).

Таким образом, на основании полногеномного SNP-анализа установлено, что штаммы *B. melitensis*, циркулирующие на Юге России, принадлежат к ранее не описанному генотипу. Впервые определены единичные нуклеотидные замены, позволяющие дифференцировать разные генотипы возбудителя бруцеллеза. Сформулировано предположение об общности происхождения штаммов возбудителя бруцеллеза, циркулирующих на Юге России и регионах Центральной Азии.

Разработана и применена модифицированная методика SNP-анализа полных геномов патогенных микроорганизмов, которая, в отличие от альтернативных, включает анализ как кодирующих, так и некодирующих участков генома, что позволяет повысить достоверность полученных результатов, а также выявить ранее не описанные полиморфизмы. Проведенное исследование позволило уточнить филогенетические связи штаммов *B. melitensis* NI, *B. melitensis* F2/06-6 и *B. melitensis* BG2 (S27).

Литература

- Plumb GE, Olsen SC, Buttke D. Brucellosis: One Health challenges and opportunitie. Rev Sci Tech. 2013;32:271-8.
- Nicoletty P. Brucellosis: past, present and future. Prilozy. 2010;31:21-32.
- Ficht T. Brucella taxonomy and evolution. Future Microbiol. 2010 Jun; 5(6):859-66. doi: 10.2217/fmb.10.52.
- Лямкин ГИ, Пономаренко ДГ, Худолеев АА, Русанова ДВ, Вилинская СВ, Куличенко АН. Обзор эпидемиологической ситуации по бруцеллезу в Российской Федерации в 2015 г. и прогноз на 2016 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2016;2:11-3. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-11-13
- Tan KK, Tan YC, Chang LY, Lee KW, Nore1 SS, Yee WY, et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. BMC Genomics. 2015;16:93-104. doi: 10.1186/s12864-015-1294-x
- Коренберг ЭИ, Желудков ММ, Кулаков ЮК, Erdenebaator J. Генетическая характеристика изолятов *Brucella melitensis* из Монголии, России и Азербайджана. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011; 2:8-12.
- Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarylykov P, Filipenko M, et al. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16. Infection, Genetic and Evolution. 2015;34:173-180. doi:10.1016/j.meegid.2015.07.008
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30:2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013;29(8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
- Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Nimwegen E. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads. Molecular Biology and Evolution. 2014;31(5):1077-88.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology. 2014;10(4):e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. 2012;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. Tracer v1.6, 2014. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 13.05.2016).
- Rambaut A. FigTree version 1.4.2, 2014. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. (accessed 13.05.2016).
- Marchais A, Naville M, Bohn C, Bouloc P, Gautheret D. Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. Genome Res. 2009;19(6):1084-92. doi: 10.1101/gr.089714.108
- Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J Bacteriol. 2009;191(8):2864-70. doi: 10.1128/JB.01581-08

References

- Plumb GE, Olsen SC, Buttke D. Brucellosis: One Health challenges and opportunitie. Rev Sci Tech. 2013;32:271-8.
- Nicoletty P. Brucellosis: past, present and future. Prilozy. 2010;31:21-32.
- Ficht T. Brucella taxonomy and evolution. Future Microbiol. 2010 Jun; 5(6):859-66. doi: 10.2217/fmb.10.52.
- Lyamkin GI, Ponomarenko DG, Khudoleev AA, Rusanova DV, Vilinskaya SV, Kulichenko AN. Review of Epidemiological Situation on Brucellosis in the Russian Federation in 2015 and Prognosis for 2016. Problems of Particularly Dangerous Infections. 2016;2:11-3. doi: 10.21055/0370-1069-2016-2-11-13. (In Russian).
- Tan KK, Tan YC, Chang LY, Lee KW, Nore1 SS, Yee WY, et al. Full genome SNP-based phylogenetic analysis reveals the origin and global spread of *Brucella melitensis*. BMC Genomics. 2015;16:93-104. doi: 10.1186/s12864-015-1294-x
- Kulakov YuK, Zheludkov MM, Korenberg EI, Erdenebaator J. Genetic characterization of *Brucella melitensis* isolates from Mongolia, Russia, and Azerbaijan. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2011;2:8-12. (In Russian).
- Shevtsov A, Ramanculov E, Shevtsova E, Kairzhanova A, Tarylykov P, Filipenko M, et al. Genetic diversity of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* in Kazakhstan using MLVA-16. Infection, Genetic and Evolution. 2015;34:173-180. doi:10.1016/j.meegid.2015.07.008
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics. 2014;30:2114-20. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Gurevich A, Saveliev V, Vyahhi N, Tesler G. QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics. 2013;29(8):1072-5. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086
- Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, Nimwegen E. Automated reconstruction of whole genome phylogenies from short sequence reads. Molecular Biology and Evolution. 2014;31(5):1077-88.
- Bouckaert R, Heled J, Kühnert D, Vaughan T, Wu CH, Xie D, et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology. 2014;10(4):e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. Nature Methods. 2012;9(8):772. doi: 10.1038/nmeth.2109.
- Rambaut A, Suchard MA, Xie D, Drummond AJ. Tracer v1.6, 2014. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (accessed 13.05.2016).
- Rambaut A. FigTree version 1.4.2, 2014. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. (accessed 13.05.2016).
- Marchais A, Naville M, Bohn C, Bouloc P, Gautheret D. Single-pass classification of all noncoding sequences in a bacterial genome using phylogenetic profiles. Genome Res. 2009;19(6):1084-92. doi: 10.1101/gr.089714.108
- Foster JT, Beckstrom-Sternberg SM, Pearson T, Beckstrom-Sternberg JS, Chain PS, Roberto FF, et al. Whole-genome-based phylogeny and divergence of the genus *Brucella*. J Bacteriol. 2009;191(8):2864-70. doi: 10.1128/JB.01581-08

Информация о соавторах:

Ковалев Дмитрий Анатольевич, заведующий лабораторией биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Хачатурова Анна Андреевна, младший научный сотрудник лаборатории биохимии ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Волынкина Анна Сергеевна, научный сотрудник лаборатории диагностики природно-очаговых инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Русанова Диана Владимировна, научный сотрудник лаборатории бруцеллеза ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Куличенко Александр Николаевич, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15
Телефон: (865-2) 26-0312

Information about co-authors:

Dmitry A. Kovalyov, Head of Biochemistry Laboratory of FSIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Anna A. Khachaturova, junior researcher, Biochemistry Laboratory of FSIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Anna S. Volynkina, researcher of the Laboratory of Natural and Focal Infection Diagnosis of FSIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Diana V. Rusanova, researcher of Brucellosis Laboratory of FSIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Alexander N. Kulichenko, Director of FSIH Stavropol Plague Control Research Institute of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 13/15, ul. Sovetskaya, Stavropol', 355035, Russian Federation
Phone: (865-2) 26-0312

Уважаемые коллеги!

В соответствии с Приказом Роспотребнадзора №308 от 25.04.2016 г., подписанного руководителем Поповой А.Ю.

20–22 сентября 2016 г.
в г. Санкт-Петербург состоится

II НАЦИОНАЛЬНЫЙ КОНГРЕСС БАКТЕРИОЛОГОВ

В работе конгресса примут участие ведущие ученые страны в области санитарной и клинической микробиологии.

На конгрессе будут рассмотрены следующие вопросы:

- Современное состояние и тенденции развития санитарной и клинической микробиологии. Инновационные технологии. Вопросы импортозамещения.
- Совершенствование лабораторной диагностики инфекционных болезней и методов обнаружения патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах.
- Перспективы развития лабораторной диагностики особо опасных инфекций.
- Проблемы совершенствования нормативно-правовой базы по санитарно-микробиологическому контролю объектов окружающей среды и пищевых продуктов.
- Актуальные вопросы организации деятельности бактериологических лабораторий системы Роспотребнадзора на современном этапе.
- Нормативно-правовое регулирование производства и применения медицинских изделий для санитарной и клинической микробиологии.
- Опыт применения современных методов лабораторной диагностики инфекционных болезней и индикации патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов в объектах окружающей среды и пищевых продуктах в лабораториях Роспотребнадзора.

Организаторы

- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор);
- ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии (ФБУН ГНЦ ПМБ) Роспотребнадзора;
- ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора;
- ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в городе Санкт-Петербург Роспотребнадзора.

В конференции примут участие

заведующие бактериологическими лабораториями учреждений Роспотребнадзора из всех субъектов Российской Федерации.

Приглашены ведущие бактериологи страны из лечебно-профилактических учреждений здравоохранения, включая бактериологов Санкт-Петербурга, бактериологов пищевой, молочной промышленности.

В общей сложности ожидается участие не менее 400 человек.

В рамках конгресса предусмотрена культурная программа, позволяющая в неформальной обстановке обсудить вопросы взаимодействия.

В ходе работы конгресса будет организована специализированная выставка. Участникам выставки будет предоставлена возможность выступить с кратким сообщением на научных сессиях конгресса.

Приглашаем Вас принять участие в национальном конгрессе бактериологов.

Контактное лицо:

Шепелин Анатолий Прокопьевич, Зам. директора ФБУН ГНЦ ПМБ
E-mail: shepelin@obolensk.org, Тел.: 8 – (4967) 31-21-81

Технический организатор

ООО «Ком-форум»
www.baltica21.ru

В рамках работы Конгресса пройдет выставка производителей медицинских изделий.

Вход на выставку и заседания конгресса бесплатный

Размещение в гостинице

Парк Инн Пулковская.
Стоимость проживания в гостинице оплачивается самостоятельно участниками Конгресса.

Тел./факс: +7 (812) 315-23-72; +7 (812) 310-43-09

E-mail: irina.petrova@baltica21.ru

Контактное лицо: Петрова Ирина Николаевна

По вопросам участия коммерческих компаний

в выставке и научной программе Конгресса обращаться к техническому организатору

Тел./факс: +7 (812) 315-23-72; +7 (812) 310-43-09

E-mail: irina.petrova@baltica21.ru

Контактное лицо: Петрова Ирина Николаевна

По организационным вопросам проведения конгресса

можно обращаться к зам. главного врача ФБУЗ «ЦГиЭ в г. Санкт-Петербурге» Гречаниновой Татьяне Александровне

Тел.: +7 (812) 570-60-78

E-mail: tatyana_grechani@mail.ru

Эпидемиологическая эффективность применения бактериофагов для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах

В.Г.Акимкин^{1,2,3}, А.В.Алимов⁴, В.С.Поляков⁵

¹ФБУН НИИ дезинфектологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация;

²ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова, Москва, Российская Федерация;

³ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Москва, Российская Федерация;

⁴ФБУН НИИ вирусных инфекций Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Екатеринбург, Российская Федерация;

⁵ФГКУ 1026 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны Российской Федерации, Екатеринбург, Российская Федерация

Была изучена микробиологическая и эпидемиологическая эффективность бактериофагов (стрептококкового, стафилококкового, поливалентного) и бициллина-5 для профилактики болезней органов дыхания бактериальной этиологии в организованном коллективе в период сезонного подъема заболеваемости. Изучена структура выделенных культур мазков из зева, уровень и структура заболеваемости военнослужащих болезнями органов дыхания до применения бактериофагов и бициллина-5, динамика изменения микробного пейзажа и заболеваемости в течение 3 мес после профилактического курса. Установлена высокая фаголизательность всех бактериофагов к выделенным чистым культурам. Применение бактериофагов позволило достоверно снизить уровень заболеваемости болезнями органов дыхания бактериальной этиологии в организованных коллективах от 1,8 до 9,0 раз.

Ключевые слова: стрептококковые инфекции, эпидемиологическая эффективность, бактериофаг стрептококковый, стафилококковый, полибактериофаг, «Секстафаг», бициллин-5, болезни органов дыхания бактериальной этиологии

Для цитирования: Акимкин В.Г., Алимов А.В., Поляков В.С. Эпидемиологическая эффективность применения бактериофагов для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах. Бактериология. 2016; 1(1): 80–87. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-80-87

Epidemiological efficiency of the use of bacteriophages for prevention of acute respiratory bacterial infections in organized groups

V.G.Akimkin^{1,2,3}, A.V.Alimov⁴, V.S.Polyakov⁵

¹FBIS RI of Disinfectology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;

²FSBEI HPE I.M. Sechenov 1st Moscow State Medical Institute, Moscow, Russian Federation;

³FBIS Central RI of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Moscow, Russian Federation;

⁴FBIS RI of Viral Infections of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, Ekaterinburg, Russian Federation;

Для корреспонденции:

Акимкин Василий Геннадьевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заслуженный врач РФ, полковник медицинской службы запаса, заместитель директора по научной работе ФБУН НИИ дезинфектологии Роспотребнадзора

Адрес: 117246, Москва, Научный проезд, 18
Телефон: (495) 332-0150

Статья поступила 07.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Vasily G. Akimkin, corresponding member of the Russian Academy of Sciences, doctor of medical sciences, honoured doctor of the Russian Federation, colonel of a health service, deputy director on scientific work of FBIS Research Institute of Disinfectology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

Address: 18, Nauchnyi proezd, Moscow, 117246, Russian Federation
Phone: (495) 332-0150

The article was received 07.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

⁵FSGI 1026 Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Defence of the Russian Federation, Ekaterinburg, Russian Federation

Studied microbiological and epidemiological effectiveness of bacteriophages (streptococcal, staphylococcal, polyvalent) and bicillin-5 for the prevention of acute respiratory bacterial diseases in an organized groups in the period of seasonal rise of morbidity. Studied the structure of selected cultures of swabs from the pharynx, the level and structure of morbidity of soldiers with respiratory diseases to the use of bacteriophages and bicillin-5, changes in the microbial structure and morbidity within three months after the preventive course. The high favoritelist all of bacteriophages to pure isolated cultures. The use of bacteriophages has allowed significantly to reduce the incidence of respiratory diseases of bacterial etiology in organized groups from 1.8 to 9.0 times.

Key words: group A beta-hemolytic streptococci (GABHS), respiratory diseases of bacterial etiology, prevention of disease in military units, efficiency of the use of bacteriophages and bitsillin-5, streptococcal infections, epidemiological efficiency, bacteriophage streptococcal, staphylococcal, polybacterial, «Sextapes», bicillin-5, respiratory diseases of bacterial etiology

For citation: Akimkin V.G., Alimov A.V., Polyakov V.S. Epidemiological efficiency of the use of bacteriophages for prevention of acute respiratory bacterial infections in organized groups. *Bacteriology*. 2016; 1(1): 80–87. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-80-87

Стрептококковые группы А (СГА) инфекции входят в число наиболее острых проблем здравоохранения во всех странах мира. По данным ВОЗ, в мире ежегодно возникает свыше 111 миллионов случаев стрептодермии и 616 миллионов случаев стрептококковых фарингитов. В России ежегодно более 10 миллионов детей и лиц юношеского возраста переносят респираторную стрептококковую инфекцию.

Острые болезни органов дыхания в настоящее время являются одной из самых актуальных проблем для военной медицины в связи с высоким уровнем заболеваемости военнослужащих, проходящих военную службу по призыву [1, 2].

Так, по данным Главного военно-медицинского управления, в 2014 г. в структуре общей заболеваемости доля болезней органов дыхания составила более 57%.

В Вооруженных Силах стрептококковые заболевания занимают одно из первых мест среди инфекционных заболеваний военнослужащих. В качестве средства экстренной профилактики используется антибиотик (бициллин 5) [3].

СГА имеют широкий спектр суперантигенов (САГ) (эритрогенные токсины А, В и С, Д, экзотоксин F (митогенный фактор), стрептококковый суперантиген (SSA), эритрогенные токсины SpeX, SpeG, SpeH, SpeJ, SpeZ, Sme Z-2). Все эти САГ могут взаимодействовать с антигенами главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) второго класса, экспрессированными на поверхности антигенпрезентирующих клеток (АПК) и вариabельными участками бета-цепи (Vбета-рецепторами) Т-лимфоцитов, вызывая их пролиферацию и тем самым мощный выброс цитокинов, особенно таких, как фактор некроза опухоли и гамма-интерферон. Эта гиперпродукция оказывает системное воздействие на организм и приводит к разрушительным последствиям.

СГА способны продуцировать целый ряд других биологически активных экстрацеллюлярных веществ, таких как стрептолизин О и S, стрептокиназа, гиалуронидаза, ДНКаза В, стрептодорназа, липопроотеиназа, С5а-пептидаза и др. Клеточная стенка включает капсулу, белковый, полисахаридный (группспецифический антиген) и мукопротеидный слой. Капсула состоит из гиалуроновой кислоты и является одним из факторов вирулентности. Наряду с М-белком она обеспечивает антифагоцититарную устойчивость возбудителя. В адгезии (колонизации) поверхности клеток слизистых

человека также активную роль играют М-белок, липотейхоевая кислота, F-белок.

В антигенном отношении (по М-белку) выделяют свыше 110 серотипов СГА. Известно, что ревматизм чаще всего возникает после инфицирования стрептококком М-типов 1, 3, 5, 6, 18, а гломерулонефрит – 2, 17, 19, 24, 49, 55, 57, 59 типов. В то же время известно, что стрептококки первого серотипа способны вызывать как ревматизм, так и гломерулонефрит. С экологических позиций различают «кожные» (находящиеся на кожных покровах) и «респираторные» (в носоглотке) штаммы стрептококков [4–6].

Резервуар и источники инфекции – больные различными клиническими формами острых стрептококковых заболеваний и носители патогенных стрептококков. Наибольшее эпидемиологическое значение имеют больные с локализацией микробного очага в области верхних дыхательных путей (скарлатина, ангина). Такие больные обладают высокой заразительностью, а выделяемые ими стрептококки содержат основные факторы вирулентности: капсулу и М-белок. Поэтому заражение восприимчивых лиц от указанных больных наиболее часто заканчивается развитием у них манифестной инфекции. Лица, у которых очаги стрептококка располагаются вне дыхательных путей (стрептококковые пиодермиты, отиты, мастоидиты, остеомиелиты и т.д.), имеют меньшее эпидемиологическое значение в связи с менее активным выведением возбудителя из организма больного.

Механизм передачи инфекции в основном аэрозольный, путь передачи – воздушно-капельный. Заражение происходит, как правило, при тесном длительном общении с больным или носителем. Возможен алиментарный (пищевой) и контактный (через загрязненные руки и предметы обихода) пути инфицирования людей.

Возбудитель чаще всего выделяется во внешнюю среду при экспираторных актах (кашель, чихание, активный разговор). Заражение происходит при вдохе образующегося воздушно-капельного аэрозоля. Допускается передача и через капельно-ядрышковую фазу аэрозоля. Высокая плотность людей в помещениях, длительное тесное общение являются условиями, благоприятствующими заражению. В организованных коллективах с круглосуточным пребыванием детей и взрослых воздушно-капельный путь

передачи возбудителя наиболее эффективен в спальных помещениях, игровых комнатах, местах длительного пребывания членов коллектива. При этом следует учитывать, что на расстоянии более 3 м этот путь передачи практически не осуществляется.

Дополнительными факторами, способствующими передаче возбудителя, являются низкая температура и высокая влажность воздуха в помещении, т.к. в этих условиях дольше сохраняется капельная фаза аэрозоля, в которой возбудитель содержится в вирулентном состоянии.

Помимо аэрозольного, в передаче возбудителей инфекции определенное значение имеют бытовой и алиментарный пути заражения. Факторами передачи возбудителя в первом случае являются загрязненные руки и предметы ухода, а во втором – инфицированная пища. СГА, попадая в определенные пищевые продукты, способны размножаться и длительно находиться в них в вирулентном состоянии. Так, описаны вспышки заболеваний ангиной или фарингитом при употреблении таких пищевых продуктов, как молоко, компоты, сливочное масло, салат из вареных яиц, омара, моллюсков, бутербродов с яйцом, ветчиной и др. Риску развития гнойных осложнений стрептококкового генеза подвергаются раненые, обожженные, больные в послеоперационном периоде, а также роженицы и новорожденные. Инфекция может развиваться и эндогенным путем.

Естественная восприимчивость людей – высокая. В последние годы получены данные о связи между группами крови системы АВ0, HLA-антигенами и аллоантигенами В лимфоцитов Д 8/17 и заболеваниями ревматизмом, а также скарлатиной и ангиной.

Бета-гемолитические СГА наиболее вирулентны для человека. Они вызывают такие БОД, как фарингит, тонзиллит, пневмонию. Кроме того, СГА являются этиологическим фактором развития скарлатины, кожных инфекций, ревматических осложнений и гломерулонефрита.

Бактериофаги – это современная альтернатива антибиотикам. Особенно в тех случаях, когда применение антибиотиков затруднено. Первый известный науке отчет об успешной фаготерапии был сделан в 1921 г. Брионгом и Майсином, которые использовали стафилококковый бактериофаг для лечения заразных болезней кожи. В 1920-е гг. фаги активно использовались при лечении различных заболеваний [7–9]. Однако в 1940-е гг. они были потеснены антибиотиками, а на Западе о фагах забыли вовсе [10–14].

Сегодня в западных странах интерес к фагам проснулся вновь. Побудительным мотивом к этому явилось всевозрастающее число устойчивых к антибиотикам микроорганизмов, особенно стафилококков и синегнойной палочки [6, 10].

Целью работы была оценка эпидемиологической эффективности применения бактериофагов (стрептококкового, стафилококкового, пиобактериофага поливалентного) для профилактики острых респираторных инфекций бактериальной этиологии в организованных коллективах в период их формирования.

Задачи исследования

1. Изучить уровень, структуру и динамику заболеваемости стрептококковыми инфекциями и болезнями органов дыхания бактериальной этиологии в организованных коллективах военнослужащих.

2. Изучить этиологическую структуру возбудителей болезней органов дыхания в организованных коллективах военнослужащих.

3. Выявить группы военнослужащих, имеющих повышенный риск заболевания болезнями органов дыхания бактериальной этиологии, а также факторы внешней среды, способствующие повышению заболеваемости у военнослужащих.

4. Усовершенствовать систему эпидемиологического надзора за болезнями органов дыхания в организованных коллективах военнослужащих.

5. Оптимизировать систему мероприятий по профилактике стрептококковых инфекций с применением бактериофагов в организованных коллективах.

Материалы и методы

Оценку эффективности применения бактериофагов и бициллина-5 осуществляли по двум направлениям: микробиологическое и эпидемиологическое.

Микробиологические исследования (динамику изменения микробного пейзажа у военнослужащих основной и контрольной групп до и после применения профилактических средств) проводили в лаборатории центра государственного санитарно-эпидемиологического надзора Центрального военного округа Министерства обороны (г. Екатеринбург). Мазок из зева [15] для бактериологического исследования забирали до утреннего туалета полости рта, натошак в соответствии с требованиями методических указаний [16]. Количественные исследования мокроты проводили в соответствии с требованиями приказа Министерства здравоохранения СССР от 22.04.1985 г. №535 [17]. Диагностически значимым считали обнаружение возбудителя в 1 мл бульона в концентрации 10^5 и выше.

Специфичность (литическую активность) бактериофагов в отношении выделенных чистых культур определяли методом Отто (стекающей капли) путем добавления на питательные среды соответствующего бактериофага. В качестве контроля добавляли чистый физиологический раствор.

Эпидемиологическую эффективность применения бактериофагов (стрептококкового, стафилококкового, пиобактериофага поливалентного) и бициллина-5 оценивали путем анализа проявлений эпидемического процесса заболеваемости тонзиллитами (и другими болезнями органов дыхания бактериальной этиологии) в опытной и контрольной группах до и после применения профилактических средств. Для анализа использовалась схема когортного исследования, рекомендованного ВОЗ (WHO, 92324). Статистическую значимость различий показателей оценивали методом Хи-квадрат (χ^2), заполняя четырехпольную таблицу. Статистически достоверными считали различия, при которых значение χ^2 составляло более 3,841 ($p \leq 0,05$).

В исследовании принимали участие 510 здоровых военнослужащих (мужчин), из них 404 – основная группа, призванных в Вооруженные Силы в декабре 2013 г. из 26 субъектов Приволжского, Уральского и Сибирского федеральных округов, в возрасте от 18 до 26 лет (средний возраст $19,3 \pm 1,6$ лет) и проходящих военную службу по призыву в одном из учебных воинских соединений на территории Свердловской области.

Таблица 1. Характеристика контрольной и основных групп

Группы и подгруппы	Количество обследуемых, чел.		Применявшееся профилактическое средство
	всего	в т.ч. обследованы бактериологически	
Контрольная	106	67	Нет
Основная	404	164	
1-я подгруппа	111	35	Бактериофаг стрептококковый
2-я подгруппа	92	31	Бактериофаг стафилококковый
3-я подгруппа	107	59	Пиобактериофаг поливалентный
4-я подгруппа	94	39	Бициллин-5
Всего	510	231	

В процессе повседневной военно-профессиональной деятельности военнослужащие занимались учебно-боевой подготовкой в учебных классах и полевых условиях, обслуживанием военной техники в парке. Военнослужащие основной группы были распределены на 4 подгруппы по принципу принадлежности к воинскому подразделению (табл. 1).

В первую подгруппу вошли лица, получавшие с 14.01.2014 г. по 03.02.2014 г. (три календарные недели) бактериофаг стрептококковый, раствор для приема внутрь, местного и наружного применения. Предприятие-изготовитель – ФГУП «НПО «Микроген» (г. Пермь).

Во вторую подгруппу вошли лица, получавшие в этот же период бактериофаг стафилококковый, раствор для приема внутрь. Предприятие-изготовитель – ФГУП «НПО «Микроген» (г. Нижний Новгород).

В третью подгруппу вошли лица, получавшие в этот же период пиобактериофаг поливалентный («Секстафаг»), раствор для приема внутрь. Предприятие-изготовитель – ФГУП «НПО «Микроген» (г. Пермь).

Все виды бактериофагов разводили в соотношении 1 : 1 с физиологическим раствором в условиях аптеки лечебного учреждения. Применяли все виды бактериофагов путем аэрозольного орошения ротоглотки по 1,5–2 мл, два раза в день (утром за 1,5 ч до приема пищи, вечером – через 2 ч после приема пищи).

В четвертую подгруппу вошли лица, получившие однократно бициллин-5. Предприятие-изготовитель – ОАО «Синтез» (г. Курган).

В контрольную группу вошли военнослужащие одного из подразделений учебного воинского соединения, имеющие аналогичные условия размещения, питания, труда, отдыха и военно-профессиональной деятельности, не получавшие ни одного из перечисленных профилактических средств и прививок.

Результаты и обсуждение

В структуре общей первичной заболеваемости военнослужащих учебного центра (табл. 2), так же, как и в ВС РФ, первое ранговое место по уровню заболеваемости занимают БОД (X класс по МКБ-10). Их доля в анализируемом 2014 г. составила 68,8% (в ВС РФ – 57,8%). Второе ранговое место занимают болезни кожи и подкожной клетчатки (XII класс по МКБ-10) – 11,1% (ВС РФ – 14,6%). Третье ранговое место – некоторые инфекционные и паразитарные болезни (I класс по МКБ-10) – 7,8% (ВС РФ – 5,0%). На долю остальных 16 классов и нозоформ в учебном центре в 2014 г. пришлось 12,3% заболеваний (ВС РФ – 22,6%).

Уровень заболеваемости военнослужащих учебного центра БОД в 2014 г. (рис. 1) составил 1749,42‰, что статистически достоверно выше в 2,4 раза ($p < 0,05$) показателя заболеваемости ВС РФ (723,00‰) и в 5,2 раза выше заболеваемости БОД населения России в 2014 г. (333,70‰).

В многолетней динамике заболеваемости БОД (ОРЗ, острыми тонзиллитами, внебольничными пневмониями, бронхитами и бронхиолитами) военнослужащих учебного центра (рис. 2) за период с 2009 по 2014 гг. наметилась устойчивая тенденция к росту (коэффициент регрессии b составил +201,69, коэффициент детерминации R^2 составил 0,7022). В Вооруженных Силах за этот же период также наметилась тенденция к росту, но менее выраженная ($b = +54,67$, $R^2 = 0,62$) в сравнении с заболеваемостью военнослужащих учебного центра.

Наименьший уровень заболеваемости БОД военнослужащих учебного центра, так же, как и в ВС РФ, регистрировался в 2010 г. – 776,10‰ (ВС РФ – 528,83‰). Наибольший уровень зарегистрирован в учебном центре в 2013 г. (2049,07‰), а в ВС РФ – в 2012 г. (833,30‰). На протяжении всего изучаемого периода уровень заболеваемости БОД военнослужащих учебного центра был выше показателей ВС РФ: от 1,5 раз (в 2010 г.) до 2,6 раз (в 2013 г.).

В структуре БОД военнослужащих учебного центра (рис. 2), так же, как и в ВС РФ, более половины заболеваний приходится на ОРЗ. Их доля в анализируемом 2014 г. составила 62,0% (в ВС РФ – 61,7%).

Заболеваемость другими стрептококковыми инфекциями и заболеваниями, такими как рожа, гломерулонефрит, ревматические осложнения, в ВС РФ носят спорадический характер и первостепенного эпидемиологического значения в учебном центре не имеют.

Учитывая преимущественно осенне-зимнюю сезонность стрептококковых инфекций и болезней органов дыхания

Таблица 2. Уровень и структура общей первичной заболеваемости военнослужащих учебного центра в 2014 г. (в сравнении с ВС РФ, 2014 г.)

Основные классы и нозоформы по МКБ-10	Учебный центр		ВС РФ	
	заболеваемость, на 1 тыс. чел., ‰	доля, %	заболеваемость, на 1 тыс. чел., ‰	доля, %
X класс. Болезни органов дыхания	1749,42	68,8	723,00	57,8
XII класс. Болезни кожи и подкожной клетчатки	281,94	11,1	182,00	14,6
I класс. Некоторые инфекционные и паразитарные болезни	198,90	7,8	63,10	5,0
Другие классы и нозоформы	311,56	12,3	281,90	22,6
Общая первичная заболеваемость	2541,81	100,0	1250,00	100,0

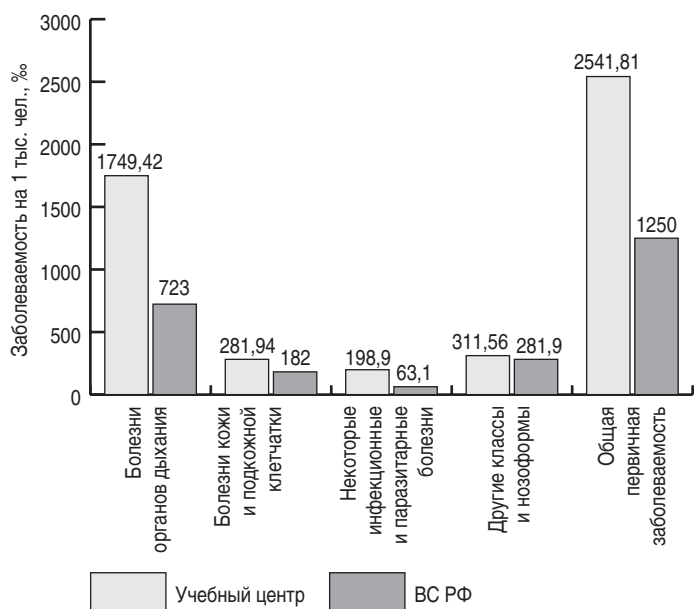


Рис. 1. Уровень заболеваемости основными актуальными классами заболеваний военнослужащих учебного центра в 2014 г. (в сравнении с ВС РФ, 2014 г.).

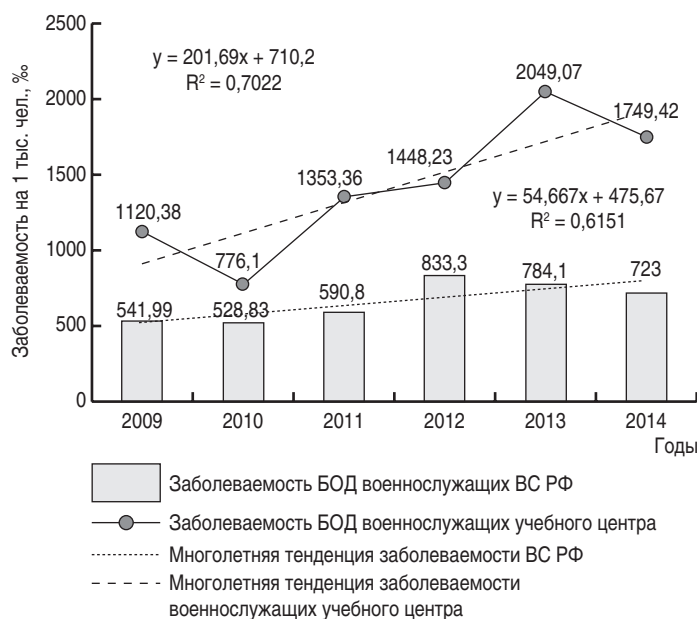


Рис. 2. Многолетняя динамика заболеваемости БОД (ОРЗ, острыми тонзиллитами, внебольничными пневмониями, бронхитами и бронхиолитами) военнослужащих учебного центра.

бактериальной этиологии, при построении графиков внутригодовой динамики заболеваемости военнослужащих учебного центра использовали эпидемический год, начинающийся с 1 июня и заканчивающийся 31 мая следующего года.

Внутригодовая динамика заболеваемости ОРЗ (рис. 3) военнослужащих учебного центра соответствует 4 фазам развития эпидемического процесса. В течение года в заболеваемости ОРЗ наблюдаются два сезонных подъема, превышающих верхний предел круглогодичной заболеваемости (55,08%). Меньший – летний (июль–август), больший – зимний (декабрь–март). Максимум заболеваемости ОРЗ приходится на январь (118,26%).

Сезонная заболеваемость острым тонзиллитом (так же, как и другими БОД) в учебном центре (рис. 4) определяется временем прибытия пополнения, т.е. периодом начального перемешивания личного состава с различным уровнем иммунитета к сложившейся в коллективе или занесенной в него стрептококковой микрофлоре. При этом в зависимости от внутренних особенностей воинских подразделений (доля новобранцев, условия размещения военнослужащих в казармах, длительность пребывания их в закрытых помещениях) повышение заболеваемости тонзиллитом начинается

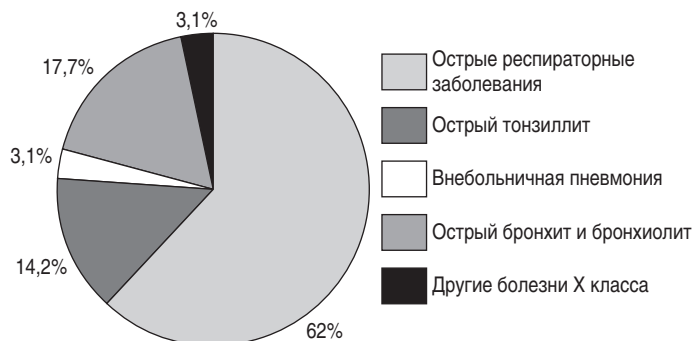


Рис. 3. Структура заболеваемости БОД (X класс по МКБ-10) военнослужащих учебного центра в 2014 г.

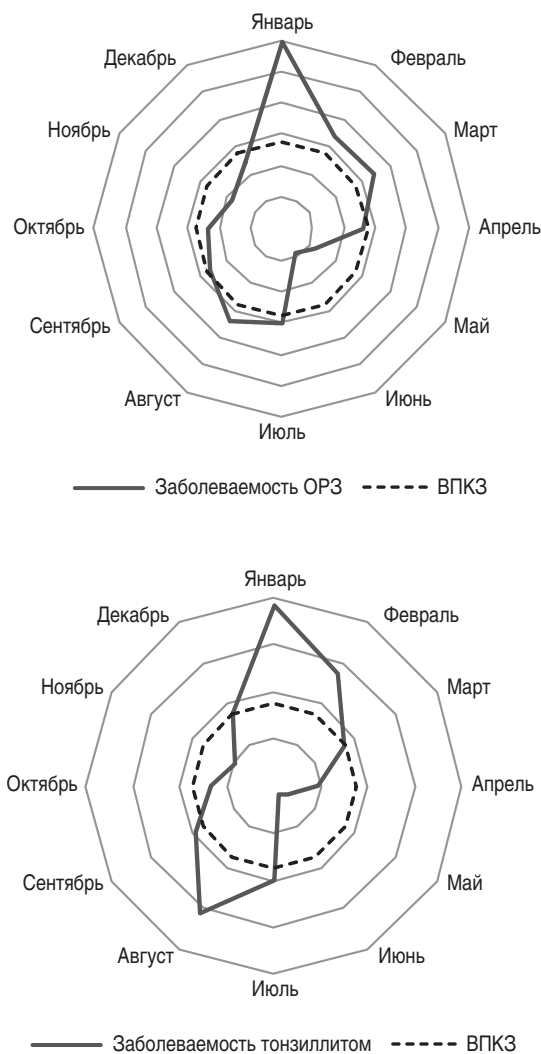


Рис. 4. Внутригодовая динамика (сезонность) заболеваемости ОРЗ (слева) и острым тонзиллитом (справа) военнослужащих учебного центра.

Таблица 3. Результаты микробиологических исследований подгруппы №1, получавшей бактериофаг стрептококковый, и контрольной группы, не получавшей профилактических средств

№ п/п	Возбудитель	Подгруппа №1		Контрольная группа	
		До проф. курса, абс. (%)	После проф. курса, абс. (%)	Первое исследование (январь 2014), абс. (%)	Второе исследование (февраль 2014), абс. (%)
1	<i>Str. pneumoniae</i>	31 (47,7)	–	–	5 (12,5)
2	<i>Str. pyogenes</i>	19 (29,2)	21 (84,0)	13 (76,5)	32 (80,0)
3	<i>S. aureus</i>	15 (23,1)	4 (16,0)	4 (23,5)	–
4	<i>Str. pneumoniae + S. aureus</i>	–	–	–	3 (7,5)
	Всего	65 (100,0)	25 (100,0)	17 (100,0)	40 (100,0)

в первые же дни после прибытия пополнения, достигая максимума через полтора-два месяца.

Бактериофаг стрептококковый. В структуре выделенных культур (до применения бактериофага стрептококкового) преобладали стрептококки – 76,9% (50 чел.), в т.ч. *Str. pneumoniae* – 47,7% (31 чел.), *Str. pyogenes* – 29,2% (19 чел.). *S. aureus* выделялся в 23,1% случаев (15 чел.). В контрольной группе в этот же период результаты оказались аналогичными. Стрептококки выделялись в 76,5% (13 чел.), *S. aureus* – в 23,5% (4 чел.) (табл. 3).

После профилактического курса количество выделенных стрептококков в подгруппе №1 уменьшилось в 2,4 раза, в основном за счет уменьшения доли пневмококков. В контрольной группе количество выделенных культур стрептококков увеличилось в 2,8 раза (с 13 до 37) за счет роста доли стрептококков (с 13 до 32) и появления пневмококков (с 0 до 5).

Исходный уровень заболеваемости ОРИ бактериальной этиологии (рис. 5а) в подгруппе №1 и контрольной группе (в декабре 2013 г.) статистически достоверно не различался (306,3% и 367,9%, $\chi^2 = 0,67$; $p > 0,05$).

Динамика заболеваемости военнослужащих ОРИ в подгруппе №1 (после профилактического курса стрептококкового бактериофага) свидетельствует о достоверном снижении в 1,8 раза в феврале 2014 г. (с 306,3% в декабре 2013 г. до 171,2% в феврале 2014 г., $\chi^2 = 4,86$; $p < 0,05$). При этом в контрольной группе уровень заболеваемости вырос в 1,4 раза (с 367,9% до 518,9%, $\chi^2 = 4,30$; $p < 0,05$).

Уровень заболеваемости в подгруппе №1 в феврале 2014 г. в 3,0 раза ниже уровня заболеваемости в контрольной

группе (171,2% и 518,9% соответственно, $\chi^2 = 27,64$; $p < 0,05$).

Исходный уровень заболеваемости тонзиллитом (рис. 5б) в подгруппе №1 и контрольной группе (в декабре 2013 г.) статистически достоверно не различался (9,0% и 9,4%, $\chi^2 = 0,45$; $p > 0,05$).

Во время проведения профилактического курса (январь 2014 г.) уровень заболеваемости тонзиллитом в подгруппе №1 вырос в 9,0 раз (с 9,0% до 81,1%; $\chi^2 = 5,13$; $p < 0,05$). Аналогичный рост заболеваемости в 9,0 раз в этот же период наблюдался и в контрольной группе, не получавшей профилактических средств (с 9,4% до 84,9%; $\chi^2 = 5,14$; $p < 0,05$).

Однако после завершения профилактического курса (февраль 2014 г.) уровень заболеваемости в подгруппе №1 достоверно снизился в 9,0 раз до исходного уровня (с 81,1% до 9,0%; $\chi^2 = 5,13$; $p < 0,05$). В контрольной группе уровень заболеваемости снизился с 84,9% до 28,3%, однако статистической достоверности различий не выявлено ($\chi^2 = 2,2$; $p > 0,05$).

Высокая эффективность в снижении заболеваемости тонзиллитом связана со стрептококковой этиологией заболеваний. Высокая эффективность бактериофага стрептококкового в отношении *Str. pneumoniae* подтверждается отсутствием даже спорадических случаев заболеваний нижних дыхательных путей (бронхит, пневмония) в подгруппе №1. Хотя до применения бактериофага (в декабре 2013 г.) случаи заболевания бронхитом и пневмонией регистрировались.

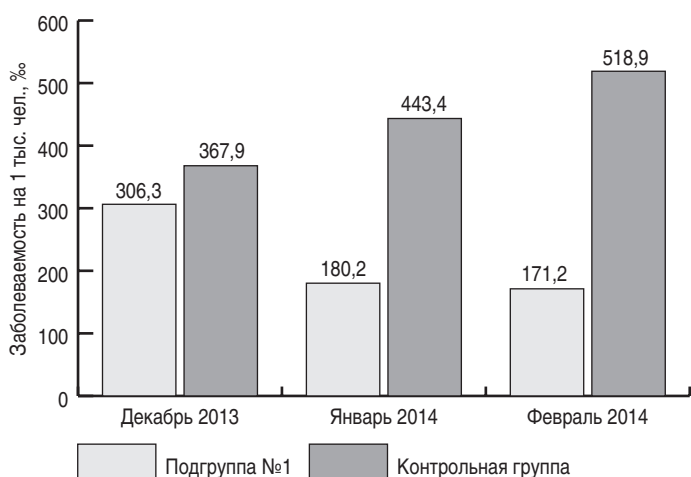


Рис. 5а. Заболеваемость ОРИ военнослужащих подгруппы №1, получавшей бактериофаг стрептококковый, и контрольной группы, не получавшей профилактических средств (на 1000 чел., %).

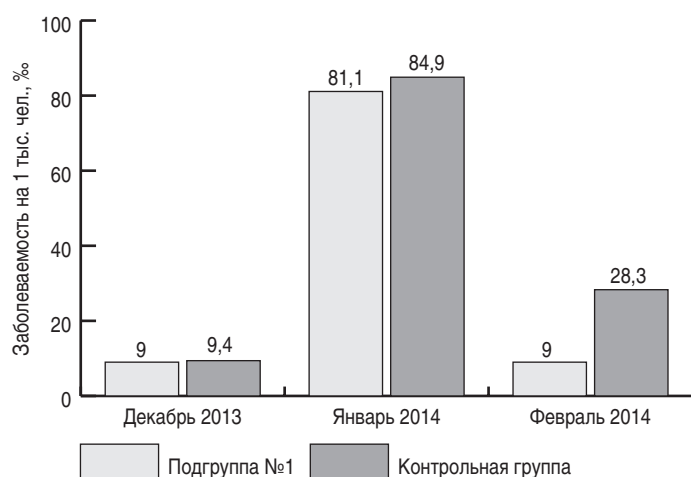


Рис. 5б. Заболеваемость тонзиллитом военнослужащих подгруппы №1, получавшей бактериофаг стрептококковый, и контрольной группы, не получавшей профилактических средств (на 1000 чел., %).

Случаев заболевания скарлатиной среди военнослужащих в подгруппе №1 и контрольной группе в декабре 2013 г. – феврале 2014 г. не зарегистрировано.

Бактериофаг стафилококковый. В структуре выделенных культур (до применения бактериофага стафилококкового) преобладали стрептококки – 71,9% (23 чел.), в т.ч. *Str. pneumoniae* – 15,6% (5 чел.), *Str. pyogenes* – 56,3% (18 чел.). *S. aureus* выделялся в 28,1% случаев (9 чел.). В контрольной группе в этот же период результаты оказались схожими. Стрептококки выделялись в 76,5% (13 чел.), *S. aureus* – в 23,5% (4 чел.).

После профилактического курса количество выделенных стафилококков в подгруппе №2 уменьшилось в 1,8 раза (статистической достоверности не выявлено, $\chi^2 = 0,03$; $p > 0,05$). В контрольной группе количество выделенных культур стафилококков уменьшилось ($\chi^2 = 12,54$; $p < 0,05$). Однако после профилактического курса выявлено комбинированное носительство *Str. pneumoniae* и *S. aureus* (8,2%).

Динамика заболеваемости военнослужащих ОРИ в подгруппе №2 (после профилактического курса стафилококкового бактериофага) свидетельствует о достоверном снижении в 1,7 раза. В то же время отмечена более низкая эффективность бактериофага стафилококкового в снижении заболеваемости тонзиллитом, что связано с преимущественно стрептококковой этиологией заболеваний.

Бактериофаг поливалентный («Секстафаг»). В структуре выделенных культур в подгруппе №3 (до применения Секстафага) выделялись стрептококки – 75,0% (12 чел.) и золотистый стафилококк – 25,0% (4 чел.). В контрольной группе в этот же период стрептококки выделялись в 76,5% (13 чел.), *S. aureus* – в 23,5% (4 чел.).

После профилактического курса у 8 военнослужащих в подгруппе №3 выделен стрептококк (*Str. pneumoniae*). Других возбудителей и их комбинаций выделено не было.

Динамика заболеваемости военнослужащих ОРИ в подгруппе №3 (после профилактического курса полибактериофага) свидетельствует о незначительном, статистически не значимом снижении в феврале 2014 г. При этом в контрольной группе уровень заболеваемости вырос в 1,4 раза.

Бициллин-5. В структуре выделенных культур, до применения бициллина-5 и после его однократного введения, статистически достоверных различий не выявлено. Однако исследования показали высокую чувствительность выделенных культур *Str. pyogenes* к антибиотикам пенициллинового ряда, в том числе бициллину-5.

Выводы

1. В структуре общей первичной заболеваемости организованных воинских коллективов болезни органов дыхания занимают доминирующее положение (до 70%).

2. В структуре этиологических агентов острых респираторных инфекций в организованных коллективах военнослужащих преобладают стрептококки (*Str. pneumoniae* и *Str. pyogenes*) (до 75%) и стафилококки (*S. aureus*) (20–25%).

3. Основной группой риска заболевания острыми респираторными инфекциями являются военнослужащие из числа молодого пополнения, составляя 65–80% численного состава подразделений учебного типа. Наиболее значимыми

факторами риска, способствующими повышению заболеваемости БОД в организованном коллективе, являются несоблюдение требований, предъявляемых к размещению (скученность); общее переохлаждение организма в результате неблагоприятного воздействия комплекса метеорологических факторов; нарушение качественной и количественной адекватности питания; переутомление.

4. Профилактическое применение стрептококкового бактериофага позволило достоверно снизить уровень заболеваемости военнослужащих в период формирования воинского коллектива ОРИ бактериальной этиологии в 1,8 раза, тонзиллитами – в 9,0 раз. Высокая эффективность в снижении заболеваемости тонзиллитом и ОРИ бактериальной этиологии связана с преимущественно стрептококковой этиологией данных заболеваний.

5. Высокая эффективность бактериофагов в снижении уровня заболеваемости тонзиллитами и более длительный профилактический эффект, по сравнению с результатом, полученным при применении бициллина-5, подтверждает предпочтительность применения бактериофагов в воинских коллективах.

6. Применение бактериофагов не влияет на проведение плановой иммунопрофилактики военнослужащих в период формирования воинских коллективов, может применяться как отдельно, так и в сочетании с применением антибиотиков и не влияет негативно на иммунный статус лиц призывного возраста.

При применении бактериофагов в целях профилактики простудной заболеваемости отмечается эффект санации организованного воинского коллектива. В результате местного действия на микрофлору носоглотки военнослужащих нарушается процесс циркуляции в коллективе возбудителей простудных заболеваний кокковой этиологии и, как следствие, предотвращается формирование эпидемического штамма, обуславливающего групповую заболеваемость военнослужащих.

7. Применение бактериофагов путем аэрозольного орошения ротоглотки в течение трех календарных недель не вызывает аллергических реакций у военнослужащих.

8. Применение бактериофагов является современным направлением профилактики инфекционных болезней стрептококковой этиологии в организованных коллективах военнослужащих.

Литература

1. Акимкин ВГ, Музыченко ФВ, Малиновский АА. Роль и место главных медицинских специалистов в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия войск (сил). Военно-медицинский журнал. 2008;329(8):41-3.
2. Акимкин ВГ, Калмыков АА, Аминев РМ, Поляков ВС, Артебякин СВ. Опыт применения бактериофагов и бициллина-5 для снижения заболеваемости военнослужащих болезнями органов дыхания бактериальной этиологии. Военно-медицинский журнал. 2016;337(2):36-40.
3. Ангина. Указания по диагностике, лечению и профилактике в Вооруженных Силах Российской Федерации. Утверждены начальником Главного военно-медицинского управления Министерства обороны Российской Федерации, 1999.
4. Брико НИ, Ещина АС, Ряпис ЛА. Лабораторная диагностика стрептококковых инфекций: Пособие для врачей и научных работников. М.: Хризостом, 2000.

5. Брико НИ, Журавлев МВ, Малышев НА. Эпидемиология и профилактика стрептококковой (группы А) инфекции: Учебное пособие. М., 2003.
6. Насонова ВА, Белов БС, Страчунский ЛС. и др. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия: Методические рекомендации для клиницистов. 1999;1(1).
7. Бессмертная НГ, Чижова ГВ, Владимирова НЮ. и др. Эффективность применения пиобактериофага у беременных с пиелонефритом. Современные методы диагностики и лечения в акушерстве и гинекологии. Сборник научных трудов. Саратов, 1999. С. 35-6.
8. Дolidze НГ, Аччеславский ЭГ, Шатиришвили ЕИ. Лечение гнойных осложненных плевры методом плеврального диализа с использованием бактериофага. Медицинские новости Грузии. 2000;7-8:37-9.
9. Vieu JF, Guillermet F, Minck R, Nicolle P. Donnees actuelles sur les applications therapeutiques des bactériophages. Bull Acad Natl Med. 1979;163:61.
10. Аrolava ДМ, Тимофеева МЕ, Мухитдинова МИ. Клеточный иммунитет больных острой дизентерией при фаготерапии. Актуальные вопросы бактериальных инфекций. М., 1989. 11-3.
11. Зуева ЛП, Сухоминова ГИ, Линник СА, и др. Адаптированный бактериофаг для лечения и профилактики гнойно-септических инфекций. Актуальные проблемы гнойно-септических инфекций. СПб., 1994.
12. Толкачева ТВ, Абакумов ЕМ, Мартынова ВА. и др. Коррекция дисбактериоза кишечника биологическими препаратами у больных острыми лейкозами. Проблемы гематологии и переливания крови. 1981;7:29-31.
13. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy revisd: The population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. Am Nat. 1996; 147:881-98.
14. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J Gen Microbiol. 1987;133:1127-35.
15. Микробиологическая диагностика стрептококковых инфекций. Методические рекомендации. М., 1995.
16. Эпидемиологический надзор и профилактика стрептококковой (группы А) инфекции. Методические указания МУ 3.1.1885-04.
17. Об унификации микробиологических (бактериологических) методов исследования, применяемых в клинико-диагностических лабораториях лечебно-профилактических учреждений. Приказ Министерства здравоохранения СССР от 22.04.1985 г. №535.
5. Briko NI, Zhuravlev MV, Malyshev NA. Epidemiologiya i profilaktika streptokokkovoi (gruppy A) infektsii: Uchebnoe posobie. Moscow, 2003. (In Russian).
6. Nasonova VA, Belov BS, Strachunskii LS, et al. Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya: Metodicheskie rekomendatsii dlya klinitsistov. 1999;1(1). (In Russian).
7. Bessmertnaya NG, Chizhova GV, Vladimirova NYu. et al. Effektivnost' primeneniya piobakteriofaga u beremennykh s pielonefritom. Sovremennyye metody diagnostiki i lecheniya v akusherstve i ginekologii. Sbornik nauchnykh trudov. Saratov, 1999. pp. 35-6. (In Russian).
8. Dolidze NG, Achcheslavskii EG, Shatirishvili EI. Lechenie gnoinykh oslozhenii plevry metodom plevral'nogo dializa s ispol'zovaniem bakteriofaga. Meditsinskie novosti Gruzii. 2000;7-8:37-9. (In Russian).
9. Vieu JF, Guillermet F, Minck R, Nicolle P. Donnees actuelles sur les applications therapeutiques des bactériophages. Bull Acad Natl Med. 1979;163:61.
10. Arolava DM, Timofeeva ME, Mukhitdinova MI. Kletochnyi immunitet bol'nykh ostroi dizenterii pri fagoterapii. Aktual'nye voprosy bakterial'nykh infektsii. Moscow, 1989. pp. 11-3. (In Russian).
11. Zueva LP, Sukhominova GI, Linnik SA, et al. Adaptirovannyi bakteriofag dlya lecheniya i profilaktiki gnoino-septicheskikh infektsii. Aktual'nye problemy gnoino-septicheskikh infektsii. SPb., 1994. (In Russian).
12. Tolkacheva TV, Abakumov EM, Martynova VA, et al. Korrektsiya disbakterioza kishechnika biologicheskimi preparatami u bol'nykh ostrymi leikozami. Problemy gematologii i perelivaniya krovi. 1981;7:29-31. (In Russian).
13. Levin B, Bull JJ. Phage Therapy revisd: The population biology of a bacterial infection and its treatment with bacteriophage and antibiotics. Am Nat. 1996;147:881-98.
14. Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. Factors influencing the survival and multiplication of bacteriophages in calves and in their environment. J Gen Microbiol. 1987;133:1127-35.
15. Mikrobiologicheskaya diagnostika streptokokkovykh infektsii. Guidelines. Moscow, 1995. (In Russian).
16. Epidemiologicheskii nadzor i profilaktika streptokokkovoi (gruppy A) infektsii. Guidelines MU 3.1.1885-04. (In Russian).
17. Ob unifikatsii mikrobiologicheskikh (bakteriologicheskikh) metodov issledovaniya, primenyaemykh v kliniko-diagnosticheskikh laboratoriyakh lechebno-profilakticheskikh uchrezhdenii. Prikaz Ministerstva zdravookhraneniya SSSR ot 22.04.1985 g. №535. (In Russian).

References

Информация о соавторах:

Алимов Александр Викторович, полковник медицинской службы запаса, директор ФБУН НИИ вирусных инфекций Роспотребнадзора
Адрес: 620030, Екатеринбург, ул. Летняя, 23
Телефон: (343) 261-9947

Поляков Виталий Сергеевич, майор медицинской службы, начальник ФГКУ 1026 Центр государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 620144, Екатеринбург, ул. Декабристов, 87
Телефон: (343) 257-9401

Information about co-authors:

Alexander V. Alimov, reserve colonel of medical service, Director of FBIS Research Institute of Viral Infections of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
Address: 23, ul. Letnyaya, Ekaterinburg, 620030, Russian Federation
Phone: (343) 261-9947

Vitaly S. Polyakov, major of medical service, Head of FSGU 1026 Center of the State Sanitary and Epidemiological Surveillance, Ministry of Defence of the Russian Federation
Address: 87, ul. Dekabristov, Ekaterinburg, 620144, Russian Federation
Phone: (343) 257-9401

1. Akimkin VG, Muzychenko FV, Malinovsky AA. Role and place of chief medical officers in guarantee of sanitariumepidemiological well-being of the Army. Военно-медицинский журнал. 2008;329(8):41-3. (In Russian).
2. Akimkin VG, Kalmykov AA, Aminev RM, Polyakov VS, Artebyakin SV. Experience of using bacteriophages and bitsillin-5to reduce the incidence of respiratory diseases of bacterial etiology in military personne. Военно-медицинский журнал. 2016;337(2):36-40. (In Russian).
3. Angina. Ukazaniya po diagnostike, lecheniyu i profilaktike v Vooruzhennykh Silakh Rossiiskoi Federatsii. Utverzhdenu nachal'nikom Glavnogo voenno-meditsinskogo upravleniya Ministerstva oborony Rossiiskoi Federatsii, 1999. (In Russian).
4. Briko NI, Eshchina AS, Ryapis LA. Laboratornaya diagnostika streptokokkovykh infektsii: Posobie dlya vrachei i nauchnykh rabotnikov. Moscow, 2000. (In Russian).

MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями

С.В.Балахонов, Л.В.Миронова, М.В.Афанасьев, Е.С.Куликалова, А.С.Остяк

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора,
Иркутск, Российская Федерация

Проведено комплексное исследование эффективности использования MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности культур *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* в рамках эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Установлена высокая информативность видовой идентификации патогенов на основании профиля константных белков микробной клетки с применением расширенной базы данных MALDI Biotyper 3,0 при оперативном эпидемиологическом анализе и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов.

Ключевые слова: эпидемиологический надзор, чума, холера, туляремия, MALDI-ToF масс-спектрометрия, ускоренная идентификация

Для цитирования: Балахонов С.В., Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Куликалова Е.С., Остяк А.С. MALDI-ToF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями. Бактериология. 2016; 1(1): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94

MALDI-ToF mass-spectrometric detection of pathogen specific belonging in improvement of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases

S.V.Balakhonov, L.V.Mironova, M.V.Afnas'ev, E.S.Kulikalo,va, A.S.Ostyak

Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk, Russian Federation

A complex research of mass-spectrometric MALDI-ToF efficiency was conducted to detect the taxonomic belonging of *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis* cultures in the network of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases. High information value of the pathogen specific identification on the basis of the constant protein profile of a microbial cell was determined using the extended database MALDI Biotyper 3,0 in operative epidemiological analysis and retrospective examination of the collection isolates.

Key words: epidemiological surveillance, plague, cholera, tularemia, MALDI-ToF mass-spectrometry, accelerated identification

For citation: Balakhonov S.V., Mironova L.V., Afnas'ev M.V., Kulikalova E.S., Ostyak A.S. MALDI-ToF mass-spectrometric detection of pathogen specific belonging in improvement of epidemiological surveillance for dangerous infectious diseases. Bacteriology. 2016; 1(1): 88–94. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-88-94

В системе эпидемиологического надзора за опасными инфекционными заболеваниями в РФ значимая роль отводится оперативному определению видовой принадлежности возбудителей, обеспечивающему своевременное принятие управленческих решений по необходимому ком-

плексу и объему профилактических и противозидемических мероприятий. При этом эффективность диагностической подсистемы эпидемиологического надзора определяется интеграцией в национальную систему лабораторной диагностики современных молекулярных технологий инди-

Для корреспонденции:

Балахонов Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78

Телефон: (3952) 22-0135

E-mail: chumin@mail.ru

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Sergei V. Balakhonov, Sc.D. (Med), Professor, Director Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor

Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation

Phone: (3952) 22-0135

E-mail: chumin@mail.ru

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

кации и идентификации патогенов [1, 2]. Применение новых высокотехнологичных подходов существенно сокращает время анализа, обеспечивает его высокую чувствительность и специфичность при существенном повышении информативности.

Один из таких подходов – прямое белковое профилирование с использованием MALDI-ToF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация с время-пролетным разделением) масс-спектрометрического анализа. Суть MALDI-ToF масс-спектрометрии заключается в «мягкой» ионизации лазером сокристаллизованного с матрицей аналита (исследуемого образца), последующем разделении ионизированных молекул и генерации специфического спектра, характеризующего качественный состав образца. Метод в последние годы широко применяется в идентификации и молекулярном типировании микробных патогенов [3–7]. Принцип идентификации с применением MALDI-ToF MS основан на анализе белкового паттерна исследуемого микроорганизма, сопоставлении его с типовыми масс-спектрами, представленными в базе данных, и определении на основании этого таксономической принадлежности изолята [6]. Идентификация микроорганизмов по белковому профилю характеризуется высокой воспроизводимостью, специфичностью, скоростью, простотой и низкими материальными затратами на выполнение протокола [4, 6, 8].

Цель исследования – разработка методологических подходов и оценка эффективности применения прямого белкового профилирования в ускоренной идентификации возбудителей чумы, холеры и туляремии.

Материалы и методы

В работе использовано 104 штамма *Y. pestis*, 92 – *V. cholerae* и 97 – *F. tularensis*, хранящихся в музее живых культур ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и изолированных на курируемой институтом территории.

Штаммы чумного микроба выращивали на питательном агаре для культивирования микроорганизмов общего назначения, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) в течение 24 ч при 28°C, холерного вибриона – на щелочном агаре, pH 7,6 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) при 37°C в течение 18 ч, туляремийного микроба – на FT-агаре (pH 7,0) при 37°C 48 ч.

Таксономическая принадлежность взятых в исследование штаммов определялась на основании комплекса стандартных фенотипических тестов, включающих изучение тинкториальных, культурально-морфологических, биохимических, серологических и ряда других свойств.

Экстракция клеточных белков осуществлялась посредством последовательной обработки микробной взвеси этиловым спиртом, 70% муравьиной кислотой с последующим добавлением ацетонитрила. По окончании экстракции 1 мкл супернатанта переносился в лунки MSP-чипа, образцы подсушивались на воздухе, сверху наносился 1 мкл матрицы (насыщенный водный раствор α -циано-4-гидроксикоричной кислоты, содержащий 50% ацетонитрила и 2,5% трифторуксусной кислоты). В качестве калибровочного стандарта и

положительного контроля анализа использовался белковый экстракт штамма *E. coli* DH5a (Bruker Daltonics, Германия). Наряду с экстракцией белков для микроорганизмов, отнесенных к III группе патогенности (*V. cholerae* не O1/O139, нетоксигенные *V. cholerae* O1), использовалось прямое нанесение культуры на MSP-чип с последующим наложением матрицы.

Для оценки биологической безопасности способа пробоподготовки использовались белковые экстракты трех штаммов каждого исследованного таксона. Дополнительно исследовались смывы с поверхности MSP-чипа с нанесенными на него белковыми экстрактами и матрицей. Исследование специфической стерильности для *V. cholerae* и *Y. pestis* проводилось в соответствии с «Инструкцией по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного или холерного микробов», 1982 г. Стерильность белковых препаратов туляремийного микроба определялась посредством внутрибрюшинного заражения биопробных животных (белых мышей) и прямого посева на чашки с FT агаром.

Спектры собирались в автоматическом режиме на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия) с использованием программы Flex Control (ver. 3.3, build 108). Для получения одиночного масс-спектра использовали 40 импульсов лазера (частота 60 Гц), анализируемый диапазон масса/заряд составлял 2000–20 000 Да. С каждой лунки чипа снимался исходный спектр, представляющий собой сумму 6 одиночных спектров (240 импульсов лазера). Для получения референсных библиотек спектров образец исследовался в 12 повторах, для идентификации – в пяти повторах. Анализ масс-спектров, генерация референсных библиотек и идентификация осуществлялись с использованием программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 (Bruker Daltonics, Германия).

Заключение о таксономической принадлежности исследуемого изолята осуществлялось на основании значения индекса совпадения (параметр score value, SV). Значение $SV \geq 2,3$ соответствовало достоверной идентификации до вида; $SV 2,299–2,000$ – достоверной идентификации до рода, вероятной идентификации до вида, значение SV в диапазоне 1,7–1,999 рассматривалось как вероятная идентификация до рода и менее 1,7 – недостоверный результат.

Результаты и обсуждение

Известно, что выбор способа пробоподготовки для масс-спектрометрического анализа определяется целью исследования и предполагаемой патогенностью идентифицируемого микроорганизма. В случае работы с возбудителями особо опасных инфекций одним из критериев выбора метода подготовки проб для исследования является его обеззараживающее действие на образец. Экспериментальные исследования по оценке специфической стерильности белковых препаратов анализируемых патогенов, полученных с использованием метода экстракции муравьиной кислотой/ацетонитрилом, подтвердили его эффективную обеззараживающую способность. Отсутствие роста возбудителей чумы, холеры и туляремии при посеве белковых экстрактов и смывов с поверхности MS-чипа позволило дальнейшие исследо-

вания осуществлять в соответствии с требованиями, предъявляемыми к обеззараженному материалу.

Одним из существенных препятствий внедрения масс-спектрометрического анализа в систему лабораторной диагностики особо опасных инфекций было отсутствие в поставляемой в РФ базе данных программы MALDI Biotyper 3.0 белковых профилей соответствующих возбудителей, что определило необходимость формирования локальных библиотек референсных спектров.

Для получения референсных спектров использовались белковые экстракты типичных, охарактеризованных по комплексу культурально-морфологических, биохимических, серологических и молекулярно-генетических свойств штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*. Референсный спектр каждого штамма (рис. 1–3) представляет сумму 72 одиночных спектров, соответствующих ряду критериев, в т.ч.: отношение сигнал/шум для каждого пика спектра должно быть не менее 2, количество качественных пиков – до 300, минимальная интенсивность пика – не менее 100 отн. единиц, ширина пика – 4 m/z. Генерированные суммарные референсные спектры импортировались в базу данных программы Biotyper MALDI Biotyper 3.0.

Апробация применения MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа для определения таксономической принадлежности коллекционных штаммов исследуемых патогенов показала высокую аналитическую чувствительность и специфичность метода. Для всех включенных в исследование предварительно охарактеризованных по бактериологиче-

Таблица 1. Результаты MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации коллекционных штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*

Исходная таксономическая характеристика штаммов по микробиологическим тестам	Результаты MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа			
	количество исследованных штаммов	основной таксон	максимальное значение score value	
<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>pestis</i>	44	<i>Y. pestis</i>	2,41–2,67
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>altaica</i>	26	<i>Y. pestis</i>	2,39–2,76
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>hissarica</i>	2	<i>Y. pestis</i>	2,45–2,51
	<i>Y. pestis</i> ssp. <i>ulegeica</i>	2	<i>Y. pestis</i>	2,33–2,42
<i>V. cholerae</i>	<i>V. cholerae</i> classica O1	2	<i>V. cholerae</i>	2,53–2,68
	<i>V. cholerae</i> eltor O1	23	<i>V. cholerae</i>	2,33–2,59
	<i>V. cholerae</i> O139	4	<i>V. cholerae</i>	2,38–2,57
	<i>V. cholerae</i> RO	2	<i>V. cholerae</i>	2,39–2,43
	<i>V. cholerae</i> не O1/O139	9	<i>V. cholerae</i>	1,98–2,69
<i>F. tularensis</i>	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>tularensis</i>	3	<i>F. tularensis</i>	2,36–2,41
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>novicida</i>	1	<i>F. tularensis</i>	2,22
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>mediasiatica</i>	2	<i>F. tularensis</i>	2,20–2,36
	<i>F. tularensis</i> ssp. <i>holarctica</i>	38	<i>F. tularensis</i>	2,43–2,85

ским тестам коллекционных культур подтверждена их принадлежность к соответствующему таксону по профилю константных белков (табл. 1).

Для подавляющего большинства исследуемых штаммов индекс совпадения масс-спектров с референсными профилями базы данных превышает 2,3, что соответствует достоверной идентификации их до вида. Исключение в данной выборке составляет один изолят *V. cholerae* не O1/O139, при анализе которого определена вероятная принадлеж-

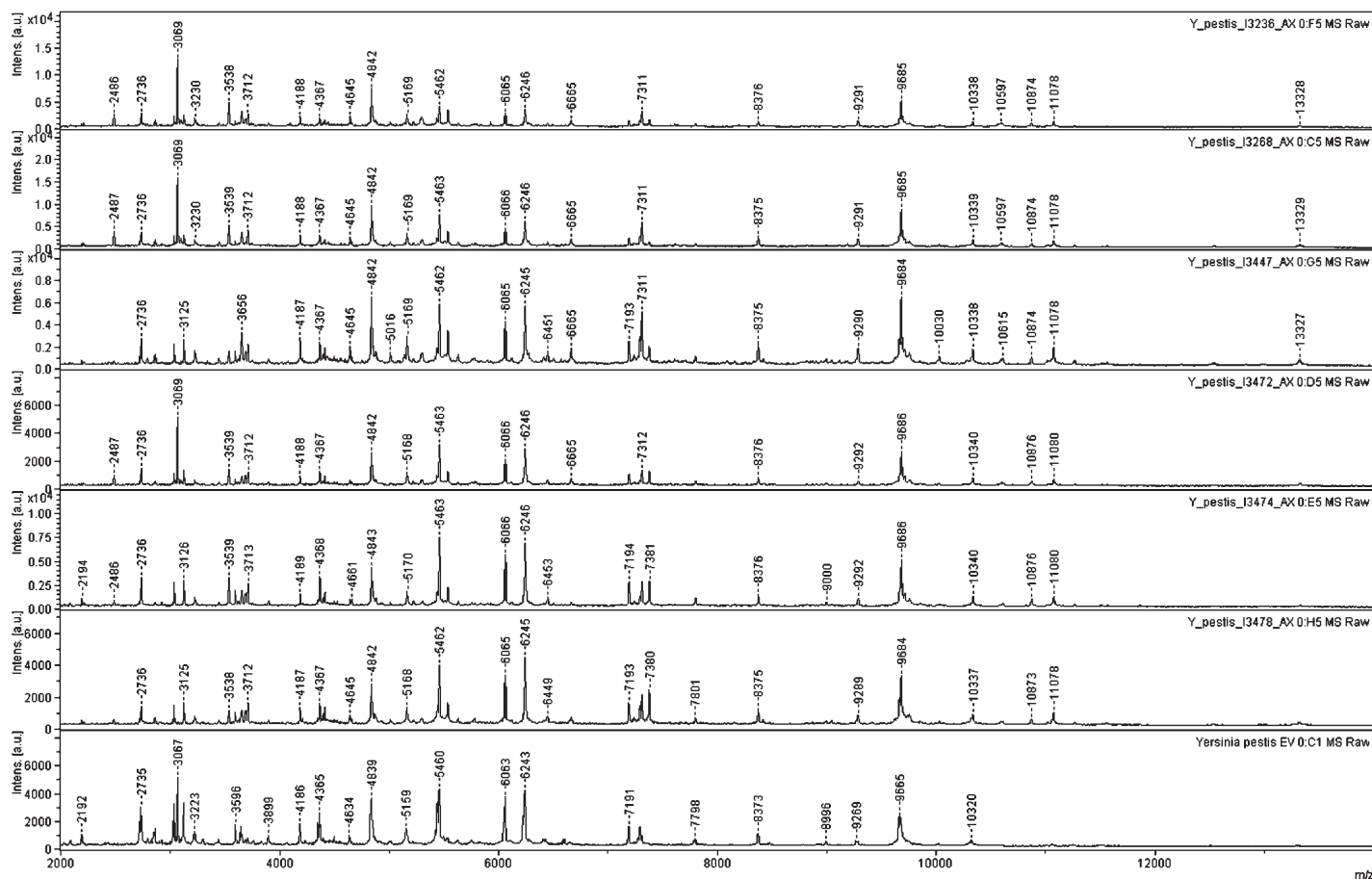


Рис. 1. Масс-спектры референсных штаммов *Y. pestis*.

ность к роду *Vibrio* (SV 1,98), что, по всей вероятности, обусловлено применением для исследования вибрионов не O1/O139 серогрупп прямого нанесения культуры на чип на этапе пробоподготовки. Не выявлено различий масс-спектрометрической идентификации культур в зависимости от длительности хранения в лиофилизированном состоянии в коллекции.

При оперативной идентификации выделенных на курируемой институтом территории штаммов в рамках деятельности Регионального центра по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней II–IV групп патогенности и Референс-Центра по природно-очаговым инфекциям, действующих на базе Иркутского научно-исследовательского противочумного института, масс-спектрометрический ана-

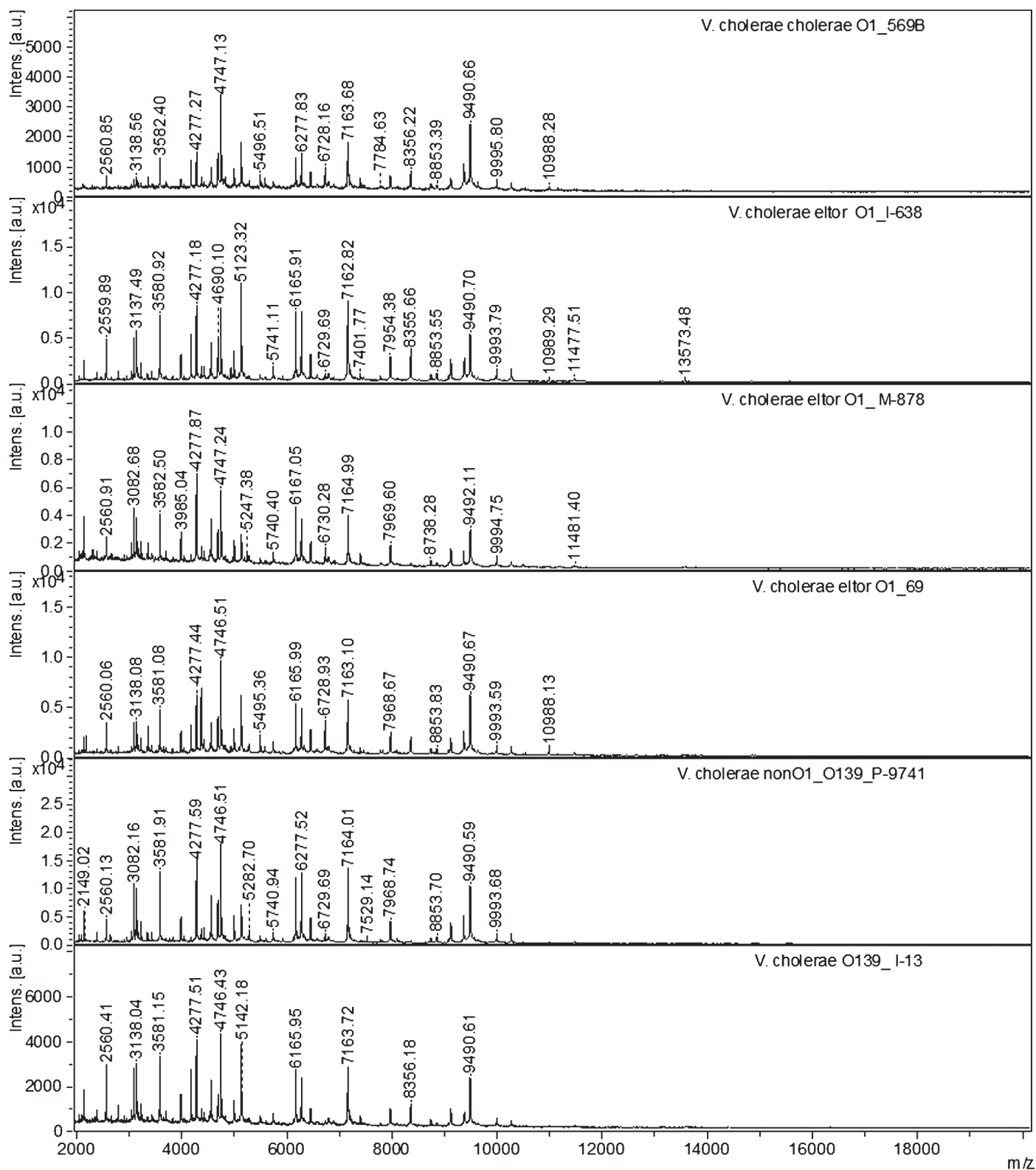


Рис. 2. Масс-спектры референсных штаммов *V. cholerae*.

лиз применяется наряду с комплексом стандартных бактериологических тестов. Всего при оперативном анализе проведено определение таксономической принадлежности 23 штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Тувинского и Алтайского природных очагов чумы, 46 штаммов *V. cholerae* из поверхностных водоемов штаммов и 47 штаммов *F. tularensis*, изолированных на курируемой территории.

В результате по профилю константных белков с высокой достоверностью подтверждена видовая принадлежность всех исследуемых культур. При этом данные масс-спектрометрической идентификации в 100% случаев совпали с данными бактериологического анализа (табл. 2).

MALDI-ToF масс-спектрометрическая идентификация использовалась при комплексном изучении изолята чумного

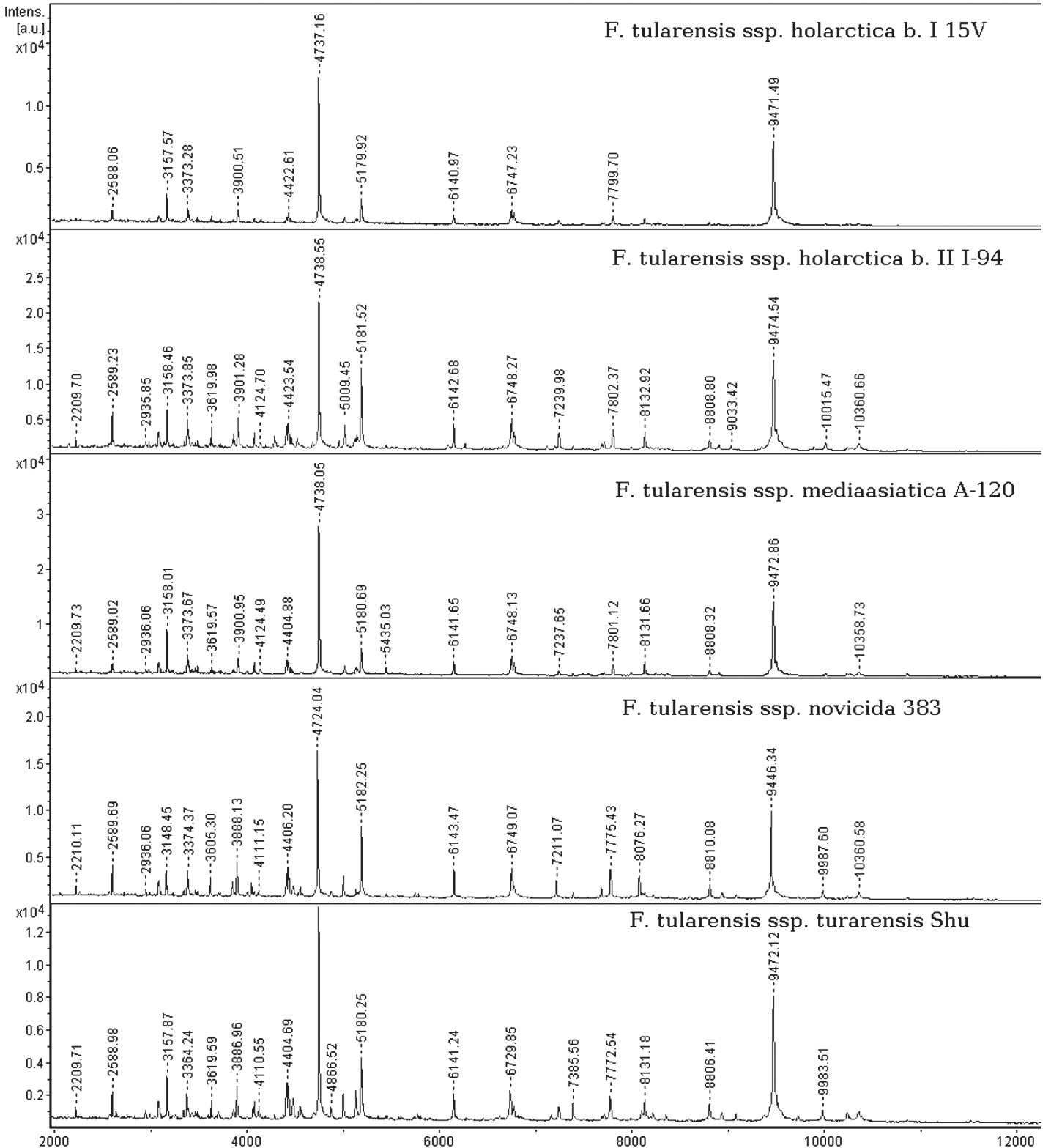


Рис. 3. Масс-спектры референсных штаммов *F. tularensis*.

Таблица 2. Результаты оперативной MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae*, *F. tularensis*

Таксон	Год	Территория	Количество штаммов	Результат идентификации	max SV
<i>Y. pestis</i>	2015	Республика Алтай	23	<i>Y. pestis</i>	2,43–2,61
		Алтайский край	1	<i>V. cholerae</i>	2,39
<i>V. cholerae</i>	2012	г. Иркутск	2	<i>V. cholerae</i>	2,34–3,38
		г. Тюмень	13	<i>V. cholerae</i>	2,38–2,51
		Забайкальский край	6	<i>V. cholerae</i>	2,43–2,53
		Республика Бурятия	1	<i>V. cholerae</i>	2,55
	2013	Иркутская область	1	<i>V. cholerae</i>	2,46
		Хабаровский край	2	<i>V. cholerae</i>	2,55–2,58
		Забайкальский край	6	<i>V. cholerae</i>	2,44–2,63
	2014	Алтайский край	1	<i>V. cholerae</i>	2,55
		г. Иркутск	1	<i>V. cholerae</i>	2,42
		Приморский край	3	<i>V. cholerae</i>	2,51–2,55
		Забайкальский край	1	<i>V. cholerae</i>	2,57
2015	г. Иркутск	1	<i>V. cholerae</i>	2,603	
	Забайкальский край	7	<i>V. cholerae</i>	2,44–2,57	
<i>F. tularensis</i>	2012	Красноярский край	4	<i>F. tularensis</i>	2,23–2,66
		Приморский край	1	<i>F. tularensis</i>	2,24
	2015	Красноярский край	1	<i>F. tularensis</i>	2,38
		Республика Алтай	6	<i>F. tularensis</i>	2,23–2,46
		Хабаровский край	35	<i>F. tularensis</i>	2,38–2,67

микроба эпидемиологически значимого основного подвида, впервые выделенного в Алтайском горном природном очаге чумы в 2012 г. При этом с высокой степенью достоверности установлена принадлежность указанного изолята к виду *Y. pestis* [9].

В эпидемиологическом анализе, наряду с оперативной идентификацией, необходимы изучение генетического родства изолятов, углубленная молекулярно-генетическая характеристика, направленные на реконструкцию звеньев эпидемиологической цепи и выяснение направлений заноса возбудителя на территорию.

Оценка перспектив применения MALDI-ToF масс-спектрометрии для молекулярного типирования возбудителя чумы показала возможность внутривидовой дифференциации на основе белковых паттернов штаммов основного и алтайского подвидов. Так, в масс-спектрах *Y. pestis ssp. altaica* установлено отсутствие пика со значением m/z 3065 ± 2 [10], что, по всей вероятности, определяет их объединение в самостоятельную группу при кластерном анализе. Кроме того, при сравнительном исследовании масс-спектров штамм *Y. pestis*, выделенный в Горном Алтае в 2012 г., вошел в один кластер с изолятом основного подвида чумного микроба из природного очага чумы в Монголии (1988 г.), что согласуется с результатами VNTR-типирования [9] и позволяет определить возможные направления заноса на территорию РФ данного эпидемиологически значимого клона возбудителя.

Все штаммы холерного вибриона по белковым профилям дифференцируются на ряд групп, ассоциированных с некоторыми фенотипическими и эпидемиологическими характеристиками. В частности, отдельные кластеры образуют *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп, штаммы *V. cholerae eltor* O1, изолированные на вспышке холеры в г. Южно-Сахалинске в 1999 г. Однако строгих закономерностей группирования штаммов в зависимости от их биовара, токсигенных свойств, особенностей структуры детерминант вирулентности не наблюдалось [11]. Вместе с тем, MALDI-ToF масс-спектрометрия оказалась эффективным инструментом для анализа результатов минисеквенирования при идентификации генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовара Эль-Тор [12], ко-

торые в настоящее время выступают в качестве этиологического агента холеры в мире [13].

Таким образом, проведенное исследование свидетельствует о высокой информативности MALDI-ToF масс-спектрометрии при определении таксономической принадлежности изолированных культур в рамках оперативного эпидемиологического анализа и ретроспективном исследовании коллекционных изолятов возбудителей опасных инфекционных болезней. Учитывая значительное сокращение сроков видовой идентификации культур в сравнении с бактериологическим анализом, высокую чувствительность и специфичность метода, внедрение его в схему лабораторной диагностики существенно повысит качество диагностической подсистемы эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями, а дальнейшие исследования по разработке подходов к внутривидовой дифференциации на основании белковых паттернов обеспечат применение MALDI-ToF масс-спектрометрии в качестве инструмента для молекулярного типирования патогенов.

Литература

1. Онищенко ГГ, Ежлова ЕБ, Демина ЮВ, Мельникова АА. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. 2013;2:4-13.
2. Шарова ИН, Казакова ЕС, Портенко СА, Красовская ТЮ, Осина НА, Куклев ВЕ, и др. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. Проблемы особо опасных инфекций. 2013;2:46-8.
3. Buchan BW, Ledebor NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. Clin Microbiol Rev. 2014;27(4):783-822. doi: 10.1128/CMR.00003-14.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. Nat Rev Microb. 2013; 11:574-85.
5. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. Biochim Biophys Acta. 2015;1854(6):528-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022

6. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. 2008;3(7):e2843. doi: 10.1371/journal.pone.0002843.
7. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):760-5. doi: 10.1128/JCM.01635-14.
8. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
9. Балахонов СВ, Афанасьев МВ, Шестопалов МЮ, Остяк АС, Витязева СА, Корзун ВМ, и др. Первый случай выделения *Yersinia pestis* subsp. *pestis* в Алтайском горном природном очаге чумы. Сообщение 1. Микробиологическая характеристика, молекулярно-генетическая и масс-спектрометрическая идентификация изолята. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013;1:60-5.
10. Афанасьев МВ, Остяк АС, Балахонов СВ. Апробация метода масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией для идентификации возбудителя чумы. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2014;8:39-43.
11. Афанасьев МВ, Миронова ЛВ, Басов ЕА, Остяк АС, Куликалова ЕС, Урбанович ЛЯ, и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014;3:22-9.
12. Khunkheeva ZhYu, Mironova LV, Balakhonov SV, Afanas'ev MV. Using of MALDI-TOF for genetically altered *Vibrio cholerae* eltor variants detection. Abstracts of 15th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 26-29 April 2016):56.
13. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol*. 2015;23(8):479-89. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010.
14. spectrometry: do we need guidance for data interpretation? *J Clin Microbiol*. 2015;53(3):760-5. doi: 10.1128/JCM.01635-14.
15. Clark AE, Kaleta EJ, Arora A, Wolk DM. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: a Fundamental Shift in the Routine Practice of Clinical Microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26:547-603. doi: 10.1128/CMR.00072-12.
16. Balakhonov SV, Afanas'ev MV, Shestopalov MYu, Ostyak AS, Vityazeva SA, Korzun VM, et al. The First Case of *Yersinia Pestis* Subsp. *Pestis* Isolation in the Territory of Altai Mountain Natural Plague Focus. Communication 1. Microbiological Characteristics, Molecular-Genetic and Mass-Spectrometric Identification of the Isolate. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;1:60-5. (In Russian).
17. Afanasyev MV, Ostiyak AS, Balakhonov SV. The approbation of technique of mass spectrometry with matrix-activated laser desorption/ionization for identification of plague agent. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2014; 8:39-43. (In Russian).
18. Afanasev MV, Mironova LV, Basov EA, Ostyak AS, Kuliakalova ES, Urbanovich LY, et al. MALDI-TOF mass spectrometry in the accelerated identification of microorganisms of the *Vibrio* genus. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2014;3:22-9. (In Russian).
19. Khunkheeva ZhYu, Mironova LV, Balakhonov SV, Afanas'ev MV. Using of MALDI-TOF for genetically altered *Vibrio cholerae* eltor variants detection. Abstracts of 15th Medical Biodefense Conference (Munich, Germany, 26-29 April 2016):56.
20. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol*. 2015;23(8):479-89. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.010

References

1. Onishchenko GG, Ezhlova EB, Demina YuV, Melnikova AA. On measures to improve epidemiological surveillance in the indication of infectious pathogens. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2013;2:4-13. (In Russian).
2. Sharova IN, Kazakova ES, Portenko SA, Krasovskaya TYu, Osina NA, Kuklev VE, et al. Improvement and Standardization of Laboratory Diagnostics Procedures as Concerns Particularly Dangerous, “Emerging”, and “Reemerging” Infectious Diseases. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2013;2:46-8. (In Russian).
3. Buchan BW, Ledebouer NA. Emerging technologies for the clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Rev*. 2014;27(4):783-822. doi: 10.1128/CMR.00003-14.
4. Fournier PE, Drancourt M, Colson P, Rolain JM, La Scola B, Raoult D. Modern clinical microbiology: new challenges and solutions. *Nat Rev Microb*. 2013;11:574-85.
5. Nomura F. Proteome-based bacterial identification using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS): A revolutionary shift in clinical diagnostic microbiology. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1854(6):528-37. doi: 10.1016/j.bbapap.2014.10.022
6. Sauer S, Freiwald A, Maier T, Kube M, Reinhardt R, Kostrzewa M, et al. Classification and identification of bacteria by mass spectrometry and computational analysis. *PLoS One*. 2008;3(7):e2843. doi: 10.1371/journal.pone.0002843.
7. Spinali S, van Belkum A, Goering RV, Girard V, Welker M, Van Nuenen M, et al. Microbial typing by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass

Информация о соавторах:

Миронова Лилия Валерьевна, кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78
Телефон: (3952) 22-0139

Афанасьев Максим Владимирович, кандидат биологических наук, ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78
Телефон: (3952) 23-9985

Куликалова Елена Станиславовна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела зоонозных инфекций ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78
Телефон: (3952) 22-0139

Остяк Александр Сергеевич, научный сотрудник отдела биологического и технологического контроля ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора
Адрес: 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78
Телефон: (3952) 22-0132

Information about co-authors:

Liliya V. Mironova, PhD (Med), Head, Plague Research Laboratory, Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0139

Mikhail V. Afanas'ev, PhD (Biol), Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 23-9985

Elena S. Kuliakalova, PhD (Med), Senior Researcher, Zoonotic Infections Dept., Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0139

Alexandr S. Ostyak, Researcher, Biological & Technological Control Dept., Irkutsk Antiplague Research Institute, Rospotrebnadzor
Address: 78, ul. Trilissera, Irkutsk, 664047, Russian Federation
Phone: (3952) 22-0132

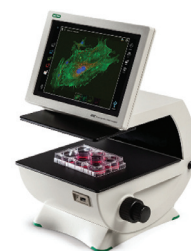
Клеточные технологии

оборудование и реагенты для исследований

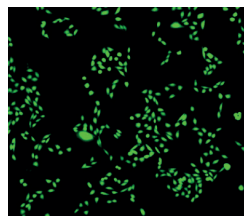


Сортер клеток S3 – это первый действительно автоматизированный клеточный сортер доступный для ученых. Создан экспертами в этой области, имеет феноменальную точность и автоматизацию, оснащен одним или двумя лазерами и детектором светорассеивания. Не занимает много места. Сортировка одновременно 2 определенных популяций. Автоматическая очистка линии образца между прогонами.

Широкий спектр систем для **трансфекции** предназначен для доставки нуклеиновых кислот в клетки разных типов.



Новый автоматический **счетчик клеток TC20** Персональная система флуоресцентной визуализации клеток **ZOE™** от компании Bio-Rad является отличным решением для изучения клеток с использованием трех каналов флуоресценции и возможностью последующего анализа полученных изображений. Визуализация образцов без использования темной комнаты, прямо на рабочем месте!



Специально созданный для расширения спектра многофункциональных детекторов **SpectraMax® i3** анализирует изображения и получает информацию о клетках. Теперь картинку предоставит ваш микропланшетный ридер!



Мультиплексный анализ

в диагностике боррелиозов и иерсиниозов

MIKROGEN
DIAGNOSTIK

- Наборы совместимы с платформами BioPlex, Luminex200
- Полный профиль антигенов возбудителя в одном тесте
- Программа интерпретации RecomQUANT (в комплекте)
- Интегрированный внутренний контроль
- Количество материала – 10 мкл сыворотки
- Результат менее чем за 3 часа

Recombead Borrelia IgG/IgM

Антиген	Описание
P100	Uncharacterised <i>Borrelia</i> specific antigen
OspA	Outer surface protein A
OspC	Outer surface protein C
VlsE	Variable major protein
P58	Oligopeptide permease
P39	Borrelial membrane protein A
p18	Decorin binding protein A

Recombead Yersinia IgG/IgM

Антиген	Описание
YOP M	Yersinia outer protein
V-AG	Yersinia virulence factor
PsaA	Adhesin (specific for <i>Y. pseudotuberculosis</i>)
YOP D	Yersinia outer protein
MyfA	Adhesin (specific for <i>Y. enterocolitica</i>)
YOP E	Yersinia outer protein



ЗАО «БИОХИММАК»
Москва, Ленинские горы, МГУ, д. 1 стр. 11
Телефон: +7 (495) 647-27-40
E-mail: hla@biochemmack.ru
www.biochemmack.ru



Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы

С.В.Борисевич, Э.А.Яковлев

ФГБУ 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад-6, Российская Федерация

Материалы отечественных и зарубежных публикаций подтверждают нарастающий подъем уровня заболеваемости Ку-лихорадкой. По своим эколого-эпидемиологическим особенностям возбудитель инфекции близок к возбудителю клещевого риккетсиоза – *Rickettsia sibirica*. Способность патогена к распространению на обширных территориях объясняется уникальными многоуровневыми связями его со средой обитания. При рассмотрении проблемы в целом важное значение приобретают исследования на клеточном уровне, уточнение взаимоотношений *Coxiella burnetii* с теплокровными и трансмиссивным переносчиком, а также детализация условий развития спорадических заболеваний и эпидемий.

Ключевые слова: коксиеллез, лихорадка Ку, вспышки, природные, антропоургические очаги

Для цитирования: Борисевич С.В., Яковлев Э.А. Эколого-эпидемиологические особенности возбудителя лихорадки Ку в Российской Федерации и странах Европы. Бактериология. 2016; 1(1): 96–101. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-96-101

Ecological and epidemiological features of the causative agent of Q fever in the Russian Federation and European countries

S.V.Borisevich, E.A.Yakovlev

Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute, Sergiev Posad-6, Russian Federation

The materials of domestic and foreign publications confirm an alarming rise in the incidence of Q fever. According to its ecological and epidemiological features of an infectious agent similar to the causative agent of *Rickettsia sibirica*. The ability of pathogens to the spread over large areas, due to the unique multi – level relations with its habitat. When considering the problem as a whole become important research at the cellular level, to clarify the relationship *Coxiella burnetii* warm – blooded and transmissible carrier, as well as detailed conditions for the development of sporadic diseases and epidemics.

Key words: coxiellosis, Q fever, outbreaks, natural, anthropurgic foci

For citation: Borisevich S.V., Yakovlev E.A. Ecological and epidemiological features of the causative agent of Q fever in the Russian Federation and European countries. Bacteriology. 2016; 1(1): 96–101. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-96-101

Ку-лихорадка (коксиеллез) – широко распространенная зооантропонозная инфекция, способная при развитии эпидпроцесса создавать в любой стране мира серьезную медико-социальную проблему [1].

Возбудителем заболевания являются *Coxiella burnetii*, относящиеся к группе γ-протеобактерий и образующие самостоятельный род, выведенный из состава семейства *Rickettsiaceae*. Рестрикционным анализом хромосомной ДНК изолятов коксиелл из Северной Америки и Африки

установлено наличие шести геногрупп, тогда как их аналоги Евро-Азиатского происхождения по антигенным и иммунохимическим характеристикам составляют генетически однородную группу [2–8].

C. burnetii – облигатный внутриклеточный паразит. В организме млекопитающих бактерии поражают клетки системы мононуклеарных фагоцитов, проходя цикл развития внутри фаголизосом. Единственным механизмом саморегуляции данной паразитарной системы является гетерогенность по-

Для корреспонденции:

Борисевич Сергей Владимирович, доктор биологических наук, кандидат медицинских наук, профессор, начальник ФГБУ 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации

Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206
E-mail: 48cnii@mail.ru

Статья поступила 09.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Sergey V. Borisevich, Doctor of Science (biol.), PhD (med.), professor, Head of Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute

Address: 11, ul. Oktyabr'skaya, Moskovskaya oblast', Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-12064
E-mail: 48cnii@mail.ru

The article was received 09.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

пуляций хозяина и паразита с их изменчивостью в процессе взаимодействия. Этот процесс при Ку-лихорадке не сопровождается выраженным повреждающим действием на клетки-мишени хозяина, что способствует длительной персистенции возбудителя с развитием ретроспективно выявляемой хронической формы заболевания. Хронический коксидиоз чаще всего осложняется эндокардитом, лечение которого затягивается на многие годы, а порой заканчивается неблагоприятным исходом [9–14].

Социальное значение данного зооантропоноза обусловлено значительными экономическими потерями в сельском хозяйстве, поскольку у зараженных коз и овец беременность заканчивается абортными, у крупного рогатого скота развивается либо бесплодие, либо наблюдается рождение телят пониженного веса. В ряде случаев эпидобстановка требует планирования превентивных мероприятий вплоть до выбраковки всего поголовья скотоводческих ферм [15–21].

Изложенное аргументирует необходимость проведения анализа накопленных за неполных 30 лет в Российской Федерации и странах Европы данных по эколого-эпидемиологическим аспектам проблемы коксидиоза и критической оценки достигнутых результатов.

По своим эколого-эпидемиологическим особенностям возбудитель Ку-лихорадки близок к возбудителю клещевого риккетсиоза (*Rickettsia sibirica*). При этом способность данного патогена к распространению на обширных территориях земного шара может быть объяснена существованием уникальных многоуровневых связей его со средой обитания. Так, цикл размножения коксидиоза в кислой среде фаголизосом может происходить как с разрушением, так и персистентно без разрушения инфицированных клеток. Анализ проблемы на клеточном уровне приобретает принципиальное значение при выработке стратегии наиболее эффективной химиопрофилактики и этиотропного лечения Ку-лихорадки. Не менее важный интерес представляют сведения о взаимоотношениях на организменном уровне коксидиоза с теплокровными и трансмиссивным переносчиком, а также рассмотрение условий, предопределяющих возможность возникновения спорадических заболеваний и развития эпидемий [22–24].

Важная роль теплокровных в экологии коксидиоза определяется разнообразием видов в различных географических районах земного шара, расширяющих возможности паразитирующих там кровососущих членистоногих. В эпидемиологическом плане различают два типа очагов Ку-лихорадки – природные (первичные) и антропоургические (вторичные или сельскохозяйственные) [22, 24].

Природные очаги коксидиоза формируются благодаря участию в циркуляции возбудителя около 100 видов диких млекопитающих и десятков видов птиц. После питания на них зараженных переносчиков у животных и птиц развивается инфекционный процесс с уровнем бактериемии (в течение нескольких суток на пике заболевания), достаточным для инфицирования новой партии клещей. В отношении *S. burnetii* установлен, пожалуй, самый широкий круг спонтанно заразившихся клещей, причем доминирующую роль играют иксодиды (около 77 видов и подвидов) [25]. Доказано также участие в циркуляции возбудителя Ку-лихорадки аргасовых и в меньшей степени – гамазовых клещей. Как и ик-

содовые клещи, они могут инфицироваться на любой активной фазе развития, длительно (до нескольких лет при голодании) сохранять коксидиозы и передавать их своему потомству. Помимо передачи возбудителя при кровососании, клещи способны выделять его во внешнюю среду с фекалиями и коксидиальной жидкостью [22–25].

Показательными в этом плане оказались исследования, проведенные в Ростовской и Воронежской областях РФ. Энтомологические наблюдения за возбудителем Ку-лихорадки в Ростовской области включали экстенсивный учет численности иксодовых клещей на крупном рогатом скоте и открытых стациях в период их наибольшей активности (май–октябрь). С 1998 по 2000 г. было исследовано 2975 экземпляров клещей. Антиген *S. burnetii* обнаружили в 24,5% случаев. Клещей собирали в 40 районах области, положительными оказались пробы из 23. На различных территориях показатель инфицированности клещей составлял от 11,8 до 100%. Из общего числа инфицированных клещей 74,5% относились к роду *Dermacentor marginatus*, 15,7% – *Hyalomma plumbeum*, 5,9% – *Rhipicephalus rossicus*, 3,9% – *Ixodes ricinus*. 61,2% инфицированных клещей были сняты с крупного рогатого скота, 38,8% – собраны на флаг [26].

Фауна иксодовых клещей на территории Воронежской области также отличается разнообразием, причем преобладают *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *D. marginatus*. Пик активности клещей приходится на май–июнь и сентябрь–октябрь. Эти клещи являются резервуаром и источником возбудителя лихорадки Ку, вызвав в 2005 г. 18 заболеваний [27].

Проведенный в Воронежской области мониторинг видового состава мелких млекопитающих свидетельствует о тенденции к увеличению популяции полевки рыжей (*Clethrionomys glareolus*) в лугополевых и лесостепных стациях и уменьшению количества лесной мыши. Существует риск возникновения вспышек коксидиоза, туляремии и лихорадки с почечным синдромом, так как рыжая полевка является основным носителем возбудителей указанных инфекций [28].

На территории Северо-Западного региона РФ также установлена значительная зараженность возбудителем Ку-лихорадки диких мелких млекопитающих. Основным его источником являются: полевка рыжая, бурозубка обыкновенная (*Sorex araneus*), мышь полевая (*Apodemus agrarius*). Инфицированность этих зверьков в среднем составляет: в Ленинградской области – 4,1%, в Санкт-Петербурге и его окрестностях – 2,6%, а в Вологодской области – 2,2% [29].

В ряде республик бывшего СССР на протяжении последних лет не проводилось должного контроля за циркуляцией возбудителя лихорадки Ку. Это вело к активному формированию как природных, так и антропоургических очагов инфекции. Так, например, в Узбекистане по данным оценки 2800 экземпляров клещей была подтверждена их зараженность коксидиозом в 28,5% случаев. Изучение сывороток крови диких и сельскохозяйственных животных позволило выявить показатель инфицированности в 14–18% случаев. Положительная реакция в РСК к антигену *S. burnetii* у 10 987 ретроспективно обследованных пациентов составила 5,2% [30].

В настоящее время столь широкая распространенность Ку-лихорадки во многом объясняется хозяйственной дея-

тельностью человека. В антропоургических очагах основным источником инфекции является пораженный мелкий и крупный рогатый скот (козы, овцы, коровы и др.). Его инфицирование происходит двумя путями. В естественных условиях оно может быть последствием нападения клещей при выпасе животных в эндемичных районах, при этом эпизоотия развивается постепенно. Развитие процесса происходит более остро в случае завоза больных животных в благополучные по коксиеллезу фермерские хозяйства, особенно, если это случается перед их окотом или отелом. Для лихорадки Ку характерна передача от животного животному, причем при стойловом содержании здоровые животные заражаются от больных в течение нескольких недель. Инфекция у них протекает, как правило, латентно, хотя могут наблюдаться легкие лихорадочные формы. Довольно часто заболевание становится хроническим и проявляется в виде маститов, бронхопневмоний, перикардитов, а зачастую заканчивается прерыванием беременности [15, 16, 22].

Больные животные выделяют *C. burnetii* в окружающую среду с испражнениями, молоком, а во время родов – с околоплодной жидкостью и плацентой. Поступление возбудителя с молоком инфицированных животных может продолжаться от 2 мес до 2 лет, а его концентрация в нем может составлять от 1×10^2 до 1×10^5 ИД₅₀ мл⁻¹ для морских свинок [20]. Содержание коксиелл в плаценте достигает 10^9 ИД г⁻¹ [22, 31, 32].

О непростой ситуации с данным зооантропонозом свидетельствуют результаты выборочных проверок скотоводческих хозяйств. В отдельных регионах Российской Федерации количество выявленных сероположительных животных колебалось от 2 до 29% [15, 16, 26] и даже 70% [26], а в Украине – от 14 до 38% [33]. В странах Западной Европы ретроспективно подтверждали инфицирование животных в 38–79% случаев [34–37]. Все исследователи отмечают наибольший процент заболеваемости на фермах по содержанию и разведению коз и овец, у которых обнаруживали коксиеллы в 97 и 78% отобранных проб молока соответственно [38].

Прежде чем резюмировать существующие представления о Ку-лихорадке, включая вопрос об источниках и путях инфицирования людей, необходимо остановиться на рассмотрении характерных особенностей возбудителя, несомненно имеющих определяющее эпидемиологическое и эпизоотологическое значение. К ним следует отнести высокую устойчивость коксиелл к воздействию неблагоприятных факторов внешней среды.

Установлено, что в коровьем молоке, находившемся при комнатной температуре, возбудитель Ку-лихорадки удавалось определять до 125 сут, а в хранившемся при 4°C – до 273 дней. В процессе пастеризации молока полной стерилизации не происходит. В молочных продуктах с высокой кислотностью (ацидофилин, простокваша) коксиеллы не выявляли после суток хранения при комнатной температуре, а в кефире – их идентифицировали. В сыворотке от творога возбудитель сохранял жизнеспособность при комнатной температуре до 30 сут. В течение 41 дня хранения при температуре 4°C его находили в масле и сыре, приготовленных из инфицированного молока [16, 39]. В воде при комнатной

температуре коксиеллы выживали до 160 сут, а в масле инфицированных животных при 4°C – до 30 сут [9].

После хранения при температуре от 16 до 23°C полная инактивация возбудителя зафиксирована в опилках через 30 суток, а в пробах песка, глины и шерсти – через 5, 7 и 9 мес соответственно. Из высохшего навоза коксиеллы выделяли в течение полутора лет [40].

Благодаря уникальной устойчивости возбудителя Ку-лихорадки в зону повышенного риска вовлекаются как зоофермы и прилегающие к ним территории, так и предприятия по переработке животноводческой продукции. Обладая выраженной пневмотропностью, коксиеллы способны вызывать главенствующее ингаляционное поражение человека. Для его респираторного инфицирования достаточно от одной до 10 частиц [9]. Человек заражается возбудителем лихорадки Ку практически исключительно респираторным путем посредством вдыхания вторичного аэрозоля, образуемого при диспергировании высохших выделений от инфицированных животных и клещей. Так, например, на неблагополучных по заболеваемости предприятиях по переработке шерсти овец и пуха коз в отобранных пробах воздуха содержалось от 10 до 1000 частиц в литре соответственно. Антиген коксиелл довольно часто обнаруживали непосредственно в отобранных для анализа пробах пуха коз и шерсти овец [41].

Одним из наглядных примеров значимости аэрогенного механизма заражения людей является вспышка лихорадки Ку в Швейцарских Альпах. После перегона с пастбищ отар овец в населенных пунктах, расположенных непосредственно у дорог или на некотором удалении от них, произошло фактически одномоментное заболевание 415 человек [42].

Во многих литературных источниках [6, 8, 9, 20, 25, 33, 43, 44], наряду с ингаляционным, в качестве возможных упоминаются алиментарный, трансмиссивный, трансфузионный, трансплантационный и половой пути инфицирования человека. Подтверждают такую возможность выборочное ретроспективное исследование сывороток крови населения с упоминанием в анамнезе факта употребления молока и мяса, поступающих из неблагополучных по Ку-лихорадке хозяйств, данных переливания крови или пересадки органов от доноров с сероположительным результатом или посещения естественных угодий с зафиксированным нападением кровососущих клещей. Так, например, обследования показали, что у нескольких десятков добровольцев, употребляющих сырое молоко, не установлено клинических проявлений заболевания, однако положительные серологические сдвиги отмечались у 28,6% участников эксперимента [цит. по 10].

Следовательно, в современных условиях для практического здравоохранения наиболее значимыми являются мониторинг ситуаций, связанных с оценкой возможности возникновения антропоургических вспышек Ку-лихорадки, а также планирование комплекса мероприятий по их предупреждению, своевременному выявлению и ликвидации. На необходимость повышения настороженности к данной инфекции указывают материалы отечественных и зарубежных публикаций, подтверждающие подъем уровня заболеваемости у людей. Подобная тенденция объясняется антропогенным преобразованием природных ландшафтов, выпасом домашних животных на территориях, неблагополучных в отноше-

нии зооантропонозов и отсутствием должного медицинского и ветеринарного надзора. Вынуждены констатировать гиподиагностику данной зооантропонозной инфекции, что в значительной степени связано не только с трудностями ее клинического распознавания, но и с недостаточным объемом выпуска необходимых диагностических и превентивных средств [46, 47].

Литература

- Онищенко ГГ, Монисов АА, Гульченко ЛП, Федоров ИМ. Заболеваемость зооантропонозными и природно-очаговыми инфекциями и меры их профилактики. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1999;4:14-8.
- Лукин ЕП, Воробьев АА, Быков АС. Таксономия и классификация риккетсий. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001;2:104-10.
- Лукин ЕП, Воробьев АА, Малеев ВВ, Быков АС. Молекулярно-генетическое разнообразие риккетсий. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2006;1:92-9.
- Тарасевич ИВ. Современные представления о риккетсиозах. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2005;7(2):119-29.
- Hoek W, Meekelenkamp JCE, Dijkstra F, et al. Proximity to Goat Farms and *Coxiella burnetii* Seroprevalence among Pregnant Women. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2360-3.
- Rijks JM, Roest HIJ, Tulden PW, Kik MJ, IJzer J, Gröne A. *Coxiella burnetii* Infection in Roe Deer during Q Fever Epidemic, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2369-71. doi: 10.3201/eid1712.110580.
- Roest HIJ, Ruuls RC, Tilburg JJHC, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, et al. Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak, the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2011;14(4):668-75. doi: 10.3201/eid1704.101562.
- Tilburg JHC, Rossen JWA, Tilburg JJHC, Melchers WJ, Hermans MH, van de Bovenkamp J, et al. Genotypic Diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007-2010 Q Fever Outbreak, the Netherlands. J of Clinical Microbiol. 2012;50(3):1076-8. doi: 10.1128/JCM.05497-11
- Лобан КМ, Лобзин ЮВ, Лукин ЕП. Риккетсиозы человека (Руководство для врачей). М., СПб., 2002.
- Токаревич НК. Активность лекарственных препаратов в отношении *Coxiella burnetii* – возбудителя Ку-лихорадки. Антибиотики и химиотерапия. 2007; 52(1-2):46-56.
- Delsing CE, Kullberg BJ. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. The Netherlands J of Medicine. 2008;66(9):365-7.
- Raoult D. Treatment of Q fever (Minireview). Antimicrob Agents and Chemother. 1993;37(9):1733-6.
- Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy. Diagnosis, treatment and follow – up. Arch Intern Med. 2002;162:701-4.
- Raoult D, Marrie T, Mege I. Natural history and pathophysiology of Q fever. Lancet Infect Dis. 2005;5:219-26.
- Тинькова ЕЛ. К проблеме эпизоотологии коксиеллеза. Ветеринарная патология. 2003;2:37-8.
- Фетисова НФ, Гафарова МТ. Эколого-эпидемиологические аспекты коксиеллеза. Вестник РАМН. 2008;7:15-8.
- Hogerwerf L, van der Brom R, Rorst HIJ, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, et al. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep the Netherlands. Emerg Infect Dis. 2011;17(3):379-86. doi: 10.3201/eid1703.101157.
- Kampschreur LM, Wegdam-Blans MCA, Thijsen SFT, Groot CA, Schneeberger PM, Hollander AA, et al. Acute Q fever related in hospital mortality in the Netherlands. The Netherlands J of Medicine. 2010;68(12):408-12.
- Klassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ. et al. Emerg Infect Dis. 2009;15(4):613-6.
- Maurin M, Raoult D. Q fever. Clin Microbiol Rev. 1999;12(4):518-53.
- Whelan J., Sehimmer D., Schneeberger P. et al. Q fever among Culling Workers, the Netherlands, 2009–2010. Emerg Infect Dis. 2011;17(9):1719-23.
- Грабарев ПА, Лукин ЕП, Махлай АА, Перепёлкин ВС. Риккетсиозы: экологические аспекты проблемы. Военно-медицинский журнал. 1998;319(8):27-34.
- Лукин ЕП, Махлай АА, Перепёлкин ВС. Риккетсиозы: эпидемиологическая оценка. Военно-медицинский журнал. 1997;318(8):25-33.
- Rehacek J, Tarasevich IV. Acari – Borne Rickettsiae. Rickettsioses in Eurasia. Bratislava, 1988.
- Балашов ЮС, Дайтер А.Б. Кровососущие членистоногие и риккетсии. Л.: Наука, 1973.
- Зыкова ТА. Эпидемиологические особенности коксиеллеза в Ростовской области. Современные средства иммунодиагностики, иммуно- и экстренной профилактики актуальных инфекций: Труды конференции, 22–23 апреля 2004 г. Санкт-Петербург, 2004, 61-2.
- Баркалова ЛД, Негроров ОП, Бахметьева ЮО. и др. Роль иксодовых клещей Воронежской области в распространении природно-очаговых инфекций. Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины: Российская научно-практическая конференция, посвященная 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова, 22–24 марта 2006 г. С.-Петербург, 2006. С. 39.
- Жуков ВИ, Сильвестров ВБ, Чубирко МИ, и др. Характеристика видовой состава мелких млекопитающих Воронежской области как источника природно-очаговых инфекций. VI Российский съезд врачей инфекционистов: Материалы съезда, 29–31 октября 2003 г. Санкт-Петербург, 2003, 136-7.
- Токаревич НК, Стоянова НА, Грачёва Л.И. Актуальные проблемы зооантропонозных инфекций в Северо-западном федеральном округе. Идеи Пастера в борьбе с инфекциями: Материалы третьей международной конференции, посвященной 80-летию института имени Пастера, 4–5 сентября 2003 г. Санкт-Петербург, 2003, 121-4.
- Бахрамова НН. Эколого-эпидемиологическое изучение лихорадки Ку на территории республики Узбекистан. Инфекционные болезни: проблемы здравоохранения и военной медицины: Российская научно-практическая конференция, посвященная 110-летию кафедры инфекционных болезней Военно-медицинской академии им. С.М.Кирова, 22–24 марта 2006 г. Санкт-Петербург, 2006, 41-42.
- Fournier PE, Marrie T, Raoult D. Diagnosis of Q fever. J Clin Microbiol. 1998; 36:1823-34.
- Wolrden HC, Mason BM, Hehaul LK, mith JA Jr, Jack G, Cookson MS. et al. Q fever outbreak in industrial setting. Emerg Infect Dis. 2004;10(7):1282-9.
- Кушнір ЗГ. Вивчення механізму передачі збудника Ку гарячки на території України. Профілактична медицина. 2008;1:39-43.
- Ryan ED, Kirby M, Collins DM, Sayers R, Mee JF, Clegg T. Prevalence of *Coxiella burnetii* (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk – milk samples. Epidemiol Infect. 2011;139:1413-7. doi: 10.1017/S0950268810002530
- Santoro D., Giura R., Colombo M.C. et al. Q fever in Como, North Itali. Emerg Infect Dis. 2004;10(1):157-58.
- Serbezov V, Kazar J, Novkirishki V, Gatcheva N, Kováčová E, Voynova V. Q fever in Bulgaria and Slovakia. Emerg Infect Dis. 1999;5(3):388-94.
- Varga V. An Explosive outbreak of Q-fever in jedlove Kostolal any, Slovakia. Centr Eur J Publ Hlth. 1977;4:180-2.
- Eibach R, Bothe F, Runge M, Fischer SF, Philipp W, Ganter M. Q fever: baseline monitoring of a sheep and a goat flock associated with human infections. Epidemiol Infect. 2012;140:1939-49.
- Зубкова ПИ. Выживаемость риккетсий Бернета в молоке и молочных продуктах. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 1957; 9:42-6.

40. Здродовский ПФ, Голиневич ЕМ. Учение о риккетсиях и риккетсиозах. М.: Медицина, 1972.
41. Wattiau P, Baldisoa E, Toman R, Van Esbroeck M, Quoilin S, Hammadi S, et al. Q fever in woollarters, Belgium. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2368-9. doi: 10.3201/eid1712.101786
42. Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. *Intern J Epidemiol.* 1987;16(2):282-7.
43. Богомолов БП. Инфекционные болезни: неотложная диагностика, лечение, профилактика. М.: Ньюдиамед, 2007.
44. Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, Brouqui P. Serological evidence of Rickettsia infections in forestry rangers in north - eastern Italy. *Clin Microbiol Infect.* 2006;12:493-5.
45. Reimer LG. Q fever. *Clinic Microbiol Rev.* 1993;6(3):193-8.
46. Панфёрова ЮА, Фрейлихман ОА, Токаревич КА. и др. Оценка распространенности *Coxiella burnetii* в природных очагах с использованием молекулярно-генетических методов детекции. Отечественная эпидемиология в XXI веке: приоритетные направления развития и новые технологии в диагностике и профилактике болезней человека: Труды юбилейной Всероссийской научной конференции, 19–20 апреля 2012 г. Санкт-Петербург, 2012, 133-4.
47. Bielawska-Drozdz A, Cieslik P, Mirski T, Bartoszczke M, Knap JP, Gawel J, et al. Q fever – selected issues. *Ann Agricul Environ Med.* 2013;20(2):222-32.
13. Raoult D, Fenollar F, Stein A. Q fever during pregnancy. Diagnosis, treatment and follow – up. *Arch Intern Med.* 2002;162:701-4.
14. Raoult D, Marrie T, Mege I. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005;5:219-26.
15. Tin'kova EL. K probleme epizootologii koksiielleza. *Veterinarnaya patologiya.* 2003;2:37-8. (In Russian).
16. Fetisova NF, Gafarova MT. Ecological and epidemiological aspects of Q-fever. *Annals of the Russian academy of medical sciences.* 2008;7:15-8. (In Russian).
17. Hogerwerf L, van der Brom R, Rorst HIJ, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, et al. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(3):379-86. doi: 10.3201/eid1703.101157.
18. Kampschreur LM, Wegdam-Blans MCA, Thijsen SFT, Groot CA, Schneeberger PM, Hollander AA, et al. Acute Q fever related in hospital mortality in the Netherlands. *The Netherlands J of Medicine.* 2010;68(12):408-12.
19. Klassen CH, Nabuurs–Franssen MH, Tilburg JJ. et al. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(4):613-6.
20. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(4):518-53.
21. Whelan J., Sehimmer D., Schneeberger P. et al. Q fever among Culling Workers, the Netherlands, 2009–2010. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(9):1719-23.
22. Grabarev PA, Lukin EP, Makhlai AA, Perepelkin VS. Rikkettsiozy: ekologicheskie aspekty problemy. *Voenno-meditsinskii zhurnal.* 1998;319(8):27-34. (In Russian).
23. Lukin EP, Makhlai AA, Perepelkin VS. Rikkettsiozy: epidemiologicheskaya otsenka. *Voenno-meditsinskii zhurnal.* 1997;318(8):25-33. (In Russian).
24. Rehacek J, Tarasevich IV. Acari - Borne Rickettsiae. *Rickettsioses in Eurasia.* Bratislava, 1988.
25. Balashov YuS, Daiter A.B. *Krovososushchie chlenistonogie i rikkettsii.* L.: Nauka, 1973. (In Russian).
26. Zykova TA. Epidemiologicheskie osobennosti koksiielleza v Rostovskoi oblasti. *Sovremennye sredstva immunodiagnostiki, immuno- i ekstremnoi profilaktiki aktual'nykh infektsii: Trudy konferentsii, 22–23 Apr 2004.* Saint Petersburg, 2004, pp. 61-2. (In Russian).
27. Barkalova LD, Negrobov OP, Bakhmet'eva YuO. et al. Rol' iksovovykh kleshchei Voronezhskoi oblasti v rasprostraneni prirodno-ochagovykh infektsii. *Infektsionnye bolezni: problemy zdravookhraneniya i voennoi meditsiny: Rossiiskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashchennaya 110-letiyu kafedry infektsionnykh boleznei Voenno-meditsinskoi akademii im. S.M. Kirova, 22–24 March 2006.* Saint Petersburg, 2006. p. 39. (In Russian).
28. Zhukov VI, Sil'vestrov VB, Chubirko MI, et al. Kharakteristika vidovogo sostava melkikh mlekopitayushchikh Voronezhskoi oblasti kak istochnika prirodno-ochagovykh infektsii. *VI Rossiiskii s'ezd vrachei infektsionistov: Materialy s'ezda, 29–31 Oct 2003.* Saint Petersburg, 2003, pp. 136-7. (In Russian).
29. Tokarevich NK, Stoyanova NA, Gracheva LI. Aktual'nye problemy zoonoznykh infektsii v Severo-zapadnom federal'nom okruge. *Idei Pastera v bor'be s infektsiyami: Materialy tret'ei mezhdunarodnoi konferentsii, posvyashchennoi 80-letiyu instituta imeni Pastera, 4–5 Sep 2003.* Saint Petersburg, 2003, pp. 121-4. (In Russian).
30. Bakhramova NN. Ekologo-epidemiologicheskoe izuchenie likhoradki Ku na territorii respubliki Uzbekistan. *Infektsionnye bolezni: problemy zdravookhraneniya i voennoi meditsiny: Rossiiskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya, posvyashchennaya 110-letiyu kafedry infektsionnykh boleznei voenno-meditsinskoi akademii im. S.M.Kirova, 22–24 March 2006.* March, 2006, pp. 41-42. (In Russian).
31. Fournier PE, Marrie T, Raoult D. Diagnosis of Q fever. *J Clin Microbiol.* 1998; 36:1823-34.
32. Wolrden HC, Mason BM, Hehaul LK, mith JA Jr, Jack G, Cookson MS. et al. Q fever outbreak in industrial setting. *Emerg Infect Dis.* 2004;10(7):1282-9.
33. Kushnir ZG. Vivchenna mekhanizmu peredachi zbudnina Ku garyachki na territorii Ukraini. *Profilaktichna meditsina.* 2008;1:39-43. (In Ukrainian).

References

1. Onishchenko GG, Monisov AA, Gul'chenko LP, Fedorov IM. Morbidity from zoonanthropotic and natural-focus infections and the measures for their prevention. *Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology.* 1999;4:14-8. (In Russian).
2. Lukin EP, Vorob'ev AA, Bykov AS. Taxonomy and classification of rickettsiae. *Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology.* 2001;2:104-10. (In Russian).
3. Lukin EP, Vorobyev AA, Maleev VV, Bykov AS. Molecular genetic variety of rickettsiae. *Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology.* 2006;1:92-9. (In Russian).
4. arasevich IV. Sovremennye predstavleniya o rikkettsiozakh. *Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy.* 2005;7(2):119-29. (In Russian).
5. Hoek W, Meekelenkamp JCE, Dijkstra F, et al. Proximity to Goat Farms and *Coxiella burnetii* Seroprevalence among Pregnant Women. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2360-3.
6. Rijks JM, Roest HIJ, Tulden PW, Kik MJ, IJzer J, Gröne A. *Coxiella burnetii* Infection in Roe Deer during Q Fever Epidemic, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(12):2369-71. doi: 10.3201/eid1712.110580.
7. Roest HIJ, Ruuls RC, Tilburg JJHC, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, et al. Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak, the Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2011;14(4):668-75. doi: 10.3201/eid1704.101562.
8. Tilnurg JHC, Rossen JWA, Tilburg JJHC, Melchers WJ, Hermans MH, van de Bovenkamp J, et al. Genotypic Diversity of *Coxiella burnetii* in the 2007-2010 Q Fever Outbreak, the Netherlands. *J of Clinical Microbiol.* 2012;50(3):1076-8. doi: 10.1128/JCM.05497-11
9. Loban KM, Lobzin YuV, Lukin EP. Rikkettsiozy cheloveka. Moscow, Saint Petersburg, 2002. (In Russian).
10. Tokarevich NK. Drug activity against *Coxiella burnetii*, a pathogen of Q fever. *Antibiotics and Chemotherapy.* 2007;52(1-2):46-56. (In Russian).
11. Delsing CE, Kullberg BJ. Q fever in the Netherlands: a concise overview and implications of the largest ongoing outbreak. *The Netherlands J of Medicine.* 2008;66(9):365-7.
12. Raoult D. Treatment of Q fever (Minireview). *Antimicrob Agents and Chemother.* 1993;37(9):1733-6.

34. Ryan ED, Kirby M, Collins DM, Sayers R, Mee JF, Clegg T. Prevalence of Coxiella burnetii (Q fever) antibodies in bovine serum and bulk – milk samples. Epidemiol Infect. 2011;139:1413-7. doi: 10.1017/S0950268810002530.
35. Santoro D., Giura R., Colombo M.C. et al. Q fever in Como, North Itali. Emerg Infect Dis. 2004;10(1):157-58.
36. Serbezov V, Kazar J, Novkirishki V, Gatcheva N, Kováčová E, Voynova V. Q fever in Bulgaria and Slovakia. Emerg Infect Dis. 1999;5(3):388-94.
37. Varga V. An Explosive outbreak of Q-fever in jedlove Kostolal any, Slovakia. Centr Eur J Publ Hlth. 1977;4:180-2.
38. Eibach R, Bothe F, Runge M, Fischer SF, Philipp W, Ganter M. Q fever: baseline monitoring of a sheep and a goat flock associated with human infections. Epidemiol Infect. 2012;140:1939-49.
39. Zubkova RI. Vyzhivaemost' rikketsii Berneta v moloke i molochnykh produktakh. Journal of microbiology, epidemiology, and immunobiology. 1957;9:42-6. (In Russian).
40. Zdrodovskii PF, Golinevich EM. Uchenie o rikketsiyakh i rikketsiozakh. Moscow: «Meditsina» Publ., 1972. (In Russian).
41. Wattiau P, Baldisova E, Toman R, Van Esbroeck M, Quoilin S, Hammadi S, et al. Q fever in woollarters, Belgium. Emerg Infect Dis. 2011;17(12):2368-9. doi: 10.3201/eid1712.101786.
42. Dupuis G, Petite J, Peter O, Vouilloz M. An important outbreak of human Q fever in a Swiss alpine valley. Intern J Epidemiol. 1987;16(2):282-7.
43. Bogomolov BP. Infektsionnye bolezni: neotlozhnaya diagnostika, lechenie, profilaktika. Moscow: «N'yudiamed», 2007. (In Russian).
44. Cinco M, Luzzati R, Mascioli M, Floris R, Brouqui P. Serological evidence of Rickettsia infections in forestry rangers in north – eastern Italy. Clin Microbiol Infect. 2006;12:493-5.
45. Reimer LG. Q fever. Clinic Microbiol Rev. 1993;6(3):193-8.
46. Panferova YuA, Freilikhman OA, Tokarevich KA. i dr. Otsenka rasprostranennosti Coxiella burnetii v prirodnykh ochagakh s ispol'zovaniem molekulyarno-geneticheskikh metodov detektsii. Otechestvennaya epidemiologiya v XXI veke: prioritetye napravleniya razvitiya i novye tekhnologii v diagnostike i profilaktike boleznei cheloveka: Trudy yubileinoi Vserossiiskoi nauchnoi konferentsii, 19–20 Apr 2012. Saint Petersburg, 2012, pp. 133-4. (In Russian).
47. Bielawska-Drozd A, Cieslik P, Mirski T, Bartoszcze M, Knap JP, Gawel J, et al. Q fever – selected issues. Ann Agricul Environ Med. 2013;20(2):222-32.

Информация о соавторе:

Яковлев Эдуард Андреевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник научно-исследовательского отдела ФГБУ 48 Центральный НИИ Министерства обороны Российской Федерации
Адрес: 141306, Московская область, Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11
Телефон: (496) 552-1206

Information about co-author:

Edward A. Yakovlev, PhD (biol.), senior researcher of research department of Russian Federation Ministry of Defense
48 Central Research Institute
Address: 11, ul. Oktyabr'skaya, Moskovskaya oblast', Sergiev Posad-6, 141306, Russian Federation
Phone: (496) 552-12064



ИНДИВИДУАЛЬНОЕ ПРОЕКТИРОВАНИЕ • ПРОИЗВОДСТВО • СЕРВИСНОЕ ОБСЛУЖИВАНИЕ

БОКСЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ

ЧИСТЫЕ ЗОНЫ

ЧИСТЫЕ ПОМЕЩЕНИЯ

www.lamsys.ru



СРЕДСТВА ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ ДЛЯ РАБОТЫ С ПБА I-IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ

ИЗОЛИРУЮЩИЕ СИСТЕМЫ

ОДЕЖДА ДЛЯ ЧИСТЫХ ПОМЕЩЕНИЙ

www.lamsystems-lto.ru



Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета

В.В.Фирстова, О.В.Калмантаева, А.А.Горбатов, Е.А.Тюрин

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

Для профилактики туляремии используется живая туляремийная вакцина. В связи с реактогенностью препарата разработка более совершенной вакцины является актуальной задачей. В формировании иммунитета против туляремии ведущая роль отводится клеточному звену иммунитета. Тем не менее, защитные уровни клеточных реакций не установлены. В работе проведено сравнительное изучение реакций иммунных и наивных лимфоцитов на антигены *F. tularensis*. Показано, что в группе вакцинированных против туляремии людей специфически увеличиваются пролиферативная активность В-лимфоцитов, количество активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) и клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺). Данные параметры совместно с выявлением антител к ЛПС *F. tularensis* предлагается использовать для оценки противотуляремийного иммунитета.

Ключевые слова: туляремия, вакцина, иммунитет, лимфоциты, маркеры активации, пролиферация

Для цитирования: Фирстова В.В., Калмантаева О.В., Горбатов А.А., Тюрин Е.А. Специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета. Бактериология. 2016; 1(1): 102–108. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-102-108

Specific cellular reactions reflected antitularemia postvaccinal immunity

V.V.Firstova, O.V.Kalmantaeva, A.A.Gorbatov, E.A.Turin

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

Live tularemia vaccine is used to prevent tularemia. Development of improved vaccine is an urgent task in connection with the reactogenicity of the live tularemia vaccine. Cell-mediated immunity to *F. tularensis* is a major component of the protective immune response. However, much remains to be clarified about protective level of cellular immune response. A comparative study of the reactions of immune and naive lymphocytes to antigens *F. tularensis* was done. Specific increase in proliferative activity of B-cells, number of activated T-helper cells (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) and memory cells (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺) were found in vaccinated against tularemia donors. These parameters together with the detection of antibodies to LPS *F. tularensis* may correlates of immunity and protection against *F. tularensis*.

Key words: tularemia, vaccine, immunity, lymphocytes, activation markers, proliferation

For citation: Firstova V.V., Kalmantaeva O.V., Gorbatov A.A., Turin E.A. Specific cellular reactions reflected antitularemia postvaccinal immunity. Bacteriology. 2016; 1(1): 102–108. DOI: 10.20953/2500-1027-2016-1-102-108

Антибактериальный иммунитет формируется с участием специфических антител, комплемента и за счет проявления функциональной активности определенными клеточными субпопуляциями. Иммунологическая эффективность вакцинации большинства коммерческих вакцин оценивается на основании выявления титров специфических антител. Для инфекций (туберкулез, туляремия, чума, бруцеллез и др.), иммунитет против которых обусловлен клеточ-

ными факторами, в первую очередь функциональной активностью Т-лимфоцитов, защитные уровни клеточных реакций не установлены.

Для формирования иммунных реакций необходимы сигналы для активации, пролиферации и дифференцировки Т- и В-лимфоцитов в эффекторные клетки и клетки памяти. Запуск иммунных реакций начинается с активации клеток. В качестве сигналов активации выступают биологические

Для корреспонденции:

Фирстова Виктория Валерьевна, доктор биологических наук, заведующая сектором иммунологии ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора

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

Статья поступила 06.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

For correspondence:

Viectoria V. Firstova, Doctor of Science (biol.), Head of Immunology Sector, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare

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

The article was received 06.06.2016, accepted for publication 15.08.2016

молекулы, которые определяют направленность пути иммунного ответа. При активации лимфоцитов на поверхности клеток появляются ко-стимулирующие молекулы и маркеры активации: CD69, CD80, CD86, CD28, CD25, HLA-DR, CD71 и т.д. [1]. Пролиферация лимфоцитов приводит к появлению большого количества специализированных Т- и В-клеток, способных обеспечивать формирование иммунитета. Длительность иммунитета, в том числе поствакцинального, обеспечивают клетки иммунологической памяти [2]. Отсутствие одного из сигналов приведет к снижению эффективности формирования иммунного ответа.

Для профилактики туляремии в России используют живую туляремийную вакцину, использование аналога которой за рубежом ограничено в связи с высокой реактогенностью [3]. Необходимость разработки более совершенной вакцины против туляремийной инфекции очевидна. Тем не менее, множество попыток создать менее реактогенную и протективную противотуляремийную вакцину не привело к успехам. Ряд сконструированных препаратов индуцировал активный синтез антител против антигенов *F. tularensis*, однако экспериментальные животные не были защищены от заражения туляремией [4]. Это связано с ключевой ролью клеточного иммунитета в защите от туляремийной инфекции и, в частности, Т-клетками памяти и их способностью запускать специфический иммунный ответ [5]. Вместе с тем, методы оценки клеточного противотуляремийного иммунитета не разработаны. Учитывая многофакторность клеточного иммунного ответа, его оценка должна проводиться на основании комплекса показателей.

Цель работы – выявить специфические клеточные реакции, отражающие наличие поствакцинального противотуляремийного иммунитета.

Материалы и методы

Доноры. В ходе выполнения работы была использована кровь 70 постоянно вакцинирующихся (на протяжении 20–25 лет) против туляремии людей и 20 непривитых доноров, которых использовали в качестве группы сравнения. Иммунизацию живой туляремийной вакциной (ГУП НПО «Микроген») проводили подкожным способом в плановом порядке и согласно приказу Минздрава России от 27.07.2001 №229 «О национальном календаре профилактических прививок по эпидемическим показаниям» и в полном соответствии с утвержденными инструкциями по применению вакцин. Забор крови осуществляли из локтевой вены доноров в объеме 10 мл. Получение сыворотки крови и гепаринизированной крови проводили общепринятыми методами. Лимфоцитарную массу выделяли методом центрифугирования в градиенте плотности Diacoll-1077 (Диа-М, Москва).

Кислото-нерастворимый комплекс *F. tularensis* (КНК) – белково-липополисахаридная фракция, полученная из осветленного лизата бактерий *F. tularensis* 15 линии НИИЭГ в результате его закисления до pH 4,5. Препараты КНК предоставлены доктором биологических наук В.М.Павловым (отдел микробиологии чумы ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск).

Определение уровня антител к липополисахаридам (ЛПС) *F. tularensis*. Выявление специфического связывания ЛПС с антителами в сыворотках крови доноров проводили мето-

дом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). ЛПС адсорбировали в концентрации 10 мкг/мл по 100 мкл в лунках 96-луночных плоскодонных полистирольных планшетов для ИФА. Результаты ИФА оценивали по оптической плотности окрашенного раствора на микропланшетном спектрофотометре «Униплан» («Пикон», Россия) при длине волны 450 нм.

Иммуноблоттинг проводили по методу Towbin H., et al. (1984) [6]. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C из геля после электрофореза осуществляли на полужидкостном электроблоттере в течение 1 ч при 200 мА в буферном растворе (pH 8,3) следующего состава: 0,025 М трис-HCl, 0,193 М глицина, 20% этанола. После этого мембрану отмывали 0,01 М фосфатным буфером (pH 7,2) и проводили иммуноанализ. Блокировку мембран осуществляли 5% обезжиренным молоком в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2) 1 ч при 37°C. Мембраны инкубировали с тестируемыми сыворотками в разведении 1/100 1 ч при 37°C, затем добавляли пероксидазный конъюгат Anti-human IgG (whole molecule) (Sigma, США) в разведении 1 : 1000 и инкубировали 1 ч при 37°C. Результаты реакции визуализировали, добавив свежеприготовленный субстрат, содержащий 0,05% диаминобензидина и 0,015% перекиси водорода, 0,1 мг/мл хлорида никеля (NiCl₂) в 0,01 М фосфатно-солевом буфере (pH 7,2).

Определение пролиферативной активности лимфоцитов с использованием красителя сукцинимидилового эфира карбоксифлуоресцеина (CFSE). 50 × 10⁶ кл/мл лимфоцитов окрашивали 5 мкМ/мл CFSE (BD e-Bioscience, США) при температуре 37°C, в атмосфере 5% углекислого газа (CO₂) и 5% влажности в течение 10 мин. Затем клетки отмывали дважды центрифугированием в RPMI-1640, содержащей 10% фетальной сыворотки, осадок ресуспендировали в полной питательной среде до концентрации 1 × 10⁶ кл/мл. Инкубировали в лунках 96-луночного планшета по 200 мкл при температуре 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% углекислый газ (CO₂) в присутствии 10 мкг/мл КНК *F. tularensis* или только в полной питательной среде в течение шести суток. Для анализа пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов окрашенные CFSE лимфоциты после активации КНК *in vitro* метили моноклональными антителами CD19-APC, CD3-FITC (Caltag Invitrogen, США).

Определение пролиферативной активности в реакции бласттрансформации лимфоцитов. Лимфоциты (2 × 10⁵ кл/мл) инкубировали с КНК в течение 48 ч при температуре 37°C в газовой среде с 5% углекислого газа (CO₂). В качестве неспецифического стимулятора Т-клеток использовали конканавалин А (Sigma, США) в концентрации 5–10 мкг/мл. Пролиферацию оценивали с помощью добавления [3H]-тимидина (1 мкКи/лунку, «Изотоп», Россия) и последующей 16-часовой инкубации. Включение [3H]-тимидина было определено на сцинтиляционном счетчике Rackbeta (LKB, Sollentuna, Швеция). Результаты представлены в виде индексов стимуляции, рассчитанных как отношение импульсов в минуту в присутствии КНК и без него.

Выявление маркеров активации лимфоцитов. Выявление маркеров CD69-FITC, CD28-PE, CD86-PE, HLA-DR-PE (Caltag Invitrogen, США) проводилось в цельной крови, культивируемой в течение 24 ч и 48 ч в полной питательной среде с КНК и без него, на поверхности CD19⁺, CD3⁺, CD3⁺CD4⁺,

CD3⁺CD8⁺ субпопуляций клеток, меченных моноклональными антителами CD3-PerCP, CD19-APC, CD4-APC, CD8-PE, CD45RO-FITC (Caltag Invitrogen, США). Цитофлуориметрический анализ проводили на проточном цитометре FACSCalibur, BD (США). Полученные данные обрабатывали в программе CellQuest Pro.

Статистический анализ. Обработку полученных данных проводили методами вариационной статистики при помощи программы Microsoft Excel 2007. Критерий Стьюдента применялся в работе для определения статистически значимых различий между средними значениями двух групп. Результаты экспериментов были представлены как средняя величина, стандартное отклонение (ошибка среднего) и достоверность различий между группами, с вычислением доверительного интервала (P), определяемого путем расчета критерия Стьюдента t с помощью программ статистической обработки данных, встроенных в программу Microsoft Excel 2007. Стандартные отклонения P менее чем 0,05 считали статистически достоверными.

Результаты и обсуждение

Выявление антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках крови вакцинированных против туляремии людей. Анализ специфического гуморального звена иммунитета показал, что у вакцинированных против туляремии доноров в 92% случаев в сыворотке крови выявлялись антитела к ЛПС (в титрах 1 : 400–1 : 5120) и к белкам *F. tularensis* различной молекулярной массы (рис. 1).

Анализ активации В-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis*. В-лимфоциты не только синтезируют антитела, но также способствуют активации Т-лимфоцитов за счет межрецепторных взаимодействий. При условии наличия иммунитета против проникшего патогена повторное проникновение антигена в организм приводит к стремительной активации лимфоцитов и экспрессии ко-рецепторов для межклеточных взаимодействий. Между группами вакцинированных против туляремии людей и не вакцинированных доноров была проведена сравнительная оценка влияния антигенов *F. tularensis* на способность В-лимфоцитов крови усиливать экспрессию маркера ранней активации CD69 и ко-стимулирующего рецептора CD86, необходимого для активации и индукции пролиферации CD4⁺Т-лимфоцитов.

В-лимфоциты (CD19⁺), полученные как от вакцинированных против туляремии людей, так и от не вакцинированных доноров, в течение первых 18 ч в присутствии КНК усиливали экспрессию CD69 маркера на поверхности клеток в 77% и 20% случаев соответственно (рис. 2). Аналогичные результаты наблюдали при анализе изменения экспрессии CD86

маркера на поверхности CD19⁺ лимфоцитов. В 20% случаев у не вакцинированных и в 60% случаев у иммунизированных туляремийной живой вакциной доноров наблюдалось усиление экспрессии CD86 рецептора на поверхности В-лимфоцитов под влиянием КНК (рис. 2). Наличие антител в сыворотке крови не всегда совпадало с появлением маркеров активации на поверхности В-лимфоцитов под влиянием КНК.

Оценка пролиферативной активности лимфоцитов. Усиление пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на стимуляцию антигеном отражает способность лимфоцитов активироваться под влиянием данного антигена и увеличивать пул специфических лимфоцитов для борьбы с инфекционным патогеном. Данные реакции бласттрансформации показали, что индекс стимуляции лимфоцитов антигенами туляремийного микроба у постоянно прививаемых людей (на протяжении 20–25 лет) был повышен по сравнению с не-

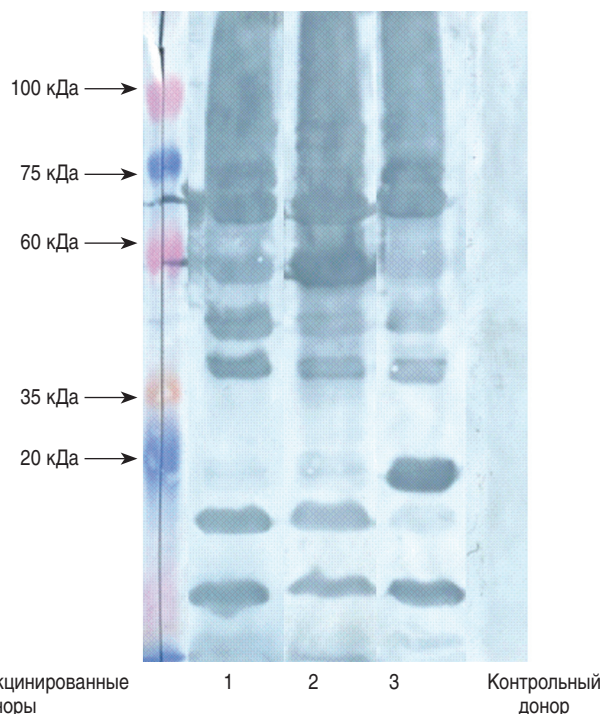
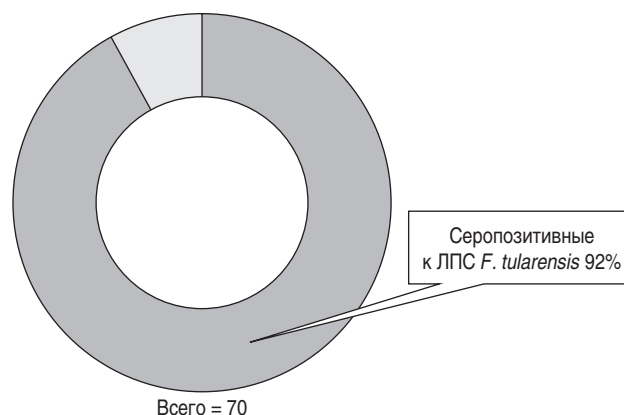


Рис. 1. Выявление антител к антигенам *F. tularensis* в сыворотках крови у иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. А – процент выявления антител в сыворотке крови к ЛПС *F. tularensis* 15/10; Б – иммуноблот сывороток доноров с ультразвуковым дезинтегратором *F. tularensis* 15/10.

Таблица 1. Индекс стимуляции лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* 15 НИИЭГ в реакции бласттрансформации у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров

Группа	Индекс стимуляции	
	до иммунизации	после иммунизации
Доноры, вакцинированные <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	2,71 ± 1,33	3,59 ± 1,16
Не вакцинированные доноры	1,10 ± 0,11	–

иммунными донорами (табл. 1). После иммунизации живой туляремийной вакциной индекс стимуляции лимфоцитов у отдельных людей не превышал значения до иммунизации. Цитометрический анализ пролиферативной активности (табл. 2) с одновременным использованием CFSE-красителя и моноклональных антител против CD19 и CD3 молекул показал, что усиление пролиферации под влиянием КНК в группе иммунизированных людей наблюдалось в первую очередь за счет субпопуляции В-лимфоцитов, среднее процентное содержание которой в цельной крови составляет 12–15%, что может объяснять незначительное повышение индекса стимуляции лимфоцитов у доноров после вакцинации.

Анализ активации Т-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis*. Ключевую роль в формировании противотуляремийного иммунитета играют Т-лимфоциты. В условиях стимуляции *in vitro* КНК клеток крови, полученных от ранее не вакцинированных против туляремии людей (рис. 3), процент Т-лимфоцитов (и их субпопуляций CD4⁺ и CD8⁺), экспрессирующих CD69, не увеличивался по сравнению с показателями не стимулированных клеток и составил $1,02 \pm 0,42\%$ и $1,22 \pm 0,47\%$ соответственно. Под влиянием КНК *in vitro* в крови, полученной от вакцинированных доноров, специфически увеличивалось количество активированных Т-хелперов ($5,47 \pm 0,82\%$ CD3⁺CD4⁺CD69⁺). В крови, по-

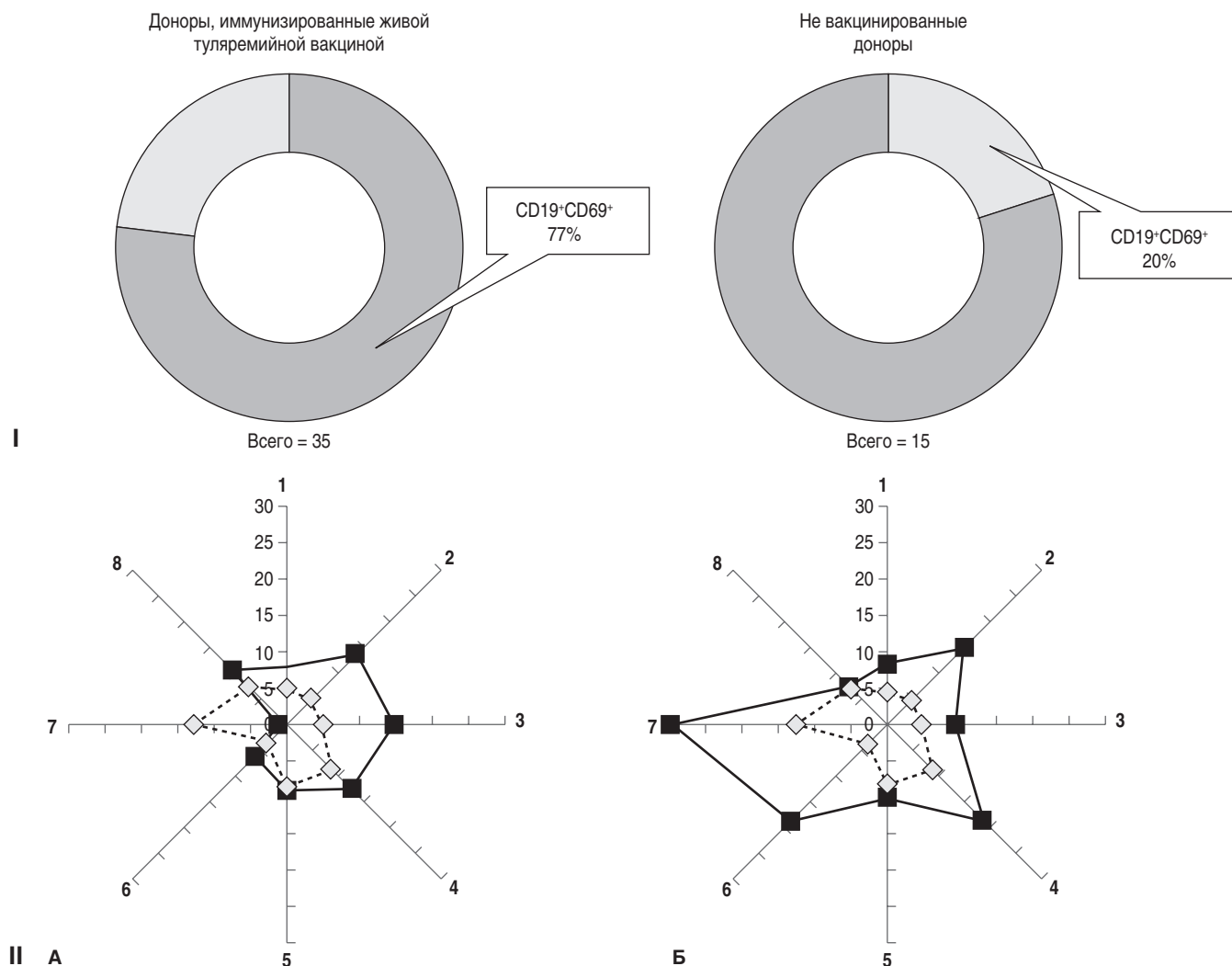


Рис. 2. Появление маркеров активации на В-лимфоцитах под влиянием КНК *F. tularensis* у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. I – процент CD19⁺ В-лимфоцитов, усиливающих экспрессию CD69 молекулы, под влиянием КНК. II – процент CD19⁺ В-лимфоцитов, усиливающих экспрессию CD86 молекулы, под влиянием КНК у контрольных (А) и иммунизированных живой туляремийной вакциной (Б) доноров после инкубирования клеток в течение 24 ч в среде (светлые маркеры) или в среде с КНК (темный маркер). Против делений оси 1 указаны проценты. На каждой оси двумя маркерами отображены индивидуальные данные, полученные от одного донора.

Таблица 2. Процентное содержание пролиферирующих Т- и В-лимфоцитов под влиянием антигенов *F. tularensis* у невакцинированных и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров

Группа	Субпопуляция	Среда	Условия инкубации клеток	
			Среда + КНК	Среда + тулярин
Доноры, вакцинированные <i>F. tularensis</i> 15 НИИЭГ	Т-лимфоциты	(4,56 ± 1,14)%	(4,51 ± 1,5)%	(4,85 ± 1,54)%
	В-лимфоциты	(4,31 ± 1,64)%	(8,62 ± 3,14)%	(7,41 ± 3,98)%
Невакцинированные доноры	Т-лимфоциты	(3,45 ± 1,45)%	(4,12 ± 1,47)%	(3,21 ± 1,21)%
	В-лимфоциты	(3,14 ± 1,01)%	(3,41 ± 1,38)%	(4,58 ± 1,54)%

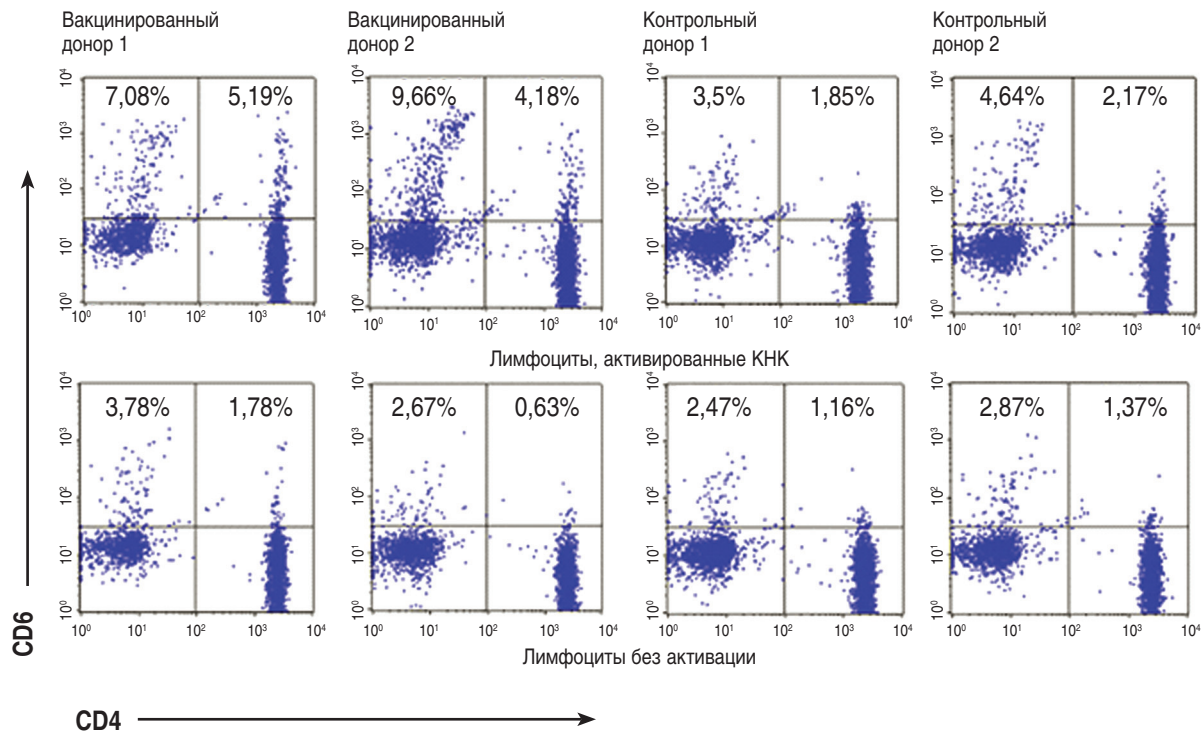


Рис. 3. Анализ активации Т-лимфоцитов под влиянием КНК *F. tularensis* у здоровых и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. В верхней левой четверти гистограммы указан процент CD3⁺CD8⁺CD69⁺ лимфоцитов, в правой – CD3⁺CD4⁺CD69⁺ клеток.

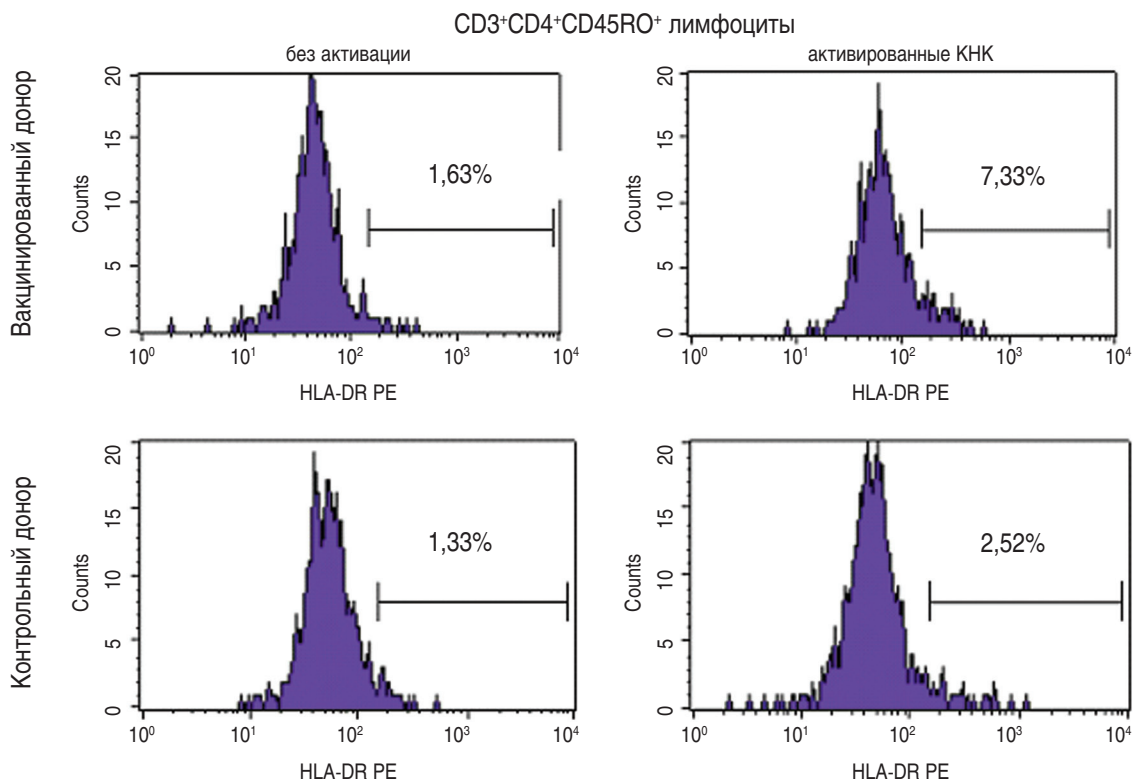


Рис. 4. Выявление специфических Т-лимфоцитов памяти CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ у здоровых и иммунизированных живой туляремийной вакциной доноров. На гистограммах указан процент CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ лимфоцитов, экспрессирующих активационную молекулу HLA-DR.

лученной от вакцинированных доноров, под влиянием КНК увеличивалось количество цитотоксических клеток, экспрессирующих CD69 молекулу, до $9,41 \pm 2,44\%$. Однако в 40% случаев в крови, полученной от невакцинированных доноров, количество CD3⁺CD8⁺CD69⁺ клеток под влиянием КНК также увеличивалось ($4,72 \pm 3,65\%$).

Выявление специфических Т-лимфоцитов памяти. Субпопуляции клеток памяти CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ являются минорными, и в крови здоровых доноров не превышают 1–2% [87]. У контрольных и вакцинированных доноров содержание CD45RO⁺HLA-DR⁺ субпопуляций CD3⁺-лимфоцитов после инкубирования клеток крови в питательной среде колебалось в пределах ($0,99 \pm 0,56\%$) (рис. 4). Через 48 ч активации клеток *in vitro* КНК в популяции лимфоцитов, полученных от вакцинированных, но не контрольных доноров, происходило увеличение CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺ клеток ($8,04 \pm 0,34\%$).

Основным иммунодоминантным антигеном *F. tularensis*, к которому синтезируются специфические антитела после заболевания или вакцинации людей, является ЛПС туляремийного микроба [18]. Наши исследования показали, что после вакцинации против туляремии в 92% случаев выявляются антитела к ЛПС. Учитывая, что антигенная структура *F. tularensis* гетерогенна [119], мы проанализировали сыворотки в иммуноблот-анализе, который показал, что у доноров антитела синтезировались против полисахаридов и антигенов *F. tularensis* белковой природы.

Для формирования протективного противотуляремийного иммунитета необходимо синергичное участие клеточного и гуморального иммунитета [10]. Продукция специфических антител является одной из функций В-лимфоцитов. В процессе формирования иммунного ответа В-лимфоциты регулируют функциональную активность Т-лимфоцитов, выступая в роли предоставляющих антиген клеток, несущих на поверхности ко-стимулирующие молекулы [11], способствуя пролиферации и проявлению эффекторной функции Т-лимфоцитами. Усиление экспрессии молекулы ранней активации CD69 и ко-стимулирующей молекулы CD86 на поверхности В-лимфоцитов в присутствии КНК наблюдали как в группе вакцинированных против туляремии, так и в группе невакцинированных доноров. Поэтому выявление молекул CD69, CD86 на поверхности В-лимфоцитов, активированных КНК, не может быть использовано для выявления противотуляремийного иммунитета.

Учитывая ведущую роль Т-лимфоцитов в формировании протективного противотуляремийного иммунного ответа, мы сравнили способность к активации под влиянием КНК Т-клеток, полученных от иммунных и неиммунных доноров. Для формирования протективного иммунитета к возбудителю туляремии необходимо участие обеих субпопуляций Т-лимфоцитов CD4⁺ и CD8⁺. Косвенно об этом свидетельствует тот факт, что у дефицитных мышей по одной из субпопуляций снижается выживаемость после заражения вирусulentным штаммом *F. tularensis* [12, 13].

В связи с важностью обеих субпопуляций лимфоцитов в формировании иммунитета к туляремии мы оценили способность КНК активировать субпопуляции Т-хелперов и цитотоксических лимфоцитов. В результате было выявлено, что в группе вакцинированных против туляремии людей специфически

увеличивалось количество CD4⁺CD69⁺ Т-лимфоцитов под влиянием КНК. Цитотоксические лимфоциты также активировались под влиянием КНК, но не только в группе иммунизированных против туляремии людей, но также и в группе некоторых (40%) контрольных доноров. Об информативности показателей пролиферативной активности лимфоцитов и их способности усиливать экспрессию CD69 молекулы под влиянием КНК косвенно свидетельствуют наши предыдущие исследования на мышах, где было показано, что усиление пролиферативной активности и способность Т-лимфоцитов активироваться под влиянием антигенов *F. tularensis* у мышей, иммунизированных против туляремии, коррелируют с защитой животных от заражения туляремийной инфекцией [14].

В формировании постинфекционного и поствакцинального противотуляремийного иммунитета ключевую роль играют Т-лимфоциты памяти. Т-лимфоциты памяти отличаются от зрелых неиммунных Т-лимфоцитов по экспрессии ряда мембранных молекул. В частности, на клетках памяти экспрессируется значительное количество молекул CD45RO, которые ассоциированы с TCR и ко-рецепторами, что способствует существенному снижению (на два порядка и более) порога активации лимфоцита антигеном [15]. Т-лимфоциты памяти нуждаются в меньшей степени, чем зрелые неиммунные лимфоциты, в ко-стимулирующих воздействиях, и поэтому легче выходят в продуктивную эффекторную фазу иммунного ответа [16]. Активация этих клеток сопровождается экспрессией HLA-DR молекулы – маркера поздней активации клетки [17]. В клеточной культуре, полученной от вакцинированных против туляремии людей, в отличие от неиммунных доноров, под влиянием КНК *F. tularensis* отмечалось специфическое усиление экспрессии HLA-DR рецептора на поверхности Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺) памяти (CD45RO⁺). Способность клеток памяти активироваться под влиянием КНК свидетельствует о наличии циркулирующих в крови специфических лимфоцитов памяти, эффективно распознающих антигены *F. tularensis*.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что реакции иммунных и наивных лимфоцитов на КНК *F. tularensis* различаются по некоторым параметрам активации. В частности, в группе вакцинированных против туляремии людей специфически увеличивались пролиферативная активность В-лимфоцитов, количество активированных Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺CD69⁺) и клеток памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺HLA-DR⁺). Эти параметры, по всей видимости, могут быть использованы для выявления клеточного противотуляремийного иммунитета. Совместный анализ данных гуморального и клеточного противотуляремийного иммунитета позволит проводить оценку иммунологической эффективности вакцинации.

Литература

1. Зурочка АВ, Хайдуков СВ, Кудрявцев ИВ, Черешнев ВА. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2014.
2. Медуницын НВ, Миронов АН, Мовсесянц АА. Теория и практика вакцинологии: монография. М: ООО «Ремедиум», 2015.
3. Darling RG, Woods JB. USAMRIID's medical management of biological casualties handbook 5th ed. Fort Detrick. 2004.
4. Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87:277-81.

5. Sunagar R, Kumar S, Franz BJ, Gosselin EJ. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016;6:9-23. Epub 2016 May 4.
6. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72:313.
7. Chatterjee S, Clark CE, Lugli E, Roederer M, Nutman TB. Filarial Infection Modulates the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis through Expansion of CD4+ IL-4 Memory T Cells. *J Immunol*. 2015;194(6):2706-14. doi: 10.4049/jimmunol.1402718.
8. Аронова НВ. Липополисахарид бактерий рода *Francisella* как иммунодоминантные антигены и их фазовые вариации в условиях *in vivo*: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07. Саратов, 2005.
9. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clinical Microbiol Rev*. 2002; 10:631-46.
10. Steiner DJ, Furuuya Y, Metzger DW. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect Drug Resist*. 2014;7:239-51. doi: 10.2147/IDR.S53700.
11. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutasa G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol*. 2007;179:5109-16.
12. Bakshi CS, Malik M, Mahawar M, Kirimanjeshwara GS, Hazlett KR, Palmer LE, et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine*. 2008;26:5276-88.
13. Conlan JW, Shen H, Kuolee R, Zhao X, Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha T cell- and interferon gamma-dependent mechanism. *Vaccine*. 2005;23:2477-85.
14. Фирстова ВВ, Павлов ВМ, Горбатов АА, Комбарова ТИ, Караулов АВ, Дятлов ИА. Влияние степени воспаления у мышей линии balb/c, индуцированного разными дозами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, на формирование антитуляремийного клеточного и гуморального иммунного ответа. *Иммунология*. 2014;35(3):147-50.
15. Хайтов РМ, Игнатъева ГА, Сидорович ИГ. *Иммунология*. М.: Медицина, 2000.
16. Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, et al. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. 2013;587(24):3986-94. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.034.
17. Литвинова ЛС, Гуцол АА, Сохоневич НА, Кофанова КА, Хазиахматова ОГ, Шуплетова ВВ, и др. Основные поверхностные маркеры функциональной активности Т-лимфоцитов. *Медицинская иммунология*. 2014;16(1):7-26.
9. Ellis J, Oyston PC, Green M, Titball RW. Tularemia. *Clinical Microbiol Rev*. 2002;10:631-46.
10. Steiner DJ, Furuuya Y, Metzger DW. Host-pathogen interactions and immune evasion strategies in *Francisella tularensis* pathogenicity. *Infect Drug Resist*. 2014;7:239-51. doi: 10.2147/IDR.S53700.
11. O'Neill SK, Cao Y, Hamel KM, Doodes PD, Hutasa G, Finnegan A. Expression of CD80/86 on B cells is essential for autoreactive T cell activation and the development of arthritis. *J Immunol*. 2007;179:5109-16.
12. Bakshi CS, Malik M, Mahawar M, Kirimanjeshwara GS, Hazlett KR, Palmer LE, et al. An improved vaccine for prevention of respiratory tularemia caused by *Francisella tularensis* SchuS4 strain. *Vaccine*. 2008;26:5276-88.
13. Conlan JW, Shen H, Kuolee R, Zhao X, Chen W. Aerosol-, but not intradermal-immunization with the live vaccine strain of *Francisella tularensis* protects mice against subsequent aerosol challenge with a highly virulent type A strain of the pathogen by an alpha T cell- and interferon gamma-dependent mechanism. *Vaccine*. 2005;23:2477-85.
14. Firstova VV, Pavlov VM, Gorbатов AA, Kombarova TI, Karaulov AV, Dyatlov IA. The formation of cell articulating and humoral immune response induced it mice f tularensis 15 niieg. *Immunologiya* 2014;35(3):147-50. (In Russian).
15. Khaitov RM, Ignat'eva GA, Sidorovich IG. *Immunology*. Moscow: "Meditcina" Publ., 2000. (In Russian).
16. Xue J, Gao X, Fu C, Cong Z, Jiang H, Wang W, et al. Regulation of galectin-3-induced apoptosis of Jurkat cells by both O-glycans and N-glycans on CD45. *FEBS Lett*. 2013;587(24):3986-94. doi: 10.1016/j.febslet.2013.10.034.
17. Litvinova LS, Gutsol AA, Sokhnevich NA, Kofanova KA, Khaziakhmatova OG, Shupletsova VV, et al. Basic surface markers of functional activity T-lymphocytes. *Medical Immunology*. 2014;16(1):7-26. (In Russian).

Информация о соавторах:

Калмантаева Ольга Валериевна, научный сотрудник сектора инфекционной иммунологии отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Горбатов Алексей Александрович, младший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии Роспотребнадзора
 Адрес: 142279, Московская область, Серпуховский р-н, п. Оболенск, ФБУН ГНЦ ПИМБ
 Телефон: (4967) 36-0003

Тюрин Евгений Александрович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией 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) 36-0003

Information about co-authors:

Olga V. Kalmantaeva, researcher, Infectious Immunology Sector, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

Aleksey A. Gorbатов, junior researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

Eugene A. Tyurin, PhD (med.), Chief of the Laboratory of Biological Safety, FBIS State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare
 Address: SRCAMB 142279 Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, Russian Federation
 Phone: (4967) 36-00-03

References

1. Zurochka AV, Khaidukov SV, Kudryavtsev IV, Chereshev VA. *Protochnaya tsitometriya v meditsine i biologii*. Ekaterinburg, 2014. (In Russian).
2. Medunitsyn NV, Mironov AN, Movsesyants AA. *Teoriya i praktika vaktsinologii: monografiya*. Moscow: Remedium Publ., 2015. (In Russian).
3. Darling RG, Woods JB. *USAMRIID's medical management of biological casualties handbook* 5th ed. Fort Detrick. 2004.
4. Oyston PC, Quarry JE. Tularemia vaccine: past, present and future. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005;87:277-81.
5. Sunagar R, Kumar S, Franz BJ, Gosselin EJ. Tularemia vaccine development: paralysis or progress? *Vaccine* (Auckl). 2016;6:9-23. Epub 2016 May 4.
6. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunoblotting: Current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72:313.
7. Chatterjee S, Clark CE, Lugli E, Roederer M, Nutman TB. Filarial Infection Modulates the Immune Response to Mycobacterium tuberculosis through Expansion of CD4+ IL-4 Memory T Cells. *J Immunol*. 2015;194(6):2706-14. doi: 10.4049/jimmunol.1402718.
8. Aronova NV. *Lipopolisakharid bakterii roda Francisella kak immunodominantnye antigeny i ikh fazovye variatsii v usloviyakh in vivo*. Dissertation. Saratov, 2005. (In Russian).

Современная нормативная база, регламентирующая профессиональную подготовку в формате непрерывного медицинского образования (НМО), необходимую для работы по специальностям «Бактериология», «Вирусология» и «Паразитология»

А.Р.Мавзютов

ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России, Уфа, Российская Федерация

Специфика современных преобразований в системе профессионального образования такова, что приоритетными становятся требования работодателя. Указанное вывело на первый план понятие о профстандартах, в которых эти требования должны быть изложены, а с 1 июля 2016 года все работодатели обязаны применять профессиональные стандарты (Федеральный закон от 2 мая 2015 г. №122-ФЗ).

Однако при этом высветилась проблема, заключающаяся в чрезмерности количества специальностей, подготовка по которым осуществляется в нашей стране. Изложенная ситуация не могла не коснуться и системы здравоохранения, где до недавнего времени официально существовало порядка 150–200 медицинских специальностей и профилизаций, количество их практически ежегодно увеличивалось, тогда как в большинстве зарубежных систем здравоохранения количество медицинских специальностей не превышает нескольких десятков. Это существенно осложняло в России как практическую деятельность медицинских работников, так и их профессиональную подготовку, а еще более – профессиональную переподготовку. Система до- и последипломного образования стала громоздкой, инертной и была лишена возможности оперативного реагирования на изменяющиеся требования реальности. В этих условиях медицинские работники стали заложниками своих узких специализаций, что, с одной стороны, затрудняло их трудоустройство, способствовало хроническому дисбалансу специальностей в здравоохранении и предполагало необходимость нескольких смежных специальностей, подкрепленных сертификатами, а с другой – приводило к неэффективным затра-

там времени и ресурсов на регулярные продолжительные «повышения квалификации», «специализации» и «переподготовки». Последние в связи с этим приобретали все более формальный характер, становились все менее эффективными и стали благодатными для увеличения числа мало-квалифицированных, но дипломированных при этом специалистов, со всеми вытекающими отсюда последствиями.

Серьезный шаг в нормализации ситуации, можно считать, был сделан, когда стал более эффективно использоваться инструмент номенклатуризации специальностей медицинских работников. В частности, в соответствии с приказом Минздрава России от 07.10.2015 N 700н «О номенклатуре специальностей специалистов, имеющих высшее медицинское и фармацевтическое образование» (Зарегистрировано в Минюсте России 12.11.2015 N 39696) утверждена новая номенклатура специальностей медиков и фармацевтов, имеющих профильное высшее образование, включающая 94 специальности, в том числе «Бактериология», «Вирусология» и «Паразитология».

В соответствии с приказом МЗ РФ №707н от 08.10.2015 г. «Об утверждении Квалификационных требований к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки»» (Рег. в Минюсте России 23.10.2015 №39438) определены квалификационные требования к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки», необходимые для работы по специальностям «Бактериология» (табл. 1), «Вирусология» (табл. 2) и «Паразитология» (табл. 3).

Изменен порядок проведения лицензионного контроля в сфере здравоохранения и оценки соответствия лицензионным требованиям сертификатов специалистов в связи с переходом к системе аккредитации специалистов с 1 января 2016 г. и вступлением в силу статьи 69 Федерального закона N 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г.

Для корреспонденции:

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук, заведующий кафедрой фундаментальной и прикладной микробиологии, профессор кафедры лабораторной диагностики ИДПО ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет Минздрава России
Адрес: 450077, Уфа, ул. Ленина, 3
E-mail: ufalab@mail.ru
Orcid.org/0000-0001-5943-1882

Статья поступила 03.06.2016 г., принята к печати 15.08.2016 г.

В соответствии с приказом МЗ РФ от 25 февраля 2016 г. №127н «Об утверждении сроков и этапов аккредитации специалистов, а также категорий лиц, имеющих медицинское, фармацевтическое или иное образование и подлежащих аккредитации специалистов», переход к системе аккредитации специалистов будет осуществляться в несколько этапов (табл. 4).

Формы, правила и особенности проведения аккредитации медицинских работников утверждены приказом МЗ РФ N 334н от 2 июня 2016 года, который регламентирует **3 вида аккредитации медицинских работников**:

1. первичная аккредитация – для медработников, завершивших высшее или среднее медицинское образование;
2. первичная специализированная аккредитация – для медицинских работников, завершивших освоение программ подготовки кадров высшей квалификации и дополнительных профессиональных программ (профессиональная переподготовка), а также медработников с дипломами, полученными за рубежом;
3. периодическая аккредитация – для медицинских работников, завершивших освоение профессиональных образовательных программ медицинского образования и фармацевтического образования, обеспечивающих непрерывное совершенствование профессиональных знаний и навыков в течение всей жизни, а также постоянное повышение профессионального уровня и расширение квалификации.

Для первичной специализированной и периодической аккредитации необходимы:

- заявление;
- копия документа, удостоверяющего личность;
- портфолио;
- копия сертификата специалиста (при наличии) или свидетельства об аккредитации специалиста (при наличии);
- копии документов о высшем образовании и о квалификации (с приложениями) или о среднем профессиональном образовании (с приложениями) или выписка из протокола заседания государственной экзаменационной комиссии;
- копия трудовой книжки (при наличии);
- копия страхового свидетельства обязательного пенсионного страхования (при наличии).

Этапы первичной и первичной специализированной аккредитации медицинских работников

Тестирование: на основе случайной выборки 60 тестовых заданий из Единой базы оценочных средств на решение тестовых заданий отводится 60 мин, чтобы получить «сдано», необходимо правильно ответить минимум на 70% вопросов.

Оценка практических навыков (умений) в симулированных условиях. Оценивать будут правильность и последовательность выполнения не менее 5 практических заданий; чтобы получить «сдано», нужно правильно выполнить минимум 70% заданий.

Таблица 1. Квалификационные требования к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки» специальность «Бактериология» (Приложение к приказу МЗ РФ от 8 октября 2015 г. N 707н)

Специальность «Бактериология»	
Уровень профессионального образования	Высшее образование – специалитет по одной из специальностей: «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика», «Медицинская кибернетика» Подготовка в ординатуре по специальности «Бактериология»
Дополнительное профессиональное образование	Профессиональная переподготовка по специальности «Бактериология» при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей: «Вирусология», «Инфекционные болезни», «Клиническая лабораторная диагностика», «Лабораторная микология», «Эпидемиология»
Должности	Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности Врач-бактериолог; заведующий (начальник) структурным подразделением (отдела, отделения, лаборатории, кабинета, отряда и другое) медицинской организации – врач-бактериолог

Таблица 2. Квалификационные требования к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки» специальность «Вирусология» (Приложение к приказу МЗ РФ от 8 октября 2015 г. N 707н)

Специальность «Вирусология»	
Уровень профессионального образования	Высшее образование – специалитет по одной из специальностей: «Лечебное дело», «Педиатрия», «Медико-профилактическое дело», «Медицинская биохимия», «Медицинская биофизика», «Медицинская кибернетика» Подготовка в ординатуре по специальности «Вирусология»
Дополнительное профессиональное образование	Профессиональная переподготовка по специальности «Вирусология» при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей: «Бактериология», «Инфекционные болезни», «Клиническая лабораторная диагностика», «Эпидемиология»
Должности	Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности Врач-вирусолог; заведующий (начальник) структурным подразделением (отдела, отделения, лаборатории, кабинета, отряда и другое) медицинской организации – врач-вирусолог

Таблица 3. Квалификационные требования к медицинским и фармацевтическим работникам с высшим образованием по направлению подготовки «Здравоохранение и медицинские науки» специальность «Паразитология» (Приложение к приказу МЗ РФ от 8 октября 2015 г. N 707н)

Специальность «Паразитология»	
Уровень профессионального образования	Высшее образование – специалитет по специальности «Медико-профилактическое дело» Подготовка в ординатуре по специальности «Паразитология»
Дополнительное профессиональное образование	Профессиональная переподготовка по специальности «Паразитология» при наличии подготовки в интернатуре/ординатуре по одной из специальностей: «Инфекционные болезни», «Эпидемиология»
Должности	Повышение квалификации не реже одного раза в 5 лет в течение всей трудовой деятельности Врач-паразитолог; заведующий (начальник) структурным подразделением (отдела, отделения, лаборатории, кабинета, отряда и другое) медицинской организации – врач-паразитолог

Решение ситуационных задач. Нужно правильно ответить на 5 вопросов, содержащихся в каждой из 3 ситуационных задач, на подготовку дается 60 мин, на заслушивание ответа – не более 30 мин.

Этапы периодической аккредитации медицинских работников

Оценка портфолио. Портфолио – это отчет о профессиональной деятельности за последние 5 лет, который медицинский работник создает самостоятельно. В него включаются: сведения об индивидуальных профессиональных достижениях, сведения об освоении программ повышения квалификации, обеспечивающих непрерывное совершенствование профессиональных навыков и расширения квалификации. Эти сведения подаются с подтверждающими документами.

Документы для прохождения периодической аккредитации медицинский работник представляет лично или направляет заказным письмом с уведомлением.

Тестирование проводится на основе случайной выборки 60 тестовых заданий из Единой базы оценочных средств, на решение отводится 60 мин. Для получения «сдано» необходимо правильно ответить минимум на 70% вопросов.

Условия прохождения аккредитации. В момент прохождения аккредитации запрещается иметь при себе и использовать любые средства связи. В помещениях должна быть обеспечена техническая возможность записи видеоизображения и аудиосигнала, при этом качество видеозаписи должно обеспечивать возможность обзора всего помещения, а аудиозапись должна содержать речь аккредитуемого.

Итоги аккредитации. Медработники, успешно прошедшие все этапы аккредитации, признаются аккредитованными. Им не позднее чем через 30 календарных дней с момента подписания протокола заседания аккредитационной комиссии выдается свидетельство об аккредитации. Не прошедшие аккредитацию могут подать жалобу на решение аккредитационной комиссии в апелляционную комиссию в течение 2 рабочих дней с момента размещения результатов прохождения этапа аккредитации. Решения аккредитационной комиссии и апелляционной комиссии могут быть обжалованы в Минздраве России.

Порядок и сроки совершенствования медицинскими работниками и фармацевтическими работниками профессиональных знаний и навыков путем обучения по дополнительным профессиональным образовательным программам в образовательных и научных организациях регламентированы приказом МЗ РФ от 3 августа 2012 г. №66н «Об утверждении Порядка и сроков совершенствования медицинскими работниками и фармацевтическими работниками профессиональных знаний и навыков путем обучения по дополнительным профессиональным образовательным программам в образовательных и научных организациях» (зарегистрирован Министерством юстиции Российской Федерации 4 сентября 2012 г., регистрационный № 25359).

Однако в настоящее время подготовлен проект новой редакции вышеуказанного приказа, согласно которому с 1 января 2016 года работники, получившие сертификат специалиста или свидетельство об аккредитации специалиста после 1 января 2016 года, проходят обучение только в рамках системы непрерывного медицинского и фармацевтического образования. Обучение работника в рамках системы непрерывного образования представляет собой самостоятельное формирование работником с использованием интернет-портала непрерывного медицинского и фармацевтического образования Министерства здравоохранения Российской Федерации индивидуального комплекса образовательных программ повышения квалификации, разрабатываемых образовательными организациями, образовательных мероприятий, реализуемых общественными профессиональными некоммерческими организациями, а также интерактивных образовательных модулей по соответствующей специальности. В дальнейшем данный комплекс осваивается дискретно, в том числе с использованием дистанционных образовательных технологий и электронного обучения, в течение 5 лет, завершающегося прохождением процедуры аккредитации. Для определения трудоемкости индивидуального плана в системе непрерывного образования применяется система зачетных единиц (1 зачетная единица равна 1 академическому часу). Общая трудоемкость разделов индивидуального плана составляет 250 зачетных единиц с ежегодным распределением объема освоения не менее 50 зачетных единиц.

Таблица 4. Этапы перехода к процедуре аккредитации медицинских работников

Этап	Дата начала этапа	Категория лиц
Первый этап	1 января 2016 г.	Лица, получившие после 1 января 2016 г. высшее образование по основным образовательным программам в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами по специальностям «Стоматология» и «Фармация»
Второй этап	1 января 2017 г.	Лица, получившие после 1 января 2017 г. высшее образование по основным образовательным программам в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами по специальностям укрупненной группы специальностей «Здравоохранение и медицинские науки» (уровень специалитет)
Третий этап	1 января 2018 г.	Лица, получившие после 1 января 2018 г. высшее образование по программам подготовки кадров высшей квалификации в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами по специальностям укрупненной группы специальностей «Здравоохранение и медицинские науки» (уровень ординатура)
		Лица, получившие после 1 января 2018 г. высшее образование по основным образовательным программам в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами по специальностям укрупненной группы специальностей «Здравоохранение и медицинские науки» (уровень бакалавриат, уровень магистратура)
		Лица, получившие после 1 января 2018 г. среднее профессиональное образование в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами по специальностям укрупненной группы специальностей «Здравоохранение и медицинские науки»
Четвертый этап	1 января 2021 г.	Лица, получившие после 1 января 2018 г. медицинское и фармацевтическое образование и после 1 января 2018 г. дополнительное профессиональное образование по программам профессиональной переподготовки
		Лица, получившие после 1 января 2018 г. медицинское и фармацевтическое образование в иностранных государствах
		Лица, получившие после 1 января 2018 г. иное высшее образование по основным образовательным программам в соответствии с федеральными государственными образовательными стандартами
		Иные лица, не перешедшие к процедуре аккредитации специалистов на этапах 1–3

В качестве компонентов индивидуального плана реализуются образовательные программы повышения квалификации, направленные на совершенствование имеющихся или освоение новых умений и навыков в рамках имеющейся у работника квалификации, освоение новых знаний, умений и навыков с присвоением новой квалификации, а также образовательные программы и дистанционные образовательные модули по наиболее актуальным вопросам профилактики, диагностики и лечения социально значимых заболеваний, иных заболеваний, оказывающих основное влияние на заболеваемость и смертность населения, продолжительностью не более 36 академических часов, разрабатываемые образовательными организациями для подготовки в рамках системы непрерывного образования в целях актуализации работниками знаний, умений и навыков с учетом развития медицинской науки и техники, включенные в **лист образовательной активности**, размещенный на интернет-портале непрерывного медицинского образования Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Образовательные программы повышения квалификации, реализуемые в рамках системы непрерывного образования, могут предусматривать возможность дискретной реализации и реализации с использованием дистанционных образовательных технологий и электронного обучения.

Форма освоения и содержание обучения определяются образовательной программой повышения квалификации, разрабатываемой образовательной организацией. Ежегодный объем освоения образовательных программ составляет не менее 36 зачетных единиц.

В качестве компонентов индивидуального плана могут быть использованы образовательные мероприятия (конференции и семинары, в том числе проводимые с использованием дистанционных технологий, дистанционные образовательные модули), реализуемые общественными профессиональными некоммерческими организациями, включенные в лист образовательной активности, а также интерактивные образовательные модули, размещенные на интернет-портале. Общий ежегодный объем освоения образовательных мероприятий и интерактивных модулей может составлять не более 14 зачетных единиц.

Решение о включении образовательной программы повышения квалификации (образовательного мероприятия) в лист образовательной активности принимается Экспертной комиссией по непрерывному медицинскому образованию, создаваемой Министерством здравоохранения Российской Федерации по ходатайству образовательной организации, реализующей данную программу в соответствии с лицензией на право ведения образовательной деятельности (общественной профессиональной некоммерческой организации, проводящей данное мероприятие).

В состав Экспертной комиссии Министерства включаются представители Министерства здравоохранения Российской Федерации, главные внештатные специалисты-эксперты Министерства здравоохранения Российской Федерации по медицинским и фармацевтическим специальностям, представители Федерального фонда обязательного медицинского страхования, Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения, медицинских профессиональных некоммерческих организаций, образовательных и медицинских

организаций, Учебно-методического объединения по медицинским и фармацевтическим специальностям.

В случае принятия положительного решения о включении образовательной программы повышения квалификации (образовательного мероприятия) в лист образовательной активности, паспорт данной программы (данного мероприятия) размещается на интернет-портале.

Образовательная организация (общественная профессиональная некоммерческая организация) вправе ходатайствовать о включении в лист образовательной активности одной или нескольких реализуемых образовательных программ повышения квалификации (образовательных мероприятий).

Работники, успешно прошедшие регистрацию, получают доступ к листу образовательной активности, инструменту, обеспечивающему формирование индивидуального плана и возможность создания предварительной заявки для зачисления на обучение по выбранной образовательной программе повышения квалификации (для участия в выбранном образовательном мероприятии). Создание предварительной заявки для освоения дистанционного образовательного модуля и интерактивного модуля не требуется. Подтверждение предварительной заявки осуществляется работником с использованием технических возможностей интернет-портала после согласования с работодателем.

При отсутствии подтверждения в течение 10 дней предварительная заявка аннулируется.

Учет освоения работником компонентов индивидуального плана ведется на интернет-портале.

Освоение компонента индивидуального плана подтверждается соответствующим документом. Освоение дистанционного образовательного модуля и интерактивного модуля подтверждается с использованием технических возможностей интернет-портала.

В заключение необходимо отметить, что в нашей стране в настоящее время существует не менее 3000 специальностей. При этом разработанными профессиональными стандартами подкреплено не более 800–1000 специальностей, перечень которых выложен и должен регулярно обновляться на сайте Росминтруда (profstandart.rosmintrud.ru/reestr-professionalnyh-standartov).

В частности, остаются не разработанными профессиональные стандарты по специальностям «Бактериология», «Вирусология» и «Паразитология». Следовательно, не определены трудовые функции соответствующих специалистов, аккредитация которых предполагается. Сложившаяся ситуация включает в себя реальные риски исчезновения специальностей «Бактериология», «Вирусология» и «Паразитология» на фоне и без того малочисленной группы врачей-бактериологов, врачей-вирусологов и врачей-паразитологов. Особо следует акцентировать внимание всех заинтересованных сторон на том факте, что сфера деятельности указанных специалистов функционально не сводится лишь к разделам клинической микробиологии, поскольку предполагает в качестве обязательных составляющих специальные знания и навыки в области санитарно-бактериологических, санитарно-вирусологических и санитарно-паразитологических исследований, от которых зависит санитарно-эпидемиологическое благополучие страны.

Информация о монографиях

Микробиоценозы и здоровье человека / Под редакцией В.А.Алешкина, С.С.Афанасьева, А.В.Караулова. – М.: Издательство «Династия», 2015. – 548 с. – ISBN 978-5-98125-099-6.

Авторы: В.А.Алешкин, С.С.Афанасьев, А.В.Караулов, Е.А.Воропаева, М.С.Афанасьев, А.В.Алешкин, Ю.В.Несвижский, В.К.Гостищев, И.А.Дятлов, И.В.Евсегнеева, В.В.Фирстова, Л.А.Леванова, Л.И.Кафарская, А.М.Амерханова, О.В.Макаров, О.Ю.Борисова, Е.П.Селькова, В.М.Лахтин, И.Г.Шемякин, Л.В.Феклисова, Е.Р.Мескина, О.В.Калюжин, О.Н.Ершова, Х.М.Галимзянов, О.В.Рубальский, Э.А.Светоч, Т.Н.Савченко, А.А.Терентьев, С.Ю.Пчелинцев, Б.А.Ефимов, А.В.Куяров, А.Г.Лютов, В.В.Решетник, А.Л.Байракова, О.Г.Гречишников, О.Г.Жиленкова, В.А.Метельская, Ю.В.Захарова, Т.Н.Гренкова, Э.А.Есян, Углеша Станевич, Е.А.Егорова, Н.В.Воложанцев, А.М.Затевалов, Ю.М.Голубцова, Н.К.Фурсова, Ю.Н.Урбан, О.А.Воронина, Е.О.Рубальский, М.В.Лахтин, О.М.Кострова, А.Д.Воропаев, А.А.Калмыков, Е.Е.Рубальская, В.Б.Бондаренко, Д.Д.Воропаев, А.Н.Оганесян, Н.В.Бондаренко.

Книга представляет собой коллективный труд группы специалистов различного профиля, имеющий целью обобщить данные литературы и результаты собственных исследований по новым направлениям в исследовании и установлении механизмов функционирования и регуляции микробиоценозов открытых полостей как органа макроорганизма. В работе приводятся последние данные научных исследований по документированию интегрирующей роли колонизационной резистентности слизистых в поддержании физиологического уровня функционирования микробиоценозов как неотъемлемого компонента мукозального иммунитета. Генотипические и фенотипические (включая факторы патогенности) свойства микроорганизмов индивидуальных микробиотопов слизистых при взаимодействии с рецепторами врожденного иммунитета последних обеспечивают в онтогенезе физиологический уровень антиинфекционной резистентности и устойчивости к другим неблагоприятным факторам внешней среды; при заболевании они участвуют в запуске патогенетических механизмов инфекционного процесса, а также определяют выраженность клинических проявлений. Обсуждаются вопросы и приводится фактологический материал по использованию оригинальных запатентованных информативных тестов оценки микробиоценозов и мукозального иммунитета при разнообразной инфекционной патологии с целью разработки алгоритма обследования пациентов. Материалы собственных исследований, представленные в книге, являются в значительной части приоритетными как в научно-теоретическом, так и практическом аспектах.

XXII Олимпийские зимние игры и XI Паралимпийские зимние игры 2014 года в г. Сочи. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия / Под редакцией Г.Г.Онищенко, А.Н.Куличенко. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2015. – 576 с.

Авторы: Г.Г.Онищенко, А.Ю.Попова, Б.П.Кузькин, И.В.Брагина, Е.Б.Ежлова, Ю.В.Демина, А.А.Горский, А.С.Гуськов, О.И.Аксенова, А.А.Мельникова, Н.Д.Пакскина, Г.Е.Иванов, Л.В.Чикина, Е.С.Почтарева, В.С.Степанов, О.В.Прусаков, Н.В.Андряшина, О.Н.Скударева, Н.В.Фролова, В.Ю.Смоленский, З.М.Омариев, А.Н.Куличенко, О.В.Малецкая, Д.В.Ефременко, Т.В.Таран, Е.А.Манин, А.Г.Рязанова, Н.Ф.Василенко, Д.Г.Пономаренко, В.М.Дубянский, В.Н.Савельев, И.В.Кузнецова, Е.С.Котенёв, Г.М.Грижебовский, В.П.Клиндухов, П.Н.Николаевич, Т.В.Гречаная, М.И.Балаева, В.А.Бирюков, И.И.Божко, Ю.Г.Дараган, О.Ю.Карпунин, М.А.Потёмкина, Л.С.Вечерняя, В.А.Егоров, Е.А.Вечерняя, С.Ч.Тешева, В.В.Пархоменко, О.А.Куличенко, Г.К.Рафеенко, Л.И.Щербина, Т.А.Землякова, Е.О.Кузнецов, В.Г.Оробей, С.Б.Вараксин, Л.И.Мишина, В.Н.Ефимчук, Р.Р.Аминев, О.А.Погудина, Т.Г.Чаплыгина, Н.С.Комарова, Е.А.Беланова, Е.П.Шевченко, В.Е.Елдинова, О.М.Пиликова, Е.А.Бойко, С.К.Дерлятко, В.И.Малай, Ю.В.Юничева, Л.Е.Василенко, И.К.Романович, А.Н.Барковский, А.В.Громов, Е.С.Казакова, Т.Ю.Красовская, С.А.Портенко, В.Е.Куклев, В.В.Кутырев, И.А.Дятлов, Н.Н.Карцев, Е.В.Мицевич, А.В.Ковальчук, А.Ю.Кармишин, А.А.Петров, Е.В.Рождественский, С.В.Борисевич, О.В.Тушина, Н.В.Зайцева, И.В.Май, С.В.Клейн, С.А.Вековщина, Е.Ф.Филиппов, А.В.Бурлуцкая, В.Н.Городин.

Коллективная монография представляет собой обобщение итогов деятельности Роспотребнадзора и организаций других ведомств по обеспечению санитарно-гигиенического и эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении XXII Олимпийских зимних игр и XI Паралимпийских зимних игр 2014 года в г. Сочи. В работе приведен анализ зарубежного и отечественного опыта защиты от биологических угроз в период массовых мероприятий международного уровня. Представлены результаты оценки внешних и внутренних рисков осложнения эпидемиологической обстановки в качестве основы формирования направлений профилактической работы, показано приоритетное значение профилактических мероприятий в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия в регионе проведения Олимпиады.

Особое внимание уделено научному обоснованию и поэтапной стратегии практической реализации санитарно-эпидемиологических мероприятий, направленных на обеспечение здоровья населения, гостей и участников игр, направлениям, формам и методам их осуществления. Рассмотрены вопросы многоуровневого межведомственного организационного и функционального взаимодействия при решении поставленных задач. Приведены новые данные о возможностях использования специализированных противозидемических бригад и современных информационных технологий в практике санитарно-эпидемиологического надзора. Изложены основные направления деятельности Роспотребнадзора по обеспечению защиты прав потребителей, результаты работы по организации оказания специализированной медицинской помощи участникам и гостям Олимпийских игр.

В приложениях представлены регламентирующие, распорядительные, нормативно-методические и другие документы разного уровня, иллюстрирующие основные направления работы по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и биологической безопасности в период подготовки и проведения Олимпийских игр в г. Сочи.

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