

МАТЕРИАЛЫ
VIII Национального конгресса
бактериологов

Москва, 27–28 сентября 2023 г.

УДК [579.8+616-022](082)
ББК 28.4я43+52.64я43
М34

Материалы Конгресса подготовлены при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках гранта в форме субсидии на создание и развитие «Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости» в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, соглашение №075-15-2019-1671.

М34 **Материалы VIII Национального конгресса бактериологов, Москва, 27–28 сентября 2023 года, – Москва: Издательство «Династия», 2023. – 162 с.: ил.**

ISBN 978-5-98125-127-6

Сборник содержит материалы VIII Национального конгресса бактериологов, проходившего в Москве 27–28 сентября 2023 г. Публикации российских и зарубежных ученых и специалистов отражают современное состояние и перспективы развития широкого спектра проблем, решаемых бактериологической наукой: санитарная и клиническая микробиология; лабораторная диагностика инфекционных болезней, включая особо опасные; совершенствование нормативно-правовой базы по лабораторной диагностике инфекционных болезней; санитарно-микробиологический контроль объектов окружающей среды и пищевых продуктов; микробиологический контроль качества воды и пищевых продуктов; методология идентификации возбудителей инфекционных заболеваний; поиск информативных маркеров для целей лабораторной диагностики; достижения молекулярно-биологических исследований в области микробиологии; проблемы антибиотикорезистентности возбудителей актуальных инфекций. Сборник предназначен для широкого круга ученых-бактериологов и практических работников в сфере здравоохранения, производства пищевых продуктов и др.

УДК [579.8+616-022](082)
ББК 28.4я43+52.64я43

Материалы Конгресса будут размещены в Электронно-библиотечной системе «Научная электронная библиотека» (РИНЦ), находящейся по адресу <http://elibrary.ru>

**Приветственное слово
руководителя Федеральной службы по надзору в сфере
защиты прав потребителей и благополучия человека
Анны Юрьевны Поповой
к организаторам и участникам
VIII Национального конгресса бактериологов
(27–28 сентября 2023 г., Москва)**

Уважаемые коллеги!

От имени Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека приветствую вас на VIII Национальном конгрессе бактериологов.

Ежегодно проводимый конгресс становится значимым событием в жизни бактериологов нашей страны и всех тех, кто интересуется проблемами медицинской микробиологии.

В период борьбы с коронавирусной инфекцией бактериальные исследования стали жизненно необходимыми, так как быстрое выявление патогена и его спектра устойчивости к антибактериальным средствам стало залогом успеха сохранения жизни человека.

В научно-исследовательских институтах и противочумных учреждениях Роспотребнадзора проводятся уникальные исследования. Знаковой отметкой для отечественной науки стал факт, что с 2019 года три НИИ Роспотребнадзора включены в состав Центра геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Национального проекта «Наука и университеты», Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, рассчитанной до 2030 года.

Разработки геномного Центра в области создания новых рекомбинантных вакцин против бактериальных особо опасных инфекций посвящены поиску прогрессивных средств и методов борьбы с антибиотикорезистентностью, основанных на создании генно-инженерных биологических препаратов. Так, инновационным решением в области молекулярной эпидемиологии и сохранения биоразнообразия патогенов, а также ускоренного выявления и идентификации возбудителей инфекционных болезней стало создание «Национального интерактивного каталога патогенных микроорганизмов и биотоксинов».

Бактериологические исследования занимают значительное место в Федеральном проекте «Санитарный Щит страны – безопасность для здоровья» и Государственной программе «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации на 2021–2024 годы», в рамках которых создаются платформы для ускоренной разработки средств специфической профилактики и успешно реализуются.

На предстоящем научном форуме будут подведены итоги выполненных в стране исследований в области бактериологической науки, отмечены наиболее перспективные и значимые разработки по созданию диагностических препаратов, средств специфической профилактики и лечения инфекционных болезней, выявлены наиболее важные направления исследований.

Уверена, что VIII Национальный конгресс бактериологов даст возможность специалистам, работающим в данной области, передать друг другу накопленный опыт, сформировать новые направления исследований, которые помогут справиться с новыми биологическими вызовами и будут способствовать существенному улучшению санитарно-эпидемиологической обстановки в стране.

Желаю организаторам и участникам конгресса здоровья, успешной работы и новых творческих достижений!

*Руководитель Федеральной службы
по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека,
Главный государственный санитарный врач
Российской Федерации А.Ю.Попова*



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'A.Yu. Popova'.

Состав организационного комитета VIII Национального конгресса бактериологов

Москва, 27–28 сентября 2023 г.

Председатель

Попова Анна Юрьевна

Руководитель Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Заместители председателя

Дятлов Иван Алексеевич

директор ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Ежлова Елена Борисовна

заместитель руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, к.м.н.

Члены оргкомитета

Акимкин Василий Геннадьевич

директор ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Балахонов Сергей Владимирович

директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и дальнего Востока» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор

Зайцева Наталья Николаевна

директор ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, д.м.н.

Камбарова Светлана Юрьевна

директор ФБУН «Московский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора, д.б.н., профессор

Куличенко Александр Николаевич

директор ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Кутырев Владимир Викторович

директор ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Летюшев Александр Николаевич

начальник Управления научно-аналитического обеспечения и международной деятельности Роспотребнадзора, к.м.н.

Рудаков Николай Викторович

директор ФБУН «Омский НИИ природноочаговых инфекций» Роспотребнадзора, д.м.н., профессор

Тотолян Арег Артемович

директор ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, академик РАН, д.м.н., профессор

Храмов Михаил Владимирович

заместитель директора ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, к.м.н.

Секретариат

Домотенко Любовь Викторовна

заведующая лабораторией ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, к.х.н.

Говорунов Игорь Геннадиевич

заведующий отделом ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, к.б.н.

Материалы

VIII Национального конгресса бактериологов

Москва, 27–28 сентября 2023 г.

Фаговые эндолизины стафилококков: клонирование, получение и очистка

Абаев И.В.

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

Широкое распространение мультирезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* и других видов стафилококков является серьезной проблемой практического здравоохранения. В последнее время во всем мире интенсивно разрабатываются альтернативные антибиотикам антимикробные средства против стафилококков с использованием рекомбинантных эндолизиннов.

Эндолизинами называют пептидогликангидролазы, ферменты бактериофагов, способные при применении лизировать устойчивые к антибиотикам бактерии, в т.ч. и при инфекциях, ассоциированных с биопленками. В основе литического действия эндолизиннов лежит осмотический лизис грамположительных бактерий за счет гидролиза различных ковалентных пептидных и амидных связей пептидогликана. Из литических ферментов бактериофагов грамположительных бактерий наиболее исследованы для практического применения в медицине эндолизины *S. aureus*, одинаково эффективные против MRSA (метициллинрезистентный золотистый стафилококк) и MSSA (метициллин-чувствительные стафилококки). Механизм литического действия эндолизиннов не зависит от метаболизма бактерий, что приводит к важным последствиям. Эндолизины эффективны против биопленок и персистирующих клеток. Неоднократные попытки получить устойчивые к действию эндолизиннов штаммы *S. aureus* были безуспешны. Доказан взаимный синергизм эндолизиннов и антибиотиков при лечении инфекций человека и животных, резко повышается вероятность и скорость излечения инвазивных инфекций, вызванных штаммами MRSA. При совместном применении с эндолизинном неэффективные концентрации антибиотиков приобретают активность в отношении MRSA-штаммов, показана высокая результативность лечения системных инфекций, ассоциированных с биопленками *S. aureus*.

Разработка антистафилококковых средств на основе рекомбинантных эндолизиннов ведется в нескольких направлениях. Большинство природных эндолизиннов бактериофагов *S. aureus* в рекомбинантной форме при клонировании в *Escherichia coli* способны лизировать живые клетки

S. aureus, однако литическая эффективность этого процесса сильно отличается для разных эндолизиннов. В настоящее время для создания лечебных препаратов используется ограниченное число конструкций рекомбинантных эндолизиннов. В этом направлении создан ряд препаратов, которые успешно проходят клинические испытания для оценки эффективности и безопасности при сравнении с антибиотиками.

Другим направлением является создание антистафилококковых препаратов путем конструирования на базе эндолизиннов литических белков с заданными свойствами и измененной конструкцией. Для этого используют библиотеки охарактеризованных клонированных каталитических и рецепторных доменов эндолизиннов различных типов. При создании новых конструкций эндолизиннов используют такие подходы, как комбинирование различных каталитических и рецепторных доменов, использование мутаций с повышением или изменением эффективности каталитической активности, включение в состав литического белка модулей, способных придать рекомбинантному эндолизину новые функциональные свойства.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Компьютерное моделирование олигонуклеотидов для выявления *Streptococcus dysgalactiae* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Абашин И.Ю., Козырева Н.Г.

ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И.Скрябина и Я.П.Коваленко» РАН, Москва, Российская Федерация

Streptococcus dysgalactiae является одним из патогенов, вызывающих маститы крупного рогатого скота. Повышение числа обнаруживаемых стрептококков в молоке больных животных связано с феноменом «ухода» от иммунного ответа животного.

S. dysgalactiae входит в группы С и G по типу гемолиза к β-гемолитическим стрептококкам (по классификации Р.Лэнсфилд). Однако некоторые отдельные изоляты относят

к группе А, по типу гемолиза – к группе α -гемолитических. Размер колоний также может варьировать. Различие данных параметров приводит к неоднозначной интерпретации результата бактериологического исследования.

По сравнению с бактериологическим исследованием, помимо отсутствия стадий культивирования бактерий, этапы полимеразной цепной реакции (ПЦР) (пробоподготовка, реакция амплификации, интерпретация результатов) максимально облегчены и во многом автоматизированы, а олигонуклеотиды обладают высокой специфичностью к ДНК конкретного инфекционного агента в присутствии ДНК других микроорганизмов и организма-хозяина.

Цель работы. Моделирование олигонуклеотидов, нацеленных на ген-мишень *ppaC*, для выявления *S. dysgalactiae*, выделяемого от крупного рогатого скота.

Материалы и методы. Использовали публичную базу данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI). Последовательности выравнивали при помощи программного обеспечения VectorNTI с алгоритмом Align X. Для разработки дизайна систем олигонуклеотидов (подбор, определение термодинамических и структурных характеристик) применяли программу Primer Premier 5.

Анализировали образцы бактериальных суспензий культурального материала в двух концентрациях: №1 – 1 ед. ($3 \cdot 10^8$ КОЕ/мл) по стандарту мутности МакФарланда, №2 – 2 ед. ($6 \cdot 10^8$ КОЕ/мл). Паспортизированные штаммы идентифицированы по культуральным, морфологическим и ферментативным свойствам. ДНК выделяли из 100 мкл суспензии методом сорбции нуклеиновых кислот (набор «ДНК-Сорб-В»).

Результаты. Из генетического банка NCBI были отображены 79 нуклеотидных последовательностей гена *ppaC* длиной 550 нуклеотидных пар (н.п.). В процессе компьютерного анализа определен консервативный участок длиной 507 н.п. для дальнейшего поиска олигонуклеотидов. Длины смоделированных праймеров и флуоресцентных зондов составляли по 18 и 21 нуклеотидов соответственно. Формировали комбинации с размерами ампликонов 94 и 96 нуклеотидов со следующими термодинамическими характеристиками: температура плавления (минимальная–максимальная/средняя): 51,4–60,5/55,25 °С; содержание GC от 44 до 61%.

На начальном этапе оптимизации условий ПЦР при анализе образцов ДНК культуральных штаммов наблюдали более ранние циклы для №2 (24,68 Ct) по сравнению с №1 (25,14 Ct).

Выводы. Получены экспериментальные данные по обнаружению *S. dysgalactiae* методом ПЦР в реальном времени. Испытуемая методика амплификации фрагмента гена *ppaC* на культуральном материале послужит основой выявления патогена в полевом материале.

Влияние микрофлоры кисломолочных напитков на состав микробиома ротовой полости

Аккузина С.Г., Вотинцев Р.А.

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, Киров, Российская Федерация

Цель исследования. Изучить воздействие бактерий кисломолочных напитков на микроорганизмы ротовой полости.

Материалы и методы. Объект исследования – резидентная микрофлора ротовой полости.

Для выделения микрофлоры ротовой полости с помощью зондов брали мазки со слизистой и проводили высевы на питательные среды (лактозаагар, мясо-пептонный агар (МПА), среда Сабура, солевой агар, Бифидум-среда). Микроскопию мазков выделенных культур осуществляли при увеличении $\times 1000$, с последующей окраской по Граму. Культивирование молочнокислой микрофлоры йогурта с бифидобактериями проводили на средах Бифидум-среда, лактозаагар, МПА при 37 °С, 24 ч. Морфологические свойства микрофлоры йогурта определяли путем окраски мазка-отпечатка спирто-водным раствором метиленового синего в течение 3 мин.

Для изучения влияния молочнокислых микроорганизмов на резидентную микрофлору ротовой полости проводили посева смывов из ротовой полости после употребления кисломолочного напитка на указанные среды через 30 мин. Культивирование посевов проводили в условиях термостата при 37 °С в течение 24 ч (на среде Сабура – при 22 °С).

Вид выделенных микроорганизмов устанавливали постановкой полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты исследования. При микроскопии в мазке-отпечатке из йогурта в поле зрения отмечены кокки, расположенные попарно, короткими цепочками (3–5 клеток), палочки с закругленными концами и короткие толстые, располагающиеся одиночно или скоплениями. По данным маркировки, в йогурте присутствуют бифидобактерии вида *Bifidobacterium actiregularis*. При ПЦР выделенных молочнокислых бактерий в составе напитка обнаружены бактерии: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus salivarius thermophilus*.

Из ротовой полости до употребления напитка выделяли кокковую аэробную и анаэробную микрофлору (*Peptostreptococcus anaerobius*, *Veillonella parvula*, *Peptoniphilus asaccharolyticus*, *Sarcina ventriuli*, *Ferroglycivibrio fermentans*, *Staphylococcus aureus*), палочковидные бактерии (*Bacteroides vulgatus*, *Gemella morbillorum*, *Escherichia coli*, *Escherichia fergusonii*), грибы (*Candida albicans*, *Candida membrane faciens*) и бифидобактерии (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium dentium*).

После употребления йогурта выявили присутствие следующих микроорганизмов: *P. anaerobius*, *V. parvula*, *P. asaccharolyticus*, *Sarcina ventriuli*, *Acidaminococcus fermentans*, *B. vulgatus*, *G. morbillorum*, *C. membrane faciens*, *B. longum*, *B. dentium*.

Выводы

1. Употребление йогурта с бифидобактериями вида *B. actiregularis* привело к исчезновению из ротовой полости бактерий *S. aureus*, *E. coli*, *E. fergusonii* и гриба *C. albicans*.

2. Установлено, что выживаемость *B. actiregularis* в ротовой полости составляет не более 30 мин.

Использование протеомного анализа в практике микробиологической лаборатории научно-исследовательского института при изучении свойств бактерий

Алешукина А.В., Голошва Е.В., Маркова К.Г., Полицук И.С., Мартюшева И.Б., Березинская И.С.

ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Бурное развитие протеомики в последние десятилетия, несомненно, связано с развитием масс-спектрометрических технологий. На сегодняшний день масс-спектрометрия занимает лидирующее положение среди других спектральных методов анализа в решении многих структурно-аналитических задач. Наличие высокотехнологичного оборудования с соответствующим программным обеспечением позволяет говорить о применении при масс-спектрометрии когнитивных технологий.

Масс-спектрометрия является физико-химическим методом анализа, заключающимся в переводе молекул образца в ионизированную форму с последующим разделением и регистрацией образующихся при этом положительных или отрицательных ионов. Масс-спектр позволяет сделать выводы о молекулярной массе соединения, его составе и структуре. В лабораторной практике получил распространение метод MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight). Масс-спектрометрия широко применяется для анализа биомолекул (пептиды, белки, углеводы, олигонуклеотиды и др.).

В лаборатории вирусологии, микробиологии и молекулярно-биологических методов исследования ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора для идентификации видов бактерий методом MALDI-TOF MS в течение 10 лет использовали настольный масс-спектрометр Microflex с базой данных MALDI Biotyper (Bruker Daltonics, Germany). Для изучения вероятных белковых маркеров факторов патогенности у бактерий дополнительно использовали программный продукт MALDIquant (среда R), являющийся бесплатным приложением, адаптированным MALDI Biotyper. Высокоэффективная идентификация бактерий была применена при расследовании вспышки энтеровирусной инфекции (2013 г.), вспышки эшерихиоза с гематурическим синдромом (2021 г.), при уточнении этиологии внебольничных пневмоний в период пандемии новой коронавирусной инфекции (2020–2022 г.). Кроме биотипирования, протеомный анализ с 2014 г. используется для мониторинга маркеров антибиотикорезистентности, пленкообразования и определения чувствительности к дезинфекционным средствам, которые оцениваются с помощью масс-спектрометрии как риски возникновения инфекций, связанных с оказанием ме-

дицинской помощи, в медицинских организациях г. Ростова-на-Дону и Ростовской области.

Количественная полимеразная цепная реакция при диагностике туберкулеза – возможности и перспективы

Альварес Фигероа М.В., Литая И.С., Целешюте К.Д., Биктимирова К.Г.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Введение. В процессе диагностики туберкулеза врачу-фтизиатру необходимо подтвердить диагноз путем обнаружения *Mycobacterium tuberculosis complex* в образце биоматериала, далее оценить микобактериальную нагрузку, провести видовую дифференциацию и определить лекарственную чувствительность. Эти задачи решаются при использовании традиционных микробиологических методов. Но в связи с ограничениями этих методов (низкая аналитическая чувствительность микроскопии и медленная скорость роста при культуральном исследовании) во фтизиатрии востребованы молекулярно-биологические методы, решающие все обозначенные задачи, за исключением количественной оценки возбудителя, не реализованной до настоящего времени.

Цель. Разработать и оценить эффективность методики на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, позволяющей проводить количественное определение ДНК *M. tuberculosis complex* в образцах биологического материала при диагностике туберкулеза и контроле эффективности его лечения.

Материалы и методы. Проведено двойное слепое ретроспективное исследование образцов мокроты или промывных вод бронхов, полученных от 451 пациента старше 18 лет на начальном этапе диагностики впервые выявленного туберкулеза легких. После завершения экспериментальной части исследования проведено раскрытие информации об окончательных диагнозах, на основании которых в основную группу вошел 361 пациент, а в контрольную – 90 пациентов. Исследование образцов проводилось по новой количественной ПЦР-методике с рекомендованным Всемирной организацией здравоохранения набором реагентов Xpert MTB/RIF (Cepheid, США), в котором реализован полуколичественный расчет. Дополнительно количественной методикой были исследованы образцы пациентов основной группы, полученные при динамическом наблюдении за эффективностью противотуберкулезной терапии с помощью традиционных микробиологических методов в декретированные стандартами сроки.

Результаты. При параллельном исследовании 195 образцов совпадение результатов двух молекулярно-биологических методов в категории «обнаружено / не обнаружено» составило 96,35%. При их сравнении в категории количественного исследования также выявлено совпадение результатов. Значениям «высокий», «средний», «низкий» и «очень низкий» в наборе Xpert MTB/RIF соответствовали средние концентрации: 5,92; 3,98; 2,27; 1,88 lg ГЭ/мл.

При определении возможности использования новой методики у пациентов с положительной динамикой наблюдалась корреляция результатов микробиологических методов и ПЦР, что выражалось в их негативации или в значительном снижении микобактериальной нагрузки. В то же время у пациентов без положительной динамики в течение длительного времени выявлялся возбудитель туберкулеза при исследовании разными методами.

Выводы. Количественная оценка ДНК *M. tuberculosis complex*, присутствующей в образцах биоматериала у впервые выявленных больных туберкулезом, коррелирует с полуколичественным расчетом набора реагентов Xpert MTB/RIF и позволяет оценить степень инфекционной опасности больного, а также апробировать данную методику для оценки эффективности противотуберкулезной терапии.

Санитарно-микробиологическая оценка качества воды озера Первое в Челябинске

Андреева С.В., Алексеева К.В.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Российская Федерация

Озеро Первое используется в системе технического водоснабжения-водоотведения городских предприятий, поэтому может представлять потенциальную опасность для человека и животных.

Материалы и методы. Пробы воды отбирали в зимний период 2019–2023 гг. с трех точек озера Первое, с трех горизонтов (поверхностный, глубинный и придонный) согласно ГОСТ 31942–2012. Пробы воды концентрировали методом мембранных фильтров на приборе вакуумного фильтрования «ПВФ 47/3 НБ» с использованием целлюлозных мембран диаметром 47 мм и размером пор 0,22 мкм. Определяли общее число микроорганизмов (ОМЧ), наличие общих и термотолерантных колиформных бактерий (ОКБ и ТКБ), сальмонелл, энтерококков, стафилококков, спор сульфитредуцирующих клостридий (СРК) согласно МУК 4.2.1884–04 и паразитических вибрионов по МУК 4.2.2046–06. Выявление кишечных вирусов проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени с использованием набора реагентов «РИБО-преп» «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» на ДНК-амплификаторе DTprime. Статистическая обработка данных включала расчет средних значений микробиологических показателей с 95%-м доверительным интервалом [95% ДИ].

Результаты. ОМЧ в воде озера Первое в период 2019–2023 г. не превышало норму для рекреационного пользования и находилось в диапазоне от 160 [95% ДИ 138; 191] до 229 [200; 256] КОЕ/мл.

За весь период исследования показатели свежего и давнего фекального загрязнения были в пределах нормы для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения из поверхностных водоисточников, а также для купания (ОКБ в диапазоне от 53,2 [36,7; 69,5] до 88,7 [69; 100] КОЕ/100 мл, ТКБ – от 37,7 [26,3; 48,2] до 73,3 [59; 90,1] КОЕ/100 мл, СРК – от 18,3 [10; 28,7] до 46,5 [38,1; 63,6] КОЕ/20 мл). Из проб

воды были выделены таксоны условно-патогенных бактерий, вероятно антропогенного происхождения, которые в основном были представителями семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Yersinia* spp.). Сальмонелл, шигелл и других патогенных бактерий выявлено не было, геномы РНК вирусов не обнаружены.

Видовой состав сапрофитных микроорганизмов был представлен группой неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter* spp.), грамположительными кокками (*Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.) и палочками (*Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus* spp., *Clostridium* spp.), а также грибами (*Aspergillus* spp., *Candida* spp.). Выделенные сапрофитные микроорганизмы способны редуцировать нитраты в воде, снижать концентрацию тяжелых металлов, преобразовывать продукты переработки нефти в биоразлагаемые органические соединения, что особенно актуально для озера Первое, сильно загрязненного промышленными стоками.

Санитарно-микробиологический контроль качества воды Шершнёвского водохранилища в Челябинске

Андреева С.В., Егорова Д.А.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Российская Федерация

Шершнёвское водохранилище (ШВ) на реке Миасс – это единственный источник водоснабжения промышленного мегаполиса и его городов-спутников, который ежедневно сталкивается с сильнейшей техногенной нагрузкой.

Материалы и методы. Пробы воды были отобраны в зимний период 2019–2023 гг. с трех точек ШВ, с трех горизонтов. Отбор проб осуществляли согласно ГОСТ 31942–2012. Концентрацию проб воды проводили методом мембранных фильтров на приборе вакуумного фильтрования «ПВФ 47/3 НБ», применяли целлюлозные мембраны диаметром 47 мм, с размером пор 0,22 мкм. Проводили определение общего числа микроорганизмов (ОМЧ), общих и термотолерантных колиформных бактерий (ОКБ и ТКБ), сальмонелл, энтерококков, стафилококков, спор сульфитредуцирующих клостридий (СРК) согласно МУК 4.2.1884–04 и паразитических вибрионов по МУК 4.2.2046–06. Для определения кишечных вирусов из мембран выделяли общую РНК и проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени с использованием набора реагентов «РИБО-преп» «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» на ДНК-амплификаторе DTprime. Статистическая обработка данных включала расчет средних значений микробиологических показателей с 95%-м доверительным интервалом [95% ДИ].

Результаты. Наибольшие значения ОМЧ были зафиксированы в 2019 и в 2023 гг. (151,6 [95% ДИ 125,7; 178,2] и 139,7 [92,3; 158,6] КОЕ/мл), а наименьшие – в 2020 г. (91,4 [61,2; 128,6] КОЕ/мл). Повышение ОМЧ, вероятно, свидетельствовало о процессах самоочищения водоема, так как

в 2019 и 2023 гг. было отмечено снижение количества санитарно-показательных микроорганизмов. В 2019 г. показатель ОКБ составил 47,4 [38,4; 58,2] КОЕ/100 мл, ТКБ – 42,5 [32,3; 54,9] КОЕ/100 мл. С 2020 г. наблюдался рост значений ОКБ и ТКБ, которые достигли своего максимума в 2021 г. (113,7 [65,2; 161,8] и 109,8 [62,4; 156,8] КОЕ/100 мл), а к 2023 г. произошло снижение количества ОКБ и ТКБ до 65,3 [11,2; 118,3] и 55,1 [6,5; 98,0] КОЕ/100 мл. Аналогичная тенденция прослеживалась и для показателя давнего фекального загрязнения (СРК). С 2019 г. наблюдалось увеличение количества СРК с 28,2 [19,7; 37,0] до 43,1 [25,6; 55,4] КОЕ/100 мл в 2020 г., а к 2023 г. количество СРК составило 9,6 [7,1; 11,0] КОЕ/100 мл. Во всех исследованных пробах воды 2019–2023 гг. патогенные микроорганизмы не выявлены, геномы РНК вирусов не обнаружены.

Таким образом, вода ШВ была непригодна для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения (из поверхностных водоисточников), а также для купания в 2021 г. по количеству показателей свежего фекального загрязнения. В остальные периоды исследования микробиологические показатели качества воды были в пределах нормы.

Санитарно-микробиологический контроль качества воды озера Смолино в Челябинске

Андреева С.В., Халиман А.А.

ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Российская Федерация

Озеро Смолино находится в черте крупного промышленного города Челябинска и является рекреационным объектом: более половины береговой линии заняты пляжами, в окрестностях расположены санатории и дома отдыха.

Материалы и методы. Пробы воды отобраны с трех точек озера Смолино, с трех горизонтов (поверхностный, глубинный и придонный) в зимний период 2019–2023 гг. согласно ГОСТ 31942–2012. Концентрацию проб воды проводили методом мембранных фильтров на приборе вакуумного фильтрования «ПВФ 47/3 НБ», применяли целлюлозные мембраны диаметром 47 мм, с размером пор 0,22 мкм. Определяли общее число микроорганизмов (ОМЧ), наличие общих и термотолерантных колиформных бактерий (ОКБ и ТКБ), сальмонелл, энтерококков, стафилококков, спор сульфитредуцирующих клостридий (СРК) согласно МУК 4.2.1884–04, и паразитических вибрионов по МУК 4.2.2046–06. Для определения кишечных вирусов из мембран выделяли общую РНК и проводили полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени с использованием набора реагентов «РИБО-преп» «АмплиСенс Rotavirus/Norovirus/Astrovirus-FL» на ДНК-амплификаторе DТprime. Статистическая обработка данных включала расчет средних значений микробиологических показателей с 95%-м доверительным интервалом [95% ДИ].

Результаты. Общее количество микроорганизмов в воде озера Смолино в период 2019–2023 г. не превышало норму для рекреационного пользования, но находилось выше

нормы для питьевого водоснабжения: в диапазоне от 118 [95% ДИ 105; 204] до 210 [180; 245] КОЕ/мл.

За весь период исследования показатели свежего и давнего фекального загрязнения были в пределах нормы для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения из поверхностных водоисточников, а также для купания (ОКБ и ТКБ в диапазоне от 16 [9; 22] до 93 [85;100] КОЕ/100 мл, СРК – от 50 [45; 55] до 56 [48; 69] КОЕ/20 мл).

Патогенных бактерий в исследованных пробах воды 2019–2023 гг. не выявлено, геномы РНК вирусов не обнаружены.

Кроме таксонов антропогенного происхождения, из озера Смолино были выделены микроорганизмы, относящиеся к естественным биоремедиаторам, что свидетельствует о потенциальной способности водоема к самоочищению: *Acinetobacter haemolyticus*, *Acinetobacter radioresistens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus cereus*, *Ochrobactrum anthropi*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia cepacia*, *Rhizobium radiobacter*, *Pantoea agglomerans*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp. Стабильно в воде озера Смолино выделяли характерных для соленых вод представителей рода *Vibrio*, что косвенно говорит о сохранении его гидрохимического статуса, несмотря на сильное антропогенное опреснение.

Мониторинг стабильности диагностической листериозной сыворотки в условиях транспортирования

Андреевская Н.М., Коновалова Ж.А., Вершинская И.Б., Дихтярева И.А., Баертуева И.И.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Для серологической диагностики листериоза рекомендовано применять агглютинирующие диагностические сыворотки. Важным аспектом производства сконструированного в Иркутском противочумном институте медицинского изделия для *in vitro* диагностики «Сыворотка листериозная агглютинирующая лиофилизированная для реакции агглютинации (сыворотка листериозная)» является начальное обозначение стабильности функциональных характеристик изделия и критических параметров, влияющих на результаты исследования.

Цель исследования – определение стабильности функциональных характеристик сыворотки листериозной в условиях, имитирующих транспортирование.

При определении стабильности сыворотки листериозной в условиях, имитирующих транспортирование, заданы нижние (-20 °С) и верхние (+20 °С) температурные границы и временной период – в течение 8 дней (временные точки выемок: при выпуске, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8-е сутки). Чувствительность и специфичность одной серии лиофилизированной листериозной сыворотки определяли в ориентировочной (ОРА) и развернутой (РРА) реакциях агглютинации с 3 гомологичными (*Listeria monocytogenes* И-7, *L. monocytogenes* И-11, *L. monocytogenes* И-16) и 8 близкородствен-

ными и гетерологичными штаммами (*L. innocua* 6а, *L. ivanovii*, *Yersinia enterocolitica* O3, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *S. enteritidis* Gartneri, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*) (коллекция патогенных бактерий Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора). Учет и интерпретацию результатов проводили по четырехкрестовой схеме. За положительный результат принимали появление мелко- или крупнозернистого агглютината, видимого невооруженным глазом. РА считается положительной на 3–4 креста. Реакция на 1–2 креста не учитывается.

Установлено, что внешний вид, чувствительность и специфичность испытуемой серии сыворотки листериозной соответствовали заявленным характеристикам и оставались без изменений при хранении при температурах +20 °С, -20 °С в течение 7 суток. Сыворотка агглютинировала гомологичные штаммы *L. monocytogenes* в РРА 1:400, в ОРА в разведении 1:100 на четыре креста. Показано, что на 8-е сутки наблюдения происходит снижение титров антител при +20 °С в 2 раза. Сыворотка листериозная не агглютинировала штаммы гетерологичных и близкородственных микроорганизмов в разведении более 1/10 титра.

Таким образом, на основании данных по определению стабильности сыворотки листериозной в температурном диапазоне от -20 °С до +20 °С установлены транспортные ограничения по сохранению биологических свойств препарата в течение недели.

Роль антибиотикорезистентных *Staphylococcus haemolyticus* в этиологической структуре внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19

Анисимова А.С., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Носков А.К.

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

В настоящее время серьезной проблемой здравоохранения всего мира являются инфекции, обусловленные устойчивыми к антибиотикам бактериями, включая стафилококки. Считается, что наиболее клинически значимыми и распространенными являются три вида – *S. aureus*, *S. haemolyticus* и *S. epidermidis*. В последние годы в инфекционной патологии человека возрастает роль *S. haemolyticus*. Целью исследования явилось изучение частоты выделения и антибиотикорезистентности *S. haemolyticus* как возбудителя внебольничных пневмоний у корона-позитивных и корона-негативных больных.

Изучены 85 штаммов *Staphylococcus* spp., выделенные в диагностических количествах ($\geq 10^5$ КОЕ/мл) от корона-позитивных больных и 49 штаммов – от корона-негативных. Видовую идентификацию проводили с помощью бактериологического и масс-спектрометрического методов. Для определения MLST-типа использовали авторскую программу MLST-typer (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный

институт» Роспотребнадзора) и базы данных pubMLST. Антибиотикорезистентность изолятов изучали в соответствии с регламентирующими документами. Статистическую обработку данных проводили с помощью критерия χ^2 Пирсона. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Анализ видового состава 134 изолированных штаммов *Staphylococcus* spp. показал, что наибольшая частота выделения приходилась на *S. aureus* (75%), тогда как для *S. haemolyticus*, чаще относящегося к госпитальным штаммам, этот показатель составлял 19%. Другие виды стафилококков занимали 6%. Достоверной разницы в частоте выделения стафилококков между группами больных не зарегистрировано.

При изучении чувствительности выделенных изолятов к антибактериальным препаратам установлено, что штаммы гемолитического стафилококка характеризовались достоверно большей антибиотикорезистентностью по сравнению с *S. aureus*. Как оказалось, наибольшую резистентность (56–92%) штаммы *S. haemolyticus* проявляли к пеницилинам, цефалоспорином, аминогликозидам, тетрациклинам, макролидам, фторхинолонам и амоксиклаву. С помощью дисков с нитроцефином доказано, что все антибиотикорезистентные гемолитические стафилококки синтезировали β -лактамазы расширенного спектра действия. Частота выделения изолятов, устойчивых к клиндамицину и рифампицину, составила 28–40%. Обнаружена достаточно высокая чувствительность у гемолитических стафилококков (>80% штаммов) к карбапенемам и цефоперазон/сульбактаму. Эти результаты позволяют рассматривать данные антибиотики как препараты выбора при лечении инфекции. В отличие от *S. haemolyticus*, *S. aureus* характеризовался более низкой частотой выделения антибиотикорезистентных штаммов и обладал широким спектром чувствительности к изученным группам антибиотиков.

При определении MLST-типа у *S. haemolyticus* обнаружены новые аллели генов *arcC* и *SH_1200*, ранее не представленные в базе данных.

Таким образом, в этиологической структуре внебольничных пневмоний среди коагулазоотрицательных стафилококков полиантибиотикорезистентный *S. haemolyticus* занимает доминирующее место и может создавать угрозу развития внутрибольничных инфекций.

Усовершенствованный набор реагентов «ИФА-антиХламидия» для выявления антител к *Chlamydia trachomatis*

Анискина Ж.В., Бурлак М.В.

ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация

Хламидиоз – урогенитальная инфекция, возбудителем которой является *Chlamydia trachomatis*. Семейство *Chlamydiaceae* входит в группу граммотрицательных облигатных внутриклеточных паразитов. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире ежегодно регистрируют 131 млн новых случаев заболеваний. *C. trachomatis* вызывает ряд заболеваний: трахому, конъюнктивит, патологии бе-

ременности и др. Инфекция, вызванная *C. trachomatis*, является наиболее распространенной среди всех бактериальных инфекций, передаваемых половым путем. Так как хламидии обладают слабой антигенной активностью, наработка и накопление антител происходит в небольших количествах, поэтому метод иммуноферментного анализа наиболее информативен при первичной острой инфекции и в период реактивации хронической инфекции.

Целью данного исследования было усовершенствование иммуноферментной тест-системы (ИФТС) для выявления антител класса А, М, G к *C. trachomatis*.

Материалы и методы. При разработке тест-системы был реализован метод непрямого иммуноферментного анализа в разных условиях. На поверхность планшетов наносился очищенный рекомбинантный основной белок наружной мембраны (МОМР). В качестве конъюгата использовались моноклональные мышинные антитела против иммуноглобулинов человека класса А, М и G, меченные пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали однокомпонентный индикаторный раствор.

Для оценки параметров чувствительности и специфичности разработанной ИФТС использовали референс-панель, предварительно оцененную и подтвержденную в наборах сравнения. Референс-панель сывороток состояла из 50 негативных и 40 парных позитивных образцов сыворотки крови от лиц с диагнозом хламидиоза. Парный клинический материал собирали с начала заболевания и после проведенной антибактериальной терапии.

Результаты. Оптимальная концентрация специфических белков в конъюгате составила 7 мкг/мл. Для предотвращения ошибки при разведении конъюгата и субстратно-индикаторного раствора, а также для удобства были отработаны комплекты с готовым реагентами. Все парные сыворотки были определены как положительные в усовершенствованной ИФТС. У образцов пациентов, взятых после проведения антибактериальной терапии, наблюдалось снижение титра антител к IgG в 2 и более раз и полное отсутствие антител к IgA и к IgM. Набор сравнения показал полную корреляцию результатов. Чувствительность набора составила 100%.

50 сывороток от здоровых лиц в усовершенствованной ИФТС и в наборах сравнения были отрицательными. Специфичность составила 100%.

Выводы. На базе предприятия ЗАО «ЭКОлаб» усовершенствован набор реагентов, обладающий высокой чувствительностью и специфичностью. ИФТС может быть применена для мониторинга эффективности проводимой антибактериальной терапии. Набор рекомендован для широкого применения в клинико-диагностических лабораториях учреждений здравоохранения.

Изучение процессов везикуляции у туляремиального микроба

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С., Мелоян М.Г.

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

В настоящее время растет интерес исследователей к такому феномену жизнедеятельности бактерий, как образование мембранных везикул. Эти структуры многофункциональны и играют значимую роль в выживании и адаптации микроорганизмов. Везикулы наружных мембран (OMVs) грамотрицательных бактерий имеют, как правило, сферическую форму и содержат различные биологически активные молекулы: липополисахарид (ЛПС), ферменты, порины, токсины, рецепторы и, по некоторым данным, РНК/ДНК. Как было показано, способность к повышенной везикуляции приводит к более эффективному выживанию патогенных бактерий в организме хозяина.

Туляремиальный микроб *Francisella tularensis* вызывает тяжелое инфекционное заболевание, однако до сегодняшнего дня механизмы его вирулентности расшифрованы не полностью. Одним из возможных факторов патогенности этого микроба могут являться OMVs. Как установлено, *F. tularensis* обладает двумя типами OMVs – типичными круглыми и палочкообразными (tubes OMVs, или OMVs/T), которые специфичны именно для этого микроорганизма.

В нашей работе исследовано образование везикул у штаммов *F. tularensis* различной подвидовой принадлежности и степени вирулентности. Используются вирулентные штаммы 503 subsp. *holarctica*, 543 subsp. *mediasiatica* и их изогенные авирулентные ЛПС-дефектные варианты, а также вакцинный штамм 15 НИИЭГ. По результатам трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ) установлено, что вирулентные и вакцинный штаммы образовывали сферические и тубулярные везикулы. Отмечено, что немного большей продукцией везикул по сравнению с голарктическим штаммом характеризовались бактерии subsp. *mediasiatica*. В то же время, в отличие от вирулентных культур, вакцинный штамм продуцировал OMVs в значительно меньшем количестве. У авирулентных мутантов зарегистрировать наличие как округлых, так и тубулярных форм не удалось. Данный факт предполагает, что образование везикул у *F. tularensis* коррелирует с наличием полноценной капсулы и длинноцепочечного S-ЛПС.

Функции, выполняемые везикулами, напрямую зависят от входящих в них компонентов. Мы провели изучение композиционного состава OMVs вирулентных штаммов *F. tularensis*. Для этого были получены биологически безопасные концентрированные бесклеточные препараты везикул, которые, по данным ТЭМ, содержали как сферические, так и тубулярные элементы в большом количестве. По результатам серологических реакций (РНAt) и иммунохроматографического метода все полученные препараты, вне зависимости от штамма, проявляли высокую специфическую антигенную активность. Исследование препаратов в иммуноблоттинге подтвердило содержание в образцах в значимых количествах иммунодоминантного туляремиального анти-

гена – ЛПС, а также присутствие нескольких иммуноактивных белков с молекулярной массой 63–65 кДа и 43–45 кДа.

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что продукция везикул, а также, вероятно, реализация их биологических функций у туляремийного микроба связаны с присутствием полноценного S-ЛПС в наружной мембране *F. tularensis*.

Сложности дифференциации стрептококков группы *Mitis* на примере *Streptococcus oralis*

Афанасьева О.М.¹, Бржозовская Е.А.², Грубер И.М.¹

¹ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», Москва, Российская Федерация;

²Центр лабораторной диагностики Российской детской клинической больницы ФGAOУ ВО «РНМУ им. Н.И.Пирогова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Бактерии *Streptococcus pneumoniae*, вызывающие тяжелые инвазивные и неинвазивные заболевания, дифференцируют с близкородственными, но менее патогенными видами стрептококков группы *Mitis* (SGM), в особенности *S. mitis*, *S. oralis* и *S. pseudopneumoniae*, на основе трех свойств: чувствительности к оптохину, растворимости в желчи и агглютинации с пневмококковыми полисахаридными капсульными сыворотками. В последние годы появились сообщения об отсутствии у штаммов *S. pneumoniae* одного или нескольких характерных свойств, и эти изоляты иногда называют «атипичными пневмококками». Дифференциация SGM осложняется высоким сходством последовательности ДНК с *S. pneumoniae*. Использование метода полногеномного секвенирования (whole genome sequencing/WGS) позволяет провести тщательный генетический анализ штамма, что важно как при изучении распространения резистентности, в частности в пневмококковой популяции, так и при отборе штаммов, антигенные комплексы которых могут быть использованы при создании профилактических препаратов.

Ранее в ФГБНУ «НИИВС им. И.И.Мечникова» от большого пневмонией был выделен штамм *S. pneumoniae* 6В №296 (депонирован в коллекции ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ), из которого были получены протективные белоксодержащие антигены и изучены их иммунобиологические свойства. В ходе исследования с использованием метода WGS (эталонный геном *S. pneumoniae* Hungary 19A-6) было установлено, что штамм относится к виду *S. oralis* (так далее и обозначается).

S. oralis – штамм α -гемолитический, по морфофизиологическим свойствам не отличался от штаммов *S. pneumoniae*, за исключением более короткой лаг-фазы при культивировании в полусинтетической питательной среде. *S. oralis* слабо лизировался желчью, был нечувствителен к оптохину, слабо (+/++) агглютинировался с сывороткой 6В.

Анализ результатов WGS *S. oralis*, как и *S. pneumoniae* (двух штаммов серотипа 6В), показал присутствие ряда факторов вирулентности, связанных с адгезией, играющих значимую роль в патогенезе пневмококковой инфекции: холлин-связывающие белки (cbpD, lytB, psc/cbpE) и фибронек-

тин-связывающий белок pavA; ABC-транспортеры, связывающие Mg, Fe и Zn (psaA, piuA и zmpC); известные факторы патогенности, способствующие преодолению барьеров слизистой носа (nanA, epo и iga). Отмечены гены *cps* пневмококка, соответствующие SPH_0455–65.

Только у *S. oralis* отмечены белки семейства антигенов I/II (*sspA*), повсеместно распространенные среди стрептококков и способствующие адгезии, образованию биопленок и развитию многих стрептококковых заболеваний; полипептиды, кодируемые *cshA*, связанные с приданием клеточной поверхности гидрофобности, функционирующие в сочетании с *sspA*; *cpbA*, кодирующий коллаген-связывающий белок, способствующий адгезии к клеткам-хозяина; группа белков островка патогенности *rlrA* (*rrgA*, *rrgC*, *srtC*), связанная с синтезом белков пилей.

На основании полученных данных штамм *S. oralis* и выделенные из него протективные поверхностные белоксодержащие антигены являются перспективными для дальнейшего изучения при разработке профилактических пневмококковых препаратов.

Работа выполнена в рамках Госзадания 0525–2019–0035.

Динамика выделения этиологически значимых стрептококков и гемофильной палочки у пациентов детского многопрофильного неинфекционного стационара

Ахматова С.Н., Могилевский Д.П., Новикова О.В., Папина И.И., Борисова И.В., Булатова Г.М., Гудкова Т.С., Некрасова Т.В.

БУЗ ВО «Воронежская областная детская клиническая больница №1», Воронеж, Российская Федерация

Цель исследования. Изучить динамику выделения *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* у пациентов детского многопрофильного неинфекционного стационара с разной соматической патологией в январе–июне 2023 г. в сравнении с аналогичным периодом 2022 г.

Материалы и методы. Проанализированы результаты 10 697 проб разных биоматериалов, поступивших на исследование в январе–июне 2023 г., и 10 069 проб за аналогичный период 2022 г. Микробиологическую диагностику проводили культуральным методом путем посева биоматериалов на плотные питательные среды. Идентификацию проводили с использованием коммерческих диагностических тест-систем и реактивов.

Результаты. При анализе полученных данных исследования биоматериалов в январе–июне 2023 г. обнаружено увеличение в 7,5 раза количества проб, в которых был выделен *S. pyogenes*, в сравнении с аналогичным периодом 2022 г. (с 0,2 до 1,5%). Чаще всего этот возбудитель обнаруживали в мазках из зева и носа (увеличение с 0,3 до 2,5%), отделяемом уха (увеличение с 6,6 до 26,2%), материалах из придаточных пазух носа (увеличение с 1,6 до 12,2%). Выделение из биоматериалов *S. pneumoniae* увеличилось незначительно, с 0,6 до 0,8%. Но при детальном анализе более часто

S. pneumoniae выделялся в мазках из носа (увеличение с 4,3 до 7,0%), а в отделяемом уха и придаточных пазух носа встречался реже (уменьшение с 6,7 до 2,5% и с 17,5 до 10,8% соответственно). *H. influenzae* часто выделялась при исследовании материалов из носа (5,4% в 2022 г. и 5,1% в 2023 г.), но за анализируемый период значительно увеличилось выделение этой бактерии из материалов придаточных пазух носа – с 3,2 до 9,3%.

Выводы. За анализируемый период наблюдается увеличение выделения из биоматериалов детей с разной соматической патологией этиологически значимых стрептококков и гемофильной палочки. Значительно увеличилось выделение *S. pyogenes* из разных биоматериалов, особенно при исследовании материалов из уха и придаточных пазух носа. Наблюдается процесс замещения в материалах из уха и придаточных пазух носа *S. pneumoniae* на *S. pyogenes* и *H. influenzae*.

Формирование биопленки *Yersinia pestis* в организме *Citellophilus tesquorum* в зависимости от календарного возраста блох и сезона года

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Способность *Yersinia pestis* к образованию биопленки в пищеварительном тракте блохи обеспечила становление трансмиссивного механизма распространения микроба. Бактерии, размножаясь в преджелудке блохи, образуют «блок», отдельные группы клеток, окруженные матриксом биопленки, попадая в желудок, формируют «глыбки».

Проведен анализ динамики формирования «глыбок» и «блоков» *Y. pestis* у *Citellophilus tesquorum* – основного переносчика чумы в Тувинском природном очаге в разные сезоны года. В анализ взяты опыты с блохами двух условных «календарных» возрастов: 1) «молодые» – выплота текущего года, зараженные непосредственно перед опытом (опыты); 2) «перезимовавшие» – инфицированные осенью и зимовавшие без прокормителя в условиях искусственной норы длиннохвостого суслика (*Spermophilus undulatus*) – основного носителя возбудителя в очаге.

Весной и летом следующего после заражения года «перезимовавших» имаго подкармливали на сусликах одновременно с «молодыми» блохами. После каждой подкормки учитывали блох с биопленкой. Статистическую обработку данных выполнили стандартными методами с применением программы Excel. Влияние фактора «сезон года» на формирование биопленки оценивали с помощью однофакторного дисперсионного анализа.

Образование биопленки у «молодых» блох характеризовалось существенным изменением доли особей с разными формами агрегатов в зависимости от сезона года. Так, весной в среднем за одну подкормку отмечали $11,1 \pm 1,38\%$ блох с «глыбками», $1,1 \pm 0,34\%$ с полными и $1,5 \pm 0,45\%$

частичными «блоками». Летом соответствующие показатели составили $9,4 \pm 2,78\%$, $6,5 \pm 2,09\%$, $1,0 \pm 0,28\%$; осенью – $15,8 \pm 4,75\%$, $0,3 \pm 0,12\%$, $0,3 \pm 0,12\%$. Установлено влияние фактора «сезон года» на частоту образования все форм биопленки: «глыбок» ($F = 6,715$, $p < 0,01$), полных ($F = 5,776$, $p < 0,01$) и частичных ($F = 2,895$; $p = 0,06$) «блоков». При этом общее количество блох с биопленкой не имело существенных сезонных различий (весна – $13,7 \pm 1,61\%$, лето – $15,8 \pm 2,94\%$, осень – $16,5 \pm 4,61\%$).

Опыты с «перезимовавшими» блохами поставлены только в весенний и летний периоды, поскольку до осени следующего после заражения года выжили единичные особи. Весной регистрировали в среднем за подкормку $33,6 \pm 3,70\%$ блох с «глыбками», $0,3 \pm 0,15\%$ с полным и $1,2 \pm 0,52\%$ с частичным «блоками», $35,1 \pm 3,66\%$ всего с биопленкой. В летнем опыте соответственно – $26,5 \pm 5,56\%$, $0,8 \pm 0,29\%$, $2,7 \pm 0,28\%$, $30,0 \pm 5,62\%$. С помощью однофакторного дисперсионного анализа установлено достоверное влияние фактора «сезон года» на частоту формирования частичных «блоков» ($F = 6,868$; $p < 0,05$). Таким образом, у «перезимовавших» блох межсезонные различия суммарной доли особей с биопленкой также не выражены.

Ранее нами установлена сезонная динамика формирования «глыбок» и «блоков» у *C. tesquorum*, однако тот факт, что средняя за подкормку доля блох с биопленкой (включая все формы) в разные сезоны различалась незначительно, выявлен впервые.

Нанولیпидный гель с антимикробными пептидами

Базиков И.А.¹, Мадху Гупта², Рамеш К. Гоял², Мальцев А.Н.¹, Ефременко А.А.¹

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

²Делийский государственный фармацевтический университет, Нью-Дели, Индия

На сегодняшний день известно, что большинство бактерий находятся не в виде свободно существующих клеток, а в виде специфически организованных биопленок. Особую опасность представляют мультирезистентные бактерии. Микрофлора биопленки более устойчива к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы: ультрафиолетового излучения, дегидратации, вирусов, антибиотиков и факторов иммунной защиты. Фактором устойчивости таких бактерий в биопленках является слизисто-полимерный слой, вырабатываемый сразу после адгезии и включающий липополисахариды, протеогликаны, гликопротеиды, эндополисахариды, аналогичные веществу клеточной стенки и капсул бактерий. В настоящее время отсутствует общепринятый подход к местному этиотропному лечению раневых дефектов, осложненных антибиотикорезистентной микрофлорой. В связи с этим важную роль играет разработка препаратов, проникающих в биопленки и воздействующих на мультирезистентные бактерии.

Целью исследования явилась оценка эффективности заживления диабетических язв, осложненных антибиотикорезистентной микрофлорой, при использовании геля, разработанного с использованием выделенных нами эндогенных антимикробных пептидов на основе твердых липидных частиц.

В сообщении представлены результаты изучения нового препарата с использованием твердых липидных частиц, нагруженных эндогенными дефензинами. Динамику высвобождения антимикробных пептидов из липидных наночастиц регистрировали морфологически с помощью сканирующей электронной микроскопии, а гелевой формы дефензинов – с помощью просвечивающей трансмиссионной электронной микроскопии. Динамика высвобождения инкапсулированных пептидов в начале имела взрывной профиль, далее профиль быстрого высвобождения (от 4 ч до одного дня), затем наступала фаза более медленного высвобождения (1–3 дня), заканчивающаяся полным высвобождением пептидов. Проведена физико-химическая характеристика твердых липидных наночастиц при высвобождении пептидов *in vitro*. Фотонная корреляционная спектроскопия использовалась для расчета среднего размера и индекса полидисперсности. Установлено, что значения индекса полидисперсности были <0,5 в обоих составах, что подтверждает однородные размеры состава. Оба состава имели почти одинаковый поверхностный заряд дзета потенциала – ~33,0 мВ. Кроме того, результаты показали, что твердые липидные частицы с пептидами имели возбуждение электронов ~68%.

При использовании нанолипидного геля у крыс с индуцированным сахарным диабетом при заживлении диабетических язв, осложненных антибиотикорезистентной микрофлорой, изучался уровень в крови С-реактивного белка с маркером воспаления (гидроксипролин). На фоне лечения диабетических ран гелем на основе твердых липидных частиц изучена роль коллагена и факторов роста эндотелия сосудов (VEGF) в стимуляции ангиогенеза. Крысы, получавшие гель с твердыми липидами и пептидами, проявляли экспрессию VEGF с 5-го до 13-го дня, что приводило к высокой скорости ангиогенеза и быстрой эпителизации раны в сравнении с контрольными группами.

Гистологические и иммуногистохимические исследования в экспериментальных группах показали значительную эпителизацию при правильном коллагенозе и регенерации рогового и базального слоя ткани, а также высокий положительный цитоплазматический эффект VEGF.

Таким образом, при экспериментальном применении геля с антимикробными пептидами на основе твердых липидных частиц установлена возможность направленной доставки эндогенных дефензинов, воздействующих на мультирезистентную микрофлору в биопленках при заживлении диабетических язв.

Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из клинического материала и окружающей среды (водоассоциируемых штаммов)

Байракова А.Л.^{1,2}, Лахтин В.М.¹

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

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» МЗ РФ, Москва, Российская Федерация

Проведен молекулярно-генетический анализ антибиотикочувствительности 136 изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из рекреационных мест водопользования, и 140 клинических штаммов, выделенных от пациентов с пневмонией в летний период, предполагаемо связанных с охлаждением в местах активного отдыха с купанием.

Идентификацию изолятов проводили с использованием хромогенного агара (HiCrome UTI Agar, Modified HiMedia, Индия) и методом времяпролетной масс-спектрометрии (VactoSCREEN, «НПФ Литех», Россия). Для увязки оценки эпидемиологической значимости водных штаммов с развитием инфекционной патологии была определена антибиотикограмма диско-диффузионным методом к 8 группам препаратам с последующим ранжированием изолятов на множественную (MDR), панрезистентную (PDR) и крайнюю лекарственную устойчивость (XDR). Для изучения генетического разнообразия оценивали наличие 5 генов резистентности (тест-система «АмплиСенс®», гены KPC, IMP, NDM, VIM, OXA-48), которые, согласно данным литературы, являются маркерами экстремальной антибиотикорезистентности.

В большинстве случаев для изолятов окружающей среды наблюдался MDR- и XDR-тип резистентности (55,1/38,2%), с аналогией у клинических штаммов (62 и 28,3% случаев соответственно). Выявленное сходство в преобладании PDR (14 изолятов, или 10,5%, водного происхождения и 9 клинических, 6,2%) может указывать как на одинаковый путь формирования резистентности, так и на загрязненность объектов водопользования потенциальными возбудителями различных инфекционных патологий.

Анализ генов у культур, имеющих водное происхождение, показал, что наибольшее распространение имел ген NDM, встречающийся у XDR/PDR-фенотипов в 1,41/0,7% и 2,05/0,36% среди водного происхождения/клинических культур; несущих ген OXA-48 было значительно меньше – поровну (4 изолята) среди клинических и водоассоциируемых изолятов с XDR-типом устойчивости и PDR 3 и 4 соответственно. В данном случае выявление PDR- и XDR-фенотипа с одновременной детекцией гена резистентности NDM и OXA-48 (а также их комбинации в 1,22 и 2% случаев) является неблагоприятным обстоятельством. Этот факт объясняется тем, что данные изоляты имеют сочетанность (ассоциацию) генетических мутаций и фенотипического профиля антибиотикорезистентности. KPC встречался в 4,2% клинических штаммов и не был отмечен у изолятов, имеющих водное происхождение. VIM и IMP отсутствовали в обоих случаях.

Полученные данные могут свидетельствовать о том, что в культурах, выделенных из рекреационных мест водопользования, может быть сосредоточен заметный патогенный потенциал, который в дальнейшем ассоциирован с этиологической значимостью возбудителей, связанных с водным путем передачи. Данные результаты предоставляют собой ресурс для будущих работ, указывая на необходимость геномных исследований в отношении определения эволюционных данных о происхождении штаммов из окружающей среды и их связи с клиническими изолятами.

Конструирование нетоксичного варианта шигатоксина второго типа Stx2

Баннов В.А., Попова А.В., Светоч Э.А., Карцев Н.Н.

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

Веротоксин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (Verocytotoxin producing *E. coli*/VTEC), также известные как шигатоксин-продуцирующие *E. coli* (Shiga producing *E. coli*/STEC), вызывают потенциально летальные заболевания у человека с широким спектром клинических проявлений: от банальной легкой формы диареи до тяжелого геморрагического колита, осложненного гемолитико-уремическим синдромом (ГУС) и тромботической тромбоцитопенической пурпурой. STEC-инфекции являются серьезной проблемой для мирового сообщества в связи с возможным широким охватом населения при эпидемических вспышках и большой частотой развития ГУС, который является ведущей причиной почечной недостаточности и гибели детей в возрасте до 5 лет, а также пожилых людей. Смертность среди больных ГУС высока и колеблется от 3 до 30%. Способность энтерогеморрагических культур *E. coli* (EHEC) продуцировать шигатоксин 2-го типа (Stx2) – одна из причин такого клинического проявления. Вспышки заболеваний, вызванные STEC-штаммами, с большим охватом населения (в Японии и США), особенно вспышка STEC-инфекции в Германии (2011 г.), повлекшая за собой высокий процент гибели среди больных ГУС, непредсказуемость появления новых эмергентных возбудителей, подобных *E. coli* O104: H4 и *E. coli* O157: H7, делают актуальным и целесообразным проведение исследований по созданию прототипа вакцины (вакцин), способной защитить человека от опасных эшерихиозных инфекций. В этом аспекте важно учитывать и тот факт, что обычная антибиотикотерапия при STEC-инфекциях в большинстве случаев не только не эффективна, но и опасна, поскольку не излечивает болезнь, а наоборот, утяжеляет ее течение.

Целью настоящего исследования было получение генно-инженерных конструкций, содержащих в своем составе последовательность инактивированной субъединицы Stx2A, пригодной к использованию в качестве компонента субъединичной вакцины, протективные свойства которой были бы направлены на нейтрализацию шигатоксинов в кишечнике человека.

Для этого в нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотные остатки E167 и R170 Stx2A, с помо-

щью сайт-направленного мутагенеза на основе двухстадийной полимеразной цепной реакции (ПЦР) были внесены замены нуклеотидов, что привело к замене аминокислотных остатков E167Q и R170H. В районе внесения планируемых замен, используя программное обеспечение VectorNTI и SnapGene, были сконструированы перекрывающиеся между собой праймеры, нуклеотидная последовательность которых содержала необходимые замены. Для дизайна праймеров в качестве матрицы была использована нуклеотидная последовательность *E. coli* O157: H7 EDL933 (Shiga-like toxin II, GenBank: CP008957.1). В последовательности праймеров были включены сайты рестрикции (NdeI, HindIII и XhoI), необходимые для интегрирования амплифицированных последовательностей ДНК в плазмидные векторы pET24b и pTSL.

Одним из важных этапов получения рекомбинантного штамма *E. coli* серогруппы O157: H7, продуцирующего нетоксичный белок Stx2A, является разработка способа отбора таких рекомбинантных конструкций при скрининге бактериальных колоний. Нами был отработан способ скрининга на основе ПЦР в реальном времени (TaqMan R-T PCR). Для этой цели в зоне получаемых нуклеотидных замен были созданы олигонуклеотидные зонды на основе технологии «блокированных оснований» (LNA).

В результате проведенной работы были получены генетические конструкции, позволяющие экспрессировать в клетках *E. coli* BL21 рекомбинантные токсиды Stx2-mut для дальнейшей оценки их иммуномодулирующих, антигенных и иммуногенных свойств.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Изучение стабильности микробных культур в процессе культивирования

Барькова М.Р., Кисличкина А.А., Сизова А.А., Соломенцев В.И., Мухина Т.Н., Богун А.Г.

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

Деятельность микробных коллекций связана с изучением и поддержанием большого разнообразия штаммов микроорганизмов, используемых в медицинской, пищевой и биотехнологической промышленности. Для поддержания культур в жизнеспособном состоянии могут использоваться краткосрочные и долгосрочные методы хранения.

Однако в процессе хранения штаммов микроорганизмов часто регистрируются изменения их фенотипических и генетических свойств. Основной задачей коллекционной деятельности является сохранение штаммов микроорганизмов в неизменном состоянии. С момента разработки технологии высокопроизводительного секвенирования появилась возможность напрямую обнаруживать возникающие мутации в геномах коллекционных штаммов.

В работе был использован метод субкультивирования, который позволяет поддерживать штаммы микроорганизмов благодаря периодическим пересевам на свежие пита-

тельные среды. Объектами исследования стали следующие штаммы микроорганизмов: В-7835 *Escherichia coli* 8739; В-6824 *Vibrio parahaemolyticus* 616; В-8442 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802; вакцинные штаммы В-4341 *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и В-4782 *Yersinia pestis* EV НИИЭГ. Штаммы микроорганизмов пересеивали в количестве 10 пассажей (непрерывно, через 1 нед., 2 нед. и через месяц).

Штаммы В-7835 *E. coli* 8739; В-6824 *V. parahaemolyticus* 616; В-8442 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 культивировали на плотной питательной среде №1 ГРМ. Штамм В-4341 *F. tularensis* 15 НИИЭГ выращивали на среде для культивирования и выделения туляремийного микроба (FT-агар). Штамм В-4782 *Y. pestis* EV НИИЭГ выращивали на питательной среде для культивирования чумного микроба. Выделение ДНК из исследуемых штаммов осуществляли методом СТАВ (с использованием цетилтриметиламмония бромидом). Определение концентрации бактериальной ДНК проводили на флуориметре Quibit 4 с использованием набора Spectra Q HS (Raissol). Для подготовки библиотек для секвенирования использовали набор SG GM (Raissol).

Для проведения полногеномного секвенирования использовали платформу Genolab M, позволяющую получить большой пул коротких единичных прочтений (ридов) с высокой точностью индивидуальных прочтений каждого нуклеотида, а также платформу Nanopore MinION для получения длинных единичных прочтений. Для получения полной сборки были скомпилированы данные, полученные в результате двух методов секвенирования, что позволило получить полную сборку генома. Для гибридной сборки использовали ассемблер Unicycler 0.4.7. Полученные геномы сравнивали в программах Lasergene 11 (DNASTAR, США), Snippy 4.6.0, Mauve.

Изменения в геномах пересеиваемых штаммов, включая SNP, делеции, инверсии и перестройки, обнаружены не были, что говорит о стабильности геномов в процессе рутинного культивирования микроорганизмов в коллекционной деятельности «ГКПМ-Оболенск».

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 1.1.18.

Серотиповая структура *Streptococcus pneumoniae* у детей дошкольного возраста в Республике Татарстан

Баязитова Л.Т.^{1,2}, Зарипова А.З.², Тюпкина О.Ф.¹, Чазова Т.А.¹, Родионова М.С.¹, Исаева Г.Ш.^{1,2}, Анамов Р.И.²

¹ФБУН «Казанский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Российская Федерация

Вопрос о влиянии вакцинации на циркуляцию эпидемически значимых клонов *Streptococcus pneumoniae* в России остается достаточно актуальным. Есть данные о селективном реагировании пневмококковой популяции на действие вакцин и антибиотиков в странах, где проводится иммунизация от пневмококковой инфекции. Следовательно, необхо-

димо изучение особенностей носительства *S. pneumoniae* у детей, которые являются значимым резервуаром данного патогена в человеческой популяции.

Цель исследования. Изучить серотиповой состав *S. pneumoniae*, циркулирующих у детей-носителей дошкольного возраста с различным вакцинальным статусом.

Материалы и методы. Проведено микробиологическое исследование микробиоты носоглотки 509 здоровых организованных детей из детских дошкольных учреждений (период исследования – 2020–2021 гг.). Биоматериал высевали на Columbia agar Base (Conda, Испания) с 5% крови. Фенотипическую идентификацию *S. pneumoniae* проводили по морфологическим, тинкториальным и культуральным свойствам. Для дифференциальной диагностики использовали оптохиновый тест, лизис в присутствии солей желчи. Выделение ДНК *S. pneumoniae* выполняли с помощью набора AmpliSens® DNA-Sorb-B Nucleic Acid Extraction Kit (InterLabService, Россия) согласно инструкции производителя. Детекция серогруппы/серотипа проводилась с применением полимеразной цепной реакции в реальном времени согласно рекомендациям CDC (<http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-oligonucleotide-primers.pdf>). Исследования были одобрены локальным этическим комитетом ФБУН КНИИЭМ (протоколы №1 от 11.01.2016 и №1 от 12.03.2020).

Результаты. Бактерионосительство *S. pneumoniae* выявлено у 207 (40,7%) здоровых организованных детей, при этом частота обнаружения *S. pneumoniae* у детей, проживающих в Казани, была достоверно выше, чем у сельских детей, и составила соответственно 53,4 и 31,1% ($p < 0,05$). Достоверных различий по массивности обсемененности носоглотки в зависимости от вакцинального статуса не выявлено. По результатам серотипирования показано преобладание в детской популяции вакцинных серотипов (57,7%). У детей, которые прошли полный курс вакцинации от пневмококковой инфекции, выделены вакцинные серотипы в 24,7% случаев. У иммунизированных детей выделены серотипы, не входящие в состав конъюгированной вакцины Prevenar 13: 15AF (17,4%), 23A (19,2%), а также серотип 11AD (19,6%), входящий в состав полисахаридной вакцины, не рекомендуемой для детей дошкольного возраста. Согласно инструкции производителя, в состав Prevenar 13, рекомендованной для иммунизации детей в возрасте от 2 мес. до 5 лет, включены серотипы 1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F и 23F. У невакцинированных детей преобладали серотипы, входящие в состав вакцины Prevenar 13: 6ABCD (21%), 11 AD (15%), 14 (13%).

Заключение. Проведение микробиологического мониторинга изменения серотипового состава под селективным действием пневмококковых вакцин является важным звеном эпидемиологического надзора за возбудителем пневмококковой инфекции.

К вопросу о чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов возбудителя чумы, изолированных в Тувинском природном очаге

Белькова С.А.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Возбудитель чумы в целом проявляет высокую чувствительность к антибактериальным препаратам (АБП), применяемым для лечения и профилактики чумы – аминогликозидам, фторхинолонам, β-лактамам антибиотикам, цефалоспорином. Мониторинг антибиотикочувствительности природных изолятов *Yersinia pestis*, изучение этой характеристики коллекционных штаммов проводится постоянно и способствует выявлению нестабильности популяции по этому признаку (Балахонов и соавт., 2013; Мека-Меченко и соавт., 2017).

Цель исследования. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *Y. pestis* из сибирских природных очагов для выявления антибиотикорезистентности.

В результате изучения биологических свойств 14 штаммов чумного микроба, изолированных при проведении эпизоотологического обследования Тувинского природного очага в 2013 г., принадлежность к основному подвиду подтверждена. Чувствительность к АБП определена с применением набора индикаторных дисков «ДИ-ПЛС-50–01» (ООО «НИЦФ», Санкт-Петербург), в качестве контрольных использовали штаммы *Y. pestis* EV НИИЭГ и *Escherichia coli* ATCC 25922.

Установлено, что все изученные штаммы *Y. pestis* проявили высокую чувствительность к стрептомицину (диаметр зоны подавления от 22 до 24 мм, минимальная подавляющая концентрация (МПК) ≤16 мг/л) и амикацину (диаметр зоны подавления от 25 до 37 мм, МПК ≤16 мг/л); 9 штаммов из 14 – высокую чувствительность к ципрофлоксацину (диаметр зоны подавления от 28 до 47 мм, МПК ≤0,01 мг/л), 13 штаммов – к цефотаксиму (диаметр зоны подавления от 30 до 40 мм, МПК ≤1 мг/л), 12 штаммов – к цефтриаксону (диаметр зоны подавления от 30 до 40 мм, МПК ≤1 мг/л), 13 штаммов – к доксициклину (диаметр зоны подавления от 25 до 30 мм, МПК ≤4 мг/л).

Выявлена пограничная чувствительность к следующим АБП: цефтриаксону (диаметр зоны подавления 25 мм) – 2 штамма (№№338,733), доксициклину (диаметр зоны подавления 19 мм) – 1 штамм (№112).

Резистентность к цефотаксиму (диаметр зоны подавления 15 мм, МПК ≥4 мг/л) проявил 1 штамм (№338).

Таким образом, наибольшая эффективность в отношении штаммов возбудителя чумы отмечена у стрептомицина и амикацина, относящихся к группе аминогликозидов. Значительное снижение чувствительности к АБП из группы цефалоспоринов и тетрациклинов проявили штаммы чумного микроба №№338, 733, 112 соответственно. Первое вы-

явление обладающих пограничной чувствительностью и резистентных к отдельным АБП цефалоспоринового (цефтриаксон, цефотаксим) и тетрациклинового ряда (доксициклин) штаммов чумного микроба, изолированных в Тувинском природном очаге, относится к 2013 г. и требует продолжения исследований. Полученные сведения пополнили паспортные данные коллекционных штаммов патогенных бактерий института: *Y. pestis* subsp. *pestis* И-3581-6 (№178), И-3582 (№№228–232), И-3583 (№260), И-3584 (№326), И-3585 (№338), И-3586 (346), И-3587 (№633), И-3588 (№698), И-3589 (№733), И-3590 (№815).

ГИС-технологии – актуальное направление обучения на программах ДПО в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бердникова Т.В., Прислегина Д.А., Жарникова Т.В., Борздова И.Ю., Таран Т.В., Заикина И.Н.

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

Необходимость подготовленных к современным условиям работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп (в т.ч. с применением информационных технологий) эпидемиологов обусловлена сложной многоуровневой структурой и задачами системы эпидемиологического надзора и контроля за особо опасными инфекциями в Российской Федерации.

В инновационных условиях повышения качества дополнительного профессионального образования (ДПО) особое значение имеет поиск новых актуальных методик подготовки специалистов.

Одним из основных направлений в обучении эпидемиологов на циклах ДПО ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора является применение знаний и умений на основе использования геоинформационных систем (ГИС): а) в научном и методическом обеспечении эпидемиологического надзора за вирусными и бактериальными инфекциями на основе выявления рисков и прогнозирования эпидемиологической ситуации; б) при планировании профилактических и противоэпидемических мероприятий; в) для решения актуальных проблем санитарной охраны территории Российской Федерации.

В процессе обучения слушатели знакомятся с широко используемыми коммерческими (ArcGIS и MapInfo) и свободно реализуемыми (SAGA, QGIS) ГИС, особенностями их функционирования, преимуществами и недостатками каждой из них. Особое внимание при этом уделяется принципам работы и возможностям применения отечественной ГИС «Панорама» для визуализации данных эпизоотолого-эпидемиологического мониторинга. На практических занятиях изучаются интерактивные карты ГИС-портала ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора и «Электронный эпидемиологический атлас Приволжского федерального округа», разработанный специалистами ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н.Блохиной»

Роспотребнадзора. Кроме того, слушатели циклов непосредственно обучаются работе с интернет-ресурсом ZikaMap для оперативного анализа мониторинга по распространению комаров *Aedes albopictus* в режиме реального времени на территории Причерноморского региона Краснодарского края (разработан сотрудниками ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, свидетельство о регистрации программы для ЭВМ 2023662204, 07.06.2023, заявка №2023617333 от 19.04.2023) и получают практические навыки по заполнению учетных форм и оценке данных.

Полученные умения работы с ГИС позволяют оптимизировать методы аналитической обработки и представления статистической и оперативной информации об инфекционных и паразитарных болезнях, детализированной и объективной эпидемиологической информации по отдельным нозологиям в системе мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации, а также значительно усовершенствовать учебную деятельность в соответствии с поставленными целями обучения.

Применение современных питательных сред в лабораторной диагностике инфекционных болезней на курсах ДПО в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бердникова Т.В., Жарникова Т.В., Борздова И.Ю., Катунина Л.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Заикина И.Н.

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

В условиях повышения качества образования актуальное значение имеет поиск новых современных подходов к повышению уровня подготовки бактериологов, владеющих современными лабораторными методиками. Существующая система подготовки должна ориентироваться на усовершенствование методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний как формирующих базовые знания для овладения дисциплинами курсов первичной переподготовки (ПП) и повышения квалификации (ПК) по бактериологии и лабораторной диагностике инфекционных заболеваний.

Эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу, туляремии, сибирской язве и другим инфекциям на протяжении многих лет продолжает оставаться напряженной, вследствие чего сохраняется актуальность лабораторной диагностики этих заболеваний, основным компонентом которой является бактериологический метод, эффективность которого во многом зависит от применяемых питательных сред. Качество и состав питательных сред играют основную роль также на этапах идентификации и дифференциации выделенных культур.

В лаборатории подготовки специалистов при проведении практических занятий на циклах ПП и ПК применяются как различные зарубежные питательные среды, так и среды российского производства. Но особую эффективность при-

менения в лабораторной диагностике на занятиях показали такие питательные среды, как «Питательная среда для культивирования *Yersenia pestis* EV» (патент на изобретение РФ №2708029, опубликовано: 03.12.2019, бюл. №34), «Питательная среда плотная на основе вторичного продукта гидролизата говяжьего мяса для культивирования микроорганизмов» (патент на изобретение РФ №2681499, опубликовано: 08.03.2019, бюл. №7), «Питательная среда плотная для культивирования холерного вибриона» (патент на изобретение РФ №2303630, Опубликовано: 27.07.2007, бюл. №21), разработанные в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт».

Разработанные среды, имеющие в своем составе стандартные и доступные компоненты, а также отвечающие основным требованиям к качеству микробиологических сред, полностью удовлетворяют ростовые потребности всех культивируемых штаммов, применяемых на лабораторных занятиях, при этом обладают полноценной селективностью и не содержат токсичные для человека ингредиенты.

Применение современных питательных сред в бактериологических исследованиях значительно повышает уровень образования слушателей циклов, отвечающих современным требованиям в области бактериологии и лабораторной диагностики.

Современные подходы к диагностике сочетанных очагов туляремии на территории Алтая

Бжитских Е.Е., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Полковников Е.С., Красавина Н.Ю., Киреев А.А.

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

Туляремия – это природно-очаговое острое инфекционное заболевание с трансмиссивным путем передачи.

Заболеваемость туляремией населения Республики Алтай и Алтайского края в последние годы занимает весьма скромное место – последние два случая заболевания были зарегистрированы в 2010 г. Благополучная эпидемическая ситуация в немалой степени определена высоким уровнем иммунизации населения. С 2015 г. отмечается тенденция к расширению ареала этой инфекции на территории Алтая. С 2016 г. в природных очагах туляремии начал циркулировать штамм *F. tularensis mediasiatica*, характерный для Средней Азии. В 2017–2023 гг. изолировано 36 штаммов туляремийного микроба, из них 34 *F. tularensis mediasiatica* и 2 *F. tularensis holarctica*.

Объектами исследований традиционно являются зверьки, вода, ил, иксодовые клещи, а также комары, слепни и др. Учетом охватывались типичные биотопы предгорной зоны: луго-полевые (суходолы), занимающие основное положение по площади, влажные и околородные. Два последних биотопа наиболее важны для эпизоотологии туляремии в распространенных здесь очагах предгорно-ручьевого типа.

Основной источник выделения культур – эктопаразиты *Haemaphysalis concinna* и *Dermacentor silvarum*. Они являют-

ся резервуаром и переносчиками туляремии, что соответствует ареалу распространения этих двух видов клещей.

Выделенные штаммы *F. mediasiatica* вирулентны для лабораторных животных (белых мышей), но не вызывают значительной заболеваемости в естественных условиях, т.к. циркулируют в очаге среди клещей.

Современным подходом диагностики природных очагов туляремии, где имеет место сочетанная циркуляция возбудителя *F. tularensis mediasiatica* и *F. tularensis holarctica*, является методика определения подвидовой принадлежности на базе станции, разработанная и широко внедренная в 2017–2023 гг. совместно со специалистами ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболensk).

Возможность определения подвидовой принадлежности штаммов туляремиального микроба позволила с 2017 г. провести дифференциацию о пространственной циркуляции и укоренения возбудителя *F. tularensis mediasiatica* на территории Алтая, где длительное время циркулировал *F. tularensis holarctica*.

Для дальнейшего изучения выделенных штаммов в 2022 г. нами впервые проведено молекулярно-генетическое исследование 8 штаммов *F. tularensis mediasiatica* методом полногеномного секвенирования, показавшее, что этот подвид демонстрирует низкое генетическое разнообразие. Полученные результаты при таких расширенных границах природного очага туляремии позволят более точно определить оседлость *F. mediasiatica* в Сибири.

В заключение следует отметить, что, несмотря на благополучную эпидемическую ситуацию на Алтае, изменения в эпизоотическом процессе по-прежнему могут служить источниками заражения людей туляремией.

Бактериологическое исследование аутопсийного материала при пневмониях с летальным исходом болезни – значимое направление микробиологического мониторинга

Бондаренко А.П.¹, Троценко О.Е.¹, Огиенко О.Н.¹, Голубева А.О.¹, Костюк О.В.¹, Запругалова Л.А.², Бобровникова М.Ю.²

¹ФБУН «Хабаровский НИИ эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Хабаровск, Российская Федерация;

²КГБУЗ «Городская клиническая больница» им. проф. А.М.Войно-Ясенецкого, Хабаровск, Российская Федерация

Пандемия COVID-19 привела к росту заболеваний пневмонией и быстрому распространению антибиотикорезистентных форм возбудителей в госпитальной среде и за ее пределами. Исследование аутопсийного материала при пневмониях с летальным исходом болезни дает возможность в ряде случаев впервые определить этиологию заболеваний, подтвердить прижизненный диагноз и установить возможную причину неблагоприятного исхода. Наблюдения, проведенные в период пандемии COVID-19, выявили значительные изменения структуры возбудителей пневмоний.

Цель исследования. Установить тенденцию циркуляции возбудителей пневмоний и уровней их резистентности к антимикробным препаратам (АМП) в ранний постпандемийный период.

Материалы и методы. Материалом для исследования служили аутопсийные образцы (ткань легкого), полученные от больных с летальным исходом пневмонии. Наблюдение проведено с апреля 2021 г. по июнь 2022 г. в разные фазы эпидемического процесса с включением периодов спада и волновых подъемов заболеваемости (I, II, III периоды, всего исследовано 435 проб). Постпандемийный IV период считали с августа 2022 г. по июль 2023 г. – исследованы 111 проб. Всего при посмертном исследовании проб от 546 больных выделены 608 бактериальных изолятов.

Результаты. В течение четырех периодов наблюдения отмечено изменение рангового положения удельного веса ведущих и прочих возбудителей: *Klebsiella pneumoniae* (42,7; 61,1; 62,9; 40,5%), *Acinetobacter baumannii* (34,0; 20,4; 12,9; 18,9%), *Staphylococcus aureus* (9,7; 4,3; 12,9; 20,7%), *Escherichia coli* (14,6; 1,8; 7,6; 11,7%), *Proteus mirabilis* (2,9–0,62–3,5–8,1%), *Pseudomonas aeruginosa* (6,8; 11,1; 6,5; 7,2%), *Stenotrophomonas maltophilia* (0,8; 0,6; 1,6; 2,7%). Группу *Enterobacter aerogenes*, *Serratia marcescens* выделяли в 3,9; 1,9; 4,1; 3,6%. Во II и IV периодах выявляли *Achromobacter xylosoxidans* (1,2; 0,9%).

Доля карбапенем-резистентных штаммов (*carbR*) снизилась в постпандемийном периоде для *K. pneumoniae* (76,6; 81,8; 76,6; 51,1%) и оставалась высокой во все периоды наблюдения для *A. baumannii* (100; 97,0; 100; 95,2%) и *P. aeruginosa* (57,1; 77,8; 72,7; 100%). *S. aureus* во все периоды наблюдения был представлен в основном чувствительными к АМП вариантами. *E. coli* в постпандемийном периоде была представлена продуцентами β-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС) (63,8% случаев). Все штаммы *P. mirabilis* были устойчивы к цефепиму (цефалоспорины IV поколения).

K. pneumoniae и *A. baumannii* во все периоды наблюдения выявлены в основном в виде моноинфекции. В постпандемийном периоде наметилась тенденция к выявлению в моноинфекции *S. aureus* (52,2%), *E. coli* (84,6%), *P. mirabilis* (55,0%) и *P. aeruginosa* (62,0%). В период пандемии эти патогены выделяли в основном в качестве ассоциантов.

Заключение. В течение первого года наблюдения в постпандемийном периоде отмечено снижение доли участия *K. pneumoniae* в этиологии пневмоний с летальным исходом болезни (с 62,9 до 40,5%) с одновременным уменьшением уровня *carbR*-вариантов (с 76,6 до 51,1%) на фоне снижения прессинга интенсивного применения АМП. В целом в популяции *K. pneumoniae* выявлены 51,1% *carbR*-вариантов, 26,7% БЛРС-вариантов и 22,2% S-вариантов, чувствительных к АМП.

При сохранении лидерства *K. pneumoniae* отмечено увеличение доли этиологического участия *A. baumannii*, *S. aureus*, *E. coli* и *P. mirabilis*, что может являться следствием межвидовых взаимоотношений популяций возбудителей.

Микробиологический мониторинг путем исследования аутопсийного материала важен для выявления приоритетного распространения возбудителей и тенденций циркуляции их лекарственно-устойчивых форм.

Сравнительный анализ некоторых свойств клинических штаммов микроорганизмов в соответствии с уровнем их чувствительности к биоцидам

Бондарь С.В., Федорова Л.С., Гаджиев К.И., Ильякова А.В., Ковальчук С.Н., Архипова А.Л.

ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, являются глобальной проблемой здравоохранения. Основные меры их профилактики включают соблюдение санитарно-гигиенических и противоэпидемических требований. В первую очередь это касается режима дезинфекции помещений, медицинских изделий и других объектов. Важнейшую роль при этом играет степень чувствительности микроорганизмов к используемым средствам.

Оценка чувствительности клинических изолятов микроорганизмов, полученных из медицинских учреждений г. Москвы, проведенная микрометодом на полистироловых планшетах, показала, что к третичному амину устойчивы 27% изолятов, к АДБАХ – 24%, к ПГМГ – 17%, к перекиси водорода – 22%, к хлорамину – 19%, к ДХЦК – 10%, к этиловому спирту – 17%, к глутаровому альдегиду – 16%. Изучались микроорганизмы родов *Acinetobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Serratia*, *Enterobacter*.

Экспериментально подтверждено формирование резистентности к биоцидам при использовании суббактерицидных концентраций. Выявлена мутация в гене *rpoS*, кодирующем сигма-фактор РНК-полимеразы, отвечающий за регуляцию экспрессии генов при оксидативном стрессе, которая привела к формированию резистентности к перекиси водорода.

На основании анализа кривых роста микроорганизмов показано, что уровень резистентности не влияет на скорость роста и максимальную концентрацию микробных клеток в среде, имеет значение лишь видовая принадлежность. По результатам исследования определена длительность культивирования культур, оптимальная для постановки микрометода (17–22 ч в зависимости от вида).

Для определения влияния резистентности к биоцидам на выживаемость в условиях конкуренции проведен фитнес-тест (определение стоимости пригодности организма) чувствительных и устойчивых штаммов. Для этого смешанные в равных количествах чувствительный и устойчивый штаммы засеивались в одну пробирку в одинаковом количестве, проходили 10 пассажей в питательном бульоне, высевались на плотную питательную среду, а затем подсчитывалось их соотношение с подтверждением методом полимеразной цепной реакции.

Также были проведены исследования по изучению влияния устойчивости микроорганизмов на их способность формирования биопленок в условиях статического культивирования. Выявлено, что основным фактором, обуславливающим биопленкообразование, является видовая принадлежность, а не степень устойчивости к биоцидам.

Мышиная модель летальной пневмококковой пневмонии

Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А.

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

В настоящее время *Streptococcus pneumoniae* является причиной от 15 до 27% случаев пневмонии во всем мире. С каждым годом растет количество лекарственноустойчивых штаммов этого микроорганизма, что осложняет лечение инфекции и делает необходимым поиск эффективных препаратов и схем их применения. Для решения этой задачи крайне важно иметь адекватную животную модель этой инфекции, которую можно было бы использовать для исследования активности антибактериальных препаратов *in vivo*.

Нами была разработана мышиная модель пневмококковой пневмонии, вызываемая штаммом *S. pneumoniae* ATCC 6305. Интраназальное введение мышам линии BALB/c культуры в дозе 40 ЛД₅₀ приводит к быстрому развитию пневмонии с генерализацией инфекции. Все зараженные животные погибают в течение 8 суток. Уже через 3 ч после инфицирования пневмококк проникает в легкие, головной мозг и почки модельных животных. Концентрация патогена в этих органах достигает 7,13; 3,56 и 2,91 log₁₀ КОЕ/г. Через сутки происходит нарастание сепсиса: клетки тест-штамма в большом количестве обнаруживаются также в селезенке (6,84 log₁₀ КОЕ/г) и крови (6,7 log₁₀ КОЕ/мл).

В крови мышей снижается количество лейкоцитов при повышении доли гранулоцитов. Отмечается отклонение от нормы некоторых биохимических показателей сыворотки крови – аспартатаминотрансферазы и щелочной фосфатазы. В легочной ткани развиваются патологические изменения воспалительного характера, а в печени – некрозы. Органы иммунной системы реагируют на инфекцию уменьшением объема лимфоидной ткани.

Разработанная нами модель пневмококковой пневмонии у мышей является пригодной для оценки активности антибактериальных препаратов. Так, например, левофлоксацин в суточных дозах 25 и 100 мг/кг дает хороший лечебный эффект. Введение препарата в течение 5 дней обеспечивает выживаемость 50–100% мышей, инфицированных летальной дозой *S. pneumoniae* ATCC 6305. Эффективность терапии напрямую зависит от дозы антибиотика, но не от сроков начала терапии (через 3 или 24 ч после заражения). Лечение инфекции ампициллином в течение 5 дней в дозах 100 и 400 мг/кг защищает от гибели всех инфицированных мышей независимо от срока начала введения препарата.

Оценка профилактической и терапевтической активности фаговой деполимеразы, специфичной к капсульным полисахаридам K9-типа *Acinetobacter baumannii*, на септической модели ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных

Борзилов А.И.¹, Шнейдер М.М.^{1,2}, Перескокова Е.С.¹, Коробова О.В.¹, Комбарова Т.И.¹, Мирошников К.А.^{1,2}, Воложанцев Н.В.¹, Попова А.В.¹

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

²ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова» РАН, Москва, Российская Федерация

Цель. Оценить профилактическую и терапевтическую активность K9-специфичной фаговой деполимеразы на модели летальной ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных.

Материалы и методы. Рекомбинантная K9-специфичная деполимераза была выделена и очищена с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии с последующей ионообменной хроматографией. В качестве экспериментальных животных были использованы мыши линии BALB/c. Для инфицирования животных использовали штамм *Acinetobacter baumannii* B05, относящийся к K9-капсульному типу. Культуру вводили внутривенно в дозе 20–40 ЛД₅₀ в физиологическом растворе с 2,5% муцина. Эксперименты по изучению лечебно-профилактической эффективности K9-специфичной деполимеразы проводили с использованием следующих схем введения препарата: в группе профилактики деполимеразу назначали за 1 ч до инфицирования в разовой дозе 50 мкг; в 1-й лечебной группе препарат вводили через 1,5 ч после заражения 1 раз в день в течение 5 суток; во 2-й лечебной группе фермент назначали однократно через 6 ч после инфицирования. В одной из лечебных групп животным давали ампициллин/сульбактам (200 мг/кг + 100 мг/кг) однократно.

Результаты. В экспериментах по оценке профилактической и терапевтической активности рекомбинантной фаговой деполимеразы было показано, что однократное введение фермента мышам за 1 ч до и через 1,5 ч после парентерального инфицирования летальной дозой штамма *A. baumannii* B05 обеспечивает выживание 100% животных (с полной санацией от возбудителя). В то же время в контрольной группе наблюдалась гибель 100% мышей. Более позднее начало энзимотерапии (через 6 ч после парентерального инфицирования) давало меньший лечебный эффект и обеспечивало выживание только 40% подопытных животных. Однократное введение активного *in vitro* антибиотика ампициллин/сульбактама оказалось неэффективным по сравнению с аналогичным режимом использования деполимеразы.

Заключение. Проведенные эксперименты продемонстрировали высокую лечебно-профилактическую эффективность K9-специфичной деполимеразы.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Особенности применения среды Пизу в бактериологической диагностике дифтерии

Борисова О.Ю.¹, Чагина И.А.¹, Гадуа Н.Т.¹, Пименова А.С.¹, Полосенко О.В.², Храмов М.В.², Требунских И.П.³, Сидорова Н.А.³, Алексеева И.Н.⁴

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;

³ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

⁴КГБУЗ «Краевая клиническая психиатрическая больница» Минздрава Хабаровского края, Хабаровск, Российская Федерация

Цистиназа является индуцибельным экзоферментом, вырабатываемым при наличии субстрата, т.е. цистина или цистеина в составе белковых комплексов. При росте клетки *Corynebacterium diphtheriae* и *Corynebacterium ulcerans* благодаря ферменту цистиназе расщепляют цистин. Образующийся при этом сероводород вступает в реакцию с имеющимся в среде уксуснокислым свинцом, в результате чего последний переходит в сернистый свинец – соединение темно-коричневого цвета. При посеве уколом *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* образуют интенсивное потемнение по ходу укола и вокруг него и характерное «облачко» темно-коричневого цвета на расстоянии 1 см от поверхности. Такая способность *C. diphtheriae* и *C. ulcerans* легла в основу разработок сред, позволяющих выявлять эти микроорганизмы.

Цель исследования. Определить применение среды Пизу в лабораторной диагностике дифтерии в России на современном этапе.

С целью подготовки нового нормативного документа по лабораторной диагностике дифтерийной инфекции нами проведены эксперименты по постановке пробы Пизу с контрольным токсигенным штаммом *C. diphtheriae* биовара *gravis* №665. Постановку пробы Пизу осуществляли с 0,5–1–2–3–4–5–6–7–8 колоний, выращенных на двух видах сред первичного посева – Кровяной теллуритовой агар (КТА) и Коринебакагар (КБА) – в течение 24 и 48 ч и на 10%-м сывороточном агаре в течение 24 ч. В исследовании использовали четыре вида сред Пизу: среда Пизу, приготовленная в лабораторных условиях согласно МУ 4.2.3065–13 на основе среды для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам – АГВ среды (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота (НПО «Лейтран», Москва); коммерческая среда Пизу (ФБУН ГНЦПМБ, Оболенск); коммерческая среда Пизу (НПО «Питательные среды», «Микроген»); среда Пизу из коммерческого набора реагентов «ДС-ДИФ-КОРИНЕ» (НПО «Диагностические системы», Нижний Новгород).

Проведенные исследования показали, что при постановке пробы на всех четырех видах сред Пизу с 0,5–1–2 колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение 24 ч на КТА и КБА, положительного результата не выявлено, при постановке с 3–7 колониями регистрировали нестабильный результат и только с 8 колониями был стабильный положительный результат. При постановке пробы Пизу с *C. diphtheriae*, выросшими в течение 48 ч на КТА и КБА, положительный результат регистрировали с 4–8 колониями. При постановке пробы Пизу с колониями *C. diphtheriae*, выросшими в течение 24 ч на 10%-м сывороточном агаре после посева с первичных сред, стабильный положительный результат был с 0,5 колонии. Проведенные эксперименты послужили основанием внесения изменений в алгоритм проведения бактериологического исследования, заключающихся в постановке пробы Пизу с сывороточного агара, когда появление положительного результата возможно уже через 4–6 ч, при этом сроки выдачи окончательного ответа сохраняются в течение 3–5 дней. Новый алгоритм бактериологического исследования предложен в методических указаниях 4.2.3852–23 «Лабораторная диагностика дифтерийной инфекции».

Особенности изоляции патогенных лептоспир и их идентификация современными методами

Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю., Шаракшанов М.Б., Будаева С.Е., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

В связи с трудностью изоляции возбудителей лептоспирозов первые культуры от человека были выделены с использованием биопробных животных в Японии и Германии в 1914–1915 гг., в СССР в 1928 г., от мелких млекопитающих – в Японии в 1915–1916 гг., в России в 1929 г. Пик выделения культур патогенных лептоспир в России пришелся на 1950–1960-е гг., что было связано с развитием животноводства и ростом заболеваемости людей и животных. К сожалению, из-за сложностей культивирования и хранения большинство штаммов утрачено.

Цель исследования. Обобщить опыт Иркутского противочумного института по изоляции и идентификации культур лептоспир с 2012 г.

Бактериологическим методом, в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и реакции микроагглютинации (РМА) исследован клинический материал от 5 больных с подозрением на лептоспироз и 3 лиц, контактировавших с больными животными; биологический материал (кровь, почки и моча) от 260 мелких млекопитающих (ММ). Для идентификации культур использовали бактериологические тесты, РМА и ПЦР, MLST по схемам №№1–3 сайта pubmlst.org и MALDI-TOF масс-спектрометрию с применением оригинальной базы белковых профилей лептоспир. В ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора в 2022–2023 гг. получены полные геномы 6 штаммов.

У людей на фоне лечения антибиотиками не удалось изолировать культуру лептоспир, несмотря на положительные результаты ПЦР и РМА. От ММ выделено 7 культур: 4 *Leptospira borgpetersenii* серогруппы *Javanica* и 3 *L. kirschneri Grippotyphosa*. В природных биотопах, расположенных в черте г. Иркутска, в 2012 и 2014 гг. впервые выделены культуры лептоспир от ММ, общая инфицированность которых по результатам ПЦР составляла $12,0 \pm 6,5$ и $22,2 \pm 8,0\%$ соответственно. В Приморском крае на побережье оз. Ханка лептоспиры изолированы в 2014 и 2016 гг. в той же местности, что и в 1980–1990-е гг., ДНК/РНК обнаруживалась у ММ в $38,4 \pm 2,7$ и $48,9 \pm 5,3\%$ случаев соответственно. Одна культура лептоспир получена в пригороде г. Хабаровска прямым посевом мочи от ММ при их инфицированности $40,6 \pm 6,1\%$. Процесс изоляции и идентификации культур занимал от 3 нед. до 4 мес. в зависимости от присутствия посторонней микрофлоры и скорости адаптации лептоспир к питательным средам. Результаты идентификации методами MLST по схеме №1 и MALDI-TOF белкового профилирования полностью идентичны. MLST *in silico* по 3 схемам показала однотипность 2 штаммов серогруппы *Grippotyphosa* из Приморья и Хабаровска с профилем сиквенс-типов (ST) 110:100:94. У 4 штаммов серогруппы *Javanica* ST = 146 определяется только по схеме №1, а по схемам №№2–3 выявлены одиночные замены нуклеотидов в различных локусах, которые полностью совпадают у выделенных в г. Иркутске штаммов и имеют отличия у штамма из Приморья.

Таким образом, в 2012–2016 гг. в Сибири и на Дальнем Востоке изолировано 7 культур патогенных лептоспир от носителей в природных очагах при их инфицированности от 12,0 до 48,9%. Штаммы серогруппы *Javanica* отличаются особенностями MLST-профиля и более длительно приспосабливаются к питательным средам, чем штаммы серогруппы *Grippotyphosa*.

Оптимизация пробоподготовки клеток дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* для определения иммуномодулятора – двуспиральной РНК – в клетках дрожжей

Буданова Н.Ю., Аитов Р.С., Дунайцев И.А., Жиглецова С.К., Клыкова М.В., Коробова Н.А., Кондрашенко Т.Н.

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

Промышленное получение двуспиральной РНК (дсРНК), обладающей достоверным противовирусным эффектом, возможно при использовании рекомбинантных бактерий или киллерных штаммов дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Одной из задач при создании технологии производства дсРНК является определение оптимальных условий ферментации с точки зрения стоимости, времени процесса и выхода целевого продукта.

В настоящее время кинетика синтеза дсРНК в клетках дрожжей не изучена в связи с отсутствием методики определения количественного содержания дсРНК в клетках

дрожжей *S. cerevisiae*, причем наиболее сложным этапом для определения дсРНК является лизис клеток, поскольку многие виды дрожжей, в т.ч. *S. cerevisiae*, отличаются высокой устойчивостью к различным способам дезинтеграции, применяемыми для лизиса, без деградации РНК. Кроме этого, часто методы выделения РНК из клеток дрожжей рассматриваются для лог-фазы ферментации, однако эти методы не дают достаточного количества РНК из клеток, собранных из стационарной фазы, в которой клетки, приспосабливаясь к стрессовым условиям, обладают более прочными клеточными стенками.

Целью данного исследования являлась оценка степени лизиса клеток дрожжей без деградации нуклеиновых кислот для последующего количественного определения в лизате М-формы (1400–1800 пн) и L-формы (4700–5300 пн) дсРНК. Степень разрушения клеток (лизис клеток) оценивали по соотношению выделенного количества общей РНК (т.е. РНК из разрушенных клеток) к количеству общей РНК (во всех клетках). Использовали следующие подходы для разрушения клеток: химические на основе гуанидин-изотиацианата / экстракции фенол-хлороформ; на основе формамида/ЭДТА и эти же способы в сочетании с механическим разрушением клеток при использовании кварцевого песка и лабораторного гомогенизатора. Пробоподготовку оценивали по следующим параметрам: количество общей выделенной РНК, мкг/мг сырой биомассы дрожжей (определяли спектрофотометрически), интактность дсРНК, трудоемкость, время пробоподготовки одного образца, возможность одновременной пробоподготовки нескольких образцов (до 10), доступность реагентов для выделения РНК.

Получены следующие результаты: все использованные методики не позволили разрушить клетки на 100%, оптимальной являлась методика лизиса на основе гуанидин-изотиацианата и экстракции фенол/хлороформ. Максимальный выход общей РНК (~10 мкг/мг сырой биомассы дрожжей *S. cerevisiae*), соответствующий разрушению ~40% клеток, получили при использовании химического разрушения клеток на основе гуанидин-изотиацианата и экстракции фенол/хлороформ, чистота выделенной РНК по A260/A280 >2.1. Химическое разрушение клеток позволило получить интактную дсРНК из клеток, собранных из лог- и стационарной фазы ферментации. При механическом разрушении клеток выход общей РНК был меньше (соответствовал ~30% разрушенных клеток), что связано с сорбцией нуклеиновых кислот на поверхности песка (силикагеля) и неоптимизированной десорбцией с поверхности.

Бактериофаги и их ферменты как средство борьбы с антибиотикорезистентными энтерококками

Бузиков Р.М., Казанцева О.А., Шадрин А.М.

ИБФМ РАН – обособленное подразделение Федерального исследовательского центра «Пушкинский научный центр биологических исследований РАН», Пушкино, Российская Федерация

Рост устойчивости возбудителей к действию антибиотиков признан Всемирной организацией здравоохранения «одной из самых больших угроз глобальному здравоохранению, продовольственной безопасности и развитию». Особенно остро проблема стоит в отношении нозокомиальных инфекций, например группы ESCAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacteriaceae*). Наш интерес вызвали энтерококки, т.к. их можно рассматривать как эталон мультирезистентности: они не только природно устойчивы ко многим β-лактамам и аминогликозидам, но и активно приобретают резистентность к новым антибиотикам, в т.ч. и к ванкомицину.

В то же время бактерии подвержены негативному воздействию собственных патогенов. Вирусы бактерий – бактериофаги – участвуют в бесконечной эволюционной гонке с бактериями-хозяевами, что выгодно отличает их от антибиотиков, потенциальное количество которых является конечным. Кроме того, бактериофаги разрушают оболочки клетки-хозяина при помощи ферментов – лизинов, которые также имеют потенциал в качестве противомикробного средства. Бактериофаги и их литические ферменты могут помочь в борьбе с мультирезистентными бактериями.

Наша работа сфокусирована на изучении терапевтических бактериофагов, подавляющих энтерококки. Например, фаг iF6 входит состав препарата секстафаг – фагового коктейля, направленного на лечение желудочно-кишечных инфекций. Нами определены кинетика адсорбции вирионов iF6, размер потомства, а также pH и термостабильность. Фаг показал активность в отношении 9 из 26 тестируемых штаммов энтерококков, поражая только *E. faecium* и *E. thailandicus*.

Мы изучили морфологию вирионов методом трансмиссионной электронной микроскопии, секвенировали геном по технологии Illumina, сборку осуществляли при помощи SPAdes v3.13.0, аннотация генома осуществлена на основании проверки результатов RAST v.2 в NCBI BLASTP и HHpred. В итоге удалось выяснить, что этот фаг принадлежит к порядку хвостатых ДНК-содержащих фагов *Caudovirales*, роду *Schiekvirus*. Ближайшие родственники (фаги 163, EFP01, EFDG1) имеют очень широкую географию распространения (Канада, Италия, Израиль, Россия, Япония), что свидетельствует об их эволюционном успехе и высокой приспособляемости к инфицированию разных штаммов энтерококков. Вирион фага имеет длину $285,2 \pm 10,5$ нм и геном размером в 156,592 пн с длинными концевыми повторами. Аннотированный геном опубликован в GB под номером SAMN15856229 и включает 193 ORF, 2 из которых кодируют лизины. Препараты этих ферментов представляют интерес

в качестве противомикробных средств, как дополнение или даже альтернатива антибиотикам.

В результате нашей работы оба лизина фага iF6 были клонированы в бактериальную систему экспрессии (*Escherichia coli* BL21 Star (DE3) + pHUE), наработаны и очищены аффинной хроматографией. Нам удалось усовершенствовать ферменты методами генной инженерии (на N-конец фермента добавлены His-Тэг и домен убиквитина), что увеличило их растворимость при физиологических для человека условиях и упростило очистку препаратов. В сравнении с фагом эндолизина показали способность подавлять не только активно растущие, но и ушедшие в стационарную фазу клетки энтерококков. Но спектр их действия ограничивается только некоторыми энтерококками. Таким образом, поиск эндолизингов с более широким спектром действия представляет практический интерес.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ в рамках научного проекта №22–15–00385.

Глубинное культивирование продуцента бактериальных теней с целью изготовления противочумной вакцины

Бурмистров Е.А., Жумакаев Р.Х., Дунайцев И.А., Волошин А.Г., Клыкова М.В., Иванов С.А., Дентовская С.В., Сомов А.Н., Анисимов А.П.

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

Применение продуцентов бактериальных теней является инновационным и развивающимся направлением научных разработок. Бактериальные тени (BGs) представляют собой полностью сохраненную клеточную стенку грамотрицательных микроорганизмов, лишённую всего цитоплазматического содержимого. Это прогрессивная система для доставки лекарственных средств, активных веществ или вакцин. Для биотехнологии вакцин существенно, что BGs сохраняют молекулярные антигены клеточных стенок, могут служить хорошим адъювантом и усиливать иммунный ответ других очищенных антигенов (Langemann T. et al., 2010). Использование бактериальных теней в качестве компонента вакцины пока недостаточно изучено (Batah A.M., Ahmad T.A., 2020; Chen H. et al., 2021). Все известные работы не затрагивают область масштабирования процесса, демонстрируют низкий, нетехнологичный выход продукта (Langemann T. et al., 2010; Chen H. et al., 2021; Soleymani S. et al., 2020). Ключевым технологическим звеном получения BGs является изученная кинетика управляемого глубинного культивирования, включая рост рекомбинантного продуцента, индукцию и синтез продукта.

На сегодняшний день субъединичные чумные вакцины не смогли приблизиться по эффективности к живым вакцинам. Для решения задачи изучен процесс глубинного культивирования термоиндуцируемого вакцинного продуцента *Yersinia pestis* KM260 (12) Δ LpxMlpEYK и синтеза им BGs для последующего использования полученного продукта в комбинированном вакцинном препарате.

При использовании подобранной питательной среды и схемы управляемого высокоплотного культивирования более чем на порядок поднята концентрация клеток перед стартом термоиндукции. Показано, что при фиксации ключевых параметров массообмена (степень аэрации и интенсивность перемешивания) перед индукцией динамика изменения содержания растворенного кислорода, поступательное снижение оптической плотности культуральной жидкости (КЖ) достаточно информативны в отражении процесса формирования BGs, измеряемого *post factum* по динамике снижения титра живых клеток в КЖ. Кривая распределения частиц по размеру (медиана – несколько мкм) подтверждает наличие субъединиц клеточного размера и отсутствие какой-либо существенной их дезинтеграции. Достигнутые расчетные показатели термоиндукции (97,0–99,6%) и концентрации продукта (до $1 \cdot 10^9$ частиц/мл) подтверждают перспективность технологического процесса с целью создания противочумной вакцины.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков для штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с COVID-19

Буткевич В.В.¹, Тапальский Д.В.², Колчанова Н.Э.², Петровская Т.А.², Залуцкая О.М.³, Зайцева В.Н.⁴, Филонюк В.А.¹, Жаворонок С.В.¹

¹УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь;

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», Гомель, Беларусь;

³УЗ «Республиканский научно-практический центр пульмонологии и фтизиатрии», Минск, Беларусь;

⁴УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь

Данные, полученные в ходе многоцентровых исследований, показывают, что частота развития бактериальных коинфекций у пациентов с инфекцией COVID-19 составляет от 6 до 14%, а развившаяся антибиотикорезистентность у бактериальных патогенов вызывает серьезные затруднения при антибиотикотерапии.

Цель. Определить минимальные подавляющие концентрации антибиотиков для штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных от пациентов с COVID-19.

Материалы и методы. В исследование включены 79 клинических изолятов *K. pneumoniae*, выделенных в 2019–2022 гг. от пациентов с инфекцией COVID-19. Чувствительность к антибиотикам определяли методом микроразведений в бульоне Мюллера–Хинтон в соответствии с ISO 20776–1:2006. Определяли минимальную подавляющую концентрацию (МПК) меропенема (диапазон тестируемых концентраций 0,5–512 мкг/мл), амикацина (0,5–512 мкг/мл), колистина (0,125–128 мкг/мл), тигециклина (0,03–32 мкг/мл).

Категории чувствительности изолятов к антибиотикам (R, I и S) определяли на основании пограничных значений МПК,

установленных Европейским комитетом по определению чувствительности к антимикробным лекарственным средствам [EUCAST v.12]. Качество исследований контролировали штаммами *Escherichia coli* ATCC 25922 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Результаты и обсуждение. Показано, что 78,4% изолятов *K. pneumoniae* были устойчивы к амикацину (МПК₅₀ – 1024 мкг/мл, МПК₉₀ – 1024 мкг/мл). К меропенему были устойчивы 87,3% изолятов (МПК₅₀ – 64 мкг/мл, МПК₉₀ – 256 мкг/мл). К колистину были устойчивы 91,1% изолятов (МПК₅₀ – 32 мкг/мл, МПК₉₀ – 256 мкг/мл). 86% изолятов *K. pneumoniae* были устойчивы к тигециклину (МПК₅₀ – 0,5 мкг/мл, МПК₉₀ – 1 мкг/мл).

Выводы. Выявлены высокие уровни резистентности *K. pneumoniae* к антибиотикам, используемым для эмпирической терапии. Настораживает факт выявления устойчивости высокого уровня к колистину – препарату, традиционно использовавшемуся в качестве антибиотика последнего резерва.

Плазмидный вектор с широким кругом хозяев для производства «бактериальных теней» грамотрицательных патогенов

Вагайская А.С., Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Несмотря на успехи, достигнутые в ликвидации натуральной оспы, полиомиелита, кори, эпидемического паротита, краснухи, гриппа и гепатитов А и В и т.д., серьезным недостатком живых аттенуированных и инактивированных вакцин является длительность разработки, тестирования и получения регистрационных удостоверений, занимающая в среднем 10–15 лет. Для ускорения этих процедур предложена технология модульных вакцин (вакцинных платформ), опирающаяся на предварительно создаваемый «конструктор», включающий базовые носители (платформы) на основе прототипов уже известных патогенов и модульные антигены. Наличие таких заранее приготовленных «конструкторов», чьи базовые носители и модульные антигены успешно прошли фазу II клинических испытаний, может способствовать ускорению разворачивания их производства. Одним из перспективных носителей в составе модульных вакцин являются «бактериальные тени» (БТ) – клеточные оболочки грамотрицательных бактерий, лишенные цитоплазматического содержимого, сохранившие морфологию всех структур клеточной поверхности. Оригинальная технология получения БТ опирается на способность белка Е бактериофага фХ174 формировать трансмембранные туннельные структуры, пронизывающие внутреннюю и внешнюю мембраны бактерий.

Целью настоящей работы явилось создание плазмиды с «широким спектром хозяев», несущей под контролем термоиндуцибельного промотора гены холина (у) и эндолизина (к) чумного диагностического бактериофага Л-413С.

Для получения БТ на основе плазмиды RSF1010 с «широким спектром хозяев» сконструировали плазмиду RSFKRR'-у-к – вектор с *mob*-областью для конъюгативного переноса, устойчивостью к канамицину, несущий гены холина (у) и эндолизина (к) чумного диагностического бактериофага Л-413С под контролем термоустойчивой версии промотора бактериофага лямбда рR». Сконструированную плазмиду RSFKRR'-у-к передали в штаммы *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella Typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*. Способность образовывать БТ оценивали путем изменения оптической плотности (ОП) культур после индукции лизиса путем повышения температуры до 42 °С.

Созданная плаزمида, несущая литические гены бактериофага Л-413С, продемонстрировала способность реплицироваться в прототипных грамотрицательных патогенах различных таксономических групп. Проведенный эксперимент по индукции тенеобразования показал, что рост при температуре 28 °С не сопровождается лизисом бактериальных культур, а при повышении температуры до 42 °С наблюдали активацию генов у и к с последующим лизисом культур, что приводило к снижению ОП.

Таким образом, созданная плазмида RSFKRR'-у-к может служить платформой при создании высокоэффективных инактивированных вакцин-кандидатов, которые могли бы заменить имеющиеся в настоящее время бактериальные термоинактивированные и формолвакцины.

Работа выполнена по НИОКР 3.3 в рамках Государственного задания.

Прототип полигостальной трехкомпонентной вакцины для профилактики чумы

Вагайская А.С., Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Мазурин Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Обоснование антигенного состава любой современной вакцины является первичным и решающим этапом ее разработки. Что касается создания такого препарата для иммунопрофилактики чумы, то проблема выявления новых иммунодоминантных антигенов, а в некоторых случаях даже эпитопов, индуцирующих формирование защитного иммунитета, чрезвычайно сложна и до сих пор не решена полностью. Субъединичные вакцины на основе одного или двух иммунодоминантных антигенов (F1 и/или V) чумного микроба не защищают от заболевания, вызванного штаммами, лишенными F1 и/или продуцирующими слабо перекрестно реагирующие изоформы V антигена. Кроме того, обеспечивая 100%-ю защиту мышей, субъединичные вакцины защищают от гибели лишь часть более близких к человеку по иммунному ответу морских свинок и обезьян. В свою очередь, нерастворимый в воде «остаточный» антиген из клеточных стенок *Yersinia pestis* стимулирует Т-клеточный иммунный ответ,

обеспечивающий надежную защиту от инфекции морских свинок и обезьян, но не эффективный в отношении мышей.

Цель настоящей работы – создание полигостальной чумной вакцины, состоящей из бактериальных теней (БТ) *Y. pestis* KM260 (12) ΔlpxM, полученных с использованием холин-эндолизинной системы Л-413С и гена Е бактериофага φX174, в комбинации с иммунодоминантными антигенами чумного микроба – капсульным антигеном (F1) и V-антигеном (LcrV), и оценка ее протективности для беспородных мышей и морских свинок.

Провели двукратную подкожную с интервалом в 2 нед. иммунизацию лабораторных животных комбинацией БТ *Y. pestis* KM260 (12) ΔlpxM, F1- и V-антигенов чумного микроба. Контрольные группы состояли из неиммунных животных. Беспородных мышей и морских свинок опытных и контрольных групп заражали подкожно десятикратными разведениями тест-заражающего штамма *Y. pestis* subsp. *pestis* 231. Наблюдение вели в течение 21 суток. Определение уровня специфических IgG к препарату БТ, F1- и V-антигенам в сыворотке крови беспородных мышей и морских свинок проводили методом иммуноферментного анализа.

Подкожное введение препарата стимулировало продукцию антител у лабораторных животных. Отмечали увеличение титров специфических IgG к препарату БТ, F1- и V-антигенам после второй иммунизации мышей и морских свинок. Двукратная иммунизация обеспечивала 100%-ю защиту от гибели при подкожном заражении беспородных мышей и морских свинок вирулентным штаммом *Y. pestis* 231. Неиммунные мыши и морские свинки контрольных групп, зараженные *Y. pestis* 231, пали к 6-м и 10-м суткам эксперимента соответственно. Наблюдала иммунную защиту от гибели животных при подкожном заражении вирулентным штаммом чумного микроба (индекс иммунитета >105 для морских свинок и >104 для мышей).

Введение полученного прототипа полигостальной чумной вакцины формирует напряженный иммунный ответ и защищает от гибели при заражении вирулентным штаммом чумного микроба.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075–15–2019–1671).

Опыт применения методов метагеномного секвенирования для детекции и идентификации возбудителей бактериальных инфекций

Васильева О.В., Ульшина Д.В., Зайцева О.А.,
Волынкина А.С., Писаренко С.В., Сирица Ю.В.,
Гнусарева О.А.

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

За последнее десятилетие в области исследования метагенома сообществ микроорганизмов широкое применение получил подход, основанный на секвенировании гена 16S рРНК, который состоит из высококонсервативных и 9 гиперва-

риабельных областей. Вариабельные области демонстрируют низкую степень гомологии и различаются даже между представителями близкородственных видов.

Цель работы. Определить возможность детекции, идентификации и предел обнаружения возбудителей природно-очаговых инфекций (ПОИ) *Borrelia burgdorferi* s.l., *Rickettsia* spp., *Francisella tularensis*, *Coxiella burnetii*, *Anaplasma phagocytophilum* в образцах полевого и клинического материала с различной нагрузкой ДНК методом метагеномного секвенирования гена 16S рРНК.

Материалы и методы. 20 проб полевого и клинического материала с различной нагрузкой ДНК возбудителей ПОИ (Ct 12,62–32,3), определенной методом полимеразной цепной реакции: 17 проб суспензий иксодовых клещей, содержащих *B. burgdorferi* s.l., *F. tularensis*, *A. phagocytophilum*, *Rickettsia* spp.; 2 пробы сыворотки крови, положительные на *C. burnetii*, и 1 проба – смыв с грудной полости полевки обыкновенной, положительная на *F. tularensis*. Амплификацию фрагментов гена 16S рРНК (V1–V9) осуществляли с помощью модифицированных праймеров (I.Abellan-Schneyder et al. 2021), секвенирование библиотек – на секвенаторе Ion GeneStudio S5 Plus (Thermo Fisher Scientific Inc). Обработку и анализ проводили в режиме on-line с помощью ресурса EasyMAP.

Результаты. В пробах полевого и клинического материала выявлены: *Borrelia* spp. – в 1 пробе суспензии иксодовых клещей; *Francisella* spp. – в 1 пробе суспензии иксодовых клещей и смыве с грудной полости полевки обыкновенной; *Coxiella* spp. – в 2 пробах сыворотки крови; *Rickettsia* spp. – во всех пробах; *A. phagocytophilum* в эксперименте не обнаружен.

Выводы. Показана эффективность применения метагеномного анализа для детекции маркеров возбудителей ПОИ в пробах полевого и клинического материала, подтверждена возможность идентификации до рода для *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Francisella* spp., *Coxiella* spp. Определены пороговые значения для выявления ДНК патогенов в исследуемом материале: *Borrelia* spp. (до Ct 20,24), *Francisella* spp. (до Ct 16,1), *Coxiella* spp. (до Ct 21,4). Получена 100%-я точность идентификации до рода для *Rickettsia* spp. с различной нагрузкой ДНК в пробе (Ct 15 – Ct 32,3). Отсутствие *A. phagocytophilum* в суспензиях иксодовых клещей по данным анализа, вероятно, связано с низким содержанием патогена в материале.

Таким образом, использование метагеномного секвенирования гена 16S рРНК для индикации возбудителей ПОИ в различном материале (клинический, полевой) представляется перспективным для дальнейшего исследования направлением.

Активность деполимеразы Der_kpv74 и полимиксина против биопленок *Klebsiella pneumoniae*

Веревкин В.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В.

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

Бактериальные биопленки играют большую роль в патогенезе многих инфекционных болезней. Биопленки трудно поддаются разрушению, они более устойчивы к противомикробным препаратам и компонентам иммунной системы макроорганизма, чем планктонные культуры. Одним из способов разрушения бактериальных биопленок являются бактериофаги, использующие собственные ферменты (деполимеразы) для деградации одного из основных компонентов биопленок – бактериальных полисахаридов.

Цель нашей работы – изучение активности деполимеразы Der_kpv74 бактериофага KpV74 против биопленок *Klebsiella pneumoniae*.

Эксперименты проводили на биопленках гипермукоидного штамма *K. pneumoniae* капсульного типа K2, сформированных в течение ночи в лунках полистирольного планшета. Биопленки отмывали от свободных бактерий и обрабатывали одним из препаратов: суспензией фаговых частиц KpV74 (i), раствором деполимеразы Der_kpv74 (ii), полимиксином (iii) или смесью этих компонентов (i+ii, i+iii, ii+iii). В контрольные лунки вносили LB-бульон. Планшет инкубировали без аэрации при температуре 37 °С. Результаты учитывали через 24 ч инкубации, определяя количество живых бактерий в ячейке после разрушения биопленки 10-кратным пипетированием и высевом на плотную питательную среду, а также фотоколориметрическим методом, по оптической плотности суспензии при длине волны 405 нм.

Проведенные исследования показали, что деполимераза Der_kpv74, кодируемая фагом KpV74, не влияет на жизнеспособность бактерий в составе биопленки, сформированной на полистирольном планшете. Вместе с тем полученные нами результаты свидетельствуют о синергидном действии полисахарид-деполимеразы Der_kpv74 и антибиотика полимиксина на биопленки *K. pneumoniae*. При обработке биопленок полимиксином совместно с деполимеразой отмечено снижение жизнеспособности *K. pneumoniae* более чем в 200 раз. Менее эффективной оказалась обработка биопленок полимиксином совместно с бактериофагом KpV74 или одним полимиксином (снижение жизнеспособности *K. pneumoniae* в 36 и 10 раз соответственно). Обработка биопленок только бактериофагом или бактериофагом совместно с деполимеразой не приводила к снижению жизнеспособности *K. pneumoniae*.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что полисахарид-деполимераза Der_kpv74 усиливает активность полимиксина против биопленок *K. pneumoniae* при совместном использовании. Эти результаты позволяют предположить, что комбинация деполимеразы Der_kpv74 с антибиотиками может представлять собой многообещающую стратегию борьбы с инфекциями, вызванными лекарственно устойчивыми биопленкообразующими *K. pneumoniae*.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Оценка чувствительности микроорганизмов рода *Salmonella*, выделенных из продуктов птицеводства в Санкт-Петербурге, к антимикробным препаратам

Ветрова Л.С., Смирнова Е.В., Кафтырева Л.А.

Восточный филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в г. Санкт-Петербурге и Ленинградской области», ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Актуальность. Сальмонеллезная инфекция по-прежнему занимает одно из ведущих мест в мире среди острых кишечных инфекций с фекально-оральным механизмом передачи. Среди выделенных от людей, животных и из пищевых продуктов штаммов сальмонелл встречаются изоляты, проявляющие множественную лекарственную устойчивость к антимикробным препаратам.

Цель исследования – оценить чувствительность к антимикробным препаратам штаммов бактерий рода *Salmonella*, выделенных из продуктов птицеводства в Санкт-Петербурге за период 2021–2022 гг.

Материалы и методы. Проведены исследования 23 штаммов микроорганизмов рода *Salmonella* (из которых: 17 – *S. Infantis*, 4 – *S. Enteritidis*, 1 – *S. Brandenburg*, 1 – *S. Virchow*) на чувствительность к 11 антимикробным препаратам (в т.ч. β-лактамам, хинолонам, хлорамфениколам и треметоприм/сульфометаксозолу) диско-диффузионным методом с использованием стандартных дисков на агаре Мюллера–Хинтон.

Результаты. При исследовании антибиотикорезистентности выделенных сальмонелл установлено, что все они обладали множественной лекарственной устойчивостью, причем большинство штаммов было устойчиво к 5–7 препаратам из 11 используемых. 100% изученных штаммов были резистентны к налидиксовой кислоте и пefлоксацину, 78,6% – к ципрофлоксацину. Полученные результаты могут свидетельствовать о низкой чувствительности изолятов к антимикробным препаратам группы фторхинолонов. Цефалоспорины 3-го поколения (цефотаксим), амфениколы (хлорамфеникол) подавляли рост 82,6% изученных штаммов сальмонелл: *S. Infantis* – в 73,7%, *S. Enteritidis* – в 100% случаев. Бактерия *S. Virchow* оказалась резистентной к цефалоспорином 3-го поколения (цефотаксим, цефтазидим), хинолонам (налидиксовая кислота, пefлоксацин), фторхинолонам (ципрофлоксацин), но чувствительна к ампициллину.

Заключение. Проблема антибиотикорезистентности штаммов микроорганизмов рода *Salmonella*, отнесенных Всемирной организацией здравоохранения к группе высокоприоритетных патогенов, актуальна для Санкт-Петербурга. Высокий процент устойчивых к фторхинолонам штаммов бактерий рода *Salmonella* может свидетельствовать о возрастающей опасности распространения на территории

России микроорганизмов с выраженными антимикробными свойствами. Возникновение устойчивых к фторхинолонам штаммов микроорганизмов рода *Salmonella* может быть связано с нерациональным применением данной группы антимикробных препаратов на птицеводческих предприятиях Северо-Западного федерального округа.

Мониторинг контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов Курской области в 2017–2022 гг.

Волгина И.В., Сопина В.А., Ковальчук М.Л., Гребенюков К.В.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области», Курск, Российская Федерация

Приграничное расположение Курской области, наличие на ее территории более 340 поверхностных водоемов, температура воды которых в летние месяцы достигает 18–26 °С, не исключает вероятность передачи возбудителей инфекционных заболеваний водным путем.

Мониторинг контаминации холерными вибрионами в регионе предусматривает исследования сотрудниками микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области» проб воды поверхностных водоемов II категории в местах организованного и неорганизованного водопользования, а также мест сброса хозяйственно-бытовых сточных вод.

В 2017–2022 г. исследовано на контаминацию *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп более 3100 проб воды водоемов. Культуры *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп выявлены не были, идентифицировано 233 культуры *V. cholerae* non O1 / non O139. Таким образом, за анализируемый период удельный вес проб воды поверхностных водоемов с выделением *V. cholerae* non O1 / non O139 составил 7,5%, с колебаниями от 5,0 до 10,2%.

Для водоемов, берущих начало с территории сопредельных государств, и мест организованного рекреационного водопользования удельный вес проб с выделением *V. cholerae* non O1 / non O139 несколько ниже – 7,4 и 4,8% соответственно; для водоемов в местах неорганизованного отдыха населения и местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод закономерно выше – 8,5 и 8,8%.

Удельный вес проб воды с обнаружением *V. cholerae* non O1 / non O139 в регионе для рек и непроточных водоемов, а также малых и средних рек существенно не отличался и составил 7,6 и 7,4%, а также 8,7 и 6,8%.

Территориально в 2017–2022 гг. культуры *V. cholerae* non O1 / non O139 были выявлены в 51 стационарной точке 32 поверхностных водоемов в 27 районах и г. Курске. Таким образом, была установлена контаминация *V. cholerae* non O1 / non O139 1 водохранилища объемом >10 000 000 м³ («Курское море»), 18 прудов и 13 рек (Полевая Снова, Полевая Плата, Снагость, Речица, Олымь, Локня, Свапа, Тускарь, Смердица, Суджа, Псел и Сейм).

Проводимый мониторинг показал наличие в открытых водоемах Курской области условий, достаточных для поддержания жизнеспособности и размножения холерных ви-

брионов при их возможном завозе из неблагополучных регионов. Это требует осуществления систематического надзора за системами водоснабжения и водоотведения, а также оперативной оценки свойств изолируемых культур и своевременного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Микробиологический мониторинг носительства *Staphylococcus aureus* среди населения г. Набережные Челны за 2020–2022 гг.

Галиуллина Ч.Ф., Чумакова Р.И., Хайсаров М.К.

Набережночелнинский филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», Набережные Челны, Российская Федерация

Staphylococcus aureus является одним из наиболее распространенных микроорганизмов, способных вызывать различные патологии. Изучение носительства имеет большое значение для профилактики и контроля инфекционных заболеваний.

Целью данной работы является микробиологический мониторинг носительства *S. aureus* среди населения, прошедшего обследование в Набережночелнинском филиале ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)» за период 2020–2022 гг.

Материалы и методы. На наличие *S. aureus* в период 2020–2022 гг. исследована 6441 проба. Материал отбирался согласно МР от 19.12.1991.

Содержание работы. В 2020 г. обследование прошли 2925 человек. Удельный вес положительных проб *S. aureus* составил 23,4% (685 случаев). Из них массивный рост выявлен в 43 (6,2%) случаях, обильный – в 42 (6,13%). *S. aureus* чаще выделялся при посеве мазка из полости носа – 493 (71,9%) пробы. Распределение среди профессиональных групп населения проб, в которых наблюдался обильный и массивный этиологически значимый рост колоний: организации питания – 47 (55,2%) человек, лечебно-профилактические учреждения (ЛПУ) – 9 (10,5%), детские учреждения – 29 (34%).

В 2021 г. обследование прошли 2141 человек, удельный вес положительных проб *S. aureus* составил 33,2% (711 случаев). Чаще положительный результат давали пробы из полости носа – 490 (68,9%). Массивный рост – 102 (14,3%), обильный – 109 (15,3%). Распределение среди профессиональных групп: организации питания – 82 (38,8%) человека, ЛПУ – 45 (21,3%), детские учреждения – 84 (39,8%).

В 2022 г. обследование прошли 1375 человек, удельный вес положительных проб *S. aureus* составил 37,8% (520 случаев). Положительный результат из полости носа – 373 (71,7%). Массивный рост – 58 (11,1%), обильный – 65 (12,5%). Распределение среди профессиональных групп: организации питания – 60 (48,8%), ЛПУ – 11 (8,9%), детские учреждения – 52 (42,2%).

Выводы

1) За период 2020–2022 гг. наблюдается увеличение положительных проб *S. aureus* на этиологически значимом

уровне (обильный и массивный рост колоний). В 2020 г. их количество составило 85 (2,9%), в 2021 г. – 211 (9,8%), а в 2022 г. – 123 (8,9%).

2) Процент выявления *S. aureus* выше среди профессий, где имеется контакт с пищевыми продуктами. Это подтверждает необходимость сдачи мазка из зева и носа на наличие патогенного стафилококка при поступлении на работу и в дальнейшем по медицинским и эпидпоказаниям.

3) *S. aureus* чаще выделялся при посеве мазков из передних отделов носовых ходов. Вероятнее всего, это связано с экзогенным путем передачи возбудителя извне. Большую роль в дальнейшем распространении инфекции имеет санация выявленных носителей.

4) С 1 апреля 2021 г. отменен приказ №302н, согласно которому мазок из зева и носа на наличие *S. aureus* требовалось сдавать при поступлении на работу медицинскому персоналу ЛПУ. Сейчас же, согласно приказу Минздрава России от 28.01.2021 №29н п. 27, при выполнении работы в медицинских организациях не требуется обязательная сдача данного анализа. Исходя из этого, в нашем исследовании также наблюдается снижение удельного веса положительных проб патогенного стафилококка среди этой профессиональной группы.

Анализ патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории Российской Федерации в 2018–2022 гг.

Галкина А.Ю., Герасимова А.Д., Гусев Е.А., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

На территории Российской Федерации ежегодно проводится мониторинг возбудителя лихорадки Западного Нила – арбовирусной инфекции, протекающей у человека в гриппоподобной форме или, в ряде случаев, в виде заболевания с вовлечением центральной нервной системы. В рамках этого направления осуществляется получение изолятов вируса Западного Нила (ВЗН) из зооэнтотомолгического и клинического материала и их характеристика.

Для штаммов ВЗН, выделенных в 2022 г., нами установлены особенности течения инфекции с определением инкубационного периода и рассчитана LD_{50} . Для изучения патогенных свойств штаммов ВЗН вирусосодержащий материал титровали десятикратно и по 100 мкл вводили внутримышечно беспородным белым мышам. В течение 21 дня после заражения наблюдали за состоянием животных и фиксировали их гибель. LD_{50} рассчитывали, используя формулу Кербера в модификации Ашмарина. Статистическая обработка данных проводилась с использованием критерия Манна–Уитни.

Начиная с 7-х суток у мышей отмечались сонливость, слабость и озноб. Гибель животных, в среднем, наблюдалась с 10-х по 14-е сутки, что при сравнении с данными, полученными для штаммов, циркулировавших в 2018

и 2021 гг. (3–14-е и 6–14-е сутки соответственно), предполагает тенденцию к увеличению сроков инкубационного периода. Среднее значение LD_{50} штаммов 2022 г. составило 10^4 – 10^5 БОЕ, в то время как LD_{50} штаммов 2018 и 2021 гг. – 10^3 – 10^4 БОЕ. Летальность для штаммов 2022 г. была равна 22% и имела статистически достоверные отличия от аналогичных показателей для штаммов 2018 (60%) и 2021 гг. (40%) при уровне значимости $p = 0,05$. Однако штаммы из Астраханской области и Ставропольского края представляют особый интерес для дальнейшего изучения, так как их вирулентность сопоставима с ранее изолированными штаммами, а уровень летальности составил 57%.

Полученные результаты говорят о гетерогенности штаммов ВЗН, выделенных на территории России в 2022 г., по признаку вирулентности, при этом общей характеристикой для всех штаммов является увеличение сроков инкубационного периода.

Работа выполнена в рамках НИР 092–1–18.

Получение бактериальных теней *Listeria monocytogenes* с использованием химических реагентов и оценка их протективности для мышей линии BALB/c

Гапелъченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Дентовская С.В.

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

Листерииоз – сапроноз, вызываемый бактерией *Listeria monocytogenes*, – характеризуется разнообразием путей и факторов передачи возбудителя и наиболее опасен для новорожденных и лиц с иммунодефицитами. О вспышках листериозной инфекции сообщают более чем 65 стран, при этом летальность при инвазивной форме заболевания достигает 20–30%. В России листериоз официально регистрируется с 1992 г., ежегодно выявляют до 100 заболевших с тенденцией роста числа летальных. Кроме того, появление в последнее время гипервирулентных штаммов и изолятов с множественной лекарственной устойчивостью представляет значительную угрозу для здоровья населения. Однако до настоящего времени не создано вакцинного препарата для специфической профилактики листериоза, хотя активные исследования в этом направлении ведутся в нескольких странах мира.

В качестве вакцины могут быть предложены бактериальные тени (БТ) – пустые бактериальные оболочки, сохранившие основные структурные поверхностные компоненты клеток, полученные химическим способом при помощи различных реагентов в минимальной бактерицидной концентрации (МБК).

Для создания БТ использовали штамм *L. monocytogenes* MA 554, который обрабатывали растворами гидроксида натрия (NaOH – МБК 6,25 мг/мл) или молочной кислоты (LA – МБК 6,25 мг/мл) по стандартной методике с экспозицией

реагентов в течение 1 ч. Полученные препараты БТ-NaOH и БТ-LA подвергали лиофилизации. Стерильность и специфическую безвредность определяли по общепринятой методике. Мышей линии BALB/c иммунизировали подкожно трехкратно с интервалом 2 нед. полученными препаратами в дозах 10^7 и 10^8 КОЕ. Контрольная группа состояла из неиммунизированных животных. Через 12 суток после третьей иммунизации животных опытных и контрольной группы заражали подкожно вирулентным штаммом *L. monocytogenes* MA 554 в дозе 10^7 КОЕ.

Все интактные мыши, зараженные вирулентным штаммом листерий, пали к 7-му дню наблюдения. Мыши линии BALB/c, иммунизированные препаратом БТ-NaOH в дозе 10^7 КОЕ, не пережили заражения штаммом *L. monocytogenes* MA 554. Выживаемость животных в группе, иммунизированной БТ-NaOH в дозе 10^8 КОЕ, составила 42,8%. У мышей после введения препарата БТ-LA в дозе 10^7 КОЕ выживаемость составила 28,5%, а после введения БТ-LA в дозе 10^8 КОЕ – 57,1%. Согласно полученным данным, наибольший протективный эффект наблюдался после иммунизации животных препаратом БТ-LA.

Таким образом, БТ листерий, полученные при обработке клеток химическими реагентами, могут использоваться при создании инактивированных вакцин против листериоза.

Работа выполнена по НИОКР 3.3 в рамках государственного задания.

Влияние делеций генов *iglC*, *sodC*, *sodB*, *recA* и *recD* на протективные и иммунологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ на примере лабораторных морских свинок

Гапельченкова Т.В., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Борзилов А.И., Павлов В.М.

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

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекция, представляющая серьезную опасность для населения, проживающего в эндемичных по туляремии регионах.

Для профилактики туляремии в России используют живую вакцину, созданную на основе штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, которой свойственны некоторая реактогенность и нестабильность. Поэтому в настоящее время проблема создания нового поколения стабильных и менее реактогенных штаммов *F. tularensis* является актуальной.

В данном исследовании мы сравнивали протективные и иммунологические свойства штаммов *F. tularensis* 15/23–1 Δ RecA, 15/23–1/SodB Δ SodC Δ RecA и 15/23–1/SodB Δ SodC Δ RecD с исходным штаммом 15 НИИЭГ.

Морских свинок иммунизировали подкожно исследуемыми штаммами в дозе $5 \cdot 10^5$ КОЕ. На 30-е сутки после иммунизации животных заражали подкожно вирулентным штаммом *F. tularensis* 503 в дозе 1000 КОЕ, для контроля использовали интактных животных. Выживших животных на 30-

сутки повторно заражали интраназально вирулентным штаммом *F. tularensis* B399 в дозе 1000 КОЕ.

После заражения все интактные животные пали к 9-му дню наблюдения. Все иммунизированные животные выжили после первого и второго заражения.

У 3 животных из каждой группы была взята кровь перед заражением штаммами *F. tularensis* 503 и B399 для определения наличия агглютинирующих антител.

Средние титры агглютинации у морских свинок, иммунизированных штаммами *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 15/23–1 Δ RecA, 15/23–1/SodB Δ SodC Δ RecA и 15/23–1/SodB Δ SodC Δ RecD, составили 1/190, 1/53, 1/67, 1/12 соответственно. После заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* 503–1/160, 1/146, 1/147, 1/147. После заражения *F. tularensis* B399–1/213, 1/213, 1/187, 1/187.

В результате проведенных исследований показано: чем больше мутаций в штамме, тем ниже титр агглютинации у иммунизированных морских свинок, при сохранении 100%-й протективности от заражения штаммом *F. tularensis* 503. Выжившие животные после заражения штаммом 503 были защищены от последующего интраназального заражения более вирулентным штаммом B399.

Таким образом, полученные штаммы могут рассматриваться как кандидаты при создании живых вакцин против туляремии.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075–15–2019–1671от 31.12.2019).

Перспектива местного использования препарата коллоидного наносеребра против антибиотикорезистентных штаммов у беременных с хроническим тонзиллофарингитом

Гапон М.Н.¹, Иванова Е.А.¹, Логинов И.А.², Тагиров З.Т.²

¹ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В настоящее время актуальна проблема распространения в стационарах разных профилей антибиотикорезистентных инфекций, что диктует поиск альтернативных средств, способных воздействовать на патогены.

Целью работы явилось изучение действия спрея для горла «Аргентокеа Нанолар» при его использовании у беременных с хроническим тонзиллофарингитом (ХТФ) и на выделенные от них антибиотикорезистентные штаммы. В исследовании участвовали 55 беременных женщин-добровольцев, проходивших бактериологическое обследование ротоглотки в ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» в 2022–2023 гг.

Бактериологическая оценка ротоглоток беременных с ХТФ выявила присутствие 230 штаммов бактерий, поддерживающих состояние хронического воспаления и представляющих потенциальную угрозу их распространения в усло-

виях родовспомогательных учреждений, из них 48 обладали устойчивостью к антибиотикам.

У обследованных чаще всего в повышенной концентрации ($\geq 10^5,0$ КОЕ/мл) присутствовали *Streptococcus pneumoniae* (53,0%) и *Corinebacterium* (50,0%), несколько реже – *Staphylococcus aureus* (46,9%) и непатогенные *Neisseria* (46,5%), *Staphylococcus haemolyticus* (42,6%), *Haemophilus influenzae* (36,5%). В 33,5% случаев присутствовали дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

У беременных с ХТФ состав микробиоты характеризовался пониженной численностью нормальных зубионтов (α -гемолитические стрептококки $10^{4,2} \pm 0,1$ КОЕ/мл, коринеформные бактерии $10^{6,0} \pm 0,2$ КОЕ/мл, нейссерии $10^{6,0} \pm 0,2$ КОЕ/мл) и повышенной концентрацией патогенов (пневмококки $10^{6,8} \pm 0,2$ КОЕ/мл, золотистые стафилококки $10^{5,0} \pm 0,2$ КОЕ/мл, гемофильные палочки $10^{4,5} \pm 0,1$ КОЕ/мл, коагулазоотрицательные стафилококки (КОС) $10^{5,8} \pm 0,2$ КОЕ/мл, кандиды $10^{4,5} \pm 0,1$ КОЕ/мл).

Исследование микробиоты ротоглотки беременных после использования ими спрея серебра выявило значительное снижение этиологически значимых возбудителей. Так, средняя численность золотистого стафилококка составляла $10^{0,2} \pm 3,1$ КОЕ/мл, кандидат – $10^{0,5} \pm 3,1$ КОЕ/мл, КОС – $10^{0,5} \pm 3,1$ КОЕ/мл. Пневмококки и гемофильная палочка не обнаруживались.

В эксперименте *in vitro* препарат проявил антибактериальную и антимикотическую активность в отношении всех выделенных культур, в т.ч. и антибиотикорезистентных штаммов стафилококков, пневмококков и гемофильных бактерий.

Результаты исследования показали высокую эффективность санации беременных с ХТФ, применявших спрей для горла «Аргентокеа Нанолар». Побочных эффектов зарегистрировано не было, у всех женщин беременность протекала без осложнений и имела благополучное родоразрешение, что подтверждает возможность использования этого препарата во время беременности.

Мобильная лаборатория молекулярной диагностики в санитарно-эпидемиологической службе Республики Татарстан

Гараева Л.Т., Серазетдинова Ф.И., Закирова О.М., Буава В.Г.

Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан (Татарстан), Казань, Российская Федерация

Роспотребнадзором разработана система «Санитарный щит», которая позволит достичь цели по предупреждению ввоза инфекций из-за рубежа. «Санитарный щит» – это система противодействия инфекциям, которая поможет сохранить здоровье человека, защитить его от возможных инфекционных угроз в будущем.

В рамках реализации федерального проекта «Санитарный щит» в IV квартале 2021 г. ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)» получена мо-

бильная лаборатория молекулярной диагностики (МЛМД) на базовом шасси КАМАЗ. Мобильная лаборатория состоит из двух подвижных модулей, работающих в связке «тягач-прицеп». Каждый модуль имеет основной вход для персонала, передаточную шлюзовую камеру для приема материала, аварийный выход. Модули функционируют полностью в автономном режиме на электрогенераторах, с резервуарами для воды и канализации, имеется система поддержания нормируемых параметров микроклимата, система приточно-вытяжной вентиляции оборудована фильтрами очистки воздуха, двери снабжены функцией одностороннего доступа. Весь комплекс инженерных систем биологической безопасности предотвращает выход патогенов во внешнюю среду, что обеспечивает самый высокий уровень биологической безопасности, защиту окружающей среды и персонала.

МЛМД обеспечивает возможность быстрого реагирования в чрезвычайных ситуациях санитарно-эпидемиологического характера, на ее базе возможно массовое тестирование любой инфекции, проведение диагностических исследований по выявлению возбудителей инфекционных болезней бактериальной и вирусной этиологии I–IV групп патогенности в клиническом материале и объектах окружающей среды. Лаборатория оснащена приборами для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (Rotor-Gene Q и CFX96) и системами для автоматического выделения и очистки нуклеиновых кислот (Auto-Pure 96). Для проведения исследований методом иммуноферментного анализа имеется анализатор иммуноферментных реакций. Также используются методы экспресс- и ускоренной диагностики.

Мощность лаборатории позволяет проводить до 300 исследований за рабочую смену в зависимости от типа инфекции, имеются все необходимые разрешительные документы для осуществления деятельности с использованием возбудителей инфекционных заболеваний. В 2022–2023 гг. на базе МЛМД в районах Республики Татарстан был осуществлен тестовый мониторинг исследований на вибриофлору 3 поверхностных водоемов, ПЦР-диагностика населения на новую коронавирусную инфекцию (COVID-19), ротавирусы.

Мобильная лаборатория создает резервы для реагирования на эпидемические вызовы, обеспечивает выполнение оперативных задач при работе в очагах инфекционных заболеваний, расположенных в отдаленных, труднодоступных районах, не охваченных стационарной лабораторной сетью, в полевых условиях, в зонах чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера, при отсутствии коммуникаций. Мобильные лаборатории являются важнейшим инструментом реагирования на биологические угрозы и механизмом предупреждения вспышек инфекционных заболеваний.

Мониторинговые исследования арбовирусных инфекций на территории Запорожской области

Герасимова А.Д., Елхова А.В., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Запорожская область – регион с умеренно континентальным климатом, на территории которого расположено большое количество водоемов, являющихся местом массового выплода различных видов комаров – переносчиков возбудителей природно-очаговых инфекций. Климат, наличие и обилие как членистоногих-переносчиков, так и основных резервуаров создают благоприятные условия для циркуляции в регионе возбудителей арбовирусных инфекций, таких как лихорадка Западного Нила (ЛЗН), Синдбис, Батаи, Тягиня, Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ), клещевой вирусный энцефалит (КВЭ). В литературных источниках существуют сведения об обнаружении маркеров возбудителей указанных заболеваний в пробах из объектов окружающей среды.

Острые лихорадочные заболевания с отчетливой сезонностью – ЛЗН, КГЛ, КВЭ – на территории Запорожской области ранее регистрировались. При этом люди подвергались укусам членистоногих не только в зоне лесных посадок, но и на территории жилой застройки (как частного сектора, так и многоквартирных домов).

В рамках мониторинговых исследований, проводимых с целью контроля над эпидемической ситуацией по природно-очаговым инфекциям, передающимся кровососущими членистоногими, осуществляется выявление наличия маркеров арбовирусов во всех компонентах паразитарной системы.

Основными резервуарами арбовирусов являются мелкие грызуны, насекомоядные и птицы. Ключевым параметром, определяющим риск заражения людей, является уровень зараженности кровососущих комаров и клещей – эктопаразитов и переносчиков возбудителей заболеваний.

В результате работы в течение эпидемического сезона 2022–2023 гг. РНК вируса Западного Нила (ВЗН) II генотипа обнаружена в 8 (3,5%) пулах кровососущих комаров рода *Culex* из 227 и в органах 3 (1,9%) мышей-полевков из 159. Иммуноглобулины класса G к ВЗН выявлены в 98 (16,6%) из 591 образцов плазмы крови доноров, к вирусу Синдбис – в 5 (2,7%) из 184, к вирусу Батаи – в 5 (2,7%) из 184.

Как РНК возбудителя КВЭ, так и специфических антител к вирусу ни в одной исследуемой пробе обнаружить не удалось.

Таким образом, обнаружение РНК ВЗН, вирусов Синдбис и Батаи в комарах, а также наличие специфических антител к данным вирусам в сыворотках крови доноров, проживающих на территории Запорожской области, подтверждают факт циркуляции этих возбудителей на территории региона и обуславливают необходимость дальнейшего изучения их роли в инфекционной патологии населения.

Работа выполнена в рамках НИР 092–1–18.

Антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных из мокроты пациентов отделения профессиональной аллергологии и иммунореабилитации с бронхолегочной патологией

Гизатуллина Л.Г., Масягутова Л.М., Кудакеева Р.Х., Кабирова Э.Ф.

ФБУН «Уфимский НИИ медицины труда и экологии человека», Уфа, Российская Федерация

Болезни бронхолегочной системы составляют около 50% от всех заболеваний человека. Доминирующую массу составляет бронхиальная астма – на ее долю приходится четвертая часть болезней бронхов и легких. Остальную часть воспалительных заболеваний бронхолегочной системы составляют: пневмония, бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких и др. Состояние иммунной системы организма человека и вирулентность возбудителя являются факторами генеза развития заболевания. Среди возбудителей инфекций человека выделяется *Staphylococcus* spp., проблемой лечения которой является ее устойчивость к антимикробным препаратам.

Целью данной работы было оценить резистентность к антибактериальным препаратам (АБП) стафилококков, выделенных из мокроты пациентов с бронхолегочной патологией отделения профессиональной аллергологии и иммунореабилитации клиники института.

Материалы и методы. В исследования были включены 1263 пациента с заболеваниями бронхолегочной системы, которые находились на стационарном лечении в отделении профессиональной аллергологии и иммунореабилитации клиники института. Материал для бактериологического исследования – свободно отделяемая мокрота. Первичный посев биологического материала, культивирование, идентификация и учет результатов проведены в соответствии с нормативной документацией. Для проведения теста чувствительности выделенных микроорганизмов к АБП использовался стандартный диско-диффузный метод. Для оценки чувствительности применялись АБП групп, имеющих основное клиническое значение для лечения бронхолегочной патологии: β-лактамы, макролиды, фторхинолоны и гликопептиды. Были использованы диски со следующими антибиотиками: бензилпенициллин, азитромицин, ванкомицин, оксациллин, левофлоксацин, цефотаксим, цефтриаксон. При анализе результатов тестирования стафилококков к оксациллину штаммы стафилококков, устойчивые к оксациллину, рассматривались как устойчивые ко всем β-лактамам АБП. Исследовались условно-патогенные изоляты, если был один вид в количестве не менее $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл. Оценка резистентности к АБП выполнена для 656 выделенных чистых изолятов стафилококков, из которых 582 (88,7 ± 0,3%) культуры – *Staphylococcus epidermidis* и 74 (11,2 ± 0,8%) – *Staphylococcus aureus*.

Результаты. Оценка антибиотикорезистентности к АБП выделенных штаммов *S. epidermidis* показала, что уровень устойчивости к бензилпенициллину составил 91,9% (1,7% штаммов – умеренно-резистентные, 90,2% – резистентные),

к азитромицину – 49,9%, к левофлоксацину – 56,3%. Самыми активными АБП были цефалоспорины III поколения: цефотаксим – 80,8%, цефтриаксон – 87,5%. К ванкомицину устойчивых штаммов *S. epidermidis* не обнаружено. Анализ полирезистентности среди *Staphylococcus* показал, что устойчивость сразу к 7 препаратам не выявлена, к 6 препаратам резистентность была у 4,6% штаммов, к 5 препаратам – у 5,4%, к 4 препаратам – у 5,8%, к 3 – у 14,2%, к 2 – у 23,2% штаммов. Таким образом, более половины (63,2%) штаммов *S. epidermidis* обладают полирезистентностью, а 46,8% проявили устойчивость только к одному препарату.

Изоляты *S. aureus* проявили чувствительность к цефтриаксону (52,6%) и цефотаксиму (45,8%). Устойчивость к левофлоксацину составила 42,4%. Уровень устойчивости *S. aureus* к бензилпенициллину составил суммарно 95,2% (1,5% штаммов – умеренно-резистентные, 93,7% – резистентные), что ненамного выше, чем уровень устойчивости штаммов *S. epidermidis*. Азитромицин показал меньшую активность, его устойчивость составила 64,6%, из которых 1,7% штаммов – умеренно-резистентные и 62,9% – резистентные, что на 14,7% ниже, чем у штаммов *S. epidermidis*. При оценке полирезистентности выделенных штаммов *S. aureus* выявлено, что все 74 штамма обладают полирезистентностью: до 30% к 2 АБП, до 20% – к 3 и 4 АБП, к 5 АБП устойчивы до 5%, к 6 и 7 АБП – 1,5% штаммов.

Выводы. На основании проведенных исследований выявлена высеваемость из мокроты пациентов с бронхолегочной патологией отделения профессиональной аллергологии и иммунореабилитации клиники института стафилококков, резистентных к группе пенициллинов и макролидов. Полирезистентных изолятов *S. aureus* выявлено больше, чем у штаммов *S. epidermidis* (соответственно 71,7 и 63,2%). Для проведения рациональной химиотерапии необходима обоснованность применения антибиотиков, что возможно при использовании микробиологических методов исследования и исключении бесконтрольного применения антибиотиков.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Чувствительность к антибактериальным препаратам стрептококков различных видов в многопрофильном стационаре г. Москвы

Глушкова Е.В.¹, Кайтуков А.О.¹, Никитин Н.В.¹, Дымент Е.А.¹, Крыжановский В.Г.², Салмина Т.А.², Брико Н.И.¹

¹ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация;

²ГБУЗ г. Москвы «Городская клиническая больница №67 им. Л.А.Ворохобова» ДЗМ, Москва, Российская Федерация

Существует более 160 различных видов стрептококков. Наибольшее медицинское значение имеют *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae* и *Streptococcus*

pneumonia. В последние годы повышенное внимание уделяется и другим видам стрептококков.

Цель работы. Оценить частоту выделения стрептококков в разных отделениях многопрофильного стационара г. Москвы и определить их чувствительность к наиболее часто используемым антибиотикам.

Материалы и методы. Результаты получены на основании анализа данных историй болезни (4027) и результатов лабораторных обследований пациентов ГКБ №67 г. Москвы за период 2017–2022 гг. Выделено и изучено на чувствительность к антибиотикам 1724 культуры стрептококка.

Результаты. Наибольшее число положительных результатов микробиологических исследований на стрептококки было отмечено в отделениях гнойной хирургии (1950) и колопроктологии (1828). В отделении гнойной хирургии наибольшая доля из всех выделенных стрептококков принадлежала *S. pyogenes* (28,53%), *S. agalactiae* (22,0%), в отделении колопроктологии – *S. anginosus* (41,66%). Культуры *S. pyogenes* в отделении гнойной хирургии обладали высокой устойчивостью к тетрациклину – 65,5% (95% ДИ 58,6–72,9), умеренной устойчивостью к эритромицину – 42,3% (95% ДИ 37,1–48,3), хлорамфениколу – 33,1% (95% ДИ 28,2–38,5) и клиндамицину – 16,9% (95% ДИ 13,2–21,0). Выявлено 9 культур *S. pyogenes*, резистентных к пенициллину (2017 г. – 2,2%, 2020 г. – 2,9%, 2021 г. – 1,8%, в 2022 г. – 2,8%). *S. agalactiae* проявлял высокую устойчивость к тетрациклину – 77,9% (95% ДИ 73,3–81,97), эритромицину – 31,7% (95% ДИ 26,26–37,75) и клиндамицину – 48,9% (95% ДИ 43,77–54,23). В отделении колопроктологии у *S. anginosus* отмечается умеренная устойчивость к клиндамицину – 11,2% (95% ДИ 8,421–14,74).

Заключение. Отмечена неодинаковая частота выделения стрептококков различных видов в отделениях многопрофильной больницы. Изучение устойчивости стрептококков к антимикробным препаратам показало нецелесообразность использования тетрациклина и эритромицина для лечения пациентов в отделении гнойной хирургии.

Особенности лабораторной диагностики туляремии в зависимости от формы заболевания

Гнусарева О.А., Сирица Ю.В., Васильева О.В., Курчева С.А., Зайцева О.А., Ткаченко Н.О., Волынкина А.С.

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

Осложнение эпидемиологической ситуации по туляремии в Ставропольском крае (СК) в 2022 г. связано с активизацией природного очага туляремии на фоне увеличения численности мелких млекопитающих и возникновения эпизоотии. На территории СК зарегистрировано 76 больных туляремией из 14 районов и г. Ставрополя. Инфицирование происходило при употреблении сырой водопроводной воды, при разделке зайцев, добытых на охоте, при контакте с предметами контаминированными выделениями грызунов. Анализ клинко-эпидемиологических данных больных туляремией

показал, что главным образом преобладали язвенно-бубонная и ангинозно-бубонная формы заболевания.

Цель работы: сравнение эффективности методов лабораторной диагностики для лабораторного подтверждения диагноза при различных клинических формах туляремии.

Для обнаружения маркеров возбудителя туляремии в образцах клинического материала использовали иммуносерологические методы: реакция агглютинации (РА), реакция непрямой агглютинации/реакция торможения пассивной гемагглютинации (РНГА/РТПГА), иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Выполнено лабораторное исследование на наличие маркеров возбудителя туляремии клинического материала от больной с ангинозной формой туляремии, заражение которой произошло водным путем. Материал был отобран на 5-е сутки от начала заболевания. При иммуносерологическом исследовании сыворотки крови антитела не обнаружены, что связано с ранним обращением в лечебное учреждение. Методом ПЦР обнаружена ДНК возбудителя туляремии в мазке с миндалин (Ct 22,2). В связи с выявлением в мазке ДНК возбудителя туляремии лабораторно подтвержден диагноз «туляремия», рекомендовано исследование парных сывороток на наличие антител к возбудителю туляремии через 7–10 суток. После получения положительных результатов в ПЦР пробе мазка с миндалин биологическим методом изолирована культура *Francisella tularensis*.

Язвенно-бубонная форма характеризуется наличием первичного поражения на месте входных ворот инфекции. У охотника при госпитализации на 14-е сутки от начала заболевания отобран клинический материал (сыворотка крови, струп раны). Кровь исследовали методами РА и РНГА/РТПГА (реакция торможения непрямой гемагглютинации). Получен сомнительный результат, т.е. антитела выявлены, но в низких титрах. Методом ИФА выявили специфические антитела класса IgM (133 ед./мл) и IgG (35 ед./мл). Методом ПЦР исследовали струп на наличие ДНК *F. tularensis*. В результате обнаружена ДНК возбудителя туляремии (Ct 24,5). На основании ИФА и ПЦР подтвержден лабораторный диагноз «туляремия». Методом биопробы из первичного аффекта изолирована культура *F. tularensis*.

Рекомендовано исследование клинического материала (мазок с миндалин) методом ПЦР на 1–5-е сутки от начала заболевания, пробы первичного аффекта – на 7–14-е сутки.

Формирование биопленок штаммами *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli* в зависимости от состава питательных сред

Годовалов А.П., Шиканова Е.С.

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

В настоящее время признано, что более 80% заболеваний протекают с участием биопленкообразующих микроорганизмов, что отражается как на клиническом течении, так

и на эффективности лечения. Среди факторов, определяющих формирование биопленок, выделяют доступность веществ, обеспечивающих синтетическую активность микроорганизмов.

Цель исследования. Оценить влияние состава питательных сред на формирование биопленок штаммами *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*.

Материалы и методы. В исследовании использовали штаммы *S. aureus* ATCC 25923 и *E. coli* M17; питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), сахарный бульон (СБ) и пептонную воду (ПВ). Биопленки формировали в плоскостных полистироловых планшетах в течение 24 ч при 37 °С. По завершении инкубации пленки окрашивали кристаллическим фиолетовым для детекции их массы (O'Toole et al., 1998). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре PowerWaveX (США). Статистическая обработка данных проводилась с использованием t-критерия. За пороговый уровень значимости принимали $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. Установлено, что *S. aureus* формируют наиболее выраженную биопленку в МПБ ($1,919 \pm 0,061$ у.е.) и менее толстую – в СБ и ПВ ($0,704 \pm 0,036$ и $0,853 \pm 0,101$ у.е. соответственно; $p < 0,05$ при сравнении с пробами в МПБ). Штаммы *E. coli* более толстую пленку образовывали в ПВ ($1,039 \pm 0,013$ у.е.), чем в МПБ и СБ ($0,582 \pm 0,033$ и $0,639 \pm 0,024$ у.е. соответственно; $p < 0,05$ при сравнении с пробами в ПВ). При этом в МПБ пленка *S. aureus* была статистически значимо больше, чем таковая у *E. coli* ($p < 0,05$), а в ПВ толщина пленок этих штаммов существенно не различалась ($p > 0,05$).

Ранее показано, что сальмонеллы при снижении концентрации пептона более быстро формируют выраженную биопленку (Speranza et al., 2011). Более того, выявлено, что при культивировании в ПВ у псевдомонад повышается устойчивость к окислительному стрессу (Hostacká et al., 2007). С другой стороны, вероятно, для *S. aureus* МПБ более оптимален для формирования биопленок, т.к. углеводы СБ требуют усиления метаболической активности, что проявляется снижением синтеза компонентов биопленки (Moormeier et al., 2017; Guo et al., 2022).

Заключение. В целом на формирование биопленок штаммами *S. aureus* и *E. coli* оказывает влияние состав питательных сред и в первую очередь содержание пептона.

Антибиотикорезистентность *escape*-микроорганизмов, выделенных из мочи пожилых пациентов стационара г. Ростов-на-Дону

Голошва Е.В., Маркова К.Г., Полищук И.С.

ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Целью данного исследования явилось изучение устойчивости к антимикробным препаратам (АМП) *escape*-микроорганизмов, выделенных из мочи пожилых пациентов одного из многопрофильных стационаров города Ростова-на-Дону.

Бактериологические исследования производились в соответствии с общепринятыми методическими указаниями. Идентификация микроорганизмов осуществлялась с помощью масс-спектрометрического анализа MALDI-TOF (Bruker, Германия). Определяли чувствительность 335 штаммов условно-патогенных микроорганизмов, выделенных из мочи пожилых больных урологическими заболеваниями, к 9 АМП диско-диффузионным методом: меропенему (Mer), цефуроксиму (Cfc), цефтриаксону (Cta), цефепиму (Cpm), ципрофлоксацину (Cip), амикацину (Ak), фурадонину, комбинациям ампициллин/сульбактам (Amp/Sb), амоксициллин/клавуланат (Am/Cl).

Результаты. В ходе исследования мочи пациентов были выделены: стафилококки и условно-патогенные энтеробактерии (УПЭБ) у 100% пациентов, неферментирующие грамотрицательные бактерии (НГОБ) – 75%, энтерококки – 30%, коринебактерии – 19%. Обсемененность мочи была высокой: 10^3 – 10^8 КОЕ/мл. Было отмечено широкое видовое разнообразие коагулазоотрицательных видов стафилококков (*S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. hominis*, *S. saprophyticus*, *S. simulans*, *S. warneri*, *S. cornii*, *S. kloosii*, *S. pasteurii*, *S. arlettae*, *S. capitis*). *Staphylococcus aureus* были выделены в 16% случаев. Среди УПЭБ, выделенных из мочи пациентов, доминировали штаммы *Escherichia coli* с различной ферментативной активностью (57,2% случаев). Остальные УПЭБ были представлены видами: *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus hirae*, *Raoultella ornithinolytica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*. НГОБ были представлены многочисленными видами следующих родов: *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Weeksella*, *Achromobacter*, *Brevundomonas*. Частота встречаемости резистентных к АМП штаммов составила от 30 до 95,4%. Штаммы золотистых стафилококков (70–90%) были устойчивы к цефалоспорином (Cfc, Cta, Cpm), фторхинолонам (Cip), защищенным пенициллинам (Am/Cl, Amp/Sb). От 50 до 95,4% штаммов УПЭБ обладали устойчивостью к цефалоспорином II–III поколения, 57,1–90,9% – к цефалоспорином IV поколения (Cpm), 57,1–90,9% – к защищенным пенициллинам (Am/Cl, Amp/Sb), 100% изолятов – к нитрофуранам. Штаммы НГОБ обладали выраженной полиантибиотикорезистентностью и проявляли устойчивость к нескольким группам АМП: цефалоспорином (Cfc, Cta, Cpm) (66,7–92,8% штаммов), фторхинолонам (Cip) (57,1–83,3%) защищенным пенициллинам (Am/Cl, Amp/Sb) (66,7–85,7%), а также группе карбапенемов (Mer) (39–78,6%). Для большинства (40–90%) штаммов, выделенных из мочи, сохранялась чувствительность к препаратам групп аминогликозидов (Ak) и карбапенемов (Mer).

Заключение. Штаммы escape-микроорганизмов, выделенные из мочи пожилых пациентов, обладали выраженной полиантибиотикорезистентностью более чем к двум группам АМП. Препаратами выбора оставались аминогликозиды и карбапенемы. Вызывает настороженность высокая резистентность в отношении цефепима (цефалоспорин IV поколения), являющегося препаратом резерва для урологических больных.

Применение MVLST-анализа для поиска предкового генотипа эволюционной линии В вида *Bacillus anthracis*

Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Тимофеев В.С.

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

Возбудитель сибирской язвы *Bacillus anthracis* за свою недолгую эволюционную историю поделился на три эволюционные линии – А, В и С, разбившиеся на более мелкие *can*SNP-группы. Генетически наиболее разнообразна и наиболее распространена в мире линия А. Линия С представлена лишь немногочисленными штаммами. Линия В занимает в этом отношении промежуточное положение. До недавнего времени считалось, что основной ареал распространения этой линии – страны альпийского региона. Однако недавние исследования показали, что она широко представлена в Сибири. Недавно нами был предложен метод MVLST-генотипирования *B. anthracis*, основанный на анализе полиморфизма генов, кодирующих основные факторы патогенности. Мы полагаем, что применение этого метода позволяет получить результаты, дополняющие представления об эволюции вида *B. anthracis* в целом и линии В в частности.

Цель работы заключается в поиске вероятного предкового генотипа линии В *B. anthracis* и его вероятного географического региона происхождения с помощью MVLST-анализа.

Результаты. Филогенетический анализ MVLSTpXO1-генотипов (последовательности генов токсинообразования, локализованных на плазмиде pXO1) выполненный с помощью *goeBURST*-алгоритма показал, что центральный генотип линии В, связывающий эту линию с глобальной популяцией, объединяет российские штаммы группы В. Br.001/002, выделенные в Арктике и Южной Сибири, со штаммами группы В. Br.CNEVA, выделенными в Европе. Этот генотип связан с двумя генотипами группы В. Br.001/002 разного происхождения, один из которых, в свою очередь, связан с группой В. Br.Kruger африканского происхождения.

При дополнении MVLSTpXO1-анализа MVLSTpXO2-анализом, основанным на полиморфизме генов синтеза капсулы, расположенных на плазмиде pXO2, центральный генотип линии В представлен немногочисленной польско-литовской группой штаммов группы В. Br.CNEVA. От него отходят две основные сублинии. Одна из них представлена штаммами группы В. Br.CNEVA, циркулирующими в альпийском регионе, вторая – группой В. Br.001/002, связанной с центральным генотипом через штаммы арктического и сибирского происхождения. Африканские штаммы исключены из анализа из-за недостаточного качества опубликованных последовательностей их плазмиды pXO2.

Выводы. Наши результаты свидетельствуют в пользу концепции доколумбового происхождения сибирской язвы и указывают на то, что эволюция линии В географически привязана к территории северной Евразии, где происходило эволюционное разделение этой линии на группы В. Br.CNEVA и В. Br.001/002 и откуда штаммы этой линии были занесены в другие регионы.

Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю туляремии и оценка ее диагностической эффективности

Горбатов А.А., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Мочалов В.В., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф.

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

Туляремия – природно-очаговая инфекция, вызываемая бактериями *Francisella tularensis*, по своей эпидемиологической значимости относящаяся к особо опасным. Распространенность переносчиков (грызунов) в лесных и лесостепных ландшафтах, доминирующих на территории России, обусловила существование ряда природных очагов туляремии, в которых, несмотря на вакцинопрофилактику, ежегодно отмечаются спорадические и эпидемические случаи заболевания среди населения [Мещерякова И.С., 2010]. Поэтому актуальной проблемой является разработка средств для диагностики туляремии, совершенствование методов выявления антитуляремийных антител в крови у людей, применимых как для постановки предварительного диагноза, так и для оценки напряженности поствакцинального иммунитета и проведения эпидемиологического мониторинга в эндемичных районах. Работы зарубежных исследователей в последнем десятилетии указывают на эффективность применения иммуноферментного анализа (ИФА) для детекции специфических антитуляремийных антител в сыворотках крови человека [Chaignat V., 2014; Sharma N., 2014]. В Российской Федерации к началу 2023 г. коммерческие туляремийные серотесты в формате ИФА не производятся, что делает весьма актуальной задачу по их разработке.

Цель исследования. Разработать иммуноферментную тест-систему на основе антигена липополисахарида (ЛПС) туляремийного микроба для выявления специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках крови человека и провести оценку ее диагностической эффективности.

Материалы и методы. В качестве антигена использовали ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ. Исследовали сыворотки крови (76 образцов), полученные от людей, проживающих в эндемичных по туляремии районах Республики Карелия и Ульяновской области, а также 90 сывороток крови от условно здоровых доноров, не вакцинированных против туляремии и не имевших признаков данного заболевания в анамнезе. В качестве референсной тест-системы использовали коммерческий иммуноферментный набор ELISA classic *Francisella tularensis* IgG (SERION, Германия). Образцы сывороток крови анализировались в разведении 1:100. В качестве вторичных антител был использован конъюгат пероксидазы хрена с антителами кролика к иммуноглобулинам G человека.

Результаты. Получен лабораторный образец иммуноферментной тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю туляремии в сыворотках крови человека. Исследование сывороток крови с помощью ИФА-тест-

системы показало, что 25 образцов из 76 были положительными, что свидетельствует о наличии антител к возбудителю туляремии. При тестировании этих же сывороток референсной тест-системой ИФА (SERION, Германия) 26 образцов из 76 были определены как положительные. Анализ сывороток, полученных от здоровых доноров, показал отрицательные результаты при использовании обеих тест-систем. Диагностическая чувствительность опытного образца ИФА-тест-системы относительно референсной тест-системы составила 96,1%. Диагностическая специфичность ИФА-тест-системы и коммерческой тест-системы составила 100%.

Выводы. Разрабатываемая ИФА-тест-система на основе ЛПС *F. tularensis* 15 НИИЭГ позволяет с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять антитела к возбудителю туляремии в сыворотках крови людей. Данная тест-система может быть использована в лабораторной практике для контроля эффективности вакцинопрофилактики против туляремии, серологического мониторинга в эндемичных по туляремии районах, постановки предварительного диагноза. Эта тест-система полностью состоит из компонентов отечественного производства.

Работа выполнена в рамках Гранта Минобрнауки, соглашение №075–15–2019–1671 от 31.10.2019.

Частота выделения и антибиотикорезистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий в стационарах Нижнего Новгорода

Гординская Н.А., Борискина Е.Б., Шкуркина И.С.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

Проанализирована этиологическая структура и фенотип антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных процессов различной локализации у пациентов ряда нижегородских медицинских организаций за 2022 г. Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с использованием коммерческих наборов «ЭНТЕРОтест 24», «НЕФЕРМтест 24», «СТАФИтест 24» (Erba Mannheim, Чехия). Видовую идентификацию изолятов *Acinetobacter baumannii* подтверждали с помощью детекции генов видоспецифических β-лактамаз группы OXA-51 методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием коммерческих наборов «Ампли Сенс MDR A.b. – OXA-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Фенотип устойчивости к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера–Хинтона (XiMedia) с дисками Bioanalyse (Турция), определение минимальных подавляющих концентраций колистина – с помощью набора MIC Colistin (Erba Mannheim, Чехия).

По результатам анализов количество грамотрицательных микроорганизмов почти в 5 раз превышало численность

грамположительных возбудителей. При этом *A. baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* вместе составляли четвертую часть (25,7%) от общего числа грамотрицательных бактерий. Количество выделенных штаммов *A. baumannii* за отчетный период было в 1,9 раза больше, чем *P. aeruginosa*.

Результаты анализа антибиотикорезистентности показали, что 82,1% *P. aeruginosa* и 83,4% *A. baumannii* обладали множественной лекарственной устойчивостью, т.е. были устойчивы к представителям трех и более классов антибиотиков. 83,0% штаммов *P. aeruginosa* фенотипически были устойчивы к пенициллинам, половина изолятов были резистентны к цефалоспорином с антисинегнойной активностью – цефепиму и цефтазидиму. Две трети штаммов *P. aeruginosa* были, однако, чувствительны к цефтазидиму/авибактаму. Имипенем был активен в отношении 10,0% штаммов, меропенем – 38,0%, а при тестировании дорипенема 84,8% штаммов находились в категории умеренно резистентных. Амикацин и тобрамицин проявляли *in vitro* высокую активность – к амикацину были чувствительны 79,8% штаммов *P. aeruginosa*, к тобрамицину – 82,1%, максимальная эффективность отмечена у колистина, обнаружен только один устойчивый штамм. Показана также высокая антибиотикорезистентность *A. baumannii*, 79,2% проанализированных штаммов были устойчивы к аминогликозидам, 73,7% – к триметоприму/сульфаметоксазолу, 76,9% – к карбапенемам, 82,9% – к фторхинолонам. Пять штаммов *A. baumannii* (4,1%) имели фенотип панрезистентных, устойчивых к представителям всех классов антибиотиков, включая полимиксины. Таким образом, в отношении *A. baumannii* и *P. aeruginosa* необходим тщательный микробиологический мониторинг для назначения адекватной антимикробной терапии.

Характеристика планктонных и биопленочных культур клинических штаммов *Candida auris*

Горемыкина Е.А.¹, Слукин П.В.¹, Мицевич И.П.¹, Детушев К.В.¹, Мухина Т.Н.¹, Храмов М.В.¹, Круглов А.Н.², Фурсова Н.К.¹

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

²ГБУЗ г. Москвы «Московский многопрофильный клинический центр «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы», Москва, Российская Федерация

Цель. Изучение фенотипических и молекулярно-генетических свойств планктонных и биопленочных культур клинических штаммов *Candida auris*.

Материалы и методы. Штаммы *C. auris* ($n = 11$), выделенные из крови и мочи пациентов, получены из ГБУЗ ММКЦ «Коммунарка» Департамента здравоохранения г. Москвы в 2022 г. Видовую идентификацию микроорганизмов осуществляли на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Референс-штамм *C. auris* CBS10913 (F-2035) получен из коллекции «ГКПМ-Оболенск». Формирование биопленок оценивали тинкториальным методом по наличию ростовых трубок у клеток дрожжей в окрашенных мазках.

Чувствительность к антимикотикам амфотерицину В (АМФ) и флуконазолу (ФЛК), а также к дезинфицирующим средствам хлориду бензалкония (БХ), хлоргексидину (ХГ), молочной кислоте (МК) и N, N-бис(3-аминопропил)-додециламину (ТА) для планктонных культур определяли методом микро-разведений (EUCAST ESCMID 6.0), для биопленочных культур – методом аппликации (Слукин и соавт., 2014). Экстракцию ДНК осуществляли СТАВ-методом. RAPD-ПЦР-типирование проводили с помощью «случайных» праймеров 1247 и OPA11 (Zimmer et al., 2003). Электрофореграммы анализировали с помощью программы GelJ 2.0 (Chem. Nutr. Res. Gr., Catalonia, Spain) методом UPGMA на основе коэффициента Дайса. К одному RAPD-типу относили штаммы, сходство электрофореграмм которых составляло >70%.

Результаты. Подтверждена видовая идентификация всех штаммов *C. auris* ($n = 11$). Все они формировали биопленки на плотной питательной среде через 24 ч. Планктонные культуры всех штаммов были чувствительны к ХГ, БХ, МК и ТА. К ФЛК были устойчивы все штаммы, а к АМФ – 1 штамм. Биопленочные культуры всех штаммов были чувствительны только к ТА, а ко всем остальным препаратам – устойчивы. RAPD-типирование выявило принадлежность всех штаммов *C. auris* к одному RAPD-типу (I), а контрольного штамма – к другому (II).

Вывод. Выявлено генетическое сходство изучаемых клинических штаммов *C. auris*. Показано, что в планктонной форме эти штаммы чувствительны ко всем использованным дезинфицирующим средствам, а также к амфотерицину (кроме 1 штамма), в то время как в форме биопленок они устойчивы ко всем антимикробным препаратам, кроме N, N-бис(3-аминопропил)-додециламина. Полученные данные важны для оценки эпидемиологической ситуации и выбора стратегий контроля инфекций, вызванных патогенными кандидами.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Инновационные направления в деятельности микробиологической лабораторной службы по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Краснодарского края

Гречаная Т.В.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае», Краснодар, Российская Федерация

В Российской Федерации на протяжении последних лет реализуется стратегическая задача для сохранения здоровья нации и снижения уровня смертности, обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

Основным документом государства для реализации поставленной задачи явился указ президента Российской Федерации от 09.10.2007 №1351 «Об утверждении концепции демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года».

В соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СанПиН 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней» одной из важных задач является биологическая безопасность государства, в т.ч. в период подготовки и проведения массовых мероприятий, в т.ч. с международным участием, и оценка противозидемической готовности к проведению мероприятий в случае возникновения или завоза болезней, вызывающих чрезвычайные ситуации.

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и недопущения распространения инфекции при осуществлении эпидемиологического надзора, в соответствии с Федеральным законом «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.1999 №52, основными принципами микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» является разработка конкретных мероприятий с целью планирования мер по их минимизации, в т.ч. реализация проблемы обеспечения биологической безопасности в соответствии с «Основами государственной политики в области обеспечения биологической безопасности Российской Федерации».

При чрезвычайных ситуациях природного и техногенного характера, а также являющихся результатом террористических актов (с применением биологических агентов II–IV групп патогенности, бактериальной и вирусной природы), возникает опасность эпидемического проявления инфекционных болезней.

Применение ускоренных методов исследований (иммуноферментный анализ (обнаружение Ig), метод разделенного импеданса, метод иммунофлюоресцентного фермент-связанного анализа, полимеразная цепная реакция (выявление РНК, ДНК)) позволяет сократить время для предварительного анализа.

Одной из важнейших задач в условиях эпидситуации (пандемии) является генетический анализ циркулирующих вирусов. Полногеномное секвенирование вирусов важно не только для отслеживания их изменчивости, но и понимания динамики их распространения по регионам России, давая при этом возможность определить путь их попадания на территорию нашей страны.

В 2022 г. отделение молекулярно-биологических исследований микробиологической лаборатории провело молекулярно-генетический мониторинг штаммов возбудителя новой коронавирусной инфекции, циркулирующих на территории Российской Федерации.

В настоящее время молекулярно-биологические методы востребованы также для обнаружения мутаций, обуславливающих резистентность возбудителей инфекционных заболеваний к антибактериальным и противовирусным препаратам, при контроле качества и безопасности продуктов питания.

Иммунобиологическая активность микробной ассоциации бактерий и дрожжей

Гурина С.В., Ананьева Е.П., Тихомирова О.М.

Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Для профилактики и лечения дисбиозов, острых и хронических кишечных заболеваний наряду с пробиотическими препаратами перспективны средства, полученные на основе симбиотической ассоциации бактерий и дрожжей. Профилактическое и лечебное действие таких продуктов связано с антагонистической активностью микробных клеток, входящих в их состав, синтезом витаминов, ферментативной активностью, стимуляцией иммунной системы. Примерами таких природных ассоциаций являются кефирные зерна, «тибетский рис».

В работе исследовано действие компонентов микробной ассоциации «тибетский рис» и напитка, полученного на его основе, на функции макрофагов, которые участвуют в реакции врожденного и приобретенного иммунитета.

Природная ассоциация «тибетский рис» содержит молочнокислые, уксуснокислые бактерии и дрожжи, объединенные полисахаридным матриксом, и представляет собой симбиотическое образование в виде зерен. Зерна культивировали в специальной питательной среде в течение 3 суток, затем отделяли от жидкой фракции, которая содержала клетки и биологически активные метаболиты.

Изучали влияние клеток зерен, жидкой фракции и компонентов клеток (комплексов клеточных стенок) зерен на функции перитонеальных макрофагов мышей. Использовали разные способы введения мышам указанных фракций и клеток: пероральное (кормление) и внутрибрюшинное. Функциональную активность макрофагов определяли по показателям, моделирующим стадии фагоцитоза (хемотаксис, фагоцитоз убитых нагреванием клеток дрожжей *Candida albicans*).

При пероральном введении клеток зерен и жидкой фракции наблюдали повышение значений изучаемых показателей на 35-е сутки кормления (в 3 раза по сравнению с контролем), с сохранением эффекта до 60 суток (отмена кормления). Более выраженный стимулирующий эффект установлен при кормлении жидкой фракцией по сравнению с действием клеток.

Для внутрибрюшинного введения получали комплексы клеточных стенок зерен. Для этого зерна дезинтегрировали ультразвуком и получали фракцию, содержащую растворимые полисахариды и компоненты клеточных стенок микроорганизмов, входящих в состав ассоциации. Полученную фракцию растворяли в стерильном физиологическом растворе и вводили внутрибрюшинно белым беспородным мышам в концентрациях 0,05; 0,1; 0,5; 1 мг/мл, в объеме 1 мл. Значение показателей оценивали на 5-е сутки.

Комплексы клеточных стенок и полисахариды активно стимулировали изучаемые показатели функциональной активности макрофагов, их значение превышало уровень контроля (при введении физиологического раствора) в 2–6 раз.

Таким образом, показано, что компоненты микробной ассоциации «тибетский рис» стимулировали функции макрофагов – одного из клеточных компонентов иммунной системы – при пероральном и парентеральном введении.

Изучение патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории Волгоградской области в 2022 г.

Гусев Е.А., Герасимова А.Д., Галкина А.Ю., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Ежегодное изучение патогенных свойств новых штаммов возбудителей арбовирусных инфекций позволяет обнаруживать высоковирулентные варианты. Согласно исследованиям, проведенным ранее сотрудниками Волгоградского научно-исследовательского противочумного института, все штаммы вируса Западного Нила (ВЗН), выделенные на территории Волгоградской области в 2018–2022 гг., относились ко второму генотипу. Изоляты ВЗН, выделенные в 2018 г., относились к так называемому «волгоградскому» геноварианту 2-го генотипа. Штаммы вируса, выделенные в 2021 и 2022 гг., относились к ранее не отмечаемому на территории России геноварианту ВЗН 2-го генотипа и представляли обособленную группу («новый» геновариант).

В связи с этим целью работы являлось изучение патогенных свойств штаммов ВЗН 2-го генотипа, выделенных на территории Волгоградской области в 2022 г., по сравнению с таковыми штаммов, циркулировавших в 2018–2021 гг.

Эксперименты были проведены на модели лабораторных белых мышей (возраст 8–10 нед., вес 20–22 г), содержащихся в стандартных условиях вивария на обычном пищевом рационе со свободным доступом к воде и корму. В работе использованы штаммы ВЗН, выделенные на территории Волгоградской области в 2022 г. (Volgograd_565/22, Volgograd_911/22, Volgograd_912/22). Мышей заражали внутримышечно, объемом 100 мкл, инфицирующая доза составляла от 10^1 до 10^6 БОЕ, учитывали гибель животных в течение 21 дня; вычисляли средние величины показателей летальности, выполняли статистическую обработку данных и рассчитывали LD_{50} по Керберу в модификации И.П.Ашмарина и А.А.Воробьева.

Ранее были получены результаты по определению показателей вирулентности для штаммов ВЗН, выделенных в 2018 и 2021 гг. Средние значения LD_{50} для штаммов ВЗН, циркулировавших в 2018 г., составили $1,0 \cdot 103,5$ БОЕ, в 2021 г. – $1,0 \cdot 105,4$ БОЕ, в 2022 г. – $1,0 \cdot 104,4$ БОЕ. Летальность животных при их заражении штаммами ВЗН, выделенными в 2018 г., составила 64,67%, в 2021 г. – 38,4%, в 2022 г. – 36,0%. Анализ полученных результатов выявил, что показатели летальности для лабораторных животных аналогичны для штаммов ВЗН, выделенных в Волгоградской области в 2021 и 2022 гг., но статистически значимо (крите-

рий Манна–Уитни) отличаются от значений для штаммов ВЗН, циркулировавших в 2018 г. Это может быть связано со сменой доминирующего геноварианта ВЗН 2-го генотипа и мутациями в геноме вируса.

Таким образом, в ходе проведенного исследования статистически значимых изменений по изучаемым параметрам для штаммов ВЗН, циркулировавших на территории Волгоградской области в 2022 г., по сравнению с показателями для штаммов ВЗН 2021 г. не выявлено.

Работа выполнена в рамках НИР 099–3–21.

Микробиом – двуликий Янус: источник фармакологических ингредиентов и резервуар генов лекарственной устойчивости

Даниленко В.Н.

ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова» РАН, Москва, Российская Федерация

Микробиом кишечника – первый барьер, воспринимающий стрессовые сигналы, демпингующий и адаптирующий их для передачи в головной мозг. Микробиота человека, животных и растений – источник фармакологически активных ингредиентов и генетических ресурсов для их получения [Даниленко В.Н. и соавт., 2022]. Микробиом кишечника, состоящий из множества микроорганизмов, играет важную роль в поддержании здоровья человека. Он выполняет функции пищеварения, иммунной защиты и синтеза определенных витаминов.

Микробиота человека является эволюционно обусловленной фундаментальной основой иммунитета и резервом адаптации к неблагоприятным воздействиям окружающей среды. Нарушение взаимоотношений между хозяином и его микробиотой, возникшее в результате различных экзо- и эндогенных факторов, в первую очередь стрессовых, приводит к возникновению дисбаланса в композиции микробиоты с резким сокращением числа полезных бактерий. Длительное нарушение микробного баланса кишечника играет важную роль в развитии ослабленного иммунитета, дисфункций центральной нервной системы и различных эндокринных органов и, как следствие, приводит к возникновению различных сердечно-сосудистых, аутоиммунных и психических заболеваний [Averina O.V. et al., 2020]. Микробиота кишечника обеспечивает организм-хозяин множеством преимуществ, включая защиту кишечника, поглощение энергии и питательных веществ и защиту от вирусных заболеваний. Кроме того, помимо различий, которые наблюдались на уровне кишечной микробиоты у здоровых и больных людей, интервенционные исследования подтверждают, что модуляция микробиома кишечника приводит к изменению когнитивных функций [Danilenko V.N. et al., 2021]. Одним из многообещающих путей улучшения когнитивных процессов у людей может быть модулирование микробиоты кишечника человека.

Микробиом также может влиять на эффективность лекарственных препаратов и их метаболизм в организме. Гены

лекарственной устойчивости, присутствующие в микробиоме кишечника, играют ключевую роль в этом процессе. Лекарственная устойчивость представляет собой способность микроорганизмов выживать и размножаться при наличии лекарственных препаратов, которые обычно предназначены для их уничтожения или контроля. Эта устойчивость может быть наследуемой или приобретенной в процессе эволюции. Гены лекарственной устойчивости кодируют белки, которые могут изменять структуру или функцию мишеней лекарственных препаратов, что делает их менее эффективными или бесполезными. Микробиом кишечника содержит разнообразные микроорганизмы, включая бактерии, археи, вирусы и грибы. Эти организмы обмениваются генетической информацией путем горизонтального переноса генов, что позволяет им быстро адаптироваться к изменяющимся условиям и вызывает возникновение лекарственной устойчивости. Некоторые гены лекарственной устойчивости могут быть общими для различных видов микроорганизмов, в то время как другие могут быть специфичными для определенных видов или штаммов. Гены лекарственной устойчивости в микробиоме кишечника человека могут влиять на эффективность лекарственных препаратов, принимаемых пациентами. Например, они могут кодировать ферменты, метаболизирующие лекарственные вещества, делая их менее активными или неактивными. Это может привести к неудачному лечению инфекций или требовать более высоких доз препаратов для достижения терапевтического эффекта. Кроме того, гены лекарственной устойчивости в микробиоме кишечника могут взаимодействовать с препаратами, вызывая нежелательные побочные эффекты или ухудшая эффективность лекарственной терапии. Некоторые микроорганизмы могут иметь гены, которые разрушают или изменяют структуру лекарственных препаратов, прежде чем те достигнут своей цели. Это может привести к непредсказуемому ответу на лекарственное воздействие и усложнить выбор оптимальной терапии. Понимание генов лекарственной устойчивости в микробиоме кишечника человека становится все более важным в медицинской практике. Исследования в этой области позволяют разрабатывать новые стратегии лечения, которые учитывают влияние микробиома на лекарственную терапию.

Сегодня установлена корреляция в композиции микробиомом (дисбиозис) практически со всеми известными заболеваниями: онкологическими, кардиологическими, аутоиммунными, эндокринологическими и неврологическими [Morton J.T., ..., Danilenko V.N. et al., 2023]. В течение последнего десятилетия в лаборатории генетики микроорганизмов Института общей генетики РАН интенсивно проводятся исследования микробиома кишечника человека и разрабатываются препараты на его основе с нейромодулирующей, иммуномодулирующей и антиоксидантной активностью.

Определение активности и стабильности полисахарид-деполимеразы Dep_kpv74 при различных значениях pH и температуры

Денисенко Е.А., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В.

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

Деполимеразы являются структурными ферментами адсорбционного аппарата бактериофагов, обеспечивающими специфическое связывание фага с полисахаридами капсулы (КПС), экзополисахаридами (ЭПС) или липополисахаридами и расщепляющими повторяющиеся звенья полисахарида. Деполимеризация КПС или ЭПС лишает инкапсулированные бактерии одного из основных факторов вирулентности и делает более восприимчивыми к противомикробным агентам и к системе иммунной защиты хозяина.

Цель настоящей работы – изучение активности и стабильности деполимеразы Dep_kpv74, расщепляющей полисахариды *Klebsiella pneumoniae* капсульного типа K2, при различных значениях pH и температуры.

Деполимеразу Dep_kpv74 выделяли из полученного ранее штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21 (DE3) /pET22b-kpv74, выращенного в жидкой питательной среде с индукцией ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид). Очистку проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии с последующим диализом и лиофилизацией. Для оценки pH-зависимой стабильности фермент Dep_kpv74 растворяли в буферах с pH 3,24; 5,22; 7,00 и 9,21 и инкубировали 30 мин при 37 °C. Для оценки термостабильности деполимеразу инкубировали в 50 мМ буфере Na₂HPO₄-Na₂HPO₄ (pH 7,4) при температуре от 8 до 65 °C. После обработок серийные двукратные разведения растворов деполимеразы наносили на газон клеток *K. pneumoniae* KPi1627, инактивированных хлороформом, и определяли максимальное разведение, при котором на бактериальном газоне образовывался полупрозрачный ореол. Активность деполимеразы определяли как обратный титр (ОТ), равный наибольшему двукратному разведению, при котором наблюдали обнаруживаемый полупрозрачный ореол на бактериальном газоне. Серийные разведения выполняли максимально до 1:218. Эксперименты проводили в трех повторах.

Результаты проведенных экспериментов показали, что белок Dep_kpv74 проявляет максимальную активность при значениях pH от 7,0 до 9,0 (ОТ = 217). При pH 5,0 активность снижается умеренно (ОТ = 214), а при pH 3,0 – существенно (ОТ = 22). Эти данные согласуются с результатами других исследований, сообщающих об оптимальной стабильности *K. pneumoniae*-специфичных деполимераз в слабощелочных условиях.

В тесте на термостабильность деполимераза Dep_kpv74 проявляла оптимальную активность в диапазоне температур от 25 до 40 °C (ОТ = 217). При температурах 8 и 50 °C активность деполимеразы несколько снижалась (ОТ = 214 и 212 соответственно). При более высоких температурах активность фермента снижалась значительно. Так, при температуре 65 °C активность деполимеразы снижалась до значе-

ния ОТ = 210 в течение 1 мин. Тем не менее остаточная активность деполимеразы сохранялась при этой температуре через 30 мин инкубации (ОТ = 22).

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Обоснование выбора штамма чумного микроба для получения бактериальных теней

Дентовская С.В., Вагайская А.С., Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Мазурина Е.М., Анисимов А.П.

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

Одним из наиболее перспективных базовых носителей в составе модульных вакцин являются «бактериальные тени» (БТ) – пустые оболочки клеток грамотрицательных бактерий, лишенные цитоплазматического содержимого, но сохраняющие все неизменные морфологические и структурные особенности их живых предшественников, что нацеливает их непосредственно на первичные антигенпрезентирующие клетки. Кроме того, БТ обладают адьювантными свойствами и индуцируют усиленный гуморальный и клеточный иммунный ответ.

Целью работы стал подбор штамма-продуцента чумного микроба и генов лизиса для получения БТ чумного микроба.

Одним из недостатков вакцин на основе БТ является то, что в полученных препаратах могут оставаться жизнеспособные нелизированные бактериальные клетки. Поэтому в качестве основы для получения бактериальных теней использовали два аттенуированных штамма чумного микроба: *Yersinia pestis* KM218, бесплазмидный производный вакцинного штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ, лишенный области пигментсорбции, и *Y. pestis* KM260 (12), бесплазмидный производный штамма *Y. pestis* 231, обладающий областью пигментсорбции. Штаммы лишены трех резидентных плазмид, что сопровождается отсутствием синтеза ряда кодируемых белков, включая небезопасные для вакцинированного организма активатор плазминогена (Pla) и «мышинный» токсин, а также ряд незащищающих балластных антигенов, например *Pst*, *YopE* и др. Для снижения общей реактогенности препаратов БТ сконструировали два штамма – *Y. pestis* KM218ΔlpxM и *Y. pestis* KM260 (12) ΔlpxM, дефектные по синтезу лаурилтрансферазы LpxM, что приводило к синтезу менее токсичного пентаацелированного липополисахарида. Потерю двух основных иммунодоминантных антигенов *F1* и *LcrV* чумного микроба в дальнейшем компенсировали путем введения в препарат очищенных рекомбинантных белков. Также для получения БТ была выбрана литическая плаزمиды pEYR'-E-Y-K, несущая в себе комбинацию гена E из бактериофага λ и генов холин-эндолизинной системы из чумного диагностического фага Л-413С. Данную плазмиду трансформировали в штаммы-кандидаты, наработку препаратов БТ проводили путем термоиндукции генов лизиса.

В ходе создания рекомбинантной полигостальной чумной вакцины изучена индукция гуморального иммунитета и про-

тективная активность изолированных препаратов бактериальных теней на основе штаммов *Y. pestis* KM218ΔlpxM/pEYR'-E-Y-K и *Y. pestis* KM260 (12) ΔlpxM/pEYR'-E-Y-K, а также указанных препаратов в смеси с иммунодоминантными антигенами *F1* и *LcrV*. *Y. pestis* после двукратной подкожной иммунизации беспородных мышей и морских свинок. Показана сопоставимая способность препаратов стимулировать продукцию IgG и более низкие защитные свойства бактериальных теней на основе штамма *Y. pestis* KM218ΔlpxM/pEYR'-E-Y-K для морских свинок.

Таким образом, штамм *Y. pestis* KM260 (12) ΔlpxM/pEYR'-E-Y-K выбрали в качестве основы для получения препарата БТ, включенного в состав вакцины чумной трехкомпонентной.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Индикация продукции эксфолиативного токсина А у клинических штаммов *Staphylococcus aureus* методом времяпролетной масс-спектрометрии на масс-спектрометрах серии Microflex Bruker

Детушев К.В., Скрыбин Ю.П., Абаев И.В.

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

Эксфолиативный дерматит – тяжелое инфекционное поражение кожи новорожденных, представляющее собой злокачественный вариант пузырчатки, этиологическим агентом которого является эксфолиативный токсин А *Staphylococcus aureus*. На сегодняшний день, отсутствуют доступные тест-системы, предназначенные для определения продукции эксфолиативного токсина А, что осложняет борьбу с эпидемическими штаммами *S. aureus*.

Цель исследования: подбор условий для индикации продукции эксфолиативного токсина А методом времяпролетной масс-спектрометрии, на масс-спектрометрах серии microflex производства Bruker, клинических штаммов *S. aureus*, возбудителей эксфолиативного дерматита.

Материалы и методы. Исследовали клинические штаммы *S. aureus* с подтвержденной продукцией эксфолиативного токсина А, выделенные на территории Российской Федерации, а также референсные штаммы *S. aureus* MW2 и *S. aureus* USA300TCH1516 в качестве контрольных. Бульонные культуры *S. aureus*, культивировали в статических условиях 24 ч при 37 °С. После инкубации получали супернатанты, из которых осаждали белки. Далее белки перерастворяли в 70%-м водном растворе муравьиной кислоты и 100% ацетонитрила, смешивали с раствором матрицы синапиновой кислоты и наносили на ячейку мишени. Затем, образцы исследовали методом времяпролетной масс-спектрометрии. Одновременно проводили разделение полученных белков в полиакриламидном геле. Полосу в области 28,5 kDa вырезали и проводили стандартную процедуру вы-

деления трипсинизированных фрагментов белка, после чего, проводили исследование на масс-спектрометре и идентификацию по в базе данных Mascot Server.

Результаты. Исследованные эпидемические штаммы *S. aureus*, возбудители эксфолиативного дерматита, относились к трем разным клональным комплексам – 8, 15, 121. У всех исследованных клинических штаммов *S. aureus*, кодирующих гены эксфолиативного токсина А (eta+), наблюдали пик в области 28,5 kDa. У контрольных штаммов *S. aureus* MW2 (eta-) и *S. aureus* USA300TCH1516 (eta-), а также клинического штамма *S. aureus* CC121 (eta-), пик в области 28,5 kDa отсутствовал. Полученные результаты масс-спектрометрии полностью коррелировали с наличием или отсутствием последовательности гена эксфолиативного токсина в геноме штаммов *S. aureus*.

В результате идентификации трипсинизированных фрагментов белка, выделенных из полоски полиакриламидного геля, методом времяпролетной масс-спектрометрии и идентификации в базе данных Mascot Server установили, что данный белок является эксфолиативным токсином А.

Выводы. На основании полученных результатов, можно сделать вывод о применимости метода времяпролетной масс-спектрометрии для быстрого и экономически целесообразного тестирования штаммов *S. aureus* на наличие продукции эксфолиативного токсина А, на широко распространенных в РФ масс-спектрометрах серии Microflex Bruker.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

CRISPR-Cas-системы в клинических изолятах *Klebsiella pneumoniae*

Детушева Е.В., Кисличкина А.А., Скрыбин Ю.П., Фурсова Н.К.

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

Klebsiella pneumoniae – госпитальный патоген, вызывающий инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи, разной локализации. Высокий уровень устойчивости к антимикробным препаратам является серьезной проблемой во всем мире. Одним из методов борьбы с резистентными бактериями является разработка программируемой стратегии, способной различать даже близкородственные микроорганизмы и позволяющей контролировать состав микробной популяции. РНК-управляемая «иммунная система» CRISPR-Cas бактерий – один из кандидатов для реализации этой стратегии. Такой подход открывает в отдаленной перспективе возможность разработки антимикробных препаратов нового поколения для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными патогенами.

Цель исследования: характеристика CRISPR-Cas-систем в клинических штаммах *K. pneumoniae*.

Материалы и методы. Штаммы *K. pneumoniae* ($n = 87$) выделены от пациентов нейрореанимации г. Москвы в 2014–2020 гг. Полногеномное секвенирование штаммов осуществляли в системе Illumina. Сборку геномов осуществляли

с помощью программного обеспечения Unicycler v. 0.4.7. Биоинформатический анализ проводили в программах Vector NTI10, Mauve, LaserGene 11 и веб-ресурса BLAST. Аннотированные геномы размещали в базе данных NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v. 6.4 and v. 6.5. Скрининг геномов на наличие массивов CRISPR и генов cas проводили в программе CRISPRCasFinder.

Результаты. CRISPR-Cas-системы идентифицированы в 25 (29%) из 87 изолятов *K. pneumoniae*. В 12 из 25 штаммов они отнесены к подтипу IE*, причем в 9 из них присутствовали 2 массива CRISPR, а в остальных – по одному. В 13 из 25 штаммов CRISPR-Cas-системы отнесены к подтипу IE. Показано, что большинство CRISPR-Cas-позитивных штаммов *K. pneumoniae* (11 из 25) принадлежали к сиквенс-типу ST23, характерному для эволюционной ветви гипервирулентных клебсиелл, причем 10 штаммов несли CRISPR-Cas-системы подтипа IE*, а один штамм – подтипа IE. Менее представленными оказались штаммы ST39 и ST147 (по 5 из 25 штаммов). Все эти штаммы имели CRISPR-Cas-системы подтипа IE. Остальные были отнесены к ST2174, ST5159, ST218 и ST15. Отмечено, что CRISPR-Cas-системы не обнаружены ни в одном из штаммов *K. pneumoniae* ST395, занимающих второе место по представленности среди изучаемых штаммов (15 из 87 штаммов) после ST23 (16 из 87 штаммов).

В целом в геномах 25 CRISPR-позитивных штаммов идентифицировано 268 спейсеров, из которых 143 были уникальными, а 125 – общими как минимум с одним спейсером в другом штамме. Отмечено, что штаммы подтипа IE имели наибольшее количество спейсеров. У двух штаммов все спейсеры были уникальными, тогда как остальные 23 штамма имели спейсеры, общие с другими штаммами. Для этих штаммов установлено, что последовательности спейсеров были гомологичны последовательностям бактериофагов или плазмид, размещенных в базе данных GenBank.

Выводы. Таким образом, показано, что CRISPR-Cas-системы достаточно широко распространены среди клинических штаммов *K. pneumoniae*, причем их распространение ассоциировано с клонами высокого риска, такими как ST23, ST39 и ST149.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Оценка антимикробной активности и возможности формирования устойчивости к секнидазолу у возбудителей бактериального вагиноза

Детушева Е.В.¹, Кукес И.В.², Фурсова Н.К.¹

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

²АНО «Международная ассоциация клинических фармакологов и фармацевтов», Москва, Российская Федерация

Бактериальный вагиноз (БВ) занимает ведущее место в структуре гинекологической патологии и представляет

собой серьезную проблему общественного здравоохранения для женщин репродуктивного возраста, их потомства и их партнеров, поскольку это заболевание связано с неблагоприятными последствиями для репродуктивного здоровья, такими как воспалительные заболевания органов малого таза, выкидыши, преждевременные роды, а также повышенный риск приобретения и передачи вируса иммунодефицита человека. Кроме того, для БВ характерны высокие показатели рецидивирования, в связи с чем необходима своевременная и точная диагностика, а также эффективные методы лечения.

Цель исследования. Изучение антимикробного действия и динамики формирования устойчивости к секнидазолу у бактерий-возбудителей БВ.

Материалы и методы. Препарат исследования – секнидазол (Hunan Jiudian Hongyang Pharmaceutical Co., LTD, KHP), препарат сравнения – метронидазол (Hunan Jiudian Hongyang Pharmaceutical Co., LTD, KHP). Культуры возбудителей БВ *Gardnerella vaginalis* DSM 4944 и *Atopobium vaginae* DSM 15829 получены из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Антимикробную активность препаратов определяли методом серийных разведений в бульоне. Динамику формирования устойчивости к препаратам изучали, пассируя культуры бактерий в жидкой питательной среде со ступенчато возрастающими концентрациями антимикробных препаратов.

Результаты. Проведено исследование антимикробной активности препарата секнидазол против ключевых возбудителей БВ *G. vaginalis* и *A. vaginae*. Показано, что при сравнении с традиционно применяемым для лечения БВ метронидазолом (минимальная подавляющая концентрация (МПК) для *G. vaginalis* – 125 мг/л, *A. vaginae* – 2 мг/л), секнидазол (МПК для *G. vaginalis* – 31 мг/л, *A. vaginae* – 2 мг/л) проявлял более высокий уровень активности против исследуемых видов бактерий. Анализ динамики формирования устойчивости к препаратам метронидазол и секнидазол у штаммов бактерий-возбудителей БВ показал, что наиболее выраженный процесс адаптации наблюдался у штамма *A. vaginae* к метронидазолу (14 пассажей, МПК 8 мг/л, увеличение в 4 раза). При формировании устойчивости к секнидазолу исследуемые штаммы *G. vaginalis* и *A. vaginae* не приобрели устойчивости к тестируемому препарату при длительном (42 суток) совместном культивировании бактерий в присутствии препарата.

Выводы. Полученные результаты свидетельствуют о том, что секнидазол обладает низким потенциалом для формирования устойчивости у *G. vaginalis* и *A. vaginae* при длительном и многократном применении препарата. Секнидазол может быть высокоэффективен при лечении БВ, вызванного бактериями *G. vaginalis* и *A. vaginae*.

Изменение спектра возбудителей респираторных инфекций в Рязанской области в период распространения коронавирусной инфекции

Евдокимова О.В., Настевич Ю.А., Боброва Т.П.

ФГБОУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. акад. И.П.Павлова» Минздрава России, Рязань, Российская Федерация;
ГБУ РО «Консультативно-диагностический центр», Рязань, Российская Федерация

Цель исследования. Оценить изменения в спектре возбудителей инфекций нижних дыхательных путей у больных с различными патологиями респираторного тракта в период распространения коронавирусной инфекции.

Материалы и методы. В период с 2018 по 2022 г. проведено микробиологическое исследование 8374 образцов мокроты от пациентов с диагнозами: пневмония, острый бронхит, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмоторакс, бронхиальная астма, эмпиема, плеврит, абсцесс легкого, COVID-19. Микробиологическое исследование мокроты и идентификацию выделенных культур проводили в соответствии с действующими методическими указаниями.

Результаты. В указанные период исследования количество отрицательных результатов бактериологического и микологического исследования мокроты увеличилось с 10,9% в 2019 г. до 17% в 2022 г. Наибольшее количество отрицательных результатов регистрировалось в период эпидемического распространения SARS-CoV-2–14,2 и 17% в 2021 и 2022 гг. соответственно. Основными возбудителями инфекций с установленным этиологическим диагнозом были *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pneumoniae*, удельный вес которых в течение 5 лет оставался неизменным. Вместе с тем отмечается увеличение количества образцов мокроты с диагностически значимыми концентрациями грибов *Candida* spp. в монокультуре – с 8 до 9,5% в 2022 г. Частота выделения возбудителей кандидоза в монокультуре увеличилась с 35% в 2018 г. до 46,7% в 2022 г.

Выводы. Проведенные исследования подтверждают изменения в этиологической структуре возбудителей инфекций нижних дыхательных путей. Одна из причин увеличения частоты выделения грибов *Candida* spp. – развитие приобретенных иммунодефицитных состояний у пациентов с патологиями дыхательной системы на фоне длительной антибиотикотерапии в комплексном лечении SARS-CoV-2-инфекции и у пациентов с перенесенной коронавирусной инфекцией.

Биологические свойства природного Δ prmA мутанта *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica*

Евсеева В.В., Бахтеева И.В., Тимофеев В.С.

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

Francisella tularensis, возбудитель туляремии, делится на три подвида. Два из них – подвиды *holarctica* и *tularensis* – высокопатогенны для людей и сравнительно хорошо изучены. Третий подвид, *mediasiatica*, остается довольно загадочным. Он распространен в малонаселенных регионах Средней Азии и Сибири. До сих пор не известно ни одного случая заражения человека штаммами этого подвида, но при этом в экспериментах на лабораторных животных они сравнимы по вирулентности со штаммами наиболее вирулентного подвида *tularensis*. Генетически подвид *mediasiatica* делится на три подгруппы: MI, распространенную в Средней Азии; MII, распространенную в Сибири и наиболее генетически отличающуюся от первых двух групп; MIII, представленную на данный момент единственным штаммом 60 (Б) 57, выделенным в Узбекистане.

Цель данной работы – описать генетические и биологические свойства штамма 60 (Б) 57.

Результаты. Полногеномное секвенирование штамма 60 (Б) 57, проведенное с использованием платформ MiSeq и Nanopore, и последующая гибридная сборка полученных ридов позволили установить, что организация хромосомы этого штамма значительно отличается от таковой у типичных штаммов *F. tularensis* subsp. *mediasiatica*. Кроме того, в гене транскрипционного регулятора prmA, регулирующего в том числе экспрессию генов «островка патогенности» этого штамма, была обнаружена нонсенс-мутация. Согласно литературным данным, делетирование этого гена у вакцинного штамма *F. tularensis* LVS, а также у близкородственного организма *F. novicida* приводит к полной утере вирулентности штамма. Но при этом животные, перенесшие заражение таким штаммом, оказываются защищенными от последующего заражения вирулентными штаммами *F. tularensis* подвида *holarctica*, но не *tularensis*. Исследование вирулентных свойств штамма 60 (Б) 57 показало, что он полностью авирулентен для мышей и морских свинок в дозировке до 108 КОЕ/животное. Животные, зараженные дозами от 105 до 108 КОЕ/животное, были защищены от заражения вирулентным штаммом *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 678 через 21 день после иммунизации. Однако при увеличении временного интервала между иммунизацией и заражением эффективность иммунизации падает. Так, через 90 дней после иммунизации мыши BALB/c оказались незащищенными от заражения штаммами subsp. *mediasiatica* 678, subsp. *holarctica* 503 и subsp. *tularensis* SCHU – погибло 9 из 10 мышей в каждой группе. Среднее время гибели составило $7,8 \pm 1,5$ дня для штамма SCHU, $8,2 \pm 1,49$ дня для штамма 503 и $9 \pm 1,4$ дня для штамма 678. Для морских свинок протективность была выше – в аналогичном опыте выжили все животные, зараженные штаммами 678 и 503, но животные, зараженные штаммом SCHU, погибли.

Заключение. В целом мы можем сказать, что штамм 60 (Б) 57 обладает вакцинными свойствами, но гораздо слабее в плане протективности, чем вакцинный штамм 15 НИИЭГ. Поэтому рассмотрение штаммов subsp. *mediasiatica* Δ prmA в качестве гипотетической замены штамма 15 НИИЭГ или LVS вряд ли целесообразно. Единственным преимуществом штамма 60 (Б) 57 являются, видимо, сниженная реактогенность и высокая безопасность применения, обусловленные низкой вирулентностью штамма. С крайней осторожностью мы можем предположить, что подобные штаммы можно было бы использовать при необходимости вакцинации людей, которым противопоказана вакцинация существующей вакциной, например ввиду возраста или иммунного статуса.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Генетические особенности клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae* и выявление микроцинов

Евсеева М.А.¹, Авдеева В.А.¹, Багирова Н.С.², Григорьевская З.В.², Петухова И.Н.², Кисличкина А.А.¹, Слукин П.В.¹, Сизова А.¹, Светоч Э.А.¹, Фурсова Н.К.¹, Хохлова О.Е.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация; ²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

В Российской Федерации, как и во всем мире, *Klebsiella pneumoniae* является актуальным госпитальным патогеном и вызывает широкий спектр патологий у человека; входит в группу ESKAPE. Бактериоцины – антимикробные пептиды, продуцируемые бактериями с узким спектром действия. Микроцин E492 (MscE492) – порообразующий низкомолекулярный бактериоцин, 8 kDa, продуцируется штаммами *K. pneumoniae*, в т.ч. относящимися к гипервирулентным штаммам; обладает активностью против представителей семейства *Enterobacteriaceae*.

Штаммы *K. pneumoniae* выделены из клинического материала от пациентов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, депонированы в Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Идентификацию проводили на приборе MALDI-TOF Biotyper (Bruker, Германия). Чувствительность к антибиотикам определяли на приборе Vitek 2 Compact (BioMérieux, Франция) и методом серийных разведений в бульоне. Методом полимеразной цепной реакции выявляли гены антибиотикорезистентности (*bla*OXA-48, *bla*CTX-M, *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*KPC, *bla*VIM, *bla*NDM, *intl1*, *intl2* и *ompK36*) и вирулентности (*rmpA*, *iroN*, *iroD*, *uge*, *wabG*, *kfu*, *fimH*, *allS* и *allR*). Полногеномное секвенирование проводили на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, США). Скрининг штаммов на наличие микроцинов проводили методом двухслойной среды.

В качестве индикаторного штамма использовали *Escherichia coli* C600 ATCC 23724, в качестве контрольных – *E. coli* BS-1 и BS-2. Бактерии культивировали на среде Мюллера–Хинтон с 0,7% глюкозы (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) и среде М9 с глюкозой. Поиск генов микроцинов в полногеномных последовательностях штаммов *K. pneumoniae* осуществляли с помощью веб-ресурсов BLAST и BAGEL4.

Штаммы *K. pneumoniae* в 92,3% случаев отнесены к MDR; у 38,5% штаммов выявлена комбинация 2–4 генов резистентности. Интегроны класса 1 с генными кассетами (750–2200 п.н.) выявлены у 69,2 и 53,1% штаммов соответственно. Штаммы *K. pneumoniae* отнесены к генетическим вариантам ST 14, 1393, 86, 147, 395, 15, 48, 23, 380, 1079, 395; в геномах выявлены гены антибиотикорезистентности: *blaSHV-106,11,33,1*, *blaCTX-M-15,55*, *blaTEM-1B,1A*, *blaOXA-1,9*, *blaNDM-1*, *blaLAP-2*, *blaKPC-3*, *aac(6′)-Ib-cr*, *aadA16*, *aph(3′′)-Ib*, *ant(2′′)-Ia*, *aph(3′)-VI*, *acrR (K201M, P161R, F172S, L195V, R173, F197I)*, *fosA*, *ARR-3*, *tet(A)*, *oqxA*, *oqxB*. У 100% штаммов *K. pneumoniae* выявлены 3 гена вирулентности (*uge*, *wabG*, *fimH*), у 76% – 4 гена (*+allS*), у 38% – 5 генов (*+kfu* или *rmpA*). Проанализированы 106 полных геномов клинических штаммов *K. pneumoniae*, в 15 из них (ST380, ST23) идентифицированы полноразмерные опероны микроцина E492, 14 из них фенотипически выявлялись в отношении индикаторного штамма. При проверке активности микроцинов в отношении клинических штаммов *K. pneumoniae* ($n = 10$) установлено, что у 2 штаммов, имеющих в геноме оперон микроцина E492, в отношении штамма KR470/22 (ST395) зона задержки роста составила 2–3 мм. Клинические штаммы *K. pneumoniae* устойчивы к антибактериальным препаратам за счет снижения проницаемости наружной мембраны, разрушения или модификации антибиотика, эффлюкса; обладают значительным генетическим внутривидовым разнообразием; перспективны для выявления микроцинов.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Использование транскриптомного анализа для изучения ответа возбудителя холеры на воздействие тяжелых металлов

Евтеев А.В., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Темякова С.В., Ковалевич А.А., Герасименко А.А.

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

Холера, из-за способности возбудителя менять генотип и формировать новые патогенные варианты, сохраняет угрозу для общественного здравоохранения. Тяжелые металлы (ТМ) во внешней среде представляют серьезную опасность для здоровья человека. Одним из наиболее потенциально опасных ТМ является кадмий, привлекающий внимание исследователей не только как токсический агент, но и как фактор, приводящий к изменению свойств микроорганизмов.

Процесс загрязнения окружающей среды ТМ характерен и для нашей страны. Так, в составе донных отложений реки

Дон идентифицирован ряд ТМ, включая кадмий. Проблема влияния кадмия, присутствующего во внешней среде, на возбудителя холеры практически не изучена.

Цель работы – проведение транскриптомного анализа для изучения влияния кадмия на экспрессию генов на модели нетоксигенного штамма холерного вибриона.

Обработку РНК вибриона штамма *Vibrio cholerae* 20000 ДНКазой проводили коммерческим набором DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, США). Реакцию обратной транскрипции выполняли с помощью набора M-MuLV ProtoScript II Reverse Transcriptase (New England Biolabs, Inc, Англия). Секвенирование производили на платформе Illumina MiSeq набором для подготовки библиотек ДНК Illumina DNAPrep (Illumina Inc, США).

В результате проведенного транскриптомного анализа штамма *V. cholerae* 20000 в контрольных пробах (без кадмия) была выявлена экспрессия 938 генов, которые можно было разделить на три группы: не изменяющие свою активность, индуцируемые и репрессированные. Воздействие кадмия вызвало существенную перестройку метаболизма, что проявилось в изменении уровня экспрессии у 151 гена. При этом изменения носили разнонаправленный характер: у 61 гена экспрессия увеличилась, а у 90 генов снизилась.

Для оценки изменения уровня индукции генов использовали следующий подход. К группе с низким уровнем индукции относили гены, у которых уровень экспрессии был выше в 1,1–2,0 раза (42 гена); со средним уровнем – возрастание экспрессии в 2,1–3,0 раза (10 генов); с высоким уровнем – повышение экспрессии в 3,1 и более раз (10 генов). Для оценки ингибции экспрессии разделение было следующим: низкий уровень ингибции – снижение экспрессии до величины 0,9–0,7 (22 гена), средний уровень – 0,7–0,5 (11 генов), высокий уровень ингибции – <0,5 (57 генов).

Наибольшую индукцию при воздействии кадмия зарегистрировали для DNA-directed RNA polymerase subunit beta – показатель экспрессии 6,8, ribonuclease E – 7,8, formate C-acetyltransferase – 10,5.

По нашему мнению, необходимы дальнейшие исследования влияния ТМ на возбудителя холеры. Результаты нашего исследования демонстрируют роль кадмия как фактора, вызывающего значительную перестройку метаболизма *V. cholerae*.

Масс-спектрометрический анализ пептидов рицина для идентификации токсина в биологических образцах

Евтюхова А.Е., Сурин А.К., Rogozin M.M., Карцева А.С., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

Рицин представляет собой токсичный белок, содержащийся в семенах клещевины – *Ricinus communis*. Клещевина широко распространена по всему миру и используется в промышленных целях. Однако рицин, который можно выделить из обезжиренной клещевины после экстракции

масла, обладает чрезвычайной токсичностью, что делает его потенциальным агентом для применения в качестве биологического оружия. Помимо этого, существует риск естественных интоксикаций. Полулетальная доза для человека колеблется в диапазоне 1–3 мкг/кг массы тела. Ввиду того, что рицин обладает высокими токсическими свойствами в малых концентрациях, для его определения необходимы чувствительные и достоверные методы идентификации, позволяющие детектировать токсин при низких концентрациях.

Перспективным методом для идентификации рицина является масс-спектрометрический анализ. В частности, жидкостная tandemная масс-спектрометрия позволяет с высокой точностью и достоверностью идентифицировать белки с возможностью их количественного определения, особенно в режиме мониторинга множественных реакций (ММР).

Цель настоящего исследования – определение целевых пептидов рицина, полученных в результате ферментативного расщепления белка, и составление базы данных ММР-переходов, включающих совокупность значений m/z родительского иона и его ионов-фрагментов для идентификации рицина на масс-анализаторах широкого спектра.

Материалы и методы. Образцы рекомбинантных белков рицина, которые предварительно были визуализированы с помощью электрофореза в полиакриламидном геле, очищались от неорганических примесей. Ключевым аспектом в проведении подготовки образцов для масс-спектрометрического анализа являлся подбор протеаз, который осуществляли с использованием программ, позволяющих проводить биоинформационный анализ. В результате гидролиза длина пептидов должна соответствовать оптимальной длине, необходимой для эффективной обработки на масс-спектрометре, и находиться в диапазоне 6–20 аминокислот. В ходе анализа была выбрана протеаза трипсин, которая расщепляет пептидные связи между аргинином или лизином и другой аминокислотой, за исключением пролина. Смесь пептидов, полученных после гидролиза белков, разделяли на нанопотоковом хроматографе Easy nLC-1000 с применением колонки с обращенной фазой. Для более эффективного разделения продуктов гидролиза было увеличено время проведения хроматографии. Ионизация пептидов проводилась с помощью электроспрея в масс-спектрометре Orbitrap Elite с орбитальной ловушкой.

Результаты. Были определены значения m/z для всех ионов молекул, смываемых с колонки в каждый момент времени. Исходя из характеристик большинства масс-анализаторов, был выбран оптимальный диапазон для анализа масс-спектров – от 300 до 1600 m/z . Ионы подвергались фрагментации за счет диссоциации, активированной соударением с инертным газом. На полученных спектрах фрагментации определялись значения m/z с интенсивным сигналом. Данные анализировали с помощью программы Peaks Studio 7.5, в ходе чего было установлено соответствие свыше 75% идентифицируемых пептидов в сравнении с аминокислотной последовательностью рицина.

Выводы. Таким образом, в данном исследовании были проанализированы панорамные масс-спектры и спектры фрагментации продуктов гидролиза рицина. В ручном режи-

ме было отобрано 8 часто встречающихся пептидов. В ходе анализа были определены значения m/z родительских ионов и соответствующих им ионов-фрагментов, которые соответствовали наиболее интенсивным сигналам, представленными на масс-спектрах. Полученные результаты позволят идентифицировать рицин в составе сложных матриц и в малой концентрации.

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 1.1.14.

Нетуберкулезные микобактерии и микобактериозы в Архангельской области в 2010–2020 гг.

Елисеев П.И., Марьяндышев А.О.

ФГБОУ ВО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России, Архангельск, Российская Федерация

Введение. Нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) встречаются в окружающей среде, а отдельные виды могут вызывать заболевания (микобактериозы), схожие по клинической картине с туберкулезом. При микобактериозах, как и при туберкулезе, в материале пациента могут быть обнаружены микобактерии, что может приводить к ошибкам в диагностике и лечении. Обнаружение НТМБ, особенно однократное, не всегда говорит о наличии заболевания и требует проведения дифференциальной диагностики. НТМБ и ассоциированные заболевания регистрируются в различных регионах Российской Федерации, при этом данные по НТМБ ограничены. Мы представляем 10-летнее наблюдение за заболеваемостью и результатами лечения НТМБ в Архангельской области.

Методы. Для оценки заболеваемости и результатов лечения НТМБ в Архангельской области в 2010–2020 гг. проведено когортное ретроспективное исследование. Все пациенты, у которых микобактерии были выявлены при микроскопии и/или посевах на питательные среды с отрицательным результатом на *Micobacterium tuberculosis*, были обследованы на НТМБ. Пациентам с НТМБ, у которых были две положительные культуры и/или клинические данные, указывающие на заболевание, назначали лечение микобактериоза. Микобактериоз не регистрировался в случаях однократного обнаружения НТМБ и/или при отсутствии клинических данных.

Результаты. Микобактерии были выявлены у 3036 больных за весь период наблюдения, из них НТМБ – у 138 (4,5%) больных. *M. avium* и *M. intracellulare* были наиболее распространены и обнаружены у 56 (40%) пациентов. Также встречались следующие виды микобактерий: *M. lentiflavum* (14%), *M. fortuitum* (10%), *M. malmoense* (4%), *M. smegmatis* (4%), *M. gordonae* (4%), *M. xenopi* (3%), *M. celatum* (2%), *M. scrofulaceum* (2%), *M. abscessus* (1%), *M. interjectum* (1%), *M. chelonae* (1%), *M. genavense* (1%). Средняя выявляемость НТМБ составила 1,09 случая на 100 000 населения в год за весь период наблюдения. Микобактериоз был зарегистрирован у 67 (49%) из 138 больных, из них в 45 (67%) случаях заболевание было вызвано *M. avium* или

M. intracellulare. У 71 пациента обнаружение НТМБ расценивалось как контаминация или колонизация, и лечение не назначалось. У пациентов данной группы чаще встречались *M. lentiflavum* (24%) и *M. fortuitum* (17%). Средняя заболеваемость НТМБ составила 0,53 на 100 000 населения в год. ВИЧ-инфекция выявлена у 8 (12%) человек с микобактериозом. В большинстве случаев (90%) лечение микобактериоза включало кларитромицин, рифампицин и этамбутол. Из 67 случаев микобактериоза лечение завершено в 37 (55%) случаях, перервано – в 15 (22%), умерло от НТМБ – 8 (12%) человек, умерло от других причин – 4 (6%), покинули регион – 2 (3%), неэффективность лечения – 1 (2%).

Выводы. Выявление НТМБ важно для дифференциальной диагностики у больных с микобактериями. Диагностика и лечение НТМБ представляют трудности и требуют дальнейшего улучшения оказания помощи лицам с НТМБ.

Выявление антигенов вируса Западного Нила с помощью Dot-иммуноферментного анализа

Елхова А.В., Корсакова И.И., Яковлев А.Т.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области лабораторной диагностики лихорадки Западного Нила, создание новых тест-систем для детекции антигенов вируса в полевом и клиническом материале не утрачивает актуальности.

В нашей стране зарегистрирован набор реагентов «Иммуноферментная тест-система для выявления в исследуемых полевых образцах антигенов вируса Западного Нила БиоСкрин-ВЗН (Ag)» («АО БТК «Биосервис»), в котором реализуется классический вариант иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием специфических поликлональных антител. Тем не менее разработка альтернативных вариантов тест-систем ИФА представляет значительный практический интерес. Например, Dot-вариант иммуноферментного анализа (ДИА), отличающийся от твердофазного ИФА простотой постановки и учета результатов, экономичностью в отношении реагентов, является эффективным и удобным диагностическим методом, особенно в полевых условиях.

Цель исследования – использование Dot-иммуноферментного анализа для экспресс-обнаружения антигенов вируса Западного Нила (ВЗН).

Объектами исследования служили лизаты клеточных линий Vero, содержащие инактивированный ВЗН штаммов Volgograd_601/18, Volgograd_900/18, Volgograd_240/21, а также белковые фракции, полученные в результате хроматографической очистки этих образцов. Всего было изучено 15 антигенных препаратов.

В качестве первичных антител использовали моноклональные антитела (МКА) С2А6, полученные к эпитопам инактивированного антигена ВЗН штамма СН1ЕN-1. Диагностические антитела против IgG (H+L) белой мыши,

меченные пероксидазой (ФБУН «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ), применяли как конъюгат для ДИА.

Для постановки реакции на нитроцеллюлозную мембрану Supported Nitrocellulose Membrane (Bio-Rad Laboratories, США) с размером пор 0,45 мкм наносили по 3 мкл соответствующего антигена, затем последовательно обрабатывали МКА и конъюгатом. На завершающем этапе вносили субстрат – тетраметилбензидин. Учет реакции производили через 20–30 мин визуально. При положительных результатах регистрировали наличие пятен голубого цвета различной интенсивности.

Все антигенные препараты дополнительно выявляли тест-системой «БиоСкрин-ВЗН (Ag)».

При применении МКА в ДИА было выявлено 14 (93%) положительных образцов из 15, в то время как в ИФА-тест-системе положительная реакция отмечена для 5 (33,3%) проб, в числе которых были клеточные лизаты, содержащие ВЗН, и одна из хроматографических фракций с наибольшей концентрацией белка. Мы предполагаем, что в нашем эксперименте метод ДИА оказался эффективным за счет использования МКА. Однако в исследуемом материале была достаточно низкая нагрузка по количеству вирусного белка (~0,5 мг/мл), что могло повлиять на чувствительность и специфичность коммерческой тест-системы.

Таким образом, показана возможность применения Dot-иммуноферментного анализа на основе МКА для обнаружения антигенов ВЗН в исследуемом материале.

ПЦР-РВ – важный инструмент в решении проблемы деструктивной пневмонии у детей

Елькина М.А.¹, Яцышина С.Б.¹, Беседина М.В.², Толстова Е.М.², Зайцева О.В.², Хаспеков Д.В.³, Турищев И.В.³

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация;

³ГБУЗ «Детская городская клиническая больница святого Владимира ДЗМ», Москва, Российская Федерация

Деструктивная пневмония (ДП) – тяжелая форма внебольничной пневмонии с расплавлением легочной ткани и образованием полостей. Основными возбудителями ДП у детей являются *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus*. По данным Всемирной организации здравоохранения, с 2022 г. наблюдается рост инвазивных инфекций, вызванных *Streptococcus pyogenes*. Респираторные вирусы, преимущественно вирусы гриппа, способствуют развитию повреждения легких. Для проведения этиологической диагностики используют различные лабораторные методы. Один из наиболее быстрых и доступных – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ).

Цель исследования – установить этиологию ДП у детей. Задачи: 1) определить и охарактеризовать этиологический

агент; 2) сравнить результаты ПЦР-РВ и бактериологического исследования.

Биологический материал от 23 детей (1–12 лет, средний возраст $5,8 \pm 2,9$ года), госпитализированных в 2021–2023 гг. с диагнозом ВП с рентгенологически подтвержденными деструктивными изменениями, исследовали бактериологическим методом (жидкость бронхоальвеолярного лаважа (ЖБАЛ), содержимое плевральной полости и кровь) и методом ПЦР-РВ (ЖБАЛ, содержимое плевральной полости) с применением наборов реагентов «АмплиСенс®» («Пневмоквант-FL» (выявляющий ДНК *S. pneumoniae* и *Haemophilus influenzae*), «*Streptococcus pyogenes*-скрин/монитор-FL», «MRSA-скрин-титр-FL», «*Influenza virus A/B*-FL», «ОРВИ-скрин-FL», «COVID-19-FL», «*Enterovirus*-FL»), лабораторных методик для выявления ДНК *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и определения серотипов *S. pneumoniae* (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора).

Методом ПЦР-РВ обнаружили ДНК: *S. pyogenes* – у 11 (48%) пациентов (у трех из них выделили культуру из содержимого плевральной полости); *S. pneumoniae* – у 10 (43%) (у двух из них выделили культуру из содержимого плевральной полости и крови соответственно); *H. influenzae* – у 3 (13%) (культуру не выделили). Все образцы, из которых выделены культуры *S. pyogenes* и *S. pneumoniae*, были также положительны в ПЦР-РВ. У 3 пациентов полученные при посеве ЖБАЛ культуры охарактеризовали как стрептококки группы Viridans, однако по результатам ПЦР-РВ образцы содержали ДНК *S. pneumoniae*. В 2 случаях *S. pyogenes* обнаружили в сочетании с *S. pneumoniae*, в одном – с *H. influenzae*. РНК вируса гриппа А (H3N2) выявлена у 3 пациентов (в 2 случаях – в ассоциации с *S. pneumoniae* и *H. influenzae*). У 1 пациента в качестве единственного возбудителя обнаружен коронавирус HCoV-NL63. У 90% штаммов *S. pneumoniae* определили серотип. Чаще (66%) встречался 3-й, наиболее вирулентный серотип. На серотипы 1, 19А и 23 приходилось по 1 случаю. Обнаруженные серотипы входят в состав вакцины «Превенар® 13».

Применение ПЦР-РВ позволило установить этиологию 91% случаев ДП у детей. Обнаружение серотипов *S. pneumoniae*, входящих в состав вакцин, говорит о необходимости вакцинации, особенно детей младшего возраста. Ранняя диагностика на амбулаторном этапе с использованием ПЦР-РВ (для определения ДНК условно-патогенных бактерий – в количественном формате) позволит избежать таких тяжелых осложнений.

Резистентность к фторхинолонам бактерий *Bacillus cereus complex*, выделенных из аэрозолей атмосферного воздуха

Емельянова Е.К.^{1,2}, Андреева И.С.¹, Пучкова Л.И.¹, Сафатов А.С.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

Мониторинг биологической составляющей в аэрозолях атмосферного воздуха ведется в ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора с 1998 г. Отбор образцов аэрозолей осуществляется как из приземных слоев воздуха, так и высотных в ходе самолетного зондирования атмосферы над территорией Сибири. Изучению подлежали выделенные в разные периоды из аэрозолей воздуха представители цереусной группы бактерий. Микроорганизмы, относящиеся к *Bacillus cereus*, являются условными патогенами и способны вызывать пищевые токсикоинфекции, системные и местные гнойные инфекции; встречаются на поверхности свежих овощей, в сушеных специях и травах, ухудшают качество и приводят к порче пищевых продуктов. Согласно EUCAST, одним из эффективных средств против представителей болезнетворных штаммов *B. cereus* являются фторхинолоны второго (ципрофлоксацин) и третьего (левофлоксацин) поколений, при этом входящие в перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов. Исследования в различных странах мира в течение последних 5 лет обозначили проблему возникновения резистентных к ним спорообразующих бактерий.

Цель работы – изучить чувствительность представителей *B. cereus* и других бактерий цереусной группы к левофлоксацину и цiproфлоксацину.

Первый период исследования антибиотикорезистентности осуществлялся в 2005–2006 гг. (13 штаммов), второй – в 2015–2016 гг. (12 штаммов), третий – в 2021–2022 гг. (38 штаммов). Определение чувствительности проводили диско-диффузионным методом согласно EUCAST, версия 13.0 для *Bacillus* spp. (ципрофлоксацин Ч ≥ 50 , Р <23, левофлоксацин Ч ≥ 50 , Р <23) с применением дисков производства «НИЦФ» (Россия). В результате не обнаружено ни одного штамма бактерий цереусной группы, чувствительного к данным антибиотикам по критериям EUCAST, версия 13.0. К левофлоксацину в образцах 2005–2006 гг. устойчивыми были 23,07% штаммов, с промежуточной устойчивостью – 76,92%; в образцах 2015–2016 гг. устойчивых – 83,33%, с промежуточной устойчивостью – 16,66%; в образцах 2021–2022 гг. устойчивых – 45,52%, с промежуточной устойчивостью 54,4%. К цiproфлоксацину в образцах 2005–2006 гг. устойчивыми были 38,46% штаммов, с промежуточной устойчивостью – 61,53%; в образцах 2015–2016 гг. устойчивых – 41,66%, с промежуточной устойчивостью – 58,33%; в 2021–2022 гг. исследование не проводили. Обнаружено повышение устойчивости к антибиотикам фторхинолоновой группы

у бактерий цереусной группы в течение последних 15–16 лет, особенно ярко выраженное для левофлоксацина, по-видимому, связанное с его широким применением.

Благодарности: Олькину С.Е., Буряк Г.А., Охлопковой О.В. за отбор проб атмосферных аэрозолей. Работа выполнена в рамках Государственных заданий Роспотребнадзора (№№14–18, 11–21 и др.).

Чувствительность к рифампицину природных изолятов кокков из аэрозолей атмосферного воздуха

Емельянова Е.К.^{1,2}, Андреева И.С.¹, Пучкова Л.И.¹, Ребус М.Е., Сафатов А.С.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация

Увеличение доли резистентных к антибиотикам кокков создает проблему сужения выбора препаратов для лечения инфекционных заболеваний. Объектом исследования являлись сапрофитные и патогенные кокки, выделенные из приземных и высотных проб (500–7000 м) аэрозолей воздуха Сибири в результате многолетнего мониторинга состава жизнеспособных микроорганизмов атмосферы, проводимого ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Цель работы – оценка чувствительности выделенных из атмосферы кокков к рифампицину. Антимикробная активность рифампицина известна по отношению к *Staphylococcus aureus* (в т.ч. к MR+), *Streptococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus viridans*, поэтому он применяется отдельно или в сочетании с другими антибиотиками в качестве средства терапии заболеваний, вызываемых антибиотикорезистентными кокками.

Определение чувствительности проводили диско-диффузионным методом с применением дисков производства «НИЦФ» (Россия). Согласно EUCAST, версия 13.0, для кокков пограничные значения диаметров зон считаются $P < 21$ –26 мм в зависимости от вида.

В период 2010–2011 гг. исследовано 214 природных изолятов кокков, изолированных из высотных и наземных атмосферных аэрозолей, из них 23% способны к гемолизу. В разных пробах от 3 до 5% штаммов-гемолитиков дополнительно обладали фибринолитической или плазмокоагуляционной активностью. В период 2021–2022 гг. исследовано 89 природных изолятов кокков, из них гемолитических 32% (13% являлись α -гемолитиками, 19% – β -гемолитиками), коагулазоположительных 10%.

Доля резистентных к рифампицину кокков среди штаммов, выделенных в период 2021–2022 гг., составила 9,2%, в то время как десятилетием ранее этот показатель был 3,6%. Обнаруженное повышение устойчивости к рифампицину у природных изолятов кокков из аэрозолей воздуха за десятилетний период в 2,5 раза отражает общемировую

тенденцию роста антибиотикорезистентности микроорганизмов.

Благодарности: Олькину С.Е., Буряк Г.А., Охлопковой О.В. за отбор проб атмосферных аэрозолей. Работа выполнена в рамках Государственных заданий Роспотребнадзора (№№14–18, 11–21 и др.).

Частота встречаемости устойчивости к дезинфицирующим средствам у антибиотикорезистентных изолятов *Micobacterium tuberculosis*

Еремеева Н.И.^{1,2}, Скорняков С.Н.¹, Гончар А.С.²

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, Екатеринбург, Российская Федерация;

²Институт дезинфектологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана» Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Micobacterium tuberculosis – возбудитель туберкулеза (ТБ), широко распространенной инфекции в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения, треть населения земного шара инфицировано микобактериями туберкулеза (МБТ). В мире ежегодно до 10 млн человек заболевают туберкулезом, до 1,2 млн умирают от туберкулеза и еще до 208 тыс. умирают от ко-инфекции ТБ/ВИЧ.

Проблему общественного здравоохранения усугубляет распространение возбудителя туберкулеза с множественной и широкой лекарственной устойчивостью во всем мире. Обеззараживание объектов госпитальной среды с использованием дезинфицирующих средств (ДС) могло бы стать действенным барьером на пути появления и распространения нозокомиального туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Однако публикации последних лет демонстрируют наличие резистентности у МБТ, в т.ч. и с МЛУ, к воздействию ДС.

Целью настоящего исследования было определить частоту встречаемости устойчивости к ДС у *M. tuberculosis* с МЛУ.

Материалы и методы. В исследование были включены: 1) 46 изолятов МБТ с устойчивостью как минимум к изониазиду и рифампицину, т.е. с МЛУ; 2) ДС, зарегистрированные в установленном порядке и разрешенные к применению в России, со следующим составом действующих веществ: кислород-активное ДС (перекись водорода – 30,0%; ЧАС – 2,5%), хлор-активное ДС (натрия дихлоризоцианурат – 0,90%) и ДС на основе катионных поверхностно-активных веществ (КПАВ) №1 (ЧАС – 25,0%; АМИН – 6,0%; ГУАНИД – 1,0%) и КПАВ №2 (ЧАС – 5,0%; АМИН – 5,5%), в соответствующих туберкулоцидных режимах применения согласно Руководству Р 4.2. 3676–20. Критерием резистентности изолята МБТ с МЛУ к воздействию дезинфицирующих средств считали наличие устойчивости по крайней мере к одному из испытанных туберкулоцидных режимов применения дезинфицирующего средства в 3 повторностях.

Результаты. Количество резистентных изолятов МБТ с МЛУ к кислород-активному ДС составило 28 из 43 изоля-

тов МБТ; к хлор-активному ДС – 5 из 46 изолятов МБТ; к ДС КПАВ №1–6 из 46 изолятов МБТ; к ДС КПАВ №2–35 из 43 изолятов МБТ.

Заключение. Наибольшая частота встречаемости устойчивых изолятов МБТ с МЛУ определена как 81,4% к воздействию ДС на основе КПАВ №2, далее в порядке убывания следуют: 65,1% – к кислород-активному ДС, 13,0% – к КПАВ №2 и 10,8% – к хлор-активному ДС. Таким образом, высокая частота встречаемости устойчивости МБТ к ДС разных химических групп может существенно усугублять эпидемическую ситуацию, т.к. увеличивает риск трансмиссии антибиотикорезистентного возбудителя туберкулеза в условиях медицинских организаций.

Омиксные технологии в изучении вирулентности возбудителя чумы

Ерошенко Г.А.¹, Балыкова А.Н.¹, Коврижников А.В.¹,
Конанов Д.Н.², Сперанская А.С.², Лукина-Гронская А.В.²,
Ильина Е.Н.²

¹ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб»
Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация;

²ФБУН «Научно-исследовательский институт системной
биологии и медицины» Роспотребнадзора, Москва,
Российская Федерация

Штаммы *Yersinia pestis* основного и неосновных подвидов значительно отличаются по вирулентности и эпидемической значимости. Причины высокой и универсальной вирулентности основного подвида в сравнении с избирательной вирулентностью неосновных подвидов до сих пор остаются неустановленными. Их выявление важно для определения молекулярных основ высокой патогенности и пандемического потенциала возбудителя чумы. На современном этапе исследований эта проблема может быть решена с использованием омиксных технологий.

Для выяснения причин различий в вирулентности между основным и неосновными подвидами возбудителя чумы проведено секвенирование и гибридная сборка геномов с помощью длинных ридов, полученных на платформе PromethION24 (Oxford Nanopore), и парноконцевого полногеномного секвенирования на платформе DNBSEQ-G400RS для 5 высоковирулентных штаммов античного (ветвь 0.ANT5) и средневекового биоваров (2.MED1) основного подвида и 6 авирулентных для человека штаммов гиссарского (0.PE4h), таласского (0.PE4t) и алтайского (0.PE4a) биоваров центральноазиатского подвида *Y. pestis*. Гибридную сборку, сравнительный анализ осуществляли с помощью авторских подходов, с использованием python v3.10 и биоинформатических программ (Guppy, minimap2 v2.26, unicycler v 0.5.0, snippy 4.6., paraslonik/orthosnake).

Анализ корового генома изученных штаммов выявил 235 SNPs-замен, отличающих штаммы основного и неосновного подвида, из них: 75 SNPs локализованы в межгенном пространстве, 44 – синонимичны, 111 приводят к миссенс-мутации и 5 – к нонсенс-мутации. По результатам сравнительного анализа генов основных факторов патогенности возбудителя чумы (система секреции III типа, рН6- и F1-антигены, система транспорта железа, мышинный токсин,

активатор плазминогена, пестицин), а также предполагаемых факторов вирулентности значимые отличия между подвидами выявлены в генах *katG*, *mntH*, *ail*, *ompF*, *cysZ*, *oprD*. Сравнение ортологичных генов по данным выполненных гибридных сборок 11 штаммов основного и неосновных подвидов и взятых из NCBI GenBank позволило выявить варианты 10 генов, которые отличаются у этих подвидов. В дальнейшем будет исследовано влияние найденных мутаций на механизмы проявления вирулентности у разных подвидов возбудителя чумы.

Полученные результаты будут использованы для исследования изменчивости ключевых компонентов генных сетей, отвечающих за реализацию вирулентности у подвидов *Y. pestis* с разной эпидемической значимостью, а выявленные отличия между ними – для повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического мониторинга очагов чумы.

Сохранение жизнеспособности *Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* в смешанных биопленках с морскими бактериями в условиях долгосрочного культивирования

Еськова А.И., Яковлев А.А., Щелканов М.Ю.

«НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова»
Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

Экологические проблемы, связанные с загрязнением морской среды и потеплением климата, создают благоприятные условия для проникновения и выживания патогенных бактерий в морских экосистемах. Эти микроорганизмы вступают в межвидовые конкурентные или синергидные взаимодействия с морскими бактериями. В настоящее время характер взаимоотношений патогенных бактерий в сообществах микроорганизмов, обитающих в морской среде, и механизм формирования смешанных биопленок, где патогенные микроорганизмы существуют в ассоциации с морскими сапротрофами, мало изучен, тогда как такого рода исследования являются весьма значимыми, ибо позволяют установить, в какой степени морская среда является «кладбищем» микроорганизмов или «плацдармом» для формирования эпидемических вариантов патогенных бактерий.

Цель работы. Оценить способность исследуемых бактерий (*Listeria monocytogenes*, *Yersinia pseudotuberculosis* и морские сапротрофные штаммы *Bacillus* sp. и *Pseudomonas japonica*) сохранять жизнеспособность в условиях длительного культивирования при температуре +6 °С.

Материалы и методы. Эксперимент проводился 730 суток (в течение 2 лет). Бактерии культивировались в искусственной морской воде следующего состава (г/л): NaCl – 27,5, MgCl₂ – 5, MgSO₄•H₂O, – 2, CaCl₂ – 0,5, KCl – 1, FeSO₄ – 0,001 (Youchimizu Kimura, 1976), при температуре +6 °С (средняя температура прибрежных вод Японского моря).

Результаты. В ходе проведенных экспериментов было установлено, что через 730 суток эксперимента все исследуемые бактерии сохранили жизнеспособность в условиях

долгосрочного культивирования в искусственной морской воде без добавления источника питания при +6 °С.

Из представленных в эксперименте пар смешанных биопленок обеих патогенных бактерий с морским сапротрофным штаммом *P. japonica* на 730-е сутки культивирования доминировал только один вид бактерий – *L. monocytogenes* и *Y. pseudotuberculosis*. Возможно, морской сапротрофный штамм *P. japonica* стимулировал рост и размножение патогенных бактерий, используемых в эксперименте.

Клетки *L. monocytogenes* сохранились в большей численности при совместном культивировании с сапротрофной бактерией *Bacillus* sp. в сравнении с культивированием в монокультуре ($6 \cdot 10^3 \pm 0,004$, $2 \cdot 10^2 \pm 0,003$ соответственно, $p \leq 0,05$). Стоит отметить, что динамика численности исследуемых бактерий в смешанной биопленке варьировала на протяжении всего эксперимента.

Мы предполагаем, что сохранение жизнеспособности клеток *L. monocytogenes* и сапротрофной бактерии *Bacillus* sp. без добавления источника питания может указывать на хищнические или каннибалические отношения между этими видами бактерий в биопленке в заданных условиях эксперимента.

Резистентность к антибиотикам штаммов *Escherichia coli*, выделенных из продуктов пищевого происхождения

Жамборова М.Х.^{1,2}, Хоанг Тхи Ай Ван³, Макарова М.А.^{1,2}

¹ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³Институт Пастера, Нячанг, Вьетнам

Введение. Резистентность энтеробактерий, контаминирующих пищевые продукты животного происхождения, является серьезной проблемой здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения, общее число случаев инфицирования человека устойчивыми патогенными микроорганизмами в мире неуклонно растет. Контаминация продуктов непатогенными штаммами *Escherichia coli* не приводит к возникновению острых кишечных инфекций (ОКИ), но может послужить причиной колонизации желудочно-кишечного тракта человека и при адаптации в микробиоте стать активным резервуаром генов резистентности для широкого спектра микроорганизмов.

Цель. Охарактеризовать штаммы *E. coli*, выделенные из пищевых продуктов животного происхождения, по патогенным свойствам и резистентности к антимикробным препаратам (АМП).

Материалы и методы. Изучены 185 штаммов *E. coli*, выделенные в г. Нячанг (Вьетнам) из пищевых продуктов (свинина, $n = 97$; мясо кур, $n = 88$). Скрининг на принадлежность к диареогенным *E. coli* – возбудителям ОКИ – проводили методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с набором реагентов «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL». Чувствительность к 16 АМП (ампицилли-

ну, амоксициллин/клавуланату, цефтазидиму, цефотаксиму, цефепиму, меропенему, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, стрептомицину, гентамицину, тобрамицину, амикацину, тетрациклину, хлорамфениколу, триметоприм/сульфаметоксазолу, нитрофурантоину) изучали диско-диффузионным методом согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2021–01.

Результаты. Анализ результатов ПЦР-РВ не выявил ни у одного штамма уровни флюоресценции выше пороговых значений, соответствующих патогруппам DEC: EPEC, ENEC, ETEC, EIEC, EAgEC. Вне зависимости от вида пищевого продукта штаммы характеризовались высокими уровнями резистентности к β-лактамам АМП: 100% к ампициллину и амоксициллин/клавуланату; 97,0% – к цефалоспорином III–IV поколения. Один штамм, выделенный из свинины, был резистентен к меропенему. Штаммы, выделенные из мяса кур, сохраняли чувствительность к карбапенемам. Резистентность к хинолонам/фторхинолонам чаще встречалась в штаммах, выделенных из мяса кур (89,8/86,2%) по сравнению со штаммами, выделенными из свинины (63,9/63,3%). По суммарным данным резистентность к аминогликозидам I–II поколения, независимо от пищевого продукта, была выявлена практически у каждого второго штамма (54,6–61,9%). Чувствительность к амикацину сохраняли 97,2% штаммов. Резистентность к тетрациклину, хлорамфениколу и триметоприм/сульфаметоксазолу была выявлена у 92,1; 77,3 и 77,3% штаммов соответственно. Значимо чаще штаммы сохраняли чувствительность к нитрофурантоину – 3,2%.

Выводы. Продукты животного происхождения играют важную роль в формировании и распространении резистентности к АМП. Резистентные непатогенные *E. coli*, контаминирующие пищевые продукты, являются потенциальной угрозой для безопасности пищевых продуктов и негласным источником заражения человека. Полученные результаты свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга антибиотикорезистентности микроорганизмов, попавших в пищевую цепь.

Определение степени диссоциации штаммов возбудителя бруцеллеза после длительного хранения в лиофилизированном состоянии

Жаринова Н.В., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Белозерова О.Н., Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Карапетян М.Г.

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

Род *Brucella* является неоднородным по ряду свойств, поэтому после идентификации штаммов производится их дифференциация по видам и биоварам. Согласно методическим указаниям дифференциацию проводят с культурами возбудителя бруцеллеза, находящимися только в стабильной S-форме. Однако для культур возбудителя бруцеллеза свой-

ственно явление диссоциации, а представители видов *B. canis* и *B. ovis* в природе циркулируют только в R-форме. Переход бруцелл в R-форму возможен в природных условиях при воздействии различных антропогенных факторов. Явление диссоциации наблюдается и в лабораторных условиях при длительном хранении штаммов возбудителей бруцеллеза, под влиянием различных факторов, влияющих на биологию культуры.

Целью нашей работы было определение степени диссоциации культур бруцелл при длительном хранении и в лиофильном состоянии.

Нами была проверена степень диссоциации штаммов рода *Brucella* (*B. melitensis* – 25 штаммов, *B. abortus* – 24, *B. suis* – 29, *B. ovis* – 7), хранившихся в лиофильном состоянии более 30 лет.

Взятые для изучения ампулы с лиофилизатами возбудителей бруцеллеза вскрывали, суспендировали содержимое в 1 мл мясо-пептонного печеночного глюкозо-глицеринового бульона и проводили посев на чашки Петри с бруцеллагаром и агаром Альбими. Степень диссоциации определяли у 2 суточных культур 1, 2 и 3-й генераций пробой с трипафлавином и методом Уайт-Вилсона.

На предметном стекле агглютинировали исследуемые культуры с соевым (0,85%) раствором трипафлавина 1:500. У диссоциированных культур в течение 1–2 мин наступает агглютинация с образованием хорошо выраженных хлопьев. Взвесь S-форм бруцелл остается гомогенной, а диссоциированные культуры в течение 1–2 мин образуют хорошо выраженные хлопья.

Метод Уайт–Вилсона основан на способности диссоциированных колоний окрашиваться кристаллическим фиолетовым. На стерильном физиологическом растворе согласно стандартному образцу мутности готовили 1 млрд взвесь бруцелл, с последующим разведением до 10^6 и 10^5 м.к. Взвесь высевали по 0,2 мл на чашки Петри с бруцеллагаром, агаром Альбими и культивировали 96–120 ч. Колонии заливали водным раствором кристаллического фиолетового в разведении 1:2000, выдерживали в течение 5 мин. Диссоциированные колонии окрашивались, а S-колонии оставались неокрашенными.

При проведении проб на диссоциацию с культурами бруцеллезного микроба, выросшими из взвеси лиофилизатов (первая генерация), была установлена высокая степень диссоциации. Из взятых в опыт штаммов в R-форме выявлено >50% культур (*B. melitensis* – 53%, *B. abortus* – 75%, *B. suis* – 89,7%). По методу Уайт–Вилсона в нетипичной для вида *B. ovis* S-форме был один штамм (14,3% из взятых в опыт штаммов).

У всех испытуемых штаммов *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. ovis* после пересевов на питательные среды (2–3 генерации) диссоциированные колонии не были обнаружены. У двух штаммов *B. suis* восстановление S-формы произошло только на четвертой генерации.

Таким образом, хранение культур бруцелл в лиофильном состоянии является оптимальным для создания и поддержания коллекции штаммов.

Электрооптические исследования бактериальных суспензий в процессе их лизиса

Жумакаев Р.Х., Волошин А.Г., Дунайцев И.А., Дентовская С.В., Клыкова М.В., Бурмистров Е.А., Анисимов А.П.

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

В биотехнологических процессах, связанных с культивированием микроорганизмов, часто возникает проблема лизиса бактериальной суспензии. Это явление в культуре микроорганизмов может иметь негативный характер – фаголизис или лизис, вызванный нарушением технологии. Но лизис может являться и закономерным, целевым этапом биотехнологического процесса, приводящим к выходу из лизируемых клеток целевого продукта или к образованию из жизнеспособных бактерий их фрагментов, используемых на следующих этапах производства. В первом случае (чаще в случае фаговой контаминации) своевременная регистрация начала этого процесса позволяет сэкономить время и ресурсы путем прекращения неудачного процесса культивирования. В случае же лизиса как части технологического процесса с использованием генно-модифицированных продуцентов наблюдение за ним и регистрация происходящих изменений в лизируемой культуре позволяет оптимизировать этот процесс. Таким образом, контроль лизиса бактериальной культуры представляется важным элементом биотехнологического процесса. Электрооптический метод, позволяющий практически в режиме on-line наблюдать изменения, происходящие в суспензии микроорганизмов, является возможным решением этой проблемы.

Электрооптический метод анализа суспензий основан на способности частиц поляризоваться под действием переменного электромагнитного поля. В результате изменяется ориентация частиц в суспензии и, как следствие, оптические свойства самой суспензии. Анализ формы единичного электрооптического сигнала, особенно его релаксационной составляющей, позволяет судить о форме и размерах суспендированных частиц. Зависимость стационарной фазы электрооптического сигнала от частоты прикладываемого поля – электрооптический спектр, или частотная дисперсия анизотропии поляризуемости – отражает электрофизические свойства частиц и их структур. Таким образом, в культуре бактериальных клеток электрооптический анализ позволяет изучать гетерогенность популяции как по размерным характеристикам, так и по электрофизическим параметрам, связанным, например, с жизнеспособностью клеток.

В работе была исследована возможность использования электрооптического анализа при глубинном культивировании вакцинного продуцента бактериальных теней *Yersinia pestis* KM260 (12) Δ LpxMlpEYK с использованием термоиндуцируемого лизиса и формирования клеточных оболочек, свободных от цитоплазматического содержимого. Показано, что электрооптический метод контроля как роста бактерий, так и их разрушения в процессе лизиса в сравнении с контролем по оптической плотности, содержанию растворенно-

го кислорода и титру живых клеток является наиболее оперативным, прямым способом слежения за развитием популяции и формированием после лизиса бактериальных телей.

Совершенствование технологий мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний на юге российского Дальнего Востока

Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Щелканов М.Ю.

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

Среди мер, направленных на обеспечение биологической безопасности населения Российской Федерации, важное место отводится развитию системы мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний, включая скрининг, индикацию и идентификацию патогенов. Одним из необходимых условий, обеспечивающих реализацию этой задачи, является освоение и внедрение современных молекулярно-генетических технологий.

В ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора изучение возбудителей природно-очаговых вирусных инфекций, кишечных и респираторных инфекций, экто- и эндопаразитов ведется с использованием как классических методов, так и современных молекулярно-генетических технологий, обладающих огромным потенциалом для исследования генетической основы вариаций фенотипа патогенов.

После перехода института в систему Роспотребнадзора были приобретены и введены в эксплуатацию автоматический капиллярный секвенатор Holog 1616 и нанопоровый секвенатор MinION. Научные сотрудники прошли обучение на новом оборудовании и в настоящее время владеют молекулярно-генетическими и биоинформационными методами, которые активно используются при реализации тем НИР, выполнении поручений Роспотребнадзора по мониторингу за возбудителями инфекционных и паразитарных заболеваний. С использованием технологий секвенирования в период 2022 г. – первое полугодие 2023 г. изучены 650 штаммов бактерий и вирусов из фондов коллекции института для пополнения «Национального электронного каталога микроорганизмов и биотоксинов» в рамках реализации мероприятий федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья»; выполнено полногеномное секвенирование 310 образцов SARS-CoV-2 из клинического материала, собранного в Приморском крае в 2020–2023 гг. (данные депонированы в Национальную базу данных VGIARUS); определены нуклеотидные последовательности гена E штаммов вируса клещевого энцефалита, изолированных на юге Дальнего Востока из клеща *Ixodes persulcatus* в 1977–1993 гг. (Primorye-4152, Primorye-4195, Primorye-472, Primorye-124) и установлена их принадлежность к генетическим подгруппам Oshima и Sofjin дальневосточного генотипа; подобраны и синтезированы олигонуклеотиды для S-, M- и L-сегментов ортохантавирусов Hantaan из рабочей

коллекции. С помощью секвенирования гена COX1 (субъединица цитохромоксидазы I) осуществлена верификация корректности морфологической дифференцировки таксонов из группы *I. persulcatus*. Молекулярно-генетические методы исследований имплементированы и в практику паразитологических исследований беспозвоночных, рыб, птиц, млекопитающих. В частности, установлено, что на Дальнем Востоке России обитает генетически отличный от *Paragonimus westermani* самостоятельный вид легочного сосальщика *Paragonimus ichunensis*.

Совершенствование молекулярно-генетических методов индикации и идентификации возбудителей природно-очаговых и зоонозных инфекций, актуальных для юга российского Дальнего Востока, является важным элементом в обеспечении биологической безопасности в регионе.

Источник финансирования: субсидии на выполнение государственного задания №141–00025–22–03, №141–00098–23–00.

Современные методы преодоления резистентности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в эндоскопии

Иванов А.В.

ООО «Сарая СНГ», Москва, Российская Федерация

В настоящее время перед отечественным здравоохранением остро стоит проблема антибиотикорезистентности. Одним из факторов развития устойчивости патогенных микроорганизмов является их способность к формированию биопленок. Бактериальные биопленки устойчивы к действию не только антибиотиков, но также и дезинфицирующих веществ, используемых в эндоскопии. Данная ситуация требует оценки рациональности использования средств для борьбы с инфекциями, ассоциированными с биопленками.

Биопленки являются формой микробных сообществ, фиксированных на различных абиотических и биотических поверхностях, таких как постоянные катетеры, гибкие и жесткие эндоскопы, внутренние имплантаты, многоразовый эндоскопический инструментарий и др. Считается, что до 80% всех бактериальных инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП), в эндоскопических отделениях ассоциированы со *Staphylococcus aureus* и *Pseudomonas aeruginosa*.

В исследовании *in vitro* проводилась оценка эффективности и скорости антибактериального действия наиболее распространенных в эндоскопии современных дезинфицирующих средств на основе надуксусной кислоты (НУК), ортофталевого альдегида (ОПА) и глутарового альдегида (ГА) в отношении биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa*.

Биопленки *S. aureus* и *P. aeruginosa* культивировали при температуре 35 °С в течение 7 дней, моделями эндоскопов служили трубки для внутривенных катетеров. В исследовании использовались концентрации дезинфицирующих средств, рекомендованные производителями: 0,3% НУК, 0,55% ОПА и 2,0% ГА. Биопленки подвергали воздействию

дезинфицирующих средств в течение 60 мин и наблюдали через 5 и 30 мин с помощью просвечивающей и сканирующей электронной микроскопии.

Бактерицидный эффект НУК и ГА в отношении биопленок *S. aureus* и *P. aeruginosa* развивался через 1 и 5 мин соответственно, действие ОРА на биопленки *S. aureus* развивалось через 10 мин, на *P. aeruginosa* – через 30 мин ($p < 0,01$). Обработка НУК вызывала изменения формы клеток через 5 мин и структурные повреждения биопленок через 30 мин.

Среди исследованных дезинфицирующих средств НУК проявляла наиболее быстрый бактерицидный эффект в отношении биопленок обоих видов возбудителей, кроме того, использование НУК индуцировало морфологические изменения в моделях биопленок.

Таким образом, полученные данные позволяют рекомендовать приоритетное использование дезинфицирующих средств на основе надуксусной кислоты с целью преодоления резистентности возбудителей ИСМП в эндоскопии.

Обеспечение стерильности препарата бактериальных теней *Yersinia pestis*

Иванов С.А., Вагайская А.С., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Классические бактериальные тени (БТ) представляют собой клеточные оболочки грамотрицательных бактерий, лишенные цитоплазматического содержимого, но сохранившие морфологию всех структур клеточной поверхности. Оригинальная технология получения БТ опирается на способность белка Е бактериофага ϕ X174 формировать трансмембранные туннельные структуры, пронизывающие внутреннюю и внешнюю мембраны бактерий. Широкий спектр возможного применения в сочетании со сравнительно низкой себестоимостью производства делает платформу BG привлекательной технологией для конструирования вакцин и адресной доставки биологически активных веществ.

Снижение эффективности лизиса при производстве БТ является ключевым препятствием для полной гарантии отсутствия в препарате жизнеспособных клеток. Введение мутации в литический ген белка Е (mE) для корректировки рабочих условий, использование новых литических генов холин-эндолизинной системы, добавление дополнительных генов нуклеаз к литическим кассетам или включение в их состав генов противомикробных пептидов, применение антибиотиков на этапах отмывки препаратов, лиофилизация БТ для уничтожения всех жизнеспособных клеток применяются для улучшения результатов лизиса и обеспечения высоких выходов безопасного конечного продукта.

Цель настоящей работы состояла в поиске метода, надежно обеспечивающего стерильность препарата БТ чумного микроба, полученных с использованием глубинного культивирования.

Наработку биомассы штамма *Yersinia pestis* °KM260 (12) Δ lpxM/pEYR'-E-Y-K проводили методом глубинного культиви-

рования в питательной среде на основе гидролизата казеина при температуре 28 °С. Через 6 ч после внесения посевного материала лизис бактериальных клеток индуцировали повышением температуры выращивания до 42 °С в течение 6 ч. Процесс формирования БТ контролировали с использованием классических методов, а именно по снижению оптической плотности бактериальной суспензии и определению жизнеспособности клеток после высева на плотные питательные среды, а также по уменьшению количества потребленного кислорода. После трехкратной отмывки дистиллированной водой эффективность лизиса культуры составила 99,5%. Для обеспечения стерильности препарат БТ инкубировали в растворе стрептомицина (100 мкг/мл) в течение 10 мин с последующей отмывкой. Однако добиться полной стерильности не удавалось и остающийся в препарате стрептомицин (50 мкг/мл) оказывал токсическое действие на организм морских свинок после иммунизации. Выдерживание препарата БТ с мертиолятом натрия (1:5000) в течение 2 суток при температуре 8 °С приводило к полной стерильности. Подобный результат получили после лиофилизации суспензии БТ без стадии обработки мертиолятом натрия.

Таким образом, комбинация обработки препарата мертиолятом натрия и лиофилизации позволяет гарантированно добиться специфической стерильности полученного препарата БТ чумного микроба с защитой от последующей контаминации посторонней микрофлорой.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Комбинация моноклональных антител, способная нейтрализовать действие летального токсина *Bacillus anthracis*

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

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

Сибирская язва является острым инфекционным заболеванием людей и животных, вызываемым аэробным спорообразующим микроорганизмом *Bacillus anthracis*. Доминирующим фактором вирулентности возбудителя является летальный токсин (ЛТ), состоящий из протективного антигена (ПА) и летального фактора (ЛФ). Каждый из этих компонентов в отдельности не обладает токсическими свойствами, это свойство проявляется только при их сборке в единую структуру. ПА и ЛФ представляют собой белки, каждый из которых состоит из 4 структурных доменов, участвующих в сборке ЛТ. Одним из способов нейтрализации токсина сибирской язвы является применение моноклональных антител (МКА), специфичных к субъединицам ЛТ. В предыдущих исследованиях методом классической гибридомной технологии была получена и охарактеризована панель МКА, специфичных к ПА и ЛФ. Для повышения нейтрализующей активности нами была предложена комбинация, со-

стоящая из МКА 1Е10, специфичного к IV домену ПА, и МКА 2В8, специфичного к I домену ЛФ.

Цель исследования. Определить нейтрализующую активность совместного использования композиции МКА 1Е10 и МКА 2В8 в тесте МТТ.

Материалы и методы. В лунки 96-луночного планшета вносили клетки J774А.1 в количестве $2 \cdot 10^4$ клеток на лунку и инкубировали 12 ч при 37 °С и 5% CO₂. Далее смешивали субъединицы ЛТ (ПА + ЛФ) в дозе IC100: 0,8 мкг/мл ПА и 0,27 мкг/мл ЛФ совместно с серийными разведениями МКА 1Е10 и 2В8 в концентрациях от 5 до 0,04 мкг/мл и инкубировали 1 ч при 37 °С. По окончании инкубации смесь ЛТ и МКА добавляли в планшет к клеткам и инкубировали 4 ч при 37 °С. После этого во все лунки планшета вносили по 10 мкл раствора МТТ в ФСБ и инкубировали при тех же условиях в течение 4 ч. Затем в лунки планшета вносили по 150 мкл диметилсульфоксида для растворения кристаллов формазана и измеряли оптическую плотность при длине волны 540 нм на планшетном спектрофотометре xMark (Bio-Rad, США).

Результаты. В результате проведенного исследования было показано, что композиция, состоящая из МКА 1Е10 против IV домена ПА и МКА 2В8 против I домена ЛФ в концентрациях $\geq 0,6$ мкг/мл нейтрализует действие ЛТ на 97%.

Выводы. Поскольку IV домен ПА играет ведущую роль в связывании с рецепторами на поверхности эукариотических клеток, а I домен ЛФ необходим для проникновения ЛФ внутрь клетки, то можно предположить, что совместное применение МКА 1Е10 и 2В8 может блокировать сборку ЛТ.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Микробиологический и экологический мониторинг почвенных очагов сибирской язвы в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2018–2022 гг.)

Ивачева М.А., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Балахонов С.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Неотъемлемой частью эпидемиологического надзора за сибирской язвой является микробиологический и экологический мониторинг почвенных очагов, в ходе которого выявляется возможность сохранения сибиреязвенного микроба в почве стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов и угрожаемых территорий. Риск активизации резервуаров сибиреязвенной инфекции наиболее часто возникает при проведении земляных работ, связанных с выемкой и перемещением грунта при строительстве крупных промышленных предприятий, расширении жилых зон, освоении заброшенных участков и т.д.

За 2018–2022 гг. проведена оценка биологической опасности почвенных очагов четырех субъектов Сибири и Дальнего Востока с отбором и исследованием 2692 проб

почвы и 5 костных фрагментов сельскохозяйственных животных на наличие возбудителя сибирской язвы и/или его ДНК, а также изучением возможности выживания и сохранения сибиреязвенного микроба: Хабаровский край – 413 проб, Республика Саха (Якутия) – 863, Еврейская автономная область (АО) – 1218, Иркутская область – 250. При лабораторном исследовании проб возбудитель сибирской язвы и его ДНК не обнаружены.

После отрицательных результатов микробиологического мониторинга была замерена кислотность, изучены токсичность и питательные возможности проб почвы по отношению к возбудителю сибирской язвы.

Почва Хабаровского края имела слабощелочную реакцию (рН 7,77–7,79), средние питательные свойства и была не токсична (93%) по отношению к сибиреязвенному микробу. В Республике Саха (Якутия) 63,5% проб обладали нейтральной реакцией (рН 6,59–6,68), преимущественно низкими питательными свойствами и, в равном соотношении, средним уровнем и отсутствием токсичности для возбудителя сибирской язвы. Все пробы почвы Еврейской АО проявили слабокислую реакцию (рН 5,94–6,05), крайне низкие питательные свойства и были преимущественно не токсичны для выживания и сохранения возбудителя сибирской язвы. Для исследованных проб Иркутской области отмечена слабокислая реакция (рН 6,05), высокие (78,8%) питательные свойства и отсутствие токсичности (76%).

Таким образом, при микробиологическом контроле почвенных очагов сибирской язвы получены отрицательные результаты. Экологический мониторинг показал достаточно высокую вероятность сохранения сибиреязвенного микроба в почве Хабаровского края и Иркутской области, вместе с тем низкие питательные свойства в сочетании с отсутствием токсичности не препятствуют возможности сохранения возбудителя сибирской язвы в Еврейской АО и Республике Саха (Якутия). Наблюдение почвенных очагов является важной профилактической мерой и необходимо для прогнозирования и оперативного реагирования в период вспышек сибирской язвы.

Видовое разнообразие таксонов микроорганизмов в составе микробиоты дыхательных путей у пациентов с COVID-19

Исаева Г.Ш.^{1,2}, Чумарев Н.С.¹, Валиуллина И.Р.³

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

²ФБУН «Казанский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора, Казань, Российская Федерация;

³ГАУЗ «Республиканская клиническая больница» Министерства здравоохранения Республики Татарстан, Казань, Российская Федерация

Цель. Изучить видовой состав микробиоты дыхательных путей у больных COVID-19.

Материалы и методы. Был проведен анализ результатов бактериологического исследования микробиоты дыхатель-

ных путей пациентов с COVID-19 ($n = 102$), госпитализированных в отделения ОРИТ, ВИАО, ВИГ ГАУЗ РКБ МЗ РТ. Материал для исследования – смыв с бронхов. Забор биоматериала и транспортировку в лабораторию производили при помощи зонда-тампона (сваб) с транспортной средой Эймса без угля. В лаборатории производился посев на комплекс питательных сред: кровяной агар, шоколадный агар, желточно-солевой агар и среду Сабуро. После выделения чистой культуры выполняли идентификацию микроорганизмов масс-спектрометрическим методом.

Результаты и обсуждение. От пациентов с COVID-19 было выделено 127 культур, относящихся к 16 родам, 28 видам. Микробный пейзаж был представлен следующими видами: род *Candida* – *C. albicans*, *C. dubliensis*, *C. tropicalis*; род *Klebsiella* – *K. pneumoniae*; род *Escherichia* – *E. coli*; род *Enterobacter* – *E. cloacae*; род *Staphylococcus* – *S. aureus*; род *Streptococcus* – *S. oralis*, *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. mitis*, *S. parasanguinis*, *S. epidermidis*, *S. sanguinis*; род *Acinetobacter* – *A. baumannii*, *A. nosocomialis*; род *Haemophilus* – *H. parainfluenzae*, *H. influenzae*; род *Neisseria* – *N. subflava*, *N. meningitidis*; род *Corynebacterium* – *C. striatum*; род *Lactobacillus* – *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*; род *Pseudomonas* – *P. aeruginosa*; род *Leuconostoc* – *L. lactis*; род *Rothia* – *R. mucilaginosa*; род *Serratia* – *S. marcescens*; род *Stenotrophomonas* – *S. maltophilia*.

По данным литературы, роды *Rothia*, *Prevotella*, *Gemella*, *Veillonella*, *Fusobacteria*, *Haemophilus* и *Neisseria*, а также представители типа *Firmicutes*, такие как *Lachnospiraceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, представители типа *Bacteroidetes*, такие как *Sphingobacterium*, *Prevotella* и *Actinobacteria*, являются представителями нормобиоты дыхательных путей здоровых людей. Кроме того, грибы рода *Candida* также обнаруживаются в дыхательных путях здоровых людей, но в незначительном количестве. В нашем исследовании доминирующее положение среди выделенных от больных COVID-19 видов занимали грибы рода *Candida* (*C. albicans*, *C. dubliensis*, *C. tropicalis* были обнаружены в 35,4% случаев), *K. pneumoniae* (15%) и *S. aureus* (10,2%).

Таксономическое распределение микробиоты дыхательных путей среди пациентов, больных COVID-19, характеризуется преобладанием условно-патогенных комменсалов и оппортунистов, косвенно указывающих на иммунодефицитные состояния больных.

Выводы. Изменения в микробиоте дыхательных путей при COVID-19 происходят как в количественном, так и в качественном отношении. Механизмы, лежащие в основе этих изменений, остаются не до конца изученными, но стоит понимать, что открытие этих механизмов позволит в дальнейшем корректировать состав микробиоты дыхательных путей для восстановления ее протективных свойств.

Интеграция масс-спектрометрических методов исследования в систему лабораторной диагностики возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций

Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Абрамович А.В.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Времяпролетная масс-спектрометрия с матричной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) в настоящее время стала одним из основных методов лабораторной диагностики инфекционных заболеваний. Так как коммерческие поставляемые в Российскую Федерацию базы данных не содержат информацию о масс-спектрах микроорганизмов, относящихся к I–II группам патогенности, профильные организации разрабатывают собственные базы данных патогенных микроорганизмов, исходя из поставленных задач. Такая возможность предусмотрена производителями всех сертифицированных в Российской Федерации приборов, их программное обеспечение является открытым и позволяет создавать собственные базы и работать с ними в автоматическом режиме.

В настоящее время порядок проведения идентификации культур микроорганизмов I–II групп патогенности методом MALDI-TOF MS регламентируется МУК 4.2.3733–21. Однако в действующей нормативно-методической документации по лабораторной диагностике отдельных инфекций этот метод не рассматривается и поэтому может быть использован только в качестве дополнительного, несмотря на очевидные преимущества.

Цель работы – разработка алгоритма использования и внедрение в практику работы профильных лабораторий модульной базы данных масс-спектров, позволяющей в автоматическом режиме идентифицировать возбудителей особо опасных инфекций (ООИ), актуальных для юга России.

При создании электронной базы данных протеомных профилей штаммов возбудителей ООИ I–II групп патогенности за основу были взяты следующие принципы:

- актуальность патогена для курируемой институтом территории (природные очаги туляремии и чумы, высокий уровень заболеваемости бруцеллезом, вспышки сибирской язвы);

- модульный принцип работы электронной базы данных: для каждого возбудителя создается выборка из 50 штаммов, максимально разнообразная по фенотипическим и генетическим характеристикам входящих в нее штаммов. Также отдельные модули создавались индивидуально – для подвидов (*Yersinia pestis*), морфофункциональных форм (вегетативная клетка/спора) (для *Bacillus anthracis*);

- обязательное наличие внешней группы сравнения, которая позволяет объединить различающиеся по свойствам штаммы одного вида и повысить достоверность идентификации;

- автоматическая идентификация в режиме реального времени.

В результате проделанной работы была создана модульная база данных референсных масс-спектров возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций, актуальных для региона юга России. База состоит из 6 тематических модулей, каждый из которых является самостоятельной функциональной единицей и может быть использован как в комплексе с другими модулями, так и отдельно, в зависимости от задач исследования.

В качестве перспективных направлений развития и применения метода MALDI-TOF MS можно выделить следующие:

– разработка алгоритма применения MALDI-TOF MS в индикации и идентификации микроорганизмов I–II групп патогенности и внесение дополнений в действующие НМД по лабораторной диагностике ООИ;

– оценка возможности использования магноимносорбентов для концентрирования патогенов с последующей идентификацией методом MALDI-TOF MS;

– углубленное изучение внутривидовых и межштаммовых отличий на основе индивидуальных особенностей спектра, поиск и валидация биомаркеров для внутривидовой и межштаммовой дифференцировки;

– определение места MALDI-TOF масс-спектрометрии в молекулярной эпидемиологии, дополнение направления по молекулярно-генетическому профилированию патогенных биологических агентов на территории Российской Федерации протеомным профилированием штаммов, что позволит проводить комплексный анализ популяции возбудителя, циркулирующей на определенной территории.

Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Получение мышинных моноклональных антител против рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина *Escherichia coli* 2-го типа

Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Шкуратова М.А., Марьин М.А., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

Шигатоксины являются АВ5-токсинами, состоящими из пяти В-субъединиц (StxB), связывающихся с Gb3-рецепторами клетки-хозяина и активной А-субъединицы (StxA), действие которой на рибосому клетки приводит к подавлению синтеза белка. Шигатоксины продуцируются рядом энтеропатогенных бактерий, в т.ч. энтерогеморрагическими *Escherichia coli*. Бактерии *E. coli*, продуцирующие шигатоксин, – это патогены пищевого происхождения, повреждающие толстый кишечник человека, вызывая диарею, которая может прогрессировать до геморрагического колита. В наиболее тяжелых случаях шигатоксины распространяются кровотоком и повреждают различные органы-мишени, в основном почки и мозг (гемолитико-уремический синдром), что может приводить к смерти. Поэтому методы обна-

ружения шигатоксина должны быть быстрыми, чувствительными и надежными. Получение специфичных моноклональных антител (МКА) к шигатоксину позволит увеличить чувствительность и эффективность иммунологических методов детекции данного токсина.

Цель – получение специфичных мышинных МКА к рекомбинантной А-субъединице шигатоксина *E. coli* 2-го типа.

В результате гибридизации В-лимфоцитов мышей, иммунизированных рекомбинантным Stx2A (rStx2A) (ранее получен в нашей лаборатории) с клетками-партнерами для слияния (мышинная миеломная клеточная линия X63-Ag8.653) был получен гибридный клон 16D4, продуцирующий МКА к rStx2A. Выделение МКА из асцитической жидкости проводили путем аффинной хроматографии на колонке с белком G-сефарозой (Protein G Sepharose 4 Fast Flow). Чистоту полученных иммуноглобулиновых фракций оценивали в SDS-PAGE-электрофорезе в денатурирующих условиях. Концентрацию иммуноглобулинов определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на спектрофотометре Smart Spec Plus (BioRad, США). Исследование специфической активности МКА 16D4 методом иммуноблоттинга показало, что данные МКА специфически взаимодействовали с rSTX2A и rSTX1A и не давали перекрестных реакций с rSTX2B и rSTX1B. Было установлено, что МКА 16D4 относятся к иммуноглобулинам изотипа G1 и содержат легкие цепи изотипа каппа. У полученных МКА 16D4 была определена равновесная константа диссоциации, которая составила $2,38 \cdot 10^{-8}$. Методом твердофазного иммуноферментного анализа было показано, что МКА 16D4 в концентрации 125 нг детектировали 1 мкг rSTX2A.

Таким образом, полученные нами МКА являются специфичными и высокочувствительными, что позволяет рассматривать их как перспективные для конструирования диагностических тест-систем на их основе.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Чувствительность к антибиотикам клинических изолятов возбудителей, выделенных от пациентов Городской клинической больницы №1 г. Краснодара

Качанова О.А., Панченко Д.И., Нарбекова С.И.

*ГБУЗ «Городская клиническая больница №1 г. Краснодара» Минздрава Краснодарского края, Краснодар, Российская Федерация;
ФГБОУ ВО «Кубанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Краснодар, Российская Федерация*

Одной из важнейших проблем практического здравоохранения является формирование устойчивости к антибиотикам у микроорганизмов. Особенно остро эта проблема стоит для стационаров, в экосистеме которых по объективным причинам создаются условия для развития множественной антибиотикорезистентности у возбудителей. Решением является использование рациональной антибиотикотерапии, но ситуация усугубляется тем, что спектр устойчивости

к антибиотикам уникален не просто для отдельного вида или группы возбудителей, а для микроорганизмов каждого стационара и даже отделения. Поэтому изучение чувствительности к антибиотикам возбудителей конкретного стационара представляется актуальным.

В работе представлены результаты изучения чувствительности к антибиотикам микроорганизмов, выделенных при различных патологиях от пациентов ГБУЗ «Городская клиническая больница №1 г. Краснодара» МЗ КК за период май–июнь 2023 г. Чувствительность к антибиотикам определяли методом диффузии в агар в ходе стандартного бактериологического анализа.

Возбудители выселились из 32,81% образцов. Это связано с тем, что большинство пациентов поступали в стационар после начала антибиотикотерапии. Преобладала грамположительная кокковая флора: *Staphylococcus aureus* выделялся в 28,57%, *Enterococcus faecium* – в 19,06%, *Streptococcus agalactiae* – в 9,52%. Неферментирующие грамотрицательные бактерии были вторыми по частоте встречаемости – 19,04%. Эта группа была представлена следующими видами: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*. Кишечные бактерии выделялись у 14,29% пациентов и были представлены *Klebsiella pneumoniae*. В 9,52% случаев высевались *Candida albicans*.

К амикацину были восприимчивы 100% выделенных клинических штаммов *S. aureus*. К эритромицину, цефокситиму, клиндамицину – 66,66% культур соответственно. Наибольшее количество штаммов *E. faecium* было восприимчиво к ванкомицину (75%). К имипенему были также чувствительны 75% клинических изолятов энтерококков, но 50% – только при его повышенной концентрации. Гентамицин и ампициллин были эффективны в отношении только 50% культур *E. faecium*. *S. agalactiae* были в 100% случаев чувствительны к норфлоксацину и пенициллину, к эритромицину и клиндамицину – в 50%. *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* в 100% случаев восприимчивы к амикацину, а также к пиперациллину-тазобактаму, левофлоксацину, ципрофлоксацину, имипенему, цефепиму, цефтазидиму-авибактаму, но только при их повышенной концентрации. Для *A. baumannii*, *A. junii* на 100% эффективными были имипенем и тигециклин. К левофлоксацину, меропенему, амикацину и тобрамицину были восприимчивы только 50% выделенных культур. Для *K. pneumoniae* эффективного на 100% препарата не выявлено. Лучшие результаты получены с тигециклином, к которому были восприимчивы 66,66% выделенных культур. *S. albicans* были на 100% восприимчивы к амфотерецину и флюконазолу.

Таким образом, препаратами выбора для эмпирической терапии бактериальных инфекций, по нашим данным, являются амикацин, имипенем и тигециклин.

Монофазная *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 4, [5],12: i:- – новый возбудитель пищевых вспышек в европейских странах. Особенности лабораторной диагностики

Кафтырева Л.А.¹, Матвеева З.Н.¹, Жамборова М.Х.², Полев Д.Е.¹, Саитова А.Т.¹, Смирнова М.В.³, Мельцер А.А.³

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация

²ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³СПб ГБУЗ «Городская Мариинская больница», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В последние 15 лет во многих странах часто регистрировали вспышки диарейных и пищевых заболеваний, вызванные «монофазной *Salmonella* группы В», а точнее «монофазной *Salmonella Typhimurium*» с антигенной формулой 4, [5],12: i:-, занимающей по частоте выделения 3–4-е место после *S. Enteritidis* и *S. Typhimurium*. В 2022 г. в Великобритании были зарегистрированы случаи сальмонеллеза, вызванные штаммами монофазной *S. Typhimurium* 4, [5],12: i:-, ST 34, характеризующиеся MDR-резистентностью к антимикробным препаратам (АМП). Расследование показало, что фактор передачи – бельгийский шоколад. Заболели 150 человек из 9 стран Евросоюза. Пациенты – в основном дети младше 10 лет, 41,3% нуждались в госпитализации. Известно, что бельгийский шоколад поставлялся как минимум в 113 стран, включая Россию. В России официальная регистрация такого серовара сальмонелл пока не проводится.

Выполнено углубленное изучение 4 штаммов, выделенных в бактериологических лабораториях Санкт-Петербурга в 2015, 2019 и 2022 гг.: три выделены от госпитализированных пациентов с диареей и один штамм в 2016 г. – из пищевого продукта (говядина). Штаммы имели типичные морфологические, культурально-ферментативные свойства (ферментировали глюкозу до кислоты и газа, продуцировали H₂S, росли на цитратном агаре Симмонса, не утилизировали мочевины, лактозу и сахарозу), обладали выраженной подвижностью. Анализ полногеномных последовательностей показал, что штаммы принадлежали к ST 34 (как и европейские штаммы), сероварианту *S. Typhimurium*, но не экспрессировали классический жгутиковый антиген второй фазы «1,2» (имели мутации в гене, кодирующем Н антиген фазы 2 (1,2)), что позволило отнести их к «монофазной *S. Typhimurium*». Штаммы характеризовались резистентностью к АМП, имели индивидуальные спектры множественной резистентности, включающие резистентность к аминокликозидам, пенициллинам (продукция β-лактамаз расширенного спектра TEM-1), сульфаниламидам, тетрациклину. По данным референс-центра по сальмонеллам, в Российской Федерации в 2020 г. на четырех территориях были выделены сальмонеллы группы В (неустановленного серовара).

Выводы. Молекулярно-генетические технологии позволяют определять гены, кодирующие O- и H-антигенные комплексы штаммов, и могут заменить серотипирование сальмонелл в «реакции агглютинации на стекле» при лабораторной диагностике сальмонеллезов. Необходимо внедрять их для контроля контаминации сальмонеллами пищевых продуктов – основных факторов передачи инфекции.

Применение метода MALDI-TOF для эффективного контроля молочнокислых продуктов на основе живых лактобацилл

Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Преимущества использования метода MALDI-TOF MS (определения масс-спектрометрии) перед традиционными методами микробиологических исследований заключаются в высокой чувствительности, простоте получаемых масс-спектров, высокой скорости измерения, обеспечивающих быстрое получение окончательных данных как для идентификации микроорганизмов, так и для обнаружения продуцируемых ими биологически активных веществ. При выполнении метода MALDI-TOF MS можно быстро сравнить готовый молочнокислый продукт с исходным биотехнологическим сырьем, не прибегая к классическим методам бактериологического анализа. Это можно использовать для микробиологической оценки входящего молочного сырья, параметров его подготовки и для заключительного контроля конечного продукта.

Цель работы. Оценить возможность использования метода MALDI-TOF MS для контроля качества молочнокислых продуктов, содержащих живые штаммы *Lactobacillus*.

Материал и методы. В ходе работы были использованы йогурты на основе живых лактобацилл различных производителей. Масс-спектры MALDI-TOF MS снимали на масс-спектрометре Shimadzu фирмы Biotech Axima в режиме положительных ионов с использованием в качестве матрицы СНСА (α -циано-4-гидроксикоричная кислота). Определяли молекулярную массу фрагментов макромолекул (МФМ) *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и грибов рода *Candida*, сравнивая спектры, полученные из йогуртов и исходного молочного сырья без наличия и в присутствии микробов-контаминантов.

Результаты. Нами была выполнена работа по оценке возможности использования метода MALDI-TOF MS в контроле качества молочнокислых продуктов, содержащих живые штаммы лактобацилл. В ходе работы также определяли наличие МФМ *S. aureus*, *E. coli* и грибов рода *Candida* как возможных контаминантов присутствия в использованном молочном сырье для получения йогуртов. При проведении экспериментов по исследованию готовых йогуртов не были обнаружены спектры МФМ, соответствующие спектрам патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, взятых

в эксперимент. Такой подход в оценке спектров МФМ методом MALDI-TOF MS позволяет быстро установить отсутствие контаминации исследуемого продукта посторонней микробиотой, т.е. определить микробиологическую чистоту молочнокислого продукта и, следовательно, его безопасность перед употреблением.

Сопоставление получаемых спектров МФМ позволяет выполнить заключительный (сертификационный) контроль степени микробиологической чистоты (отсутствие контаминации посторонней микробиотой).

Метод MALDI-TOF MS показал возможность быстрого и надежного определения чистоты и безопасности молочнокислых продуктов.

Реконструкция полной последовательности генома штамма *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *talassica* B-7074 (A-1807)

Кисличкина А.А., Сизова А.А., Платонов М.Е., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Чума – особо опасное инфекционное природно-очаговое заболевание, этиологическим агентом которого является *Yersinia pestis*. Широкий круг хозяев и переносчиков в сочетании экологическими условиями очагов способствуют селекции генетических вариантов, специфичных для каждого из природных очагов чумы. Все изоляты *Y. pestis* можно отнести к одному из двух подвидов, отличающихся по эпизоотической значимости: высоковирулентные для широкого круга млекопитающих (*Y. pestis* subsp. *pestis*), и циркулирующие в популяциях полевок *Microtus* spp., как правило, слабо-вирулентные или авирулентные для морских свинок, являющиеся причиной редких заболеваний людей (*Y. pestis* subsp. *microti*). Штаммы *Y. pestis* subsp. *microti* вследствие малой эпидемиологической значимости менее изучены, в отличие от штаммов основного подвида. Однако их всестороннее изучение может оказаться полезным не только для лучшего понимания микроэволюции *Y. pestis* и совершенствования внутривидовой классификации возбудителя чумы, но и для выявления факторов патогенности, определяющих универсальную вирулентность штаммов основного подвида. А реконструкция полного генома позволяет сравнивать структуру всего генома, выявлять инверсии и определять точное количество повторяющихся элементов.

Целью работы являлась реконструкция полного генома штамма *Y. pestis* subsp. *microti* bv. *talassica* B-7074 (A-1807), выделенного в 40-м очаге и относящегося к геногруппе 0. PE4B, а также биоинформатическое сравнение с геномом референсного штамма *Y. pestis* *Pestoides* B.

Для реконструкции полного генома штамма *Y. pestis* ДНК секвенировали на платформах MGISEQ-2000 и Nanopore MinION. Гибридную сборку полной последовательности геномов проводили с помощью программы Unicycler v0.4.7 с на-

стройками по умолчанию. Геном штамма *Y. pestis* B-7074 (A-1807) состоит из хромосомы (4 579 191 п.н.) и плазмид рMT (106 987 п.н.), рCD (68 217 п.н.) и рPCP (9609 п.н.). Для детального сравнения хромосом использовали программу Snippy. В результате были выявлены нуклеотидные различия в 287 позициях. В межгенном пространстве определены 31 делеция, 39 инсерций, 52 SNP. Синонимичных SNP, не приводящих к изменению аминокислотной последовательности, выявлено 40, несинонимичных – 67. В последовательностях генов обнаружено 8 инсерций и 13 делеций, приводящих к сдвигу рамки считывания. Также выявлено 37 инсерций и делеций, приводящих к изменению длины белка. При сравнении хромосом в программе Mauve определены 27 участков инверсий и делеция 63 т.п.н. В плаزمиде имеются единичные SNP, делеции и инсерции.

В результате проведенной работы получен полный геном штамма *Y. pestis*. Анализ геномов позволил выявить различия между штаммами, относящимися к геногруппе O.PE4B.

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 1.1.18.

Биоинформатический анализ полного генома штамма *Yersinia alsatica* SCPM-O-B-7604

Кисличкина А.А., Сизова А.А., Скрябин Ю.П., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Род *Yersinia* включает 26 видов, три из которых отнесены к патогенным для человека и животных: *Y. pestis* – возбудитель острого высоколетального системного заболевания – чумы; *Y. pseudotuberculosis* и *Y. enterocolitica* вызывают заболевания желудочно-кишечного тракта. Остальные, менее известные иерсинии были выделены в отдельные виды из видов *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* на основании различий в нуклеотидной последовательности 16S рРНК, генов «домашнего хозяйства» и сравнения полных геномов. В 2019 г. в ходе изучения популяционной структуры рода *Yersinia* было описано пять новых видов. Среди штаммов *Y. frederiksenii* выделили генетическую группу в статусе нового вида – *Y. alsatica*. В базе данных NCBI Genome в настоящий момент депонировано 10 геномов бактерий этого вида, из которых только один полный.

Цель работы – биоинформатический анализ полного генома штамма *Y. alsatica* SCPM-O-B-7604 (CP104006).

Полногеномное секвенирование *Y. alsatica* SCPM-O-B-7604 осуществляли на платформах MGISEQ-2000 и Nanopore MinION. Гибридную сборку последовательности генома провели в программе Unicycler v0.4.7. Аннотацию генома выполнили в NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) и с использованием сервера RAST. Поиск детерминант резистентности к антибиотикам и CRISPR/Cas-систем осуществили с использованием программ ResFinder и CRISPRfinder соответственно.

Геном *Y. alsatica* SCPM-O-B-7604 состоит из одной кольцевой хромосомы (4 901 396 п.н.) и не содержит плазмид. Всего определили 4433 гена, из них 4271 ген кодирует белки. 44 гена определены как псевдогены. В геноме штамма SCPM-O-B-7604 118 генов, кодирующих РНК, в том числе 83 – тРНК, по 7 копий генов 16S и 23S рРНК. При аннотации с использованием сервера RAST в геноме определили 4528 кодирующих последовательностей, 33% (1453) которых относятся к 365 функциональным подсистемам. Больше всего генов (361) относится к подсистеме «Аминокислоты и их производные», 344 гена связаны с метаболизмом углеводов, 230 генов связаны с метаболизмом белков, 179 генов относятся к подсистеме, включающей кофакторы, витамины и пигменты. В геноме определен гомолог гена *uasT*, кодирующего энтеротоксин, обладающий инсектицидной активностью. У исследованного штамма не выявлено детерминант резистентности к аминогликозидам, хлорамфениколу, β-лактамам антибиотикам, фторхинолонам, полимиксину и макролидам. Кроме того, в геноме отсутствуют локусы CRISPR/Cas-систем. По результатам сравнения средней нуклеотидной идентичности геном штамма *Y. alsatica* SCPM-O-B-7604 ближе к геному *Y. alsatica* 28/85 (CQEP01) – 99,91%.

Таким образом, выполнен биоинформатический анализ полного генома штамма *Y. alsatica* SCPM-O-B-7604, установлены основные характеристики генома, подтверждено отсутствие детерминант антибиотикорезистентности и CRISPR-Cas-локусов. Детальный анализ геномов иерсиний способствует накоплению знаний о филогении и генетическом разнообразии, а также пониманию путей эволюционного развития бактерий.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Таксономическая структура и антибиотикорезистентность штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов детского возраста в хирургическом отделении Областной детской клинической больницы

Ковалева Т.С., Шураева Н.Н., Сопина В.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Курской области», Курск, Российская Федерация

Большой проблемой на сегодняшний день является рост числа штаммов, устойчивых к антимикробным препаратам. Появлению таких штаммов с множественной антибактериальной устойчивостью способствует широкое назначение антибиотиков для лечения многих заболеваний человека, в т.ч. бесконтрольное применение.

Для выявления структуры микроорганизмов в раневом отделяемом из отделения хирургии Областной детской клинической больницы Курска в 2020–2022 гг. были исследованы 1483 образца раневого отделяемого. Из них в 983 пробах был выявлен рост микроорганизмов. Наиболее часто из гнойного отделяемого выявляли: *Staphylococcus aureus* (23%), *Streptococcus epidermidis* (21%), *Escherichia coli* (13%),

Pseudomonas aeruginosa (12%). Выделялись и другие микроорганизмы: *Citrobacter diversus* (5,5%), *Enterobacter aerogenes* (3,8%), *Enterobacter cloacae* (3,6%), *Serratia rubidea* (3,6%), *Staphylococcus sahyphyticus* (2,5%), *Hafnia aalvei* (2,3%), *Klebsiella pneumoniae* (1,8%), *Enterococcus faecalis* (0,9%), *Citrobacter freundii* (0,8%), *Proteus mirabilis* (0,8%), *Enterococcus faecium* (0,7%), *Citrobacter intermedius* (0,6%), *Serratia marsenses* (0,6%), *Acinetobacter calcoaceticus* var. *Iwoffii* (0,4%), *Proteus vulgaris* (0,2%), *Enterobacter agglomerans* (0,2%).

У штаммов *S. aureus* наблюдалась устойчивость к клиндамицину (6,5%), линезолиду (6,5%), рифампицину (7,1%), эритромицину (21,8%). При увеличенной экспозиции была выявлена чувствительность к ципрофлоксацину у 2,6% штаммов.

У штаммов *S. epidermidis* наблюдалась устойчивость к клиндамицину (21,5%), линезолиду (12%), рифампицину (17,6%), эритромицину (55%), ципрофлоксацину (8,2%).

Выделенные штаммы *P. aeruginosa* проявляли устойчивость к амикацину (9,8%), имипенему (2,6%), меропенему (4,3%), ципрофлоксацину (9,5%).

У *E. coli* наблюдалась устойчивость к амикацину (3%), цефепиму (1,8%), ципрофлоксацину (3,75%), амоксициклину (7,3%).

В структуре причин, вызывавших гнойно-воспалительные процессы, преобладали стафилококки, в частности *S. aureus* (23%) и *S. epidermidis* (21%). По частоте встречаемости преобладали *E. coli* (13%) и *P. aeruginosa* (12%).

У выделенных штаммов *S. aureus* и *S. epidermidis* наибольшая резистентность наблюдалась к эритромицину (21,8 и 55% соответственно). Все выделенные из клинического материала штаммы *S. aureus* не обладали устойчивостью к ципрофлоксацину, однако при увеличенной экспозиции дозирования была выявлена чувствительность к ципрофлоксацину у 2,6% штаммов. У *P. aeruginosa* значительный уровень резистентности обнаружен к амикацину (9,8% устойчивых штаммов) и ципрофлоксацину (9,5%). У выделенных штаммов *E. coli* наибольшая устойчивость наблюдалась к амоксициклину (7,3%).

Полученные данные свидетельствуют о том, что этиологическая структура гнойно-воспалительных заболеваний в хирургическом отделении неоднородна, в т.ч. и по антибиотикорезистентности. Соответственно, для наиболее рационального лечения гнойно-хирургической патологии необходимо определение чувствительности к антибиотикам штаммов, выделенных из клинического материала.

PseudomonasAnalyser – программное обеспечение для генетического типирования штаммов *Pseudomonas aeruginosa*

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

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

Pseudomonas aeruginosa – условно-патогенный микроорганизм, который вызывает внутрибольничные инфекции (пневмония, инфекции мочевыводящих путей), осложняет

течение раневых и ожоговых инфекций, особенно у пациентов с ослабленным иммунитетом, а также является одной из ведущих причин инвалидности и смерти пациентов с муковисцидозом. Синегнойная палочка демонстрирует обширный набор как клеточно-ассоциированных, так и внеклеточных факторов вирулентности, которые определяют патогенез инфекции, контролируемый невероятно сложными системами, взаимосвязанными регуляторными цепями и сигнальными молекулами, которые придают этому патогену большую пластичность и вариабельность. В современном мире появляется все больше методик и средств для расшифровки как фрагментарных, так и полногеномных последовательностей ДНК/РНК микроорганизмов. Перед исследователями стоит задача понять, что представляет тот или иной микроорганизм, для чего создаются базы данных, сайты, программы для обработки нуклеотидных последовательностей.

Цель исследования – разработка отечественного программного обеспечения PseudomonasAnalyser для быстрого генетического типирования штаммов *P. aeruginosa* по данным полногеномного секвенирования.

При разработке программного обеспечения использовали языки программирования Java и Python. Программа дает возможность установить тип жгутикового антигена, серовариант на основе данных полногеномного секвенирования. Анализ проводят по генам активного захвата металлов: пиовердина (*pvdL*, *pvdI*), пиохелина (*pchD*, *pchE*, *pchF*, *pchG*, *plcH*, *plcN*), псевдопалина (*cntL*, *cntM*, *cntI*, *cntO*), а также гену метаболизма перемещения железа (*fur*). Помимо этого, исследование генома проводят по известным генам токсинов: *toxA*, *exoS*, *ExoU*, *exoT*, *exoY*; по данным секвенирования можно определить *exoS*- или *exoU*-тип микроорганизма.

P. aeruginosa обладает универсальными способностями уклоняться от иммунного ответа хозяина и вызывать стойкие персистирующие инфекции, такие как переключение на мукоидный фенотип, что снижает ее подвижность и вирулентность, но дает возможность образовывать постоянную биопленку и развить выраженную резистентность к антибактериальным препаратам. Программа обеспечивает возможность выявления гипотетической принадлежности штамма к мукоидному фенотипу, для этого в нее были включены гены: *mucA*, *mucE*, *AlgU*, *AlgD*, *AlgW*. Ключевым геном является *mucA*, мутантная форма которого и ассоциирована с развитием мукоидного фенотипа. Гены *mucE*, *algU*, *algD*, *algW* ассоциированы с продукцией и экспортом бактериальной альгината на поверхность наружной мембраны. Кроме того, особенностью данной программы является возможность типирования изолятов по 10 INDEL-локусам (PA0168, PA3324, PA0659, PA1451, PA4603, PA0240, PA2249, PA0911, PA1351, *morA*). Данный способ типирования позволяет разделять родственные штаммы по ограниченному числу локусов и, в отличие от SNP, применим для клинических образцов без выделения чистой культуры.

Таким образом, данная программа дает возможность предоставить развернутую характеристику штаммов *P. aeruginosa* с точки зрения как их патогенности, так и генетического родства.

Сравнительное INDEL-типирование штаммов *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных на территории Российской Федерации и Донецкой Народной Республики в период с 2006 по 2023 г.

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

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

Широкое распространение *Pseudomonas aeruginosa* поставило перед медиками и биологами ряд сложных задач, требующих неотложного решения. Проблема противодействия данному микроорганизму усложняется тем, что *P. aeruginosa* занимает лидирующее положение среди внутрибольничных инфекций, хорошо сохраняя свою жизнеспособность на различных увлажненных поверхностях, в дыхательной аппаратуре, катетерах, аэрозолях, водных резервуарах, а также растворах лекарств. Поэтому поиск и обнаружение различных генетических маркеров у инфекционных агентов является в наше время необходимым условием для проведения эпидемиологических исследований, что позволяет выявлять связи между различными изолятами и оценить генетическое разнообразие циркулирующих штаммов.

Цель исследования – поиск INDEL-локусов и типирование штаммов *P. aeruginosa* с их помощью.

В работе использовали 278 полных геномов штаммов *P. aeruginosa* (полученных из международной базы NCBI), выделенных на различных территориях Российской Федерации, а также геномы штаммов, полученных в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, изолированных на территориях Донецкой Народной Республики (г. Мариуполь), Хабаровского края (г. Хабаровск) и Ростовской области (г. Ростов-на-Дону).

В результате изучения полногеномных сиквенсов удалось отобрать 10 INDEL-локусов (PA0168, PA3324, PA0659, PA1451, PA4603, PA0240, PA2249, PA0911, PA1351, *morA*), по которым были генотипированы штаммы синегнойной палочки. Выявлено 55 уникальных генотипов у 278 штаммов, включенных в исследование, в результате чего изучаемые штаммы были разделены на пять больших кластеров (A, B, C, D, E). В свою очередь кластер A был разбит на два субкластера (Ab и Ac).

Разделение геномов штаммов *P. aeruginosa* продемонстрировало их генетическое родство, а не их географическую привязку к INDEL-типам. Интересно отметить, что и штаммы из г. Ростова-на-Дону были распределены в различные субкластеры кластера A. Установлено, что в кластер A вошли штаммы, выделенные на территориях ДНР (Мариуполь) в 2023 г., Хабаровска – 2022 г., Самары – 2020 г., Москвы – 2014 г. В кластер B вошли штаммы из Москвы и Самары, выделенные в период 2019–2020 гг. Кластер C представлен штаммами из Москвы, Самары, Нижнего Новгорода в период 2006–2020 гг. В кластер D входили штаммы из Москвы, Самары, ДНР, выделенные в период 2017–2023 гг. Кластер E был образован штаммами из Москвы, Нижнего Новгорода, Хабаровска за период 2017–2022 гг.

Исходя из этого, можно заключить, что разработанная система генотипирования штаммов *P. aeruginosa*, основанная на идентификации 10 INDEL-локусов, выявляет в большей степени генетическое родство микроорганизмов, что, в свою очередь, будет помогать устанавливать распределение генотипов синегнойной палочки. Нельзя не отметить и то, что данный способ будет полезным инструментом для изучения молекулярной эпидемиологии синегнойной инфекции.

Резистентность бактерий к дезинфицирующим веществам: молекулярно-генетические механизмы формирования и методы мониторинга

Ковальчук С.Н., Архипова А.Л., Бондарь С.В.,
Конанов Д.Н., Кривонос Д.В., Федорова Л.С.,
Ильина Е.Н.

ФБУН «НИИ системной биологии и медицины»
Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Проблема микробной резистентности к антимикробным препаратам, в т.ч. дезинфицирующим веществам (ДВ), является одной из острых в современном здравоохранении во всем мире. ДВ широко используются для неспецифической профилактики инфекций, однако наблюдаемый с 1950-х гг. феномен резистентности микроорганизмов к ним приводит к резкому снижению эффективности дезинфекционных мероприятий. Изучение механизмов формирования микробной резистентности к ДВ является необходимой научной базой для разработки методов ее мониторинга и поиска путей ее преодоления.

Основными механизмами формирования микробной резистентности к ДВ являются снижение их внутриклеточной концентрации за счет активного выведения из клетки с помощью эффлюксных насосов и уменьшение проницаемости клеточной оболочки. Для выявления генетических детерминант резистентности к ДВ используют несколько методологических подходов на основе микробиологических и молекулярно-генетических методов, включая корреляционный анализ, лабораторную селекцию бактерий на устойчивость к определенному ДВ с последующим полногеномным секвенированием и биоинформатическим анализом результатов, сайт-направленный мутагенез и генетическую трансформацию бактерий с помощью мобильных генетических элементов.

С использованием этих подходов на сегодняшний день выявлены гены эффлюксных насосов семейства Qac, способствующих формированию у бактерий резистентности к четвертичным аммониевым соединениям (ЧАС). К ним относятся гены *qacA*, *qacB* и *qacC* (*smr*) грамположительных и *qacE*, *qacEdelta1*, *qacF*, *qacL*, *qacH* и *qacS* грамотрицательных бактерий группы ESKAPE. Мониторинг бактериальных генов *qac* ведется во многих странах, однако данных об их распространенности среди российских изолятов на сегодняшний день практически нет. Выявление генов резистентности к ДВ с помощью полимеразной цепной реакции в ре-

жиге реального времени (ПЦР-РВ) является быстрым и доступным методом мониторинга распространенности генов резистентности к ДВ. В связи с этим нами разработаны тест-системы на основе ПЦР-РВ с флуоресцентно-мечеными зондами для выявления генов *qacA*, *qacB*, *smr*, *qacE*, *qacEdelta1*, *qacF*, *qacL*, *qacH* и *qacC*, которые совместно с микробиологическими методами могут быть использованы в составе комплексной методики мониторинга чувствительности клинически значимых видов микроорганизмов к ЧАС.

С целью поиска новых детерминант устойчивости бактерий к ЧАС был проведен анализ данных полногеномного секвенирования клинических изолятов бактерий *Klebsiella pneumoniae*, чувствительных ($n = 6$) и резистентных ($n = 18$) к хлориду алкилдиметилбензиламмония. В результате выявлен высококонсервативный хромосомный локус, который был характерен для резистентных изолятов и содержал два гена – *qacC* и ранее не изученный ген семейства *qac*.

Источник финансирования исследования – Госзадание №122030900064–9.

Особенности лабораторной диагностики менингококкового менингита у детей дошкольного возраста г. Минска

Кожемякина А.А., Сивец А.М., Астапов А.А., Галькевич Н.В.

УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Республика Беларусь

Целью нашей работы явилось изучение особенностей лабораторной диагностики поражения центральной нервной системы менингококковой этиологии у детей дошкольного возраста.

Материалы и методы. Проведено ретроспективное когортное исследование историй болезни 15 пациентов в возрасте до 5 лет, госпитализированных в Городскую детскую инфекционную клиническую больницу г. Минска в 2018–2022 гг. с диагнозом «менингококковая инфекция» (МИ).

Всем пациентам при поступлении проводился общий клинический анализ крови (ОАК), биохимический анализ крови (БАК), анализ ликвора. Для обнаружения *Neisseria meningitidis* использованы методы микроскопии толстой капли крови, бактериологический посев и анализ крови и ликвора методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Результаты. При поступлении в ОАК у 66,7% детей наблюдался лейкоцитоз ($11–36 \cdot 10^9/\text{л}$), у 1 (6,7%) ребенка – лейкопения ($3,5 \cdot 10^9/\text{л}$), у 26,6% – нормоцитоз. У всех пациентов отмечался сдвиг лейкоцитарной формулы влево (палочкоядерные нейтрофилы $17,7 \pm 9,6\%$, сегментоядерные нейтрофилы $55,5 \pm 13,7\%$, лимфоциты $18,87 \pm 9,7\%$), у 5 пациентов – тромбоцитопения ($20–142 \cdot 10^9/\text{л}$). Скорость оседания эритроцитов увеличена у 53,3% детей, максимально до $67 (24,4 \pm 11,8)$ мм/ч.

В БАК С-реактивный белок был повышен в 100% – $39,9–275,0$ мг/л. При поступлении ликвор был мутным в 60% случаев, выявлен нейтрофильный плеоцитоз ($23–6800$ кл./мкл). Более 1000 клеток в 1 мкл ликвора было в 53,3% случаев, $100–1000$ кл./мкл – в 20%, <100 кл./мкл – в 26,7%. Отмечалось

повышение белка ($1,13 \pm 0,83$ г/л). В 3 случаях выявлена гипогликорахия ($0,2–0,5$ ммоль/л).

У пациента с лейкопенией течение МИ осложнилось септическим шоком, пневмонией и некрозом фаланг обеих стоп. У 3 из 5 пациентов с нормоцитозом МИ сопровождалась септическим шоком, еще у 1 из 5 – двусторонней субдуральной эмпиемой в лобных и теменных долях с двух сторон (плеоцитоз <100 кл./мкл). Из 4 пациентов с плеоцитозом <100 кл./мкл МИ осложнилась септическим шоком у 3 детей.

ПЦР-анализ крови проводился 3 пациентам и был положительным в 100% случаев; ПЦР ликвора на *N. meningitidis* положительна в 8 из 9 проб. В 3 случаях удалось типировать *N. meningitidis*: по 1 случаю *N. meningitidis* типа Y/W135, типа C и типа B.

Другие методы обнаружения *N. meningitidis* были менее информативны. *N. meningitidis* выделили из мазка из носоглотки только у 4 детей из 11 обследованных. Обнаружение грамотрицательных диплококков в ликворе и крови было положительным у 2 из 11 пациентов. Рост *N. meningitidis* в ликворе был положительным только у 3 пациентов, в крови – у 2 детей.

Установить этиологию удалось в 80% случаев, у остальных пациентов диагноз был поставлен клинически по наличию смешанной формы – менингита с менингококцемией.

Таким образом, в большинстве случаев лабораторные данные соответствовали бактериальному процессу, в то время как лейкопения и плеоцитоз <100 кл./мкл явились прогностически неблагоприятными в течении менингококковой инфекции. Для этиологической расшифровки наиболее информативной оказалась ПЦР-диагностика.

Определение L-аспарагиназной активности в бесклеточных фракциях *Vibrio cholerae* радиальной энзимодиффузией в агарозном геле

Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

L-аспарагиназы (L-аспарагинамидогидролазы, КФ 3.5.1.1) – это ферменты, катализирующие процесс гидролитического расщепления аминокислоты аспарагина на аспарагиновую кислоту и аммиак. Аспарагиназы широко распространены в природе, обнаружены у многих млекопитающих, птиц, растений, простейших, грибов, бактерий и характеризуются разнообразием структурно-функциональных и биохимических свойств (Brutano L.P. et al., 2018). У патогенных для человека микроорганизмов, таких как *Salmonella Typhimurium* и *Escherichia coli* O157: H7, L-аспарагиназа, входящая в состав шигаподобного токсина, ингибирует пролиферацию T-клеток, что угнетает иммунный ответ и облегчает проникновение патогена в макроорганизм (Kullas A.L. et al., 2012; Torres A.N. et al., 2020). L-аспарагиназа, секреториру-

емая *Helicobacter pylori*, подавляет клеточный цикл фибробластов и клеток желудочного эпителия (Scotti C. et al., 2010). Подтверждена роль аспарагиназы и в вирулентности *Serratia marcescens* (Gilbert R. et al., 2022). Установлен ее плейотропный эффект на экспрессию ряда генов, а также способность подавлять формирование биопленок многих патогенных микроорганизмов (Muslim S.N. et al., 2016). Известен хороший противоопухолевый эффект препаратов аспарагиназы *E. coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* и *Dickeya didantii* при химиотерапии острого лимфобластного лейкоза и неходжскинских лимфом (Коркина Ю.С. и др., 2021). Имеются данные о наличии и распространенности L-аспарагиназ у холерных вибрионов (Radha R. et al., 2019). В отечественной литературе имеется сообщение об обнаружении L-аспарагиназ у холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 гексанцианоферратовым методом (Дуванова О.В. и соавт., 2017). Есть указания на то, что процессы метаболизма и ассимиляции аспарагина являются критичными для интраклеточного размножения и диссеминации некоторых внутриклеточных паразитов (Gesbert G. et al., 2014).

Цель исследования. Выявление аспарагиназной активности в бесклеточных фракциях *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139 разной эпидемической значимости и происхождения радиальной энзимодиффузией в агарозном геле.

Материалы и методы. В качестве объектов для исследования были взяты препараты мочевиновых экстрактов (МЭ) и супернатанты культуральной жидкости (СКЖ), полученные из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 разной эпидемической значимости и происхождения. Препараты МЭ получали из обработанной исходной бактериальной массы стерильным раствором 9М мочевины в соотношении 1:1. По завершении суточной экспозиции при комнатной температуре проводили бактериологический контроль стерильности полученных лизатов. После проверки на специфическую стерильность материал подвергали фракционированию с помощью дифференциального центрифугирования. Полученный после центрифугирования супернатант (МЭ) и осадок (наружные мембраны) лиофилизировали. СКЖ холерных вибрионов получали обработкой после пересева с плотной питательной среды бульонной культуры холерных вибрионов 0,01%-м раствором мертиолята натрия, проверки ее на специфическую стерильность и центрифугировании при 10 000 об./мин. Полученный после центрифугирования супернатант диализовали и лиофильно высушивали. Обнаружение L-аспарагиназной активности проводили по методу (Mahajan R.V. et al., 2013), используя 2%-ю агарозу, 2%-й L-аспарагин (Serva) и 0,009%-й феноловый красный в качестве индикаторов изменения pH среды, приготовленной на бидистиллированной воде (ddH₂O) и/или ацетатном буфере pH 4,0. В качестве контроля активности служили чашки Петри с агарозой без субстрата (аспарагина), отрицательным контролем служили лунки с ddH₂O и инертным белком (фитогемагглютинин). Образцы МЭ и СКЖ наносили в лунки опытной и контрольной сред в объеме 70 мкл с последующей суточной инкубацией в термостате при 37 °С. О наличии аспарагиназной активности судили по изменению цвета вокруг лунок на опытной среде в результате работы индикатора по сравнению с контрольной средой. Опыты по определению аспарагиназной активности проводили трехкратно.

Результаты и обсуждение. С помощью RED-тестов в агарозном геле с аспарагином и индикатором феноловым красным установлено наличие аспарагиназной активности у большинства взятых в исследование препаратов МЭ *V. cholerae*. При проведении этого теста с препаратами НМ *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 никаких изменений вокруг лунок после инкубации чашек не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии активности и согласуется с данными литературы (т.к. аспарагиназа – периплазматический фермент). Однако при использовании опытной среды и образцов, суспендированных в ацетатном буфере pH 4,0, после суточной инкубации чашек отмечалось изменение среды в виде темно-синих ореолов вокруг лунок с образцами. Максимальные размеры зон гидролиза (темно-синих ореолов) и интенсивность их окрашивания отмечались у МЭ *V. cholerae* El Tor И-1369, МЭ *V. cholerae* El Tor 140-Б-17 и МЭ *V. cholerae* O139 И-16 и составили 5 мм, у препарата МЭ *V. cholerae* М-878 зона гидролиза составила 3,5 мм. При тестировании образцов и среды, приготовленных на ацетатном буфере pH 4,0, отмечается увеличение зон синего окрашивания среды вокруг лунок до 8 мм.

Выводы. Установлена аспарагиназная активность бесклеточных экстрактов *V. cholerae*. С помощью тестов радиальной энзимодиффузии в агарозе с L-аспарагином в качестве субстрата показано, что L-аспарагиназной активностью обладают все препараты МЭ и СКЖ *V. cholerae* вне зависимости от эпидзначимости и вирулентности исходных штаммов-продуцентов. Полученные результаты позволяют предположить, что наличие аспарагиназ в препаратах МЭ и СКЖ у всех взятых в исследование образцов свидетельствует об их внутриклеточной локализации и секреторной экспрессии. При обработке бакмассы мочевиной происходит высвобождение активных форм аспарагиназ, их секреция вибрионами приводит к повышению pH окружающей среды, что может служить одним из механизмов персистенции холерных вибрионов в окружающей среде. Таким образом, обработка живых клеток холерного вибриона мочевиной и мертиолятом натрия позволяет получать специфически стерильные бесклеточные фракции (МЭ и СКЖ) с сохранением аспарагиназной активности, что может быть использовано для дальнейшего изучения роли аспарагиназ в жизнедеятельности холерного вибриона.

Частота распространения условно-патогенных бактерий рода *Escherichia* в кишечнике пациентов с ревматоидным артритом

Колеватых Е.П., Потехина С.В., Юрлов А.А.

ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава России, Киров, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка частоты распространения редких видов бактерий рода *Escherichia* в кишечнике пациентов при аутоиммунной патологии.

Материалы и методы. Под наблюдением находились пациенты с диагнозом «ревматоидный артрит» (1-я группа,

20 человек) и представители 2-й группы без аутоиммунной патологии (20 человек). Фекалии брали с соблюдением правил асептики и антисептики, доставляли в микробиологическую лабораторию, готовили ряд серийных разведений, посев осуществляли в питательные среды Эндо, кровяной агар, инкубировали при 37 °С в течение 24 ч. Идентификацию проводили с помощью набора «ЭНТЕРОтест 24» (Erba Lachema, Чехия). Для дифференциации *Escherichia coli* от других видов эшерихий – *E. blatte* (*Shimwellia blattae*), *E. hermannii* (*Atlantibacter hermannii*), *E. fergusonii*, *E. vulneris*, *E. coli inactive*, *E. albertii*, *E. faecalis*, *E. marmotae*, *E. senegalensis* – по биохимическим свойствам использовали совокупность следующих тестов: способность образовывать индол, декарбоксилировать орнитин, ферментировать сахарозу, адонит, сорбит, целлобиозу, утилизировать малонат натрия, наличие желтого пигмента. Определяли концентрацию короткоцепочечных жирных кислот в культуральной жидкости бактерий родов *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* методом газожидкостной хроматографии. Статистическую обработку полученных результатов выполняли стандартными методами с использованием встроенного пакета программ Microsoft Excel.

Результаты. *E. coli* были обнаружены в количестве $(4,0 \pm 0,9) \cdot 10^5$ КОЕ/мл у пациентов 1-й группы, в кишечнике здоровых людей – $(6,0 \pm 1,1) \cdot 10^7$ КОЕ/мл. При этом спектр представителей бактерий рода *Escherichia* в фекалиях по видовому составу был разнообразным. Статистически достоверно ($p \leq 0,05$) доказано участие в бактериальном консорциуме пациентов с аутоиммунной патологией *E. fergusonii* (45 и 5%), *E. coli inactive* (40 и 25%), *E. vulneris* (40 и 5%). Бактерии рода *Escherichia* в биопленках кишечника исследуемых лиц 1-й группы чаще образовывали сообщества с дрожжами рода *Saccharomyces*, а также с факультативными анаэробами *Proteus vulgaris*. Также было установлено наличие в обеих группах дисбиоза: 1-й степени (15%), 2-й степени (60 и 5%), 3-й степени (25 и 0%). Уровень короткоцепочечных жирных кислот *Bifidobacterium* spp. и *Lactobacillus* spp. снижался при нарушениях микробиологического статуса толстого кишечника в условиях аутоиммунных патологических процессов: количество уксусной и пропионовой карбоновых кислот уменьшалось до $5,23 \pm 0,013$ и $40,21 \pm 0,021$ ммоль/л; $0,08 \pm 0,003$ и $0,18 \pm 0,003$ ммоль/л соответственно. Наиболее часто гемолитическая активность условно-патогенных микроорганизмов рода *Escherichia* проявлялась в изолятах 1-й группы.

Заключение. При ревматоидном артрите статистически достоверно чаще развиваются дисбиотические процессы в кишечнике с распространением редких форм условно-патогенных микроорганизмов рода *Escherichia* (*E. fergusonii* и *E. vulneris*) на фоне снижения функциональной активности бактерий родов *Lactobacillus* и *Bifidobacterium*.

Оценка вирулентности природных штаммов *Francisella tularensis* на мышинной модели туляремии

Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Мокриевич А.Н., Борзилов А.И., Павлов В.М.

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

Туляремия – природноочаговая инфекция, представляющая серьезную опасность для населения, проживающего в эндемичных по туляремии регионах. Для выработки эффективной стратегии защиты населения от данного заболевания необходим постоянный мониторинг за эволюцией штаммов *Francisella tularensis*, циркулирующих на территории России, как генетическими, так и биологическими методами. Общепринятым простым методом оценки вирулентности природных изолятов туляремийного микроба является мышинная модель туляремии. Как правило, ЛД₅₀ природных изолятов для белых мышей составляет <10 КОЕ, что не позволяет выявлять микроразнообразие *F. tularensis* в очагах циркуляции туляремийного микроба.

В данной работе предложено модифицировать мышиную модель туляремии с целью повышения выявления отличий в вирулентности природных изолятов, циркулирующих на территории России. С этой целью экспериментальных мышей за 30 дней перед заражением иммунизировали авирулентным штаммом *F. tularensis* 3m/23–2 дозами от $1 \cdot 10^2$ до $1 \cdot 10^4$ КОЕ. Эти группы животных приобретали различную устойчивость к заражению $1 \cdot 10^3$ КОЕ природных изолятов подвидов *holarctica* и *mediasiatica*, циркулирующих на территории России, выраженную в потере веса на 7-е сутки эксперимента и доле выживших животных.

Snapper: идентификация сайтов метилирования с помощью технологии секвенирования Oxford Nanopore

Конанов Д.Н.¹, Бабенко В.В.², Балыкова А.Н.³, Коврижников А.В.³, Ерошенко Г.А.³, Сперанская А.С.¹, Ильина Е.Н.¹

¹НИИ системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. акад. Ю.М.Лопухина» ФМБА России, Москва, Российская Федерация;

³ФКУН «Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Технология секвенирования Oxford Nanopore широко используется для анализа модификаций ДНК и РНК, в частности метилирования ДНК. Нами был разработан Snapper – новый алгоритм позиционно-специфичного мотивного обогащения, нацеленный на идентификацию сайтов метилирования. Для валидации предложенного алгоритма был проанализирован метилом *Helicobacter pylori* J99, ранее охарак-

теризованный с помощью технологии SMRT-секвенирования PacBio. *H. pylori* уникален тем, что в его геноме может быть закодировано до 30 различных систем рестрикции-модификации, поэтому один из штаммов этой бактерии и был выбран в качестве объекта анализа. Дополнительно сырые данные секвенирования *H. pylori* J99 были обработаны с помощью инструментов Tombo и Nanodisco, имеющих сходную функциональность. Snapper превзошел по точности восстановления последовательностей сайтов автоматизированные режимы Tombo и Nanodisco и оказался немного более чувствительным, чем Nanodisco в режиме ручного извлечения мотивов. В сравнении с результатами PacBio алгоритм показал эквивалентную чувствительность.

С помощью Snapper был проанализирован тотальный метилом 6 вирулентных и 5 неосновных штаммов *Yersinia pestis*, культивированных при различных температурных режимах, характерных для разных носителей (блоха, млекопитающее). Было проведено сравнение представленных сайтов метилирования, в частности классических для чумной палочки сайтов GATC и CCWGG, а также доли модифицированных позиций.

Дополнительно Snapper был использован для анализа метилома нового штамма *H. pylori* A45. Анализ показал присутствие в диком типе 15 активных систем рестрикции-модификации, из которых три не были описаны ранее (сайты метилирования CCAG, GGGA и GAAC). CCAG-специфичная метилтрансфераза была подтверждена экспериментально. Кроме дикого типа, для дополнительной верификации метода были проанализированы три мутанта A45 hpy, hp9192 и hp1352, нокаутированные по генам известных метилтрансфераз, специфичных к CATG, GATC и GANTC соответственно. Ожидается во всех случаях Snapper успешно определил деактивированную метилтрансферазу, но также в мутантах hpy и hp9192 был обнаружен новый для *H. pylori* сайт метилирования CCAAK, не представленный в диком типе. Действительно, в геноме дикого типа ген соответствующей метилтрансферазы содержит фреймшифт-вставку в гомополимерном фрагменте, в то время как в мутантах hpy и hp9192 наблюдается реверс-мутация, возвращающая активность R-М системе III типа. Активность CCAAK-специфичной метилтрансферазы в мутантах hpy и hp9192 была дополнительно подтверждена данными протеомного анализа.

Использование дескриптивного анализа при контроле качества экспериментальной среды для культивирования листерий по ростовым свойствам

Коновалова Ж.А., Ивашкова О.Н., Дихтярева И.А., Войченко Н.А., Кузнецов В.И.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

Статистические методы играют важную роль в использовании и интерпретации математических моделей микробного роста на вновь конструируемых бактериологических пи-

тательных средах. В Иркутском противочумном институте разработана экспериментальная питательная среда на основе рыбного панкреатического гидролизата для культивирования листерий (СКЛ).

Особую важность в контроле качества разработанной СКЛ играют документирование и поиск адекватных методов статистической оценки полученных результатов выполнения контрольных процедур по учету роста микробных клеток с использованием расчета коэффициента прорастания (Кп).

Цель исследования – изучить ростовые свойства и дать оценку качества экспериментальной питательной среды для культивирования листерий с применением дескриптивного метода.

Проведено 10 проверок испытуемой и аттестованной (ГРМ-агар, ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск) питательных сред двумя специалистами в разные сроки. Среда разливали в чашки Петри диаметром 90 мм по 15–20 мл, подсушивали агар после застывания. По 0,1 мл рабочей взвеси тест-микроорганизма (*Listeria monocytogenes* 766) с концентрацией 10^3 КОЕ/мл засеивали поверхностным методом на чашки Петри с испытуемой и аттестованной средами в двойной повторности. После инкубации подсчитывали колонии *L. monocytogenes* 766 и определяли Кп. Испытуемая среда считается годной к использованию, если Кп составляет от 0,5 до 2 при сравнении с аттестованной питательной средой. Дескриптивный анализ первичных наблюдений включал внесение данных подсчета колоний, результатов вычислений основных статистических параметров в контрольный листок с последующим построением контрольных графиков, отражающих ход длительного мониторинга. После проведения испытаний контрольный листок и контрольную карту вносили в протокол определения стабильности питательной среды в реальном времени.

На основе полученных первичных данных по Кп проведены вычисления среднего значения Кп (0,99), стандартного отклонения (0,12), определен средний диапазон абсолютной разницы последовательных значений Кп (0,13), рассчитаны 95%-е (предупредительные: 0,76 и 1,24) и 99%-е (контрольные границы: 0,64 и 1,36) пределы распределения результатов. Использование инструментов дескриптивного анализа результатов тестирования СКЛ (контрольный листок и контрольный график с рассчитанными значениями Кп, которые не выходили за допустимые диапазоны) позволило сделать заключение о надлежащем проведении испытаний, соответствии показателей качества СКЛ критериям приемлемости и правильном приготовлении инокулята.

Разработка импортозамещающего бульона Мюллера–Хинтон

Косилова И.С., Домотенко Л.В.

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

Референтным методом определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам является метод микроразведений в бульоне, для выполнения которо-

го требуется бульон Мюллера–Хинтон (МХБ). В Российской Федерации промышленное производство его отсутствует. В ФБУН ГНЦ ПМБ выпускается агар Мюллера–Хинтон, удовлетворяющий требованиям международных стандартов CLSI, EUCAST и ГОСТ Р 59786–2021. Для его производства используется отечественный солянокислотный гидролизат казеина модифицированный (СГК) со сбалансированным содержанием ионов двухвалентных металлов Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} и тимидина.

Цель. Оценить возможность конструирования импортозамещающего МХБ на основе СГК и сравнить качество сконструированного бульона с импортным аналогом по физико-химическим и микробиологическим показателям.

Материалы и методы. В работе использовали МХБ производства BD BBL (МХБ–BD) и 3 серии экспериментальных образцов (МХБ–Оболенск). Физико-химические показатели качества, содержание двухвалентных металлов и тимидина определяли в соответствии с требованиями ГОСТ Р 59786–2021.

Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) гентамицина, амикацина, меропенема, имипенема, левофлоксацина, моксифлоксацина, ципрофлоксацина, тетрациклина, тигециклина, ванкомицина, колистина, линезолида, триметоприма/сульфаметоксазола (ТС) (все – Sigma) для тест-штаммов *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 и *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 определяли в МХБ–BD и МХБ–Оболенск методом микроразведений в бульоне по требованиям ГОСТ Р ИСО 20776–1–2010 и затем оценивали по таблицам пограничных значений EUCAST (версия 13.0) и ГОСТ Р 59786–2021 на их соответствие.

Определение показателя чувствительности МХБ проводили путем десятикратных разведений микробных суспензий тест-штаммов (из исходных, соответствующих 10 единицам стандарта мутности – ОСО), до 10–9 с последующим высевом по 0,1 мл в 10,0 мл МХБ из каждого разведения. Посевы инкубировали в течение 18–20 ч при температуре 37 °С.

Результаты. МХБ–Оболенск, сконструированный на основе отечественного СГК по классической прописи, обладал следующими показателями качества: pH 7,27–7,32, содержание ионов Ca^{2+} – 22–23,5 мг/л, Mg^{2+} – 10,3–11,0 мг/л, Mn^{2+} – 0,2–0,27 мг/л, Zn^{2+} – 0,27–0,3 мг/л. В импортном аналоге значение pH составило 7,28, концентрации ионов Ca^{2+} – 22,5 мг/л, Mg^{2+} – 10,8 мг/л, Mn^{2+} – 0,35 мг/л, Zn^{2+} – 0,4 мг/л. Все полученные значения физико-химических показателей удовлетворяли положениям ГОСТ Р 59786–2021. Значение МПК ТС для *E. faecalis* составило 0,12 мг/л в МХБ–Оболенск, а в МХБ–BD оно отличалось на одно-двукратное разведение и равнялось 0,25 мг/л, что удовлетворяет требованиям контроля качества по версии 13.0 EUCAST ($\leq 0,5$ мг/л) и свидетельствует об оптимальном содержании тимидина в обоих бульонах.

Полученные значения МПК остальных антибиотиков для исследуемых тест-штаммов микроорганизмов, определенные как на экспериментальных сериях МХБ–Оболенск, так на импортном аналоге, соответствовали допустимым диапазонам значений, а в 86% случаев – целевым значениям.

Все исследуемые образцы МХБ обеспечивали визуально обнаруживаемый рост тест-штаммов в виде диффузного помутнения среды из разведений от 10^{-1} до 10^{-7} .

Вывод. Полученные исследования показали, что образцы МХБ, приготовленные на основе отечественного СГК, соответствовали требованиям международных стандартов и не уступали по качеству импортному аналогу.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Влияние биологических свойств штаммов *Bacillus anthracis* на выработку цитокинов клетками крови человека *in vitro*

Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Щербакова В.Ю., Абрамович А.В., Калинин А.В., Родионов И.С.

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация

Изучение биологических свойств патогенных микроорганизмов в основном проводится при культивировании на искусственных питательных средах, обеспечивающих оптимальный рост и размножение микроба, или при заражении лабораторных животных. Использование лабораторных животных для оценки степени вирулентности и других особенностей штаммов возбудителей инфекции считается общепризнанным золотым стандартом. В последнее время широкое применение находят экспериментальные системы для выявления ключевых факторов патогенности и изучения взаимодействия между патогенами и клетками макроорганизма. При моделировании отдельных этапов сибиреязвенной инфекции *in vitro* эксперименты необходимо проводить в максимально стандартизованных условиях. Наиболее информативным и объективным является комплексный подход, сочетающий морфологические, молекулярно-генетические и иммунологические методы и позволяющий выявлять наиболее важные особенности штаммов *Bacillus anthracis*, влияющие на проявление их патогенных свойств.

Цель работы. Оценить влияние биологических свойств штаммов *B. anthracis* на выработку цитокинов *in vitro* клетками крови человека.

Материалы и методы. В работе использовали 38 штаммов *B. anthracis*, относящихся к основным генетическим линиям А и В, имеющих разный плазмидный состав и комплекс основных фенотипических признаков. Для эксперимента использовали цельную гепаринизированную кровь человека в объеме 1 мл на образец. Конечная концентрация спор сибиреязвенного микроба составила $5 \cdot 10^3$ спор/мл. Образцы инкубировали в глубоколоночном планшете в CO_2 -инкубаторе при 5% CO_2 и 37 °С в течение 4 ч, отбирали 400 мкл, центрифугировали и надосадочную жидкость пропускали через PVDF-фильтр. Количественный анализ уровня цитокинов проводили на приборе для мультиплексного иммунологического анализа в микропланшетах Bio-Plex 200 (BioRad, США) с использованием набора Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 17-plex (BioRad, США). Безопасность работ была обеспечена в соответствии с СП 3.3686–21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

Результаты. Для анализа влияния комплекса биологических свойств штаммов сибиреязвенного микроба на выработку цитокинов клетками крови человека была построена диаграмма, отражающая медианные значения уровня цитокинов. Наибольшие отличия в уровне продукции цитокинов наблюдались при взаимодействии клеток крови с моноплазмидными штаммами *B. anthracis*, лишенными плазмиды токсинообразования pXO1. Эта группа штаммов индуцировала максимально высокие значения G-CSF, IL-12, IL-1b, IL-6. Атипичные штаммы *B. anthracis* с фенотипом Cap (CO₂) + (O₂) +Tox-ProtA-Hly-Lec-Trp- вызывали усиленную продукцию цитокинов IL-6 и MCP-1. Большинство этих изменений касаются уровня продукции первичных воспалительных цитокинов, вызывающих индукцию белков острой фазы. Выявленные нами особенности цитокинового профиля, возможно, объясняются коротким (4 ч) сроком наблюдения. Интересным представляется исследование динамики в интервале до 24 ч. Полученные результаты подтверждают, что на ранних этапах взаимодействия сибиреязвенного микроба и макроорганизма ведущую роль играют поверхностные структуры.

Оценка санитарно-микробиологического состояния родников, расположенных на территории города Саратова

Кошелева И.С., Мамонова И.А., Кузянов Д.А., Эрдниев Л.П., Гусев Ю.С.

Саратовский МНЦ гигиены ФБУН «ФНЦ медико-профилактических технологий управления рисками здоровью населения», Саратов, Российская Федерация

Помимо централизованного водоснабжения, жители г. Саратова активно используют воды природных источников, в частности родников. Многие из них расположены вблизи автомобильных дорог, жилых домов и промышленных зон, что создает риск загрязнения данных водоисточников в результате хозяйственной деятельности человека. Учитывая, что родниковая вода, как правило, потребляется населением без предварительной водоподготовки, исследования, направленные на оценку санитарно-микробиологического состояния родников, являются необходимым условием сохранения здоровья населения.

В рамках работы в период с 2018 по 2020 г. было отобрано 100 образцов воды из 13 родников, используемых населением в питьевых целях. Отбор проб проводился четырехкратно в течение календарного года. Микробиологические исследования проводились на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» в соответствии с МУК 4.2.1018–01 «Санитарно-микробиологический анализ питьевой воды». Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 10.

Установлено, что 23% образцов воды не соответствовали санитарно-микробиологическим нормам как минимум по одному из исследуемых показателей. В 2% отобранных образцов выявлены превышения по показателю общего микробного числа. В 20% проб были обнаружены колиформные бактерии (ОКБ), в 10% – термотолерантные колиформные

бактерии (ОТБ), что является индикатором, указывающим на коммунально-бытовое загрязнение водоисточника.

Проведен анализ зависимости общего количества проб, давших положительный результат по показателям ОКБ и ОТБ, от сезона, в который был проведен забор образцов. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии статистически значимых различий ($p > 0,05$). Следует отметить, что несоответствие проб воды санитарно-микробиологическим нормам по показателям ОКБ и ТКБ регистрировалось в период с марта по ноябрь, характеризующийся положительными среднесуточными температурами окружающей среды. Отсутствие ОКБ и ТКБ в образцах, отобранных в зимний период, объясняется физиологическими особенностями данных групп микроорганизмов.

Проведенный анализ зависимости количества проб воды, отобранных из родников, не соответствующих санитарно-эпидемиологическим нормам, от временного интервала (год отбора проб) статистически значимых различий между показателями не выявил ($p > 0,05$).

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии сезонной зависимости микробиологического загрязнения родников, что косвенно указывает на превалирование антропогенного фактора, определяющего степень загрязнения родников, расположенных на территории Саратова, что требует усиления санитарно-эпидемиологического контроля за родниками и своевременного информирования населения с целью предотвращения развития острых кишечных инфекций, связанных с употреблением питьевой воды.

Обнаружение генов β-лактамаз расширенного спектра и карбапенемаз в изолятах, обнаруженных в пищевых продуктах

Кошкарева И.И., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.

ФБУН «Тюменский научно-исследовательский институт краевой инфекционной патологии» Роспотребнадзора, Тюмень, Российская Федерация

Питание – важнейший фактор, определяющий здоровье населения. Изучение продовольственного сырья и пищевых продуктов является основным в санитарно-бактериологических исследованиях. Обеспечение биобезопасности пищевых продуктов – важнейшая проблема современности.

Цель исследования. Выявление генов β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемаз бактерий, изолированных из пищевых продуктах.

Материалы и методы. В аккредитованном испытательном лабораторном центре исследовано 1013 образцов готовых пищевых продуктов, отобранных в объектах общественного питания, образовательных и лечебных организациях. Из не соответствующих санитарно-гигиеническим показателям образцов (133) выделены 162 изолята, среди которых 144 исследованы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) на наличие генов резистентности. Результаты проанализированы на соответствие требованиям актуальных нормативных документов. Идентификация культур осуществля-

лась методом MALDI-TOF MS. Чувствительность к антибиотикам проверяли диско-диффузионным методом. Для обнаружения генов резистентности к БЛРС методом ПЦР в режиме реального времени использовали наборы «БакРезиста», «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», «АмплиСенс MDR MBL-FL».

Результаты. Выявлено, что готовые пищевые продукты в 13,1% случаев не соответствовали санитарно-гигиеническим нормативам, из них 67,9% по показателю БГКП (бактерии группы кишечной палочки). Идентифицировались бактерии родов: *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Leclercia adecarboxylata*, *Lelliottia amnigena*, *Kosakonia cowanii*, *Rahnella aquatica*, *Raoultella* spp., *Pantoea* spp. Установлено, что среди всех исследуемых штаммов наибольшая резистентность (39%) определена к амоксициллин-клавулановой кислоте; около 3% штаммов устойчивы к цефтазидиму и амикацину.

Молекулярно-генетические методы выявили 6,9% штаммов, обладающих генами БЛРС классов D (оксациллиназы) и A2: OXA-48, OXA-23 и TEM, CTX-M, SHV соответственно; 3,5% штаммов явились носителями генов металло-лактомаз В класса с карбапенемазной активностью: NDM (Нью-Дели металло-β-лактамазы), VIM, IMP. Штаммы-носители БЛРС и металло-β-лактамазы (*Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp.) проявляли чувствительность к антибиотикам. Исключение составил БЛРС-отрицательный штамм *E. coli* (lac+), устойчивый к амоксиклаву, цефтазидиму, цефотаксиму, но в то же время вырабатывающий БЛРС типа TEM.

В пробах, соответствующих санитарно-гигиеническим требованиям, в 20,9% случаев были изолированы бактерии родов *Pseudomonas* и *Acinetobacter*. Изоляты *Pseudomonas* spp. в 9% случаев проявляли резистентность к меропенему, имипенему, амикацину, цефепиму и цефтазидиму. Бактерии *Acinetobacter baumannii* отличались от них чувствительностью к амикацину, один штамм обладал генами БЛРС класса A2 – SHV.

Заключение. Результаты исследований свидетельствуют о наличии потенциала патогенности бактерий, изолированных из готовых пищевых продуктов, большая часть которых приходится на ESKAPE-патогены. Частота обнаружения бактерий-носителей генов резистентности свидетельствует о низком качестве пищевой продукции и высоком риске развития воспалительных заболеваний.

Модифицированные фосфатом кальция F1- и LcrV-антигены *Yersinia pestis*, иммобилизованные на плоских микрокристаллах глутамин, проявляют повышенную иммуногенность для мышей и морских свинок

Красильникова Е.А., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Иванов С.А., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Гапельченкова Т.В., Вагайская А.С., Мазурина Е.М., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Необходимость обновления вакцины против чумы подчеркивается пандемическим потенциалом болезни в сочетании с наличием природных очагов чумы в Евразии, Африке и Америке. Недавние исследования были сосредоточены на разработке субъединичных вакцин, содержащих капсульный антиген (F1) и антиген вирулентности LcrV (V) *Yersinia pestis*. В качестве адъюванта применяют гидроокись алюминия, CpG, анатоксины холерного токсина или термолабильного токсина *Escherichia coli*. Совсем недавно было показано, что использование новой технологии белковых микрокристаллов, модифицированных фосфатом кальция (PCMC), не только повышает защитный потенциал антигенов, но и улучшает термостабильность препарата [Moore et al., 2018]. Однако протективность подобной субъединичной вакцины для профилактики чумы оценивали только на модели мышей.

В настоящем исследовании инъекционный состав рекомбинантных антигенов F1 и V *Y. pestis* был приготовлен на плоских микрокристаллах глутамин и покрыт фосфатом кальция с использованием опубликованной методологии [Jones et al., 2013]. Группам из 6 инбредных мышей или морских свинок вводили подкожно (п/к) в дни 0 и 30 препарат в объеме 0,2 мл или PBS в качестве контроля. Через 28 суток после последней иммунизации мышей и морских свинок в каждой группе заражали подкожно серийными десятикратными разведениями двухсуточной агаризованной культуры штамма *Y. pestis* 231 дикого типа, выращенного при 28 °C (6 животных на дозу).

Рекомбинантные антигены F1+V в составе PCMC индуцировали высокие уровни сывороточных анти-F1- и анти-rV-антител у мышей и морских свинок. Подкожная иммунизация препаратом F1+V в составе PCMC по схеме с двумя дозами обеспечивала полную защиту мышей от подкожного заражения 106 LD₅₀ *Y. pestis* 231, а титры антител к антигенам F1 и V достоверно коррелировали с защитой у мышей. Мы впервые продемонстрировали, что рекомбинантные антигены F1+V в составе PCMC являются иммуногенными при подкожном введении 2 доз морским свинкам и защищают животных от гибели после заражения 1,2•10³ LD₅₀ штамма *Y. pestis* 231.

Субъединичная чумная вакцина, включающая антигены F1+V в составе PCMC, вводимая в виде 2 доз подкожно, вызывает сильный иммунный ответ у мышей и морских свинок и может стать альтернативой традиционным субъединичным вакцинам на основе алюминия.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Белки наружной мембраны *Yersinia pseudotuberculosis* как мишени для терапии псевдотуберкулеза

Красильникова Е.А., Трунякова А.С., Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Светоч Т.Э., Дентовская С.В.

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

Появление грамотрицательных бактерий с множественной лекарственной устойчивостью требует новых методов лечения инфекций. Воздействие на биогенез факторов патогенности может быть стратегией, альтернативной уничтожению бактерий с помощью антибиотиков. Наружная мембрана (НМ) грамотрицательных бактерий действует как физический барьер, облегчает обмен молекулами, а также содержит множество белков, связанных с патогенностью. Для транслокации белков в НМ важен олигомерный белковый комплекс, ассоциированный с мембраной (β -barrel assembly machinery/ВAM-комплекс), и периплазматические шапероны OmpH, SurA и DegP, защищающие белки от протеаз и удерживающие в развернутом состоянии до момента доставки до ВAM-комплекса. Будучи необходимыми для биогенеза белков наружной мембраны, белки BamABCDE, OmpH, SurA и DegP могут служить привлекательными мишенями для разработки новых противоинфекционных агентов.

Целью исследования явилось определение чувствительности к комплементу сыворотки человеческой крови штаммов псевдотуберкулезного микроба с различными нокаутными мутациями в генах, кодирующих шапероны DegP, SurA и OmpH и один из белков комплекса ВAM – BamB, мутация по которому не является летальной для клетки.

Наборы штаммов *Yersinia pseudotuberculosis* 529–3260 pCad+ и *Y. pseudotuberculosis* 85 pCad+ с мутациями в генах *surA*, *bamB*, *degP* и *ompH* получали методом аллельного обмена с использованием суицидного вектора pCVD442. Чувствительность к комплементу определяли по жизнеспособности исследуемых штаммов после культивирования в 80%-й сыворотке с интактным (НЧС) или инактивированным путем нагревания (тНЧС) путем высевов на плотную питательную среду.

На основе штаммов *Y. pseudotuberculosis* 529–3260 pCad+ и *Y. pseudotuberculosis* 85 pCad+ с помощью конъюгативного переноса с использованием суицидного вектора pCVD442 были получены мутантные штаммы с делециями генах *surA*, *ompH*, *degP* и *bamB*.

Клетки исходных штаммов *Y. pseudotuberculosis* 529–3260 pCad+ и *Y. pseudotuberculosis* 85 pCad+, выращенные при температуре 28 °С, переживали действие комплемента 80% НЧС. Число жизнеспособных микробных клеток достоверно снижалось после 1 ч инкубации в НЧС по сравнению с инкубацией в тНЧС (6,83 и 6,45 lg КОЕ/мл соответственно). Показано что штаммы *Y. pseudotuberculosis* 85 pCad+ Δ *surA* и 85 pCad+ Δ *bamB* приобретали чувствительность к компле-

менту сыворотки крови со значимым снижением количества жизнеспособных клеток (2,30 и 2,08 lg КОЕ/мл соответственно). Аналогичное снижение жизнеспособности после инкубации в НЧС обнаружили для мутантов *Y. pseudotuberculosis* 529–3260 pCad+ Δ *surA* и 529–3260 pCad+ Δ *bamB* (4,75 и 5,32 lg КОЕ/мл соответственно). Штаммы *Y. pseudotuberculosis* 529–3260 pCad+ и *Y. pseudotuberculosis* 85 pCad+, дефектные по синтезу белков OmpH и DegP, переживали действие комплемента НЧС и сохраняли жизнеспособность клеток, сопоставимую со штаммом дикого типа.

Таким образом, белки BamB и SurA псевдотуберкулезного микроба являются перспективными мишенями для разработки новых противоинфекционных препаратов.

Использование микрокамер для оценки развития клеток бактерий методом фазово-контрастной микроскопии

Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Микрокультуральный метод изучения микроорганизмов хорошо зарекомендовал себя при наблюдении за делением клеток и их количественным учетом в микроколониях, при исследовании подвижности и других особенностей развития клеток. Все применяемые в настоящее время микрокамеры можно подразделить на непроточные (стационарные) микрокамеры (либо камеры), предназначенные для сравнительно непродолжительных по времени наблюдений, и проточные (перфузионные) камеры, предусматривающие периодическую или постоянную смену питательной среды. Чаще всего при кратковременных экспериментах применяется микрокамера, предложенная М.А.Пешковым, т.к. она конструктивно проста и время ее подготовки к работе невелико. Изготовление микрокамер проточного типа – более сложная техническая задача, чем создание стационарных камер. Основные требования при этом – сохранение клеток в рабочем объеме камеры (противодействие их вымыванию потоком питательной среды), надежная герметизация объема камеры, а также обеспечение ламинарного потока питательной среды через камеру.

Цель. Проведение экспериментов с камерами различной конструкции (стационарной и проточной) для сравнения влияния их конструктивных особенностей на развитие клеток микроорганизмов.

Материалы и методы. В экспериментах использовали штаммы бактерий вида *Shigella flexneri*. Инокулят бактерий (18 ч) засеивали в камеры методом стекающей капли. В работе применяли две разновидности микрокамер оригинальной конструкции О.Ю.Кузнецова: стационарную камеру диффузного типа (Отр. рац. пр. №О-2893, 1987) и проточную камеру (А.С. N 1339123, Б.И. №35, 1987) для последующего использования с фазово-контрастным устройством светового микроскопа. Эти камеры были конструктивно унифицированы на первых этапах сборки, что позволяет быстро подготовить их к работе и приступить к изучению

размещенных в них клеток микроорганизмов. В экспериментах определяли время генерации (\hat{i}) клеток I и II поколений, причем более точной была оценка \hat{i} клеток II поколения, т.к. неизвестно было начало клеточного цикла для клеток I поколения.

Результаты. При использовании 18-часового инокулята у клеток I поколения при культивировании в проточной микрокамере наблюдается сокращение \hat{i} (145 ± 7 мин) по сравнению со стационарной камерой (189 ± 12 мин). Во II поколении \hat{i} клеток стимулируется еще в большей степени – 95 ± 4 мин в проточной камере против 145 ± 6 мин в стационарной камере. Это определяется тем, что при проточном культивировании происходит удаление ингибиторов развития клеток, привнесенных в камеру вместе с инокулятом. Данные экспериментов показали, что особенности культивирования клеток в стационарной и проточной камере отличаются и зависят от реологии среды культивирования.

Возможность изучения покоящихся (некультивируемых) клеток бактерий рода *Shigella* с помощью электронной микроскопии

Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Присутствие в структуре популяции шигелл некультивируемых (покоящихся) клеток уже давно является неоспоримым фактом. При получении данных клеток иногда используют оригинальный подход с использованием антибиотиков, например, пенициллина, в больших концентрациях для устранения физиологически активных клеток, которые не способны противостоять его ингибирующему действию в процессе синтеза пептидогликана. При этом растущие клетки постепенно гибнут, образуя большое количество детритных масс, затрудняющих обнаружение некультивируемых (покоящихся) клеток. Вместе с тем такого рода подход позволяет говорить о возможном получении достаточного количества некультивируемых (покоящихся) клеток шигелл.

Цель. Обнаружить некультивируемые (покоящиеся) клетки в структуре популяции шигелл и подтвердить данный факт с помощью сканирующей электронной микроскопии.

Материал и методы. Объектом исследования были бактерии *Shigella flexneri* коллекции Simmons. Получение исследуемого материала для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ): поверхность агаризованной питательной среды в чашке Петри, предварительно засеянной бактериями методом газона, опрыскивали раствором пенициллина большой концентрации (500 тыс. ед./мл), а затем с интервалом 30 мин вырезали диски агара для изучения с помощью СЭМ.

Результаты. При выполнении СЭМ клеток *S. flexneri* после внесения пенициллина обнаружено большое разнообразие по размерам палочковидных клеток. Под воздействием пенициллина происходит интенсивное образование межклеточных связей в виде тяжей и нитей. Клетки далее

теряют свою палочковидную форму и становятся сферическими. В дальнейшем под воздействием антибиотика увеличивается количество межклеточных связей с образованием характерных соединенных между собой звездчатых структур. Через 2 ч происходит сокращение числа межклеточных связей, возникают глобулярные образования различных размеров, количество которых затем уменьшается. Через 5,5 ч наблюдается образование бесформенных детритных масс. Однако среди них можно обнаружить клетки, сохранившие типичную морфологию, характерную для обычных растущих клеток шигелл. Эти интактные клетки шигелл, резистентные к воздействию пенициллина, возможно, являются некультивируемыми формами клеток.

Таким образом, полученные электронно-микроскопические снимки подтверждают наличие и возможность изучения такого рода клеток в популяции шигелл после использования пенициллина как инструмента для получения нерастущих, нелизирующихся (покоящихся) клеток в популяции шигелл.

Некультивируемые (покоящиеся) клетки в структуре популяции бактерий рода *Lactobacillus*

Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.

ФГБОУ ВО «Ивановская государственная медицинская академия» Минздрава России, Иваново, Российская Федерация

Вопрос о присутствии некультивируемых клеток в популяциях энтеробактерий периодически обсуждается в научной литературе. Для выявления этого типа клеток используются различные методы исследования популяций бактерий – от клеточного до популяционного. При изучении развития микроорганизмов на клеточном уровне наиболее точным является метод микрокультивирования клеток, поскольку данный метод подразумевает использование специальных микрокамер для прижизненного наблюдения изучаемых клеток микроорганизмов. Процесс микрокультивирования можно реализовать в стационарном и проточном режимах. Наибольшее распространение метод микрокультивирования получил с использованием светового микроскопа при изучении развития бактериальных культур. Связано это с быстрым ростом бактериальных клеток как объекта исследования, что позволяет закончить экспериментальное наблюдение в течение одного или нескольких дней.

Цель. Обнаружить наличие некультивируемых (покоящихся) клеток в структуре развивающейся популяции лактобацилл на клеточно-популяционном уровне.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования были выбраны бактерии рода *Lactobacillus* различных видов. В работе использовали стационарную микрокамеру диффузного типа и проточную микрокамеру с использованием светового фазово-контрастного микроскопа. Для приготовления микрокамер использовали так называемые «слайдовые агаровые пластинки», получаемые путем заливки расплавленного агара в щель между двумя стерильными предметными стеклами. Суточную культуру разводили физиоло-

гическим раствором до 103 кл./мл, наносили на агаровый диск методом стекающей капли и помещали в микрокамеру. В экспериментах использовали жидкую питательную среду MRS. Культивировали при 37 °С в течение 8 ч. При этом если клетки не проявляли никакой физиологической активности на протяжении всего эксперимента и не подвергались аутолизу, то они считались некультивируемыми (покоящимися) клетками в структуре развивающейся бактериальной популяции.

Результаты. Микрокультивирование проводилось в оптимальных условиях. В ходе исследований было выполнено 10 экспериментов, при этом в каждом эксперименте в поле зрения было примерно от 50 до 100 бактериальных клеток. Некультивируемые (покоящиеся) клетки обнаруживались в физиологической структуре популяции от 1 до 3%, как при стационарном, так и при проточном режимах микрокультивирования. Это позволяет говорить о физиологической характеристике популяции лактобацилл, которая не зависит от реологических свойств питательной среды, – присутствию в физиологической структуре популяции некультивируемых (покоящихся) клеток, так же, как и у других энтеробактерий.

Динамика изменчивости структуры популяции *Francisella tularensis* в природных очагах туляремии на Алтае

Куликалова Е.С.¹, Борзенко М.А.¹, Мазепа А.В.¹,
Зарва И.Д.¹, Сынгеева А.К.¹, Холин А.В.¹,
Полковников Е.С.², Базарова Г.Х.², Мищенко А.И.²,
Балахонов С.В.¹

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Алтайская противочумная станция» Роспотребнадзора, Горно-Алтайск, Российская Федерация

Туляремия – зоонозная природно-очаговая инфекционная болезнь, вызываемая бактерией *Francisella tularensis*.

Природные очаги туляремии распространены во всех федеральных округах, в т.ч. и в Сибирском. Алтайский регион в составе Алтайского края и Республики Алтай граничит на юге с Казахстаном, Монголией и Китаем, на территории которых существуют активные очаги туляремии.

Цель. Проследить динамику изменчивости структуры популяции *F. tularensis* в природных очагах туляремии на Алтае.

Материалы и методы. Использованы первичные документы ФКУЗ «Алтайская противочумная станция», материалы государственных докладов Управлений Роспотребнадзора по Республике Алтай и Алтайскому краю, литературные источники. Проведен ретроспективный анализ данных о регистрации *F. tularensis* у млекопитающих, эктопаразитов и из объектов окружающей среды в период 1939–2021 гг.

Результаты и обсуждение. С 1939 по 2021 г. на Алтае выявлено 2728 случаев заболевания людей туляремией. Наибольшая часть из них – 2676 (98,1%) – приходилась на период 1939–1968 гг., с 2001 по 2021 г. зарегистрировано 48 случаев туляремии (Республика Алтай – 28, Алтайский край – 20).

С 1955 г. по настоящее время на исследуемой территории микробиологическим методом было выделено 682 штамма туляремии, серологические исследования (реакция прямой гемагглютинации) и полимеразная цепная реакция показали положительные результаты на наличие антител и антигена *F. tularensis* в 153 и 7 случаях соответственно, причем установлена прямая, статистически значимая корреляционная связь уровня заболеваемости людей с ростом числа положительных результатов проб микробиологического мониторинга в годовой динамике.

С 1955 г. на территории Алтая регистрировались только штаммы подвида *F. tularensis holarctica*. С 2011 г., кроме этого, началась регистрация подвида *F. tularensis mediasiatica*. Регистрация подвида *F. tularensis mediasiatica* до 2011 г. на территории России не отмечалась. Обнаружения были лишь в Казахстане (поймы рек Или и Чу) и в Узбекистане (дельта реки Амударья). Наиболее вероятной причиной появления штаммов среднеазиатского подвида на территории России является трансграничное распространение эпизоотий в северо-восточном направлении (дрейф среднеазиатских штаммов в сторону Сибири).

Отмечено, что изоляты *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* выделяются только от иксодовых клещей (*Haemaphysalis concinna*, *Dermacentor silvarum*, *Dermacentor reticulatus*) в Алтайском, Красногорском, Майминском, Смоленском и Чойском районах Алтая. Штаммы голарктического подвида обнаруживаются в пробах от больных людей и мелких млекопитающих, в клещах, объектах внешней среды (ил и вода), гидробионтах, слепнях и комарах в 5 районах Республики Алтай и в 14 районах Алтайского края.

Для повышения эффективности проводимых профилактических и противоэпидемических мероприятий, учитывая возможность трансграничного распространения эпизоотий туляремии, необходим мониторинг активности природных очагов данного зооноза, а также усиление межгосударственного сотрудничества в области борьбы с туляремией.

Изменение микробиоты кожи рук на фоне использования медицинских перчаток

Леонтьева А.В., Ганина Е.Б., Воробьева Ю.В.,
Кундасова Е.П.

ФГБОУ ВО «Тверской государственной медицинской университет» Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка влияния антисептической обработки кожных покровов рук и использования медицинских перчаток на состав микробиоты кожи.

Материалы и методы. В исследовании принимали участие 12 человек (студенты Тверского ГМУ). Эксперимент состоял из трех этапов: 1-й – взятие мазка до гигиенической обработки поверхности кожи рук; 2-й – гигиеническая обработка рук по СанПиН 2.1 3.2630;10 с дальнейшим взятием мазка; 3-й – использование смотровых медицинских перчаток в течение 60 мин с дальнейшим взятием мазка. Посев осуществлялся на дифференциально-диагностические среды Сабуро, М118, кровяной агар. Использовался класси-

ческий бактериологический метод исследования с дальнейшей идентификацией чистых изолятов API-системой. Количественный состав микробиоты рассчитывался в log КОЕ/мл. Статистический анализ результатов проводился с использованием статистического критерия Стьюдента.

Результаты. На 1-м этапе наблюдалось выделение следующих микроорганизмов: *Staphylococcus* spp. – среднее количество 3,7 log КОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* – среднее количество 3,0 log КОЕ/мл, *Staphylococcus epidermidis* – среднее количество 3,6 log КОЕ/мл, *Candida* spp. – среднее количество 3,3 log КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – среднее количество 2,9 log КОЕ/мл, *Enterococcus* spp. – среднее количество 3,1 log КОЕ/мл.

На 2-м этапе исследования количественный и качественный состав микробиоты кожи рук значительно отличался от показателей на 1-м этапе: *Staphylococcus* spp. – 2,2 log КОЕ/мл, *S. aureus* – 3,0 log КОЕ/мл, *S. epidermidis* – 2,6 log КОЕ/мл, *Candida* spp. – 3,0 log КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – 2,2 log КОЕ/мл, *Enterococcus* spp. – 2,6 log КОЕ/мл.

На 3-м этапе исследования (после 1 ч использования нитриловых перчаток) состав микробиоты кожи рук выглядел следующим образом: *Staphylococcus* spp. – 2,5 log КОЕ/мл, *S. aureus* – 2,6 log КОЕ/мл, *S. epidermidis* – 3,1 log КОЕ/мл, *Candida* spp. – 1,6 log КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – 2,1 log КОЕ/мл, *Enterococcus* spp. – 2,6 log КОЕ/мл, *Candida albicans* – 5,6 log КОЕ/мл.

Выводы. Гигиеническая обработка рук по СанПиН значительно снижает количество микроорганизмов на кожных покровах рук, в то же время использование медицинских смотровых перчаток приводит к значительному увеличению не только количества микробиоты кожи рук, но и спектра выделяемых микроорганизмов. Таким образом, условия, созданные во время использования перчаток, являются благоприятными для развития большого количества условно-патогенной микробиоты, которая может оказывать неблагоприятное воздействие как на медицинского работника, так и на пациентов при пренебрежении правилами обработки рук и частоты смены индивидуальных средств защиты (медицинских перчаток).

Создание нового подхода к диагностике туберкулеза в ветеринарии

Литау И.С., Альварес Фигероа М.В.

ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии»
Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация

Для скрининга и диагностики туберкулеза в ветеринарной медицине проводятся аллергические исследования и отбор проб биологического и/или патологического материала для проведения лабораторных исследований, к которым относятся микроскопический и культуральный методы, метод биологической пробы, а также метод полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, специфичностью, быстротой получения результатов, вследствие чего широко применяется при диагностике туберкулеза в медицине. Несмотря на это, в ветеринарии он применяется

в качестве дополнительного, уточняющего теста. Такая ситуация обусловлена отсутствием надежных и современных тест-систем. Зарегистрированные в настоящее время тест-системы не обладают достаточной чувствительностью, не адаптированы ко всем необходимым видам материала, не охватывают весь спектр возбудителей, а некоторые и вовсе устарели, т.к. представлены в формате электрофоретической детекции продуктов амплификации.

Цель работы. Разработать мультиплексную тест-систему для выявления ДНК МТВс и МАС методом ПЦР в реальном времени в одной пробирке при диагностике туберкулеза в ветеринарии.

Материалы и методы. Для подтверждения аналитической специфичности использовали 96 штаммов различных микроорганизмов и ДНК тестируемых животных. Для оценки предела обнаружения – образцы молока, фекалий, тканевого нативного материала, культур микроорганизмов и смывов с объектов окружающей среды с добавлением штаммов *Micobacterium tuberculosis* H37Ra и *Micobacterium avium* 9/68 в концентрациях $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ и $1 \cdot 10^1$ ГЭ/мл, в 20 повторях.

Для оценки диагностических характеристик разработанной тест-системы в качестве референтных использовались тест-системы для выявления ДНК МТВс «МТБ-КОМ» и ДНК МАС «АВИУМ» (обе производства ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия).

Результаты. При оценке аналитической специфичности тест-системы в 73 образцах, не принадлежащих к МТВс и МАС, был получен отрицательный результат, тогда как в 23 образцах, входящих в эти группы, был получен положительный результат по соответствующим каналам детекции. Таким образом, тест-система показала 100%-ю (95% ДИ 95,07–100,00) специфичность.

В результате оценки предела обнаружения определено, что наименьшая выявляемая концентрация возбудителя равна $1 \cdot 10^2$ ГЭ/мл для МТВс и $1 \cdot 10^3$ ГЭ/мл для МАС для всех видов анализируемого биоматериала.

Разработанная тест-система обладает 100%-й (95% ДИ 91,19–100) диагностической чувствительностью и 100%-й (95% ДИ 96,52–100) диагностической специфичностью при сравнении с референтными наборами реагентов.

Выводы. Разработанная тест-система в настоящее время не имеет аналогов, т.к. способна идентифицировать все виды возбудителей туберкулеза животных «в одной пробирке». Тест-система показала более высокую чувствительность и специфичность по сравнению с применяемыми в настоящее время, что позволяет усовершенствовать диагностику туберкулеза животных и способствовать предотвращению его распространения вследствие своевременной организации мероприятий по ликвидации очагов заболевания.

Влияние экологических факторов на заболеваемость детей COVID-19 в период военного конфликта

Лихобабина О.А., Махмутов Р.Ф., Пошехонова Ю.В., Лихобабин А.А.

ФГБОУ ВО «Донецкий государственный медицинский университет им. М.Горького» Минздрава России, Донецк, Российская Федерация

Донецкая Народная Республика (ДНР) имеет на 1 км² площади загрязнение в 4,2 раза больше, чем в США, и в 3 раза больше, чем в странах Евросоюза. Влияние качества атмосферного воздуха на заболеваемость населения составляет 7–20%, уровни тяжелых металлов в почве определяют степень загрязнения воды и пищевых продуктов.

Цель исследования. Изучить влияние экологических факторов на заболеваемость детей COVID-19 в период военного конфликта.

Материалы и методы. В работе использованы данные республиканского лабораторного центра ДНР и Минздрава ДНР.

Результаты и обсуждение. В «довоенный период» (ДП) – 2010–2013 гг. – наблюдалось превышение предельно допустимой концентрации (ПДК) тяжелых металлов (ТМ). В «переходный военный период» (ПВП) – 2014–2016 гг. – и «стабильный военный период» (СВП) – 2017–2022 гг. – отмечалось снижение уровня ПДК. Среднесуточная концентрация свинца в СВП снизилась в 1,4 раза, кадмия – в 20 раз ($p < 0,05$). Ранее содержание свинца в воздухе «грязного» района г. Донецка превышало ПДК в 9 раз, а кадмия – в 7 раз. В период СВП установлено снижение концентрации свинца в 6,4 раза, кадмия – в 5,9 ($p < 0,05$). С 2014 г. количество объектов водоснабжения уменьшилось на 20% (2010 г.). Резкое сокращение источников (в 1,2 раза) произошло в 2017 г.

Последствия неблагоприятных изменений состояния почвы – спад промышленного производства; недостаточная санитарная очистка территории населенных пунктов; несоблюдение требований санитарного законодательства при сборе, накоплении и удалении производственных и твердых бытовых отходов. Доля проб почвы селитебных территорий с превышением ПДК в среднем составляет 20% (химические), 7% (микробиологические) и 3% (паразитарные показатели).

В 2021 г. в ДНР инфекцией COVID-19 переболел 801 ребенок, в 2022 г. – 1230 детей. Детей старше 7 лет было 55%, первого года жизни – 25%. Преобладающими клиническими вариантами течения были: поражение дыхательных путей (95%), гастроинтестинальная форма (40%). По тяжести преобладали легкая (67%) и среднетяжелая (25%) формы. У детей первого года жизни преобладал стенозирующий ларингит и бронхиолит, у старших детей – тонзиллит, боль в горле, заложенность носа, субфебрильная температура, кашель, головная боль. В 2021 г. зарегистрировано 9 летальных исходов от COVID-19. Постковидный синдром наблюдался в 35% случаев.

Вывод. Оценка влияния окружающей среды ДНР на здоровье населения в период военного конфликта выступает

как первостепенная проблема, без комплексного решения которой не могут эффективно проводиться профилактические мероприятия. Стресс-индуцированные состояния во время пандемии COVID-19 и военного конфликта усугубляют действия экологических факторов, определяющих уровень заболеваемости у детей, что требует оптимизации особенностей наблюдения за детьми в постковидный период с использованием разных методов реабилитации.

Многофакторный подход в изучении риска осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве на территории Волгоградской области

Логвин Ф.В.¹, Герасименко Д.К.², Рязанова А.Г.², Мезенцев В.М.², Семенова О.В.², Аксенова Л.Ю.², Еременко Е.И.², Головинская Т.М.², Печковский Г.А.², Олейникова К.А.²

¹ФГБОУ ВО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

В последние десятилетия эпизоотолого-эпидемиологическая ситуация по сибирской язве в Российской Федерации остается нестабильной, с ежегодной регистрацией случаев заболевания сельскохозяйственных животных и людей. В связи с этим в организации надзора и профилактики сибирской язвы актуальна оценка риска осложнения обстановки с ранжированием территорий регионов на основе показателей активности инфекции, влияния природных факторов и др.

Цель работы – применение многофакторного подхода в анализе риска осложнения ситуации по сибирской язве на административных территориях Волгоградской области.

Для изучения рисков осложнения ситуации по сибирской язве использована методика ранжирования с учетом совокупности факторов/показателей, характеризующих наличие и эпизоотолого-эпидемиологическую активность стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП) в административно-территориальных единицах (АТЕ) субъекта: количество (R1) и число лет активности (R2) СНП, количество активных СНП (R3) и число лет активности (R4) за последние 10 лет, кратность активности СНП (R5), плотность (R6) и удельный вес (R7) СНП, индекс эпизоотичности (R8). Исходным величинам факторов R1–R8 относительно каждой АТЕ присвоены ранги (порядковые номера) с дальнейшим расчетом суммарных рейтингов $\Sigma R1-8$ для всех АТЕ и их распределением на 4 группы риска в геоинформационной программе ArcGIS10.

Территория Волгоградской области эндемична по сибирской язве, а потенциальные риски присутствуют в большинстве АТЕ. Согласно актуализированным данным Управления Роспотребнадзора по Волгоградской области, в регионе зарегистрировано 567 СНП в 33 районах и 5 городах областного значения, в которых с 1900 по 2016 г. имели место 1169 вспышек инфекции.

Более 60% СНП появилось в 1930–1949 гг., максимум активности СНП – 1930–1959 гг. (898 вспышек). После 2010 г. инфекция отмечалась в 4 районах. При ранжировании на основе $\Sigma R1-8$ АТЕ объединены следующим образом. Первая группа (низкая степень риска; $\Sigma R1-8$: 44,000–109,000) – Городищенский, Киквидзенский, Кумылженский, Михайловский, Новоаннинский, Палласовский, Руднянский, Чернышковский районы, г. Волгоград, г. Волжский (всего 57 СНП; 88 вспышек). Вторая (средняя; 109,001–158,000) – Даниловский, Иловлинский, Калачевский, Николаевский, Ольховский, Светлоярский, Среднеахтубинский районы, г. Камышин, г. Михайловка, г. Фролово (109 СНП; 219 вспышек). Третья (высокая; 158,001–205,000) – Алексеевский, Быковский, Дубовский, Клетский, Котовский, Ленинский, Новониколаевский, Серафимовичский, Старополтавский, Фроловский районы, г. Урюпинск (185 СНП; 406 вспышек). Четвертая (очень высокая; 205,001–256,500) – Еланский, Жирновский, Камышинский, Котельниковский, Нехаевский, Октябрьский, Суворовинский, Урюпинский районы (216 СНП; 456 вспышек).

Результаты ранжирования Волгоградской области в сочетании с анализом проявлений сибирской язвы в АТЕ с разной степенью риска обеспечат совершенствование надзора за инфекцией с принятием дифференцированных управленческих решений.

Возможности диагностики клостридиальной инфекции

Логина О.П., Шевченко Н.И.

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

По современным представлениям *Clostridioides difficile*-ассоциированная диарея – это заболевание, развивающееся при нарушении состава кишечной микробиоты с избыточной колонизацией токсигенными штаммами *C. difficile* в результате приема антибиотиков и имеющее различные клинические проявления – от легкой диареи до псевдомембранозного колита, токсического мегаколона и септического шока, что может привести к гибели пациента. В связи с этим важно в короткие сроки установить причину диареи и назначить этиотропную терапию.

Цель. Провести диагностику *C. difficile*-ассоциированных инфекций в многопрофильном стационаре.

Материалы и методы. Исследовали 182 образца фекалий от пациентов с характерными клиническими проявлениями (диарея >3 раз в сутки, боли в животе), получавших антибактериальную терапию. Проводилось определение глутаматдегидрогеназы (GDH), токсинов А и В *C. difficile* (CDAB) иммуноферментным методом на иммунологическом анализаторе VIDAS. Положительными считались результаты для CDAB $\geq 0,37$, для GDH $> 0,10$.

Результаты и обсуждение. По результатам исследования в 75 (41,2%) клинических образцах выявлены GDH и CDAB, что подтвердило наличие токсигенного штамма *C. difficile*. Таким пациентам была рекомендована этиотроп-

ная терапия препаратами первой линии (метронидазол, ванкомицин). У 37 (20,3%) пациентов получен положительный результат GDH при отрицательном результате CDAB. У этих пациентов клинические проявления могли быть обусловлены критической колонизацией *C. difficile* с последующей возможной продукцией токсина. В этом случае рекомендовано повторное определение токсина и GDH в динамике. Определение GDH позволяет с максимальной степенью вероятности исключить наличие *C. difficile* за короткий период времени (90 мин). GDH является хорошим антигенным маркером для обнаружения данного микроорганизма и рекомендуется нами в качестве скринингового теста. В случае отрицательного результата определения GDH *C. difficile* дальнейшее обследование на наличие клостридий не требуется, при положительном необходимо проведение тестов, подтверждающих наличие продукции токсинов.

У 70 (38,5%) пациентов получен отрицательный результат иммуноферментного исследования при определении GDH, что указывает на отсутствие *C. difficile* в исследуемых образцах. Для таких пациентов требуется проведение диагностического поиска иного причинного возбудителя диареи (*Candida* spp. / вирусы).

Выводы. Таким образом, для пациентов, длительно получающих антибактериальную терапию, оптимальным методом диагностики *C. difficile*-ассоциированной диареи в многопрофильном стационаре является тестирование фекалий на наличие антигена глутаматдегидрогеназы и токсинов А и В *C. difficile*. Это позволит в максимально короткие сроки установить этиологию диареи и назначить этиотропную терапию.

Характеристика уропатогенов у пациентов с сахарным диабетом

Логина О.П., Шевченко Н.И., Русаленко М.Г.

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Республика Беларусь

По сведениям некоторых авторов, в настоящее время среди основных возбудителей инфекций мочевыводящих путей (ИМП) при сахарном диабете (СД) на амбулаторном этапе лидируют *Escherichia coli* (70%), *Proteus mirabilis* (5%) и *Streptococcus* spp. (2%); в стационаре к перечисленным добавляются *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. и *Enterococcus* spp. (по 15%), *Pseudomonas aeruginosa*. Все выделенные уропатогены отличаются по чувствительности к антибактериальным препаратам в различных регионах, поэтому необходимо проводить локальный микробиологический мониторинг в стационарах с целью назначения эмпирической антибактериальной терапии у таких пациентов.

Цель исследования. Оценить результаты микробиологического мониторинга при ИМП у пациентов с СД.

Материал и методы. Объектом исследования послужили 5247 пациентов с СД и наличием воспалительных изменений в общем анализе мочи (лейкоцитурия), из них с СД 1-го типа – 2075 человек, СД 2-го типа – 2986. Посев мочи выполняли полуколичественным способом на 5%-й кровяной

агар. После инкубации производили определение степени бактериурии. Биохимическую идентификацию и определение чувствительности выполняли на анализаторе VITEK 2 Compact. Контроль качества проводили с применением контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922.

Результаты и обсуждение. Рост микроорганизмов получен в 1080 (65,2%) образцах: в монокультуре – 87,7% ($n = 948$), 2 возбудителя – 12,3% ($n = 132$). Энтеробактерии составили 57,3%, грамположительные кокки – 38,9% от всех изолятов: 69,7% – стафилококки, 30,3% – энтерококки.

E. coli и *Klebsiella* spp. обладали резистентностью к цефуроксиму в 32,6 и 33,7% случаев, к амоксициллину/клавуланату – в 22,8 и 35,7% соответственно. К карбапенемам все энтеробактерии были чувствительны в 100% случаев. *Klebsiella* spp. в 17,6% резистентна к амикацину, в 12,9% – к гентамицину, а *E. coli* – в 2,4 и 7,1% соответственно. К ципрофлоксацину штаммы *Klebsiella* spp. резистентны в 33,3%, *E. coli* – в 82,5%.

Отмечена высокая чувствительность коагулазонегативных стафилококков к ко-тримоксазолу (92,8%), левофлоксацину (76%) и гентамицину (87,1%). Выявлена высокая резистентность *Staphylococcus saprophyticus* к пенициллину (68,2%) и оксациллину (42,4%), поэтому все β -лактамы антибиотики не могут рассматриваться в качестве препаратов выбора. Все изоляты *Enterococcus faecalis* ($n = 97$) обладали 100%-й чувствительностью к ампициллину, ципрофлоксацину, нитрофурантоину, ванкомицину и тейкопланину.

Таким образом, увеличение частоты встречаемости при СД уропатогенов, обладающих высокой лекарственной резистентностью к препаратам, рекомендованным для стартовой терапии, указывает на важность проведения микробиологического мониторинга у этих групп пациентов. Это позволит провести выбор адекватной эмпирической терапии, а также оптимизировать локальные протоколы лечения пациентов с СД в условиях стационара.

Изучение антибактериального действия биологически активных соединений гидрометаллатранов

Лукьянова С.В.¹, Войченко Н.А.¹, Гефан Н.Г.¹,
Оборина Е.Н.², Гриценко И.М.², Адамович С.Н.²

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация;

²ФГБУН «Иркутский институт химии им. А.Е.Фаворского» СО РАН, Иркутск, Российская Федерация

Проблема резистентности микроорганизмов к антибиотическим препаратам остается актуальной на данный момент, что вызывает необходимость поиска новых средств для борьбы с патогенными микроорганизмами.

Большие возможности для повышения биологической активности химических соединений открывает введение в их состав металлов. В Иркутском институте химии им. А.Е.Фаворского СО РАН синтезированы уникальные комплексы триэаноламина (ТЭА) – гидрометаллатраны

(ГМА), МХп. $[N(CH_2CH_2OH)_3]m$ (для краткости МХп•nТЭА), где М = металл; Х = хлор, ацетат и др.

Цель исследования. Изучить антибактериальное действие гидрометаллатранов на ростовые свойства грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Физико-химические и фармакокинетические свойства ГМА оценивали с помощью программы SwissADME (<http://www.swissadme.ch>).

Биологическое действие ГМА (Ni (ac) 2•1ТЭА (1), Co (ac) 2•1ТЭА (2), $CoCl_2 \cdot 2ТЭА$ (3), $ZnCl_2 \cdot 2ТЭА$ (4), Zn (ac) 2•1ТЭА (5), Cd (ac) 2•1ТЭА (6) и Cd (ac) 2•2ТЭА (7) в концентрации от 0,05 до 400 мг/л на рост грамположительных *Listeria monocytogenes* 766, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P (FDA 209-P) и грамотрицательных микроорганизмов *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia enterocolitica* ОЗ 628/1 (коллекция патогенных бактерий Иркутского научно-исследовательского противочумного института) изучали микрометодом серийных разведений. Положительный контроль – питательная среда без добавления ГМА 1–7. Отрицательный контроль – питательная среда с добавлением гентамицина. Численность бактерий определяли спектрофотометрически по оптической плотности (ОП) культуральной среды при $\lambda = 490$ нм на спектрофотометре Mark (BioRad, США) с последующим определением минимальной подавляющей концентрации (МПК).

Прогноз *in silico* ADME (адсорбция, распределение, метаболизм, выделение) показал, что ГМА 1–7 соответствуют правилу Липинского, обладают липофильностью, водорастворимостью и биодоступностью, а также синтетической достижимостью.

Наиболее высокую ингибирующую активность показали ГМА 6 и 7 в отношении *S. aureus* ATCC 6538-P (FDA 209-P) (МПК 25 мг/л) и *L. monocytogenes* 766 (МПК 1,6 мг/л), что сравнимо с активностью гентамицина (МПК 0,8 мг/л); в отношении грамотрицательных микроорганизмов МПК ≥ 100 мг/л. Установлено, что при воздействии ГМА 6, 7 в дозе 100–200 мг/л происходит ингибирование роста культуры в среднем на 55–85%; а ГМА 1, 2, 3, 4 и 5 в тех же дозах оказывали ингибирующее действие в среднем на 45–75% в зависимости от вида микроорганизма. Грамположительные виды бактерий были более чувствительны к действию металлов, чем грамотрицательные. Вид противомикробного действия ГМА устанавливался на основании оценки подавления роста микроорганизма относительно положительного контроля по изменению ОП культуры: на 50% – бактериостатический, на 90–100% – бактерицидный эффект.

Таким образом, анализ антимикробной активности ГМА показал, что ее проявление зависит от химического строения и концентрации действующего вещества, а также вида патогенного микроорганизма. Все исследованные соединения обладали бактериостатическим действием, в большей степени в отношении грамположительных микроорганизмов.

Работа по синтезу соединений и изучению их физико-химических свойств выполнена при финансовой поддержке РНФ и Правительства Иркутской области (проект №23–26–10007).

Генетические особенности мутанта *Burkholderia pseudomallei*, устойчивого к действию бензалкония хлорида

Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Молчанова Е.В., Захарова И.Б.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Мелиоидоз – опасное инфекционное заболевание, возбудителем которого является микроорганизм *Burkholderia pseudomallei*. Патоген обитает в почве и воде открытых водоемов на территориях Северной Австралии, стран Юго-Восточной Азии, Африки, Латинской Америки, островов Карибского архипелага.

B. pseudomallei обладает высоким уровнем резистентности к различным классам антибиотиков, таким как цефалоспорины I и II поколений, пенициллины, аминогликозиды, полимиксины. Для возбудителя мелиоидоза описаны практически все известные механизмы, обуславливающие невосприимчивость к антибактериальным препаратам, однако на данный момент накоплено мало информации о механизмах формирования устойчивости к дезинфицирующим средствам.

Ранее нами было установлено, что *B. pseudomallei* обладает достаточно высоким потенциалом развития резистентности к бензалкония хлориду (катамин), а также показана взаимосвязь между появлением такой устойчивости и снижением чувствительности к антибиотикам различных классов, в т.ч. к цефтазидиму – основному средству терапии мелиоидоза.

Цель настоящего исследования заключалась в обнаружении у возбудителя мелиоидоза потенциальных генетических детерминант резистентности к бензалкония хлориду на основе сравнительного анализа геномов исходного и резистентного к действию бензалкония хлорида штаммов *B. pseudomallei*.

В результате сравнительного анализа геномов изогенных штаммов, отличающихся по уровню устойчивости к катамину, были обнаружены однонуклеотидные замены, делеции и вставки. Поиск среди генов, ответственных за механизмы резистентности к ксенобиотикам, выявил у резистентного к катамину штамма изменения в генах оперона эффлюксного насоса *AmrAB-OprA*, включая сдвиг рамки считывания в гене *amrA*. Продукт гена *amrA* – периплазматический линкер, ответственный за слияние с порином *OprA*, – имел более чем 50%-е отличие по аминокислотному составу в сравнении с белком исходного штамма. Также была выявлена миссенс-мутация в последовательности гена одного из транскрипционных регуляторов семейства TetR, которая привела к замене серина на пролин в 48-м положении и, как следствие, конформационным изменениям во вторичной структуре белка.

Таким образом, полученные результаты указывают на вероятное участие эффлюкс-систем в формировании у *B. pseudomallei* устойчивости к дезинфекционным агентам на основе четвертично-аммонийных соединений.

Работа выполнена в рамках НИР 098–3–21.

Бактериальные тени в составе чумных вакцинных препаратов

Мазурина Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Бактериальные тени привлекали внимание создателей вакцин как практически идеальные объекты-носители пула мембранных протективных антигенов, лишенные балласта, клеточного содержимого и способности к размножению.

На начальных этапах наработки вакцинного препарата с бактериальными тенями необходимо нормировать штамм-продуцент теней, условия культивирования, лизиса, отмывки балластного содержимого и стерильность продукта. Как адекватный тест лизиса и отмывки используют измерение активности нескольких константных для бактериальной клетки растворимых цитоплазматических ферментов.

Задачи количественного определения содержимого теней и подлинности в вакцинном препарате решаются электрофоретическим контролем теней на этапах сборки вакцины и конечной формы препарата. При этом необходимо точно определить влияние носителей и консервантов, например полиэтиленгликоля или мертиолята натрия, на процессы электрофореза. При количественном контроле положительным фактором является наличие в бактериальных тенях мембранных белков, количественное содержание которых хорошо отражает количество теней. Так, в используемом нами штамме *Yersinia pestis* KM260 (12) LpxM константным мембранным белком является AilC, который хорошо различим на электрофореграммах в области 17 кДа в образцах исходного штамма, теней и прототипа вакцинного препарата. Ген *ailC* (*ompX*) белка AilC был клонирован и экспрессирован нами в клетках кишечной палочки, что позволило получить его в гомогенном состоянии и провести иммунизацию животных.

Таким образом, количество белка AilC и, соответственно, теней можно точно определять с помощью иммуноферментного анализа, а принадлежность белка использованному штамму снимает вопросы подлинности. Создание моноклональных антител к белку AilC сделает неактуальными возможные вопросы, связанные со специфичностью анализа.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Классическая и молекулярная диагностика эшерихиозов: достижения в науке и перспективы внедрения в практику

Макарова М.А.

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Эшерихиозы в структуре острых кишечных инфекций (ОКИ) по-прежнему остаются актуальной проблемой здравоохранения ввиду их повсеместного распространения, отсутствия тенденции к снижению заболеваемости и высокой частоты развития неблагоприятных исходов. Эффективность эпидемиологического надзора за эшерихиозами в значительной степени определяется качеством микробиологического исследования, которое базируется на различных доступных лабораторных методах. Во многих практических лабораториях методом диагностики ОКИ все еще остается культуральный. Однако он характеризуется рядом недостатков: значительная трудоемкость и длительность, высокая стоимость, недостаточная воспроизводимость, невозможность оценивать эволюционные связи и структуру бактериальных популяций.

Для *Escherichia coli* патогенность не является видовым признаком, но в процессе эволюции сформировалось множество факторов патогенности, сочетание которых позволило разделить вид на множество нетаксономических групп (патоваров, патогрупп и др.). Реализация патогенного потенциала *E. coli* ограничена генетическими детерминантами вирулентности, поэтому без детекции генов или факторов вирулентности, присущих конкретному штамму, установление его клинической и эпидемической значимости невозможно.

В этой связи более перспективными являются генетические методы на основе полимеразной цепной реакции, которые характеризуются универсальностью, быстротой выполнения, высокой чувствительностью. Среди других молекулярно-генетических методов субтипирования нашли применение анализ плазмидного профиля, определение полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP), пульс-электрофорез (PFGE), риботипирование, ДНК-чипы, мультилокусное секвенирование-типирование, высокопродуктивное секвенирование нового поколения.

Важным условием эффективности культурального исследования является адекватный выбор дополнительных молекулярных методов детекции всех патогрупп диареогенных *E. coli*. Молекулярные методы расширяют аналитические и диагностические возможности лабораторной диагностики.

Бактериологический метод в персонализации антибиотикотерапии

Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Семечкин Н.В.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация

В условиях широкого распространения микроорганизмов, характеризующихся устойчивостью к антимикробным препаратам, повышение эффективности антимикробной терапии базируется на концепции персонализированной медицины. Пациент-ориентированный подход улучшает прогноз, диагностику и результаты терапии.

Цель исследования. Оценить эффективность применения бактериологического метода исследования в персонализации антибиотикотерапии оппортунистических инфекций.

Материалы и методы. Проведено клиническо-лабораторное обследование 200 больных с воспалительными заболеваниями верхних дыхательных путей. При использовании бактериологического метода выделено 168 культур, в т.ч. 120 культур стафилококков следующих видов: 60 штаммов – *S. aureus*, 24 – *S. epidermidis* и 36 – *S. haemolyticus*. Идентифицировано 48 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, из них 14 штаммов *Escherichia coli*, 22 – бактерий рода *Klebsiella*, 1 – бактерий рода *Proteus*, 9 – *Morganella morganii* и 2 – *Pseudomonas aeruginosa*. Анализ чувствительности выделенных культур микроорганизмов к антибиотикам основных групп проводили согласно клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (Версия-2018–03).

Результаты. При воспалительных заболеваниях верхних дыхательных путей с высокой частотой обнаруживались доминирующие условно-патогенные грамположительные (60%) и грамотрицательные (24%) микроорганизмы. Выделенные микроорганизмы отличались видовой и штаммовой чувствительностью к антибиотикам. Штаммы *S. aureus* проявляли преимущественную чувствительность к ингибиторозащищенным пенициллинам, цефалоспорином III–IV поколений, защищенным цефалоспорином, карбапенемам, ванкомицину и фторхинолонам. 10% штаммов *S. aureus* тестированы как MRSA. Представители семейства *Enterobacteriaceae* были чувствительны к фторхинолонам и защищенным цефалоспорином. Минимальные подавляющие концентрации препаратов была различными для отдельных штаммов.

Заключение. Бактериологический метод эффективен в определении этиологической структуры воспалительных инфекций, дает возможность определить количественные характеристики и индивидуальную чувствительность к антибиотикам доминирующих условно-патогенных микроорганизмов в каждом конкретном случае. Данный классический метод может успешно применяться с внедрением селективных хромогенных сред, полидисков, анализаторов для определения чувствительности к антибиотикам, но в отличие от молекулярно-генетического метода детекции ДНК-патогенов и детерминантов резистентности не требует слож-

ной аппаратуры, реактивов и более доступен в различных бактериологических лабораториях. Штаммозависимая антибиотикочувствительность повышает сложность выбора препаратов и делает необходимым постоянный мониторинг антибиотикочувствительности этиологически значимых культур в персонализации антибиотикотерапии.

Особенности некоторых биологических свойств штаммов, необходимых для конструирования брюшнотифозной молекулярной вакцины

Маматкулов А.И.¹, Сабиров Ж.Р.², Маматкулов И.Х.³

¹Ташкентский НИИ вакцин и сывороток, Ташкент, Республика Узбекистан;

²Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Республика Узбекистан;

³Узбекский химико-фармацевтический НИИ, Ташкент, Республика Узбекистан

К настоящему времени не созданы специфические иммунобиологические препараты с эффективностью профилактической вакцинации >70%. Поэтому целью данного исследования был отбор штаммов-претендентов для конструирования брюшнотифозной молекулярной вакцины (БМВ) двойного назначения – как для профилактической вакцинации, так и для санации хронического брюшнотифозного носительства.

В Национальную коллекцию инфекций человека НИИЭМИЗ МЗ РУз поступило 130 культур *Salmonella Typhi*, выделенных от бактерионосителей и из внешней среды (воды) Самаркандской области Республики Узбекистан, для проверки достоверности штаммов и их изучения.

При изучении 130 культур 24 культуры не дали роста, 2 культуры были отнесены к *Escherichia coli*. Дальнейшее исследование тинкториальных, культуральных, биохимических свойств, а также определение чувствительности к антибиотикам проводилось у 104 штаммов.

Из 104 штаммов 76 были выделены от бактерионосителей, 28 – из внешней среды (воды). Все отобранные штаммы обладали типичными морфологическими свойствами при микроскопировании мазков, окрашенных по Граму. Брюшнотифозные бактерии в мазках имели вид однородных грамтрицательных нежных палочек, располагающихся беспорядочно. Подвижность изучали в полужидком (0,4%) агаре. При росте сальмонелл брюшного тифа, посеянных уколом, наблюдалось равномерное помутнение агара, что свидетельствовало об их подвижности.

Культуральные свойства были изучены на селективной для сальмонелл среде Вильсона–Блера (висмут-сульфит-агар). На среде образовались колонии черного цвета с металлическим блеском, окруженные черным ободком, среда под колониями прокрашена в черный цвет. Кроме того, культуральные свойства возбудителя определяли при посеве в нейтральный бульон, где они образовывали равномерную муть. При изучении антигенных свойств *S. Typhi* не все штаммы агглютинировались сыворотками О9 и О12. Так, среди штаммов, выделенных от бактерионосителей, лишь

47 (61,8%) штаммов агглютинировались сывороткой О9 и 53 (69,7%) штамма – сывороткой О12. Штаммы, выделенные из воды, агглютинировались сывороткой О9 – 26 (92,9%), сывороткой О12 – 22 (78,6%).

При агглютинации штаммов с сыворотками Vi и Hd все штаммы (100%) были агглютинабельны.

В связи с требованиями Всемирной организации здравоохранения к штаммам для производства Vi-антигенных вакцин к дальнейшей работе для получения антигена вакцины отобраны 4 штамма.

Фенотипические особенности микробиологических свойств бактерий рода *Stenotrophomonas*

Марияш С.С.¹, Зайцева Е.А.¹, Лебедева Е.Г.², Петренко Е.А.³

¹ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация;

²ФГБУН «Дальневосточный геологический институт» ДВО РАН, Владивосток, Российская Федерация;

³ГБУЗ «Краевая детская клиническая больница №1», Владивосток, Российская Федерация

Бактерии *Stenotrophomonas* spp. широко распространены в разнообразных объектах окружающей среды и могут вызывать инфекции у людей и животных. В исследованиях последних лет показано участие *Stenotrophomonas maltophilia* в инфекционных осложнениях у лиц со сниженным иммунитетом; возможность быть причиной внутрибольничных инфекций. Роль факторов патогенности у разных видов *Stenotrophomonas*, участвующих в реализации инфекционного процесса, только начинает изучаться.

Цель исследования – оценить фенотипические особенности микробиологических свойств бактерий рода *Stenotrophomonas*, выделенных из различных источников.

В работе исследовано 10 культур бактерий рода *Stenotrophomonas*, выделенные из: клинического материала (*S. maltophilia*), горной породы (*S. maltophilia*, *S. rhizophila*), от животных (*S. maltophilia*, *S. indicatrix* – кишечник кабарги; *S. maltophilia*, *S. indicatrix*, *S. rhizophila* – кишечник изюбря), с использованием классических микробиологических методов.

В проведенном нами исследовании установлено, что все исследованные культуры были подвижны при 20–22 °С. Каталазная активность определялась у *S. maltophilia*, полученных из биоматериала человека и животных, и одного изолята *S. rhizophila* от животного.

Все исследованные культуры были биохимически активны и ферментировали глюкозу, лактозу, маннозу, рамнозу и манит. Необходимо отметить, что, по данным зарубежной литературы, для бактерий вида *S. maltophilia* не характерна ферментация глюкозы, рамнозы и маннита.

Ферментативная активность, связанная с факторами патогенности (гемолитическая, ДНКазная, протеолитическая в отношении желатина), определялась практически у всех исследованных изолятов (кроме одной культуры бактерий

вида *S. rhizophila*, которая не проявляла ДНКазной активности). При этом выраженность гемолитической, протеолитической и желатиназной активностей отличалась среди разных видов *Stenotrophomonas*. Наиболее ферментативно активным был изолят *S. maltophilia*, полученный из клинического материала (желудочное содержимое), и только у него выявлялась выраженная липазная активность.

У трех культур *S. maltophilia*, полученных из материала от животных и горной породы, не определялась протеолитическая активность по отношению к молоку в сравнении с другими изолятами. Все исследуемые культуры разлагали 2,3,5-трифенил-тетразолий хлористый до формазана.

Таким образом, в нашем исследовании выявлены особенности фенотипических проявлений биологических свойств бактерий рода *Stenotrophomonas*. Отмечено, что клинические изоляты *S. maltophilia* характеризовались наибольшей выраженностью факторов патогенности среди всех изученных в данной работе бактерий.

Определение противоменингококковых антител к менингококку серогруппы А у новорожденных

Мартыненко И.Г., Юнусова Р.Ю., Скирда Т.А., Бичучер А.М., Комбарова С.Ю.

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

Проблема менингококковой инфекции в последние годы требует пристального внимания в связи с появившимися признаками активизации эпидемического процесса. Несмотря на сохраняющиеся низкие показатели заболеваемости генерализованными формами менингококковой инфекции (ГФМИ) в России, не превышающими пороговый уровень 2,0 на 100 тыс. населения, на отдельных территориях отмечается ее рост. Так, в Москве в 2017–2019 гг. показатель заболеваемости (ПЗ) ГФМИ увеличился в 2,6 раза (с 0,66 до 1,74 на 100 тыс. населения), в 2020–2021 гг. ПЗ снизился и составил 0,99 и 1,14 соответственно, что было связано с противоэпидемическими мероприятиями, направленными на борьбу с COVID-19. В 2022 г. ПЗ ГФМИ превысил пороговый уровень и составил 2,56.

В 2022 г. в Москве ПЗ увеличился в 2 раза по сравнению с 2021 г. (2,56 и 1,14 на 100 тыс. населения соответственно): у детей 3–6 лет ПЗ увеличился в 2 раза (2,55 и 1,26), у детей 1–2 лет – в 1,4 раза (4,62 и 3,43), в возрастной группе до 1 года – в 1,3 раза (11,89 и 9,28). В структуре заболевших превалировал менингококк серогруппы А (МСА).

Изучение иммуноструктуры здорового населения методом реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) к МСА с 2006 по 2022 г. показало, что в Москве среди здорового населения увеличилась доля серонегативных лиц – с 42,9 до 64,0%. Среди лиц всех возрастных групп, имеющих антитела к МСА, преобладали лица с низкими титрами гемагглютинирующих антител (ГАТ). Удельный вес лиц с высокими титрами ГАТ (у взрослых и детей старше 4 лет титр от 1:40 и выше, у детей 0–3 лет – от 1:20 и выше) не превышал 2,7%.

Таким образом, циркуляция МСА продолжалась, но без формирования естественного популяционного иммунитета.

Целью исследования было определение ГАТ к МСА в пуповинной крови новорожденных, родившихся в ноябре–декабре 2022 г. Исследовано 36 образцов сывороток крови в РНГА с эритроцитарным менингококковым полисахаридным диагностикумом серогруппы А (АО «НПО «Микроген»). 35 образцов сывороток крови были серонегативными (ГАТ были выявлены в титре меньше 1:5), в 1 сыворотке титр антител составил 1:5.

Проведенным исследованием показано, что 36 детей, родившихся от серонегативных матерей, очень уязвимы перед менингококковой инфекцией, особенно если в семье окажутся носители менингококка или заболевшие менингококковым назофарингитом. В связи с этим врачам практического здравоохранения необходимо проводить санитарно-просветительную работу с родителями по соблюдению гигиенических правил обращения с новорожденными (сон ребенка в отдельной кроватке, избегать близкого контакта взрослого с новорожденным и т.д.), проведение вакцинации по достижении соответствующего возраста.

Приоритетным направлением в профилактике менингококковой инфекции остается расширение категорий граждан, подлежащих вакцинации против менингококковой инфекции в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686–21, а также разработка и регистрация отечественных конъюгированных вакцин против серогрупп А, С, W, Y.

Получение химерных антител к ботулотоксину типа А

Марьин М.А., Зенинская Н.А., Хлынцева А.Е., Рогозин М.М., Фирстова В.В.

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

Ботулизм – заболевание пищевого происхождения, вызываемое токсином бактерии *Clostridium botulinum*. Традиционные методы лечения ботулизма включают поддерживающую терапию и введение антитоксина – поликлональных антител, выделенных из лошадиной сыворотки. Терапевтические моноклональные антитела (химерные, гуманизированные, полностью человеческие) против ботулотоксина являются перспективной заменой антитоксической сыворотки из-за минимизации нежелательных аллергических реакций на лошадиный иммуноглобулин.

Ранее нами были получены мышинные моноклональные антитела LCA_1–4, LCA_2–55, HCA_2–11, а также установлено, что их терапевтическая композиция (25 мкг/мышь каждого) полностью защищает мышей от гибели при введении 3 LD₅₀ ботулотоксина типа А.

Цель данной работы состояла в получении химерных антител против ботулотоксина типа А.

Материалы и методы. Из РНК гибридом LCA_1–4, LCA_2–55 и HCA_2–11 получали кДНК вариабельных доменов антител, благодаря проведению реакции обратной транскрипции с последующей амплификацией целевых по-

линуклеотидов. Фрагменты, кодирующие вариабельный регион легкой цепи, химеризовали с сигнальным пептидом и человеческим константным регионом легкой цепи изотипа каппа в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Далее полученные ДНК были клонированы в бипромоторную плазмиду p2хеCMV5-ММ, созданную нами для получения высокоэффективных продуцентов антител в клетках млекопитающих. Плазида сочетает в себе комплекс решений для клонирования кДНК антител, интеграции экспрессионно-активной части в геном, селекции наиболее продуктивных клеток по устойчивости к пурамицину. Следующий этап создания рекомбинантных плазмид включал клонирование кДНК вариабельных регионов тяжелой цепи, химеризованных в ПЦР с сигнальным пептидом. Фрагмент человеческого гена IGHG1 в плазмиде p2хеCMV5-ММ находился ниже по ходу транскрипции от места клонирования кДНК вариабельного домена тяжелой цепи. Таким образом в рекомбинантных плаزمиде собирали пары генов легкой и тяжелой цепи химерных антител.

Трансфекцию клеточной линии ExpiCHO-S рекомбинантными плазмидами производили с помощью Lipofectamine LTX/Plus в формате 24-луночного культурального планшета. Затем в два этапа проводили селекцию стабильных высокопродуктивных клонов. Первый этап заключался в масштабировании культуры до объема культурального флакона Т-75. При этом по мере пересева осуществляли ступенчатое повышение концентрации пурамицина 1–5–10 мкг/мл. Возрастающая концентрация пурамицина способствовала выживанию клеток с большим числом копий генов, которые находились в позициях хромосом, более благоприятствующих экспрессии. Второй этап заключался в получении моноклональных популяций, среди которых наиболее эффективные продуценты выбирали по результатам иммуноферментного анализа. Выбранные клоны продуцентов культивировали в суспензионных условиях в колбах Эрленмейера на среде CD OptiCHO. Антитела очищали из культуральной жидкости на колонке с Protein A сефарозой.

Результаты. Получены генетически стабильные продуценты химерных антител LCA_1–4, LCA_2–55 и HCA_2–11 к ботулотоксину типа А, благодаря трансфекции клеточной линии ExpiCHO-S рекомбинантными экспрессионными плазмидами. Антитела очищены из культуральной жидкости продуцентов и используются для постановки экспериментов. Выход химерных иммуноглобулинов LCA_1–4, LCA_2–55 и HCA_2–11 составил 50, 150 и 93 мг с 1 л культуры соответственно.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Использование экспериментальной динамической модели для изучения биопленкообразования бактерий в морской воде

Матосова Е.В., Бынина М.П., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю., Яковлев А.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

Описание динамики роста и развития биологических сообществ в статических условиях лабораторного культивирования сложно по ряду причин. В значительной степени это связано с отдаленным приближением к условиям морских экосистем, где процесс идет в токе жидкости, опосредованном морским течением, наличием изменяющихся температур, запасов пищевых ресурсов, конкуренции со стороны морских бактерий. Перечисленные причины делают невозможным достоверный прогноз динамики формирования биопленки при использовании традиционных статических методов культивирования.

Целью работы была разработка и апробация экспериментальной динамической модели для изучения возможности образования биопленок бактерий на абиотических объектах в морской воде в условиях, приближенных к естественным.

Методы. В работе использовались культуры клинических изолятов *Yersinia pseudotuberculosis* из коллекции штаммов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова Роспотребнадзора после 48 ч инкубирования при температуре 4–6 °С. Для реализации модели биопленкообразования в условиях, приближенных к естественным, была собрана закрытая система, состоящая из перистальтического насоса и проточной камеры – широкогорлого химического стакана (600 мл) с крышкой и полихлорвиниловыми трубками, создающая регулируемый ток морской воды (50 мл/мин). Предметные стекла (слайды) с активированной поверхностью Superfrost Plus® (с постоянным положительным зарядом на поверхности) и Polysine Adhesion® (с электростатическим зарядом и биохимическим покрытием, улучшающим адгезию бактериальных клеток), Thermo Fisher Scientific, устанавливались вертикально в стакан с взвесью бактерий в морской воде (1000 КОЕ/мл). В качестве контроля использовали слайды с неактивированной поверхностью. Исследование проводили при температуре 2–4 °С в течение 24 ч. Количественную оценку биомассы биопленки проводили путем измерения оптической плотности окрашенных препаратов по методу Sternheimer–Malbin (кристаллический фиолетовый и сафранин О). Аналогичные исследования были проведены в статических условиях, без использования системы динамического моделирования.

Результаты. Формирование биопленки *Y. pseudotuberculosis* в динамической модельной системе происходило более активно на абиотических подложках с активированными поверхностями (Superfrost Plus 60,65 ± 4,43 у.е., Polysine Adhesion 65,33 ± 5,86 у.е.) по сравнению с подложкой с неактивированной поверхностью (43,28 ± 6,51 у.е., $p < 0.02$). Статистическая значимость различий показателей

оптической плотности в динамической системе была выше, чем на аналогичных слайдах в статических условиях (Superfrost Plus 49,82 ± 6,33 у.е., Polysine Adhesion 54,13 ± 7,16 у.е., Microscope Slides 31,64 ± 6,51 у.е.).

Характеристика биологических свойств *Enterococcus faecalis*, резистентных к линезолиду

Матушинец А.О., Пушилина А.Д., Коменкова Т.С., Зайцева Е.А.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Владивосток, Российская Федерация

Введение. Для лечения инфекций, вызванных мультирезистентными энтерококками, врачи все чаще приходят к выбору antimicrobных препаратов (АМП) резерва, в т.ч. линезолида, в связи с чем уровень линезолид-резистентных энтерококков растет. Резистентность микроорганизмов к АМП связана с изменением биологических свойств возбудителя.

Цель работы. Изучить микробиологические свойства *Enterococcus faecalis*, резистентных к линезолиду, выделенных на территории Дальнего Востока, и определить маркеры для идентификации линезолид-устойчивых штаммов *E. faecalis*.

Материалы и методы. Проведен анализ микробиологических свойств *E. faecalis*, устойчивых к линезолиду, выделенных в 2013–2019 гг. из разных биотопов на Дальнем Востоке, по результатам бактериологического, молекулярно-генетического и статистического методов.

Результаты и обсуждение. Среди 297 штаммов фекальных энтерококков было отобрано 38 изолятов, резистентных к линезолиду (12,8%). Наиболее часто линезолид-устойчивые штаммы встречаются среди *E. faecalis*, выделенных из мочи (22,4%). Анализ распространенности устойчивых к линезолиду *E. faecalis* среди возрастных групп показал, что чаще всего такие штаммы встречаются у лиц от 18 до 55 лет (31,3%).

По сравнительной оценке линезолид-чувствительных и линезолид-резистентных штаммов *E. faecalis* различий по биохимической активности и факторам патогенности выявлено не было. Гены патогенности среди линезолид-устойчивых *E. faecalis* выявляются чаще – из 6 исследованных генов было выявлено 5 (*efaA*, *aggA*, *eep*, *esp* и *gelE*). Вне зависимости от чувствительности к линезолиду у штаммов *E. faecalis* отмечается наличие генов антибиотикорезистентности *tetM* и *ermB*.

Среди устойчивых к линезолиду штаммов *E. faecalis* сохранялась чувствительность к АМП, действующим на клеточную стенку, – АМП группы β-лактамов (пенициллины, имипинем) и ванкомицин, также чувствительность сохранялась к фурадонину. У линезолид-резистентных *E. faecalis* наблюдалась устойчивость к АМП, действие которых направлено на рибосомы, – левомицетину, тетрациклину и эритромицину.

В фенотипах чувствительности к левомицетину и фторхинолонам среди *E. faecalis*, в зависимости от их чувствитель-

ности к линезолиду, наблюдались различия. Линезолид-резистентные штаммы *E. faecalis* были устойчивы к данным АМП, а среди линезолид-чувствительных штаммов чувствительность к ним сохранялась.

Заключение. *E. faecalis*, устойчивые к линезолиду, чаще выделяются из мочи у пациентов старше 18 лет. Отмечено отсутствие различий между линезолид-резистентными и линезолид-чувствительными штаммами *E. faecalis* по культуральным и биохимическим характеристикам, факторам патогенности и генам антибиотикорезистентности. Выявлены микробиологические маркеры, позволяющие идентифицировать линезолид-резистентные штаммы *E. faecalis*, – устойчивость к левомицетину и фторхинолонам на уровне фенотипа.

Мониторинг хронической инфекции легких, вызванной *Staphylococcus aureus*, у пациентов с муковисцидозом

Медведева О.С., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю.

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

У пациентов с муковисцидозом (МВ) *Staphylococcus aureus* – наиболее часто выделяемые из дыхательных путей бактерии. *S. aureus* колонизирует дыхательные пути на первом году жизни детей, больных МВ. Хроническая стафилококковая инфекция (ХСИ) регистрируется у детей в возрасте 1–4 лет – у 14,3%, в 5–7 лет – у 37,5%, в 8–14 лет – у 34,5%, в 15–18 лет – у 25%.

Цель. Изучение изолятов *S. aureus*, выделенных от пациентов с МВ при мониторинге хронической инфекции легких.

Материалы и методы. Исследована коллекция штаммов *S. aureus*, выделенных из дыхательных путей пациентов с МВ в период с 2005 по 2020 г. Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Генотипирование штаммов проводили методом RAPD-ПЦР, ПЦР-ПДРФ коагулазного гена (*coa*). Выявление генов *mecA*, *mecC*, *lukF-PV* и *lukS-PV* проводили в мультиплексной ПЦР. Определение типов SCC_{mec}-кассет осуществляли методом ПЦР. Мультилокусное секвенирование проводили согласно схеме, приведенной в базе pubmlst (<https://pubmlst.org>).

Результаты. Мониторинг был проведен у 75 пациентов с МВ. У 56 из них наблюдали ХСИ. Генотип *S. aureus* менялся в динамике ХСИ только у 33% пациентов. У 7 пациентов было выделено одновременно более одного генотипа *S. aureus*. У 22 пациентов выявлена фенотипическая гетерогенность: одновременно от одного пациента выделяли до трех различных по фенотипу изолятов *S. aureus*. У 4 больных высевали одновременно MRSA и MSSA. Исследование генотипически идентичных штаммов, выделенных от одного пациента в динамике, показало изменение антибиотикочувствительности в процессе персистенции. При анализе резистентности к антибиотикам 237 изолятов *S. aureus* установлено, что 108 были мультирезистентными, из них 8,0% изолятов *S. aureus*, выделенных от детей, и 13,5% – от взрослых

были MRSA. Все 65 штаммов MRSA имели ген *mecA*. Ген лейкоцидина *PVL* не обнаружен ни у одного изолята. При исследовании 72 штаммов MRSA на наличие SCCmec-кассет у 9 штаммов был обнаружен III тип SCCmec-кассеты и у 31 штамма – IV тип (9 штаммов – IVa, 1 – IVb, 21 – IVc). При мультилокусном секвенировании выявлены генотипы ST8, ST1, ST45, ST5, ST97, ST239, ST22, ST5143, ST1891, ST30, ST792, ST148.

Вывод. У пациентов с МВ ХСИ может быть обусловлена как длительной циркуляцией одного генотипа *S. aureus*, так и разных, сменяющих друг друга или персистирующих одновременно. При этом бактерии характеризуются мультирезистентностью, фенотипической гетерогенностью и изменчивой чувствительностью по отношению к антибиотикам. Ген лейкоцидина *PVL* у изолятов *S. aureus* отсутствовал, что может косвенно указывать на госпитальное происхождение. Доминирующими являются изоляты с кассетой SCCmec IVc типа, представляющей большую эпидемиологическую опасность при распространении MRSA и передаче детерминант антибиотикорезистентности. Больные МВ инфицированы не уникальными сиквенс-типами *S. aureus*, а сиквенс-типами, широко распространенными среди населения России. В отношении российских больных МВ эпидемическим можно считать MRSA ST8 с SCCmec IV типа.

Опыт использования автоматического анализатора для быстрой диагностики мочевых инфекций

Мещурова С.Ю., Коробова А.Г., Самоходская Л.М.

Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Цель работы. Апробировать алгоритм ускоренного микробиологического анализа мочи.

Материалы и методы. В исследование были включены 155 образцов мочи, полученных в феврале–мае 2023 г. от пациентов МНОЦ МГУ им. М.В.Ломоносова: 55 образцов – от амбулаторных пациентов, 100 – от пациентов стационара. Медиана возраста пациентов составила 65 лет, доля мужчин – 54,8%. Образцы культивировали в соответствии со стандартами микробиологического исследования мочи с использованием хромогенных питательных сред, а также с использованием автоматического анализатора HB&L (Alifax, Италия) в течение 4 ч 30 мин для детекции бактериурии $\geq 10^2$ КОЕ/мл. При выявлении роста микроорганизмов в анализаторе в тот же день проводили экстракцию микроорганизмов, для чего из флакона с положительной пробой отбирали 1 мл биоматериала, центрифугировали 5 мин при 5 тыс. оборотов, далее удаляли надосадочную жидкость, добавляли 300 мл стерильной дистиллированной воды, перемешивали, повторно центрифугировали 5 мин при 13 тыс. оборотов, осадок наносили на мишень масс-спектрометра. Идентификацию до вида проводили методом MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Результаты. По данным культурального метода было получено 106 положительных образцов, из которых 52 образца были с монокультурой. Всего выделено 186 изолятов, в спек-

тре микроорганизмов преобладали *Enterococcus faecalis* (23,66%), *Escherichia coli* (17,74)%, значительную долю составили сомнительные возбудители мочевых инфекций (коагулазонегативные стафилококки – 19,89%). По данным автоматического анализатора только в 65 исследованиях был выявлен рост микроорганизмов. В одном образце анализатор зафиксировал рост микроорганизмов, а при культивировании на плотных питательных средах микроорганизмов не было получено. Таким образом, 41 из 106 положительных культур не были выявлены при использовании автоматического анализатора, причем только в 6 из них были обнаружены первичные уропатогены.

Ускоренная идентификация была выполнена для 62 образцов биоматериала, в 49 из них микроорганизмы были идентифицированы. В остальных случаях результаты быстрой идентификации были недостоверными. Полное или частичное совпадение результатов ускоренной идентификации и классических методов исследования было получено для 48 образцов. Во всех 25 случаях, когда ускоренная идентификация проводилась для образца с монокультурой (*E. coli* – 14 образцов, *Klebsiella pneumoniae* – 3, *E. faecalis* – 3, *Klebsiella oxytoca* – 2, по одному изоляту *Enterobacter hormaechei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Lactobacillus acidophilus*), было совпадение.

Выводы. Чувствительность метода ускоренного культивирования с использованием анализатора составила 60,38%, специфичность – 97,96%.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ им. М.В.Ломоносова «Разработка инновационных лабораторных технологий, включая молекулярно-генетические, для диагностики заболеваний» (0708.005 №123032800010–0).

Инактивация вируса Западного Нила, полученного в культуре перевиваемых клеток линии Vero, с использованием мертиолята натрия

Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Галкина А.Ю., Гусев Е.А., Герасимова А.Д.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Лихорадка Западного Нила – зоонозная природно-очаговая инфекционная болезнь с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя, протекающая у человека в виде острого лихорадочного состояния с симптомами общей интоксикации, в ряде случаев приводящая к поражению центральной нервной системы с развитием менингита, энцефалита или острого вялого паралича. Вирус Западного Нила (ВЗН) – арбовирус, относящийся к роду флавивирусов, впервые был обнаружен у жительницы Уганды в 1937 г.

Для характеристики штаммов ВЗН, конструирования МФА/ИФА-тест-систем, разработки вакцин и других исследований первостепенной задачей является подбор и стандартизация технологии концентрирования и инактивации ВЗН, полученного в культуре перевиваемых клеточных

линий, в соответствии с принципами обеспечения биологической безопасности в вирусологической лаборатории.

В СанПиН 3.3686–21 методы инаktivации вирусов II группы патогенности не определены.

Нами предпринято изучение метода инаktivации ВЗН с помощью мертиолята натрия. За основу взяты стандартные условия подготовки проб крови для проведения иммуноферментного анализа.

Предварительно сформированный монослой клеток Vero в культуральном флаконе (175 см²) заражали ВЗН в дозе инфекционных частиц 1 БОЕ/клетку ($1,8 \cdot 10^7$ БОЕ), содержащихся в 10 мл поддерживающей среды. После экспозиции в течение 60 мин во флакон вносили среду DMEM с добавками по 1% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамина и антибиотика/антимикотика общим объемом 50 мл и инкубировали при 37 °С, 5,5% CO₂, 70% влажности в течение 96 ч, ежедневно отбирая аликвоты (по 0,1 мл) для определения титра вируса. Через 96 ч культуральную среду, содержащую патоген, переносили во флакон, добавляли мертиолят натрия до конечной концентрации 0,01%, прогревали в течение 30 мин при 56 °С. Для контроля эффективности инаktivации ВЗН определяли наличие инфекционного вируса методом бляшкообразования и методом заражения мышей-сосунков.

Ежедневное определение титра вируса в культуральной среде показало, что максимальная концентрация ВЗН наблюдалась уже через 72–96 ч. Рассчитанная концентрация вирусных частиц в целевом образце на 4-е сутки (96 ч) составила $2,8 \cdot 10^{11}$ БОЕ/мл.

В результате проверки эффективности инаktivации ВЗН с помощью мертиолята натрия на культуре клеток Vero в опытных лунках цитопатический эффект не был обнаружен. При введении мышам-сосункам инаktivированного материала побочных эффектов как местного, так и общего характера не наблюдалось.

Таким образом, ВЗН в среде культивирования перевиваемых клеток линии Vero может быть инаktivирован с использованием мертиолята натрия в концентрации 0,01% в сочетании с прогреванием в течение 30 мин при 56 °С.

Работа выполнена в рамках НИР 099–3–21.

Изучение инфицированности *Culex pipiens f. molestus* вирусом Западного Нила при его вертикальной передаче в экспериментальных условиях

Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Герасимова А.Д., Галкина А.Ю., Гусев Е.А.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (ВЗН) относится к роду *Flavivirus*, антигенному комплексу японского энцефалита семейства *Flaviviridae*. Вирус поддерживается в энзоотическом цикле передачи, в котором резервуаром являются птицы водного и околородного пространств (в населенных пунктах – голуби и домашние птицы), а переносчиками – орнитофильные

кровососущие комары. Основным переносчиком вируса считается вид комара *Culex pipiens*, который доминирует во второй части лета, приходя на смену комарам рода *Aedes*. Эпидемиологическое значение данных насекомых объясняется их широким распространением, высокой численностью, полифагией и способностью к эффективной передаче вируса.

Изучение инфицированности насекомых ВЗН при его вертикальной передаче является необходимой задачей для уточнения механизма поддержания вируса в популяции насекомых и подтверждения сохранения патогена в межэпидемический сезон.

Исследование заключалось в изучении вертикальной передачи ВЗН у комаров *Culex pipiens f. molestus*. Для этого имаго *Cx. p. f. molestus* содержали в лабораторных условиях в вольерах, обтянутых сеткой, и кормили 6%-м раствором глюкозы, с циклом день/ночь 12:12 ч, относительной влажности 60% в условиях температуры атмосферного воздуха 24 °С. Личинок комаров содержали в эмалированных кюветках с отстоянной водой и кормили измельченным сухим белковым кормом. Период развития *Cx. p. f. molestus* от яйца до имаго составил 24 дня.

Для определения вероятности вертикальной передачи ВЗН самки комаров *Cx. p. f. molestus* были заражены посредством кровососания на виримичной птице (перепеле обыкновенном) в лабораторных условиях.

Методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени был исследован материал от 15 кладок яиц, 100 личинок и 100 имаго первого поколения, полученных в 3 сериях опытов. РНК ВЗН была выявлена в 11 (11%) из 100 кладок яиц, у 7 (7%) из 100 личинок и у 2 (2%) из 100 имаго F1. Таким образом, средняя частота вертикальной передачи ВЗН у *Cx. p. f. molestus* составила 6,7%.

Высокое значение вероятности вертикальной передачи ВЗН у *Cx. p. f. molestus* подтверждает тот факт, что данный вид комаров не только является компетентным переносчиком вируса, но и определяет возможность сохранения патогена в их популяции в течение холодного периода в регионах с умеренным климатом.

Работа выполнена в рамках НИР 099–3–21.

Сравнительная оценка антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий из водоемов г. Ростова-на-Дону и сточных вод

Морозова М.А.¹, Седова Д.А.^{1,2}, Калюжин А.С.¹

¹ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация; ²Южный федеральный университет, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

В последнее время отмечается тенденция к повышению уровня заболеваний, связанных с водным фактором, этиологическими агентами которых являются ассоциации грамотрицательных условно-патогенных бактерий (УПБ) – аэромонад, псевдомонад, энтеробактерий и др. Известно, что

поверхностные водоемы аккумулируют всевозможные варианты антибиотикоустойчивых бактерий. Среди бактерий с высокой предрасположенностью к приобретению устойчивости фигурируют бактерии сем. *Enterobacteriaceae* и *Enterococcus* spp. Представители этих же таксонов являются основными индикаторами фекального загрязнения водной среды. При этом в водных объектах, загрязненных сточными водами, создаются благоприятные условия для формирования и сохранения резистентных штаммов. Большинство штаммов, выделенных после биологической очистки на очистных сооружениях канализации (ОСК), имеют достаточно узкий спектр резистентности при сохранении чувствительности к современным лекарственным препаратам. Необходимо отметить, что при нарушении режима обеззараживания и технологии очистки сбрасываемые сточные воды содержат условно-патогенные и патогенные микроорганизмы, при этом отмечается селекция хлоростойчивых штаммов. В работах зарубежных исследователей показано, что хлор не может быть в полной мере эффективен в отношении рода *Aeromonas* в концентрациях, используемых для обычной дезинфекции воды. В ряде случаев бактерии, не включенные в гигиенические нормативы к оценке безопасности водных объектов и сточных вод, проявляют большую устойчивость к процессам обеззараживания, чем нормируемые бактерии кишечной группы. В частности, выявляются аэромонады и синегнойные палочки, представляющие опасность для лиц с ослабленной иммунной системой. За последние несколько лет возобновился интерес к исследованиям бактерий рода *Aeromonas* как возбудителям сапронозных инфекций. *Аэромонады*, признанные этиологическим агентом заболеваний гидробионтов, спорадически могут вызывать кишечные инфекции, различные инфекционные осложнения у людей с иммунодефицитом, описаны случаи целлюлита, нозокомиальной пневмонии, инфицирования хирургических ран, сепсиса, перитонита, менингита и инфекций мочевыводящих путей.

Актуальность изучения антибиотикорезистентности микробных сообществ водных биотопов связана с необходимостью прогнозирования риска появления мультирезистентных штаммов в конкретном регионе и с распространением лекарственно устойчивых микроорганизмов в водной среде.

Цель работы. Изучить антибиотикорезистентность энтеробактерий, энтерококков, синегнойных палочек и аэромонад, выделенных из воды водоемов г. Ростова-на-Дону, а также сточных вод, прошедших весь комплекс очистки (сбросной канал).

Материал и методы. В исследование было включено 650 штаммов УПБ, выделенных в 2021–2023 гг. из воды рек Дон, Темерник на территории г. Ростова-на-Дону и сточных вод пяти очистных сооружений ряда городов Ростовской области. Пробы воды из поверхностных водоемов отбирали ежемесячно с апреля по ноябрь в местах водозаборов, зон рекреации, селитебных территорий и ниже по течению выпуска городской канализации.

Видовая и родовая идентификация изолятов проводилась с помощью тест-систем «НЕФЕРМтест 24» (Erba Lachema, Чехия), «Мультимикротесты для биохимической идентификации энтеробактерий (ММТ Е24)» («Иммунотэкс», Ставрополь, Россия) и программно-аппаратного комплекса

MALDI Biotyper. Масс-спектрометрический анализ выполняли с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex (Bruker Daltonics, Германия). Чувствительность бактерий к антимикробным препаратам (АМП) определяли диско-диффузионным методом с использованием питательного агара Muller–Hinton в соответствии с требованиями МУК 4.2.1980–04 и рекомендациями EUCAST (Ver. 4.0 2014). Чувствительность УПБ оценивали по отношению к 22 антимикробным препаратам 7 функциональных классов (β -лактамам, аминогликозидам, фторхинолонам, фосфомицину, нитрофуранам, тетрациклинам, амфениколам).

Результаты. Исследования показали, что видовой состав энтеробактерий из речных и сточных вод весьма сходен. Подавляющее большинство выделенных изолятов было представлено следующими видами: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter braakii*.

Анализ устойчивости энтеробактерий из речной воды к β -лактамам показал широкую циркуляцию ампициллинрезистентных штаммов (79%). В частности, доля нечувствительных штаммов *E. coli* составила 89%. Чувствительность к ампициллину была в 2 раза выше у энтеробактерий, выделенных из сточных вод, включая *E. coli*. В целом энтеробактерии характеризовались высокой и средней чувствительностью к карбопенемам, аминогликозидам – 95,4–100%, фторхинолонам (ципрофлоксацин, офлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин) – 76,2–100% и цефалоспорином III–IV поколения (цефепим, цефтазидим, цефоперазон, цефазолин) – 66–100% штаммов. Кроме того, установлена относительно высокая промежуточная резистентность *K. pneumoniae* к нитрофурантоину (45,5 и 75% штаммов из речной и сточной воды соответственно).

За период наблюдения выделено и идентифицировано 5 видов энтерококков, среди которых превалировал *Enterococcus faecalis*. В основном *E. faecalis*, *E. faecium* высеивались из речной воды, тогда как в сточных водах видовой состав был более разнообразным и представлен *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. mundtii*.

Энтерококки характеризовались большим разнообразием спектров антибиотикорезистентности. Более половины изолятов из речных и сточных вод были нечувствительны к пенициллинам, тетрациклинам и левофлоксацину. Вместе с тем у штаммов, выделенных из речных биотопов, спектр резистентности к ципрофлоксацину и ванкомицину оказался более широким по сравнению с изолятами из сточных вод. В то же время у энтерококков из сточных вод устойчивость к хлорамфениколу, нитрофурантоину и фосфомицину была выше в 1,8–2,5 раза.

Бактерия *Pseudomonas aeruginosa* не нормируется для оценки микробиологической безопасности воды поверхностных водоемов и сточных вод. Однако их выявление в объектах окружающей среды свидетельствует (как индикатор биологического загрязнения) об эпидемиологическом неблагополучии. Частота обнаружения *P. aeruginosa* в воде рек Дон и Темерник на территории г. Ростова-на-Дону составляла 51–58% с максимальным содержанием в зонах рекреации, ниже выпуска городской канализации и в районе речного вокзала (от 120 до 2100 КОЕ/100). В канализационных стоках

их содержание было в пределах $7 \cdot 10^3$ – $2,4 \cdot 10^5$ КОЕ/100, составив в среднем $6,1 \cdot 10^4$ КОЕ/100. При этом обеззараживание сточных вод в отношении синегнойных палочек было достаточно эффективным: их численность снижалась на 4–5 порядков или полностью происходила инактивация.

Штаммы *P. aeruginosa*, выделенные из речной воды, отличались существенно более низкой чувствительностью по сравнению со штаммами из сточных вод к амоксициллин/сульбактаму (59,2% vs 46,1%), цефоперазону (34,5% vs 8,9%), цефоперазон/сульбактаму (15,3% vs 7,7%), цефепиму (34,3% vs 20%), имипенему (15,3% vs 7,2%), меропенему (13,6% vs 8,4%). Кроме того, штаммы псевдомонад из сточных вод были чувствительны к амикацину, левофлоксацину, цiproфлоксацину, цефтазидиму, тогда как штаммы из речной воды были резистентны к этим препаратам в 3,1–22,4% случаев. Среди испытанных препаратов наибольшая устойчивость *P. aeruginosa* выявлена к хлорамфениколу – 90 и 86,7% штаммов из речных и сточных вод соответственно). Аналогичные результаты антибиотикорезистентности синегнойных палочек, выделенных из воды Нижнего Дона, были получены в 2016–2020 гг. Наблюдается тенденция к увеличению числа устойчивых к хлорамфениколу штаммов. При этом штаммов, устойчивых к гентамицину, не выявлено, тогда как в предыдущие годы их доля составляла 19,7%.

Видовой состав выделяемых бактерий рода *Aeromonas* во всех обследованных биотопах достаточно широкий и вариабельный. В то же время ряд видов (*A. caviae*, *A. media*, *A. veronii*, *A. hydrophila*, *A. bestiarum*, *A. ichtiosmia*, *A. salmonicida*) были обнаружены как в речных, так и в сточных водах. Количественные характеристики аэромонад показали, что их содержание (НВЧ КОЕ в 100 мл) в речной воде находилось в пределах $2,3$ – $2,4 \cdot 10^5$ КОЕ/100, с максимальным индексом в районе сброса сточных вод. Их численность в сточных водах также варьировала в широких пределах – от 230 до $6,2 \cdot 10^6$ КОЕ/100.

В ходе исследований антибиотикорезистентности аэромонад из разных источников была установлена высокая их устойчивость к ампициллину и амоксициллин/клавуланату. Причем количество резистентных к этим препаратам штаммов, выделенных из речных и сточных вод, было близким и составило соответственно к ампициллину 94,8 и 92,3%, к амоксициллин/клавуланату – 77,3 и 62,8%.

Для бактерий рода *Aeromonas*, выделенных из речной воды, наиболее эффективное антимикробное действие отмечено для аминогликозидов, карбапенемов и фторхинолонов. Аэромонады, полученные из сточных вод, также проявляли высокую чувствительность к этим препаратам. Однако штаммов из сточных вод, устойчивых к левомицетину, было больше в 1,8 раза, а к меропенему и цiproфлоксацину – в 4,5 раза, чем штаммов из речных биотопов.

Анализ спектра антибиотикорезистентности изученных УПБ выявил наиболее распространенную устойчивость к β -лактамам (ампициллину, амоксициллин/клавуланату). Штаммы, выделенные из речной воды, отличались существенно более низкой чувствительностью к антимикробным препаратам по сравнению со штаммами из сточных вод. Однако доля аэромонад, энтерококков и синегнойных палочек, резистентных к хлорамфениколу, была

выше в сточных водах. Наибольшей активностью среди тестируемых антибиотиков обладали фторхинолоны (ципрофлоксацин, левофлоксацин, норфлоксацин) и аминогликозиды (гентамицин, амикацин), к которым изучаемые бактерии проявляли наибольшую чувствительность.

Молекулярно-генетический мониторинг штамма Омикрон на территории Челябинской области

Москвина Т.И., Лебедева Я.Е., Кузенкова Т.В., Федорова И.О.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», Челябинск, Российская Федерация

Актуальность. Появившаяся внезапно в конце 2019 г. пандемия новой коронавирусной инфекции продолжается и по сегодняшний день. За весь период вирус распространился по всему земному шару с количеством заболевших более 700 млн. Секвенирование генома SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) является эпидемиологически значимым инструментом для выявления новых мутаций в генах, связанных с вирулентностью, и последующего воздействия на новые геноварианты.

Доминирующим вариантом вируса SARS-CoV-2 на сегодня является штамм Омикрон. Информация о штамме Омикрон (B.1.1.529) впервые появилась в ноябре 2021 г. Можно говорить о том, что он имеет наибольшее количество мутаций среди найденных на данный момент штаммов вируса SARS-CoV-2, «вызывающих беспокойство» (Variants of Concern). Омикрон представляет собой группу из вариантов: BA.1, BA.2, BA.3, BA.4, BA.5.

Штамм BA.1 является наиболее крупной сублинией. Только в спайковом (шиповидном) белке, отвечающем за проникновение вируса в клетки человека, насчитали до 30 мутаций. Супермутант оказался легким – практически не давал осложнений, но очень заразным, из-за чего быстро распространился по планете.

Вторую волну Омикрона (2022 г.) вызвал вариант BA.2, который впоследствии был назван «стелс-Омикроном», «невидимкой» в связи с тем, что его можно определить только геномным секвенированием.

Известно, что геноварианты BA.4 и BA.5 генетически очень схожи друг с другом. Общие с BA.4/BA.5 мутации в спайковом белке присутствуют в BA.2.75 – вариант Centaurus («Кентавр»).

С октября 2022 г. были обнаружены два подварианта BA.5: BQ.1 и BQ.1.1.

Что касается варианта ХВВ, то считается, что эта мутация восстанавливает способность вируса проникать в клетки, не потеряв при этом способности ускользать от нашего иммунитета. Это облегчает распространение вируса.

В структуре нового штамма мутации повышают вирулентность возбудителя и способствуют уклонению от иммунитета, образовавшегося как вследствие перенесенного заболевания, так и в результате вакцинации.

Первый случай заражения Омикрон-штаммом коронавируса SARS-CoV-2 в России выявили 6 декабря 2021 г.

Цель. Проведение молекулярно-генетического мониторинга штамма Омикрон на территории Челябинской области.

Исследование. С целью мониторинга штамма Омикрон использовался биологический материал, положительный на РНК SARS-CoV-2, полученный при взятии назофарингеальных мазков от пациентов, проживающих на территории Челябинской области.

Для дифференциации геновариантов вируса SARS-CoV-2 используются различные методы секвенирования:

- фрагментное секвенирование по Сэнгеру отдельных локусов гена, кодирующего S-белок;
- секвенирование полной последовательности S-гена;
- секвенирование полного генома вируса SARS-CoV-2.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области» (далее – ФБУЗ) с 2021 г. направляет биологический материал в научные организации Роспотребнадзора. С 2022 г. пробы направляются в ФБУН «Федеральный научно-исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» (далее – ФБУН «Виром») для проведения фрагментного секвенирования. А также с января 2023 г. на базе лаборатории особо опасных инфекций (ООИ) ФБУЗ внедрено полногеномное секвенирование на секвенаторе MinION с комплектом принадлежностей и рабочей станцией с дальнейшей биоинформативной обработкой полученных первичных данных. Данные активно вносятся в Национальную базу данных геномных последовательностей вируса SARS-CoV-2, разработчиком которой является Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора (база данных VGARus).

Результаты. С января 2023 г. по май 2023 г. включительно в лаборатории ООИ ФБУЗ проведено секвенирование 121 пробы, из них 75 проб взяты у детей 0–17 лет, 81 – у взрослых. Определены следующие контингенты: лица с диагнозом пневмонии – 9 человек, больные острой респираторной вирусной инфекцией (ОРВИ) – 50, прибывшие из-за рубежа – 10, прочие – 52. Определены следующие геноварианты: BN.1.4.3 (сублиния ВА.3); ХВВ.1.5 – вариант «Кракен»; BQ.1 – вариант «Цербер»; СН.1.1 (сублиния ВА.3); CL.1; ХВВ.1.9; ХВВ.1.9.2; ХВВ.1.9.5; ХВВ.2.3 (сублиния ВА.3); ХВВ.1.28 (ВА.3); ХВВ.1.9.1 (сублиния ВА.3) – новый рекомбинантный подвариант, который на сегодняшний день преобладает среди других. Далее идут геноварианты ХВВ.1.9.2 и CL.1.

У людей с диагнозами пневмонии и ОРВИ чаще всего определялся вариант ХВВ.1.9.1 (ВА.3). У прибывших из-за рубежа – ХВВ.1.28 (ВА.3). Среди детей также чаще всего встречался геновариант ХВВ.1.9.1.

За аналогичный период в ФБУН «Виром» направлено 173 пробы. Геноварианты определены в 160 образцах, из них 76 проб взяты у детей 0–17 лет, 84 – у взрослых. Определены следующие контингенты: лица с диагнозом пневмонии – 8 человек, больные ОРВИ – 90, по эпидемиологическим показаниям – 1, прибывшие из-за рубежа – 4, прочие – 57. Определены следующие геноварианты: BQ.1 – вариант «Цербер»; ВА.2; ВА.2.75 – вариант «Кентавр»; ВА4/ВА5; В.1.1.529; ХВВ; ХВВ 1.16; ХВВ 1.5; ХВВ 1.9.1; ХВВ 1.5.

На сегодняшний день лидирующим геновариантом является вариант ХВВ «Грифон», второе место занимает вариант ХВВ 1.5, на третьем месте по распространенности находится ВА4/ВА5.

Среди людей с диагнозом пневмонии наиболее распространен вариант ХВВ 1.5, а с диагнозом ОРВИ – варианты ХВВ и ХВВ 1.5. в равной степени. Геновариант у прибывших из-за рубежа методом фрагментного секвенирования установить не удалось.

В 2022 г. материал (4130 проб) направлялся на мультилокусное секвенирование. При осуществлении фрагментного секвенирования идентифицированы геноварианты Омикрон в 923 пробах (22,3%), Дельта – в 58 пробах (1,4%). Геновариант Омикрон выделен на 1-й неделе 2022 г. и в дальнейшем начал нарастать и преобладать над геновариантом Дельта. С 7-й недели 2022 г. вариант Дельта не генотипировался. Среди проб с определенным геновариантом 199 взято у детей, 984 – у взрослых, в т.ч. 23 медицинских работников.

Обсуждение. Анализ проведенной работы позволил определить, что при полногеномном мониторинге штамма Омикрон на территории Челябинской области циркулируют геноварианты ХВВ.1.9.1 (сублиния ВА.3), ХВВ.1.9.2, CL.1. При определении геновариантов фрагментным секвенированием лидирует вариант ХВВ «Грифон», затем следует вариант ХВВ 1.5. На третьем месте по распространенности находится ВА4/ВА5.

Благодаря возможностям секвенирования несколькими методами генома SARS-CoV-2 выявляются новые мутации в генах. Это является эпидемиологически значимым инструментом для последующего прогнозирования циркулирования штамма Омикрон в Челябинской области.

Изменение профиля экспрессии генов адаптивного ответа при *Helicobacter pylori*-инфекции

Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Новиков В.В.

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация

Helicobacter pylori – это одна из наиболее распространенных инфекций, которая колонизирует слизистую желудка и может приводить к хронической воспалительной реакции с вовлечением Т-клеток, как с провоспалительными (Th1, Th17), так и с противовоспалительными (T-reg) свойствами. Провоспалительный Т-клеточный ответ направлен на борьбу с инфекцией, но при этом вносит существенный вклад в развитие воспаления. В работах ряда авторов было продемонстрировано, что желудочное воспаление при *H. pylori*-инфекции у человека и мышей вызывается главным образом Th1-ответом, посредством секреции IFN- γ . Однако вполне вероятно, что *H. pylori* может индуцировать воспалительный ответ с помощью Th17-клеток и их основного цитокина – IL-17A, как в желудке, так и в периферической крови, что, вероятно, может вносить вклад в патогенез как желудочных заболеваний (начиная от гастрита и заканчивая раком желудка), так и аутоиммунных патологий. В свою очередь, противовоспалительный ответ, с одной стороны,

направлен на ослабление воспаления, а с другой – способствует длительному персистенции бактерии в слизистой оболочке желудка и хроническому течению инфекции. Treg-клетки и их основные цитокины (TGF- β и IL-10) являются центральными регуляторами иммунного ответа. Они ингибируют образование воспалительных Th1 и Th17 и их цитокинов (IFN- γ и IL-17A) и играют важную роль в предотвращении аутоиммунных реакций. Нарушение как количественного, так и функционального баланса клеток Th17/Treg и смещение этого соотношения в ту или иную сторону может приводить к различным патологическим состояниям.

В рамках настоящей работы с помощью цитофлуориметрического анализа мы оценили содержание клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ (близкой к популяции Th17) и CD4⁺FoxP3⁺ (Treg) от всех CD4⁺ Т-лимфоцитов в периферической крови лиц с хроническим гастритом, ассоциированным и не ассоциированным с *H. pylori*-инфекцией. Используя метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в реальном времени для оценки функционального состояния полученных клеток у лиц с гастритами, мы исследовали изменение экспрессии мРНК IL-17A и мРНК FoxP3. Цитофлуориметрический анализ популяций CD4⁺-клеток показал, что медиана содержания клеток фенотипа CD4⁺CD161⁺ и CD4⁺FoxP3⁺ у лиц с *H. pylori*-инфекцией составила 9,94% (8,52–12,06) и 2,36% (1,34–4,69), а у лиц без *H. pylori*-инфекции – 9,38% (7,46–11,25) и 2,3% (1,87–4,74) соответственно. Относительный уровень мРНК IL-17A и мРНК FoxP3 для *H. pylori*-позитивных лиц составил 0,000 (0,000–0,003) и 0,017 (0,010–0,024), а для *H. pylori*-негативных лиц – 0,000 (0,000–0,0007) и 0,025 (0,012–0,046). Мы не обнаружили статистически значимых различий в содержании Th17- и Treg-клеток, а также мРНК IL-17A и мРНК FoxP3 в периферической крови лиц с гастритами, вне зависимости от *H. pylori*-статуса. Возможно, результаты свидетельствуют о том, что ответная реакция Т-хелперов на *H. pylori*-инфекцию при ее провоспалительном течении проходит по Th-1 типу – без существенного вовлечения Th-17-клеток. Полученные данные соотносятся с описанными в литературе сообщениями, согласно которым протекание *H. pylori*-ассоциированных гастритов приводит к Th-1-доминантному ответу и воспаление слизистой оболочки желудка ассоциировано с повышенным уровнем IFN- γ и других провоспалительных цитокинов.

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Оценка роли инфекционных агентов – возбудителей гастроэнтерологической патологии в развитии локальных и системных сдвигов аутоиммунного гомеостаза».

Оценка чувствительности эталонных штаммов микроорганизмов к технологии фотокатализа при обеззараживании воздуха

Мукабенов Ф.А., Еремеева Н.И.

Институт дезинфектологии ФБУН «Федеральный научный центр гигиены им. Ф.Ф.Эрисмана», Москва, Российская Федерация

Вопрос о чистоте воздушной среды медицинских организаций в настоящее время является одним из актуальных в профилактике распространения инфекционных болезней. Применение адекватно работающих вентиляционных систем могло бы стать действующим барьером на пути распространения воздушно-капельных инфекций, однако не все медицинские организации оснащены принудительной приточно-вытяжной вентиляцией с фильтрами очистки воздуха. Поэтому перспективным является применение менее финансово затратных современных технологий, направленных на снижение концентрации и обеззараживание инфекционных аэрозолей в воздухе помещений, одной из которых является фотокатализ.

Сущность фотокатализа: воздух во время очистки проходит через пористую стенку фотокаталитического элемента (диоксид титана) и осаждается на нем. Под действием длинноволнового ультрафиолетового излучения (315–385 нм) на поверхности диоксида титана образуются радикалы с высокой реакционной способностью, которые связываются с органическими загрязнениями, вызывая их окисление и разложение до углекислого газа и воды.

Для оценки антимикробной эффективности при обеззараживании воздуха с помощью установок фотокатализа используют тест-микроорганизм *Staphylococcus aureus*. Насколько справедлива интерпретация результатов эффективности, полученных только для *S. aureus*, в отношении возбудителей туберкулеза, вирусных и других инфекций, остается вопросом открытым.

В связи с этим актуальным было проведение исследований по сравнительной оценке чувствительности эталонных тест-микроорганизмов к технологии фотокатализа при обеззараживании воздуха, которые проводили в соответствии с Руководством Р 4.2.3676–20 п. 3.2.12. Критерий эффективности обеззараживания соответствовал 85,0–99,9%. Эксперименты проведены в испытательных камерах объемом 1 м³ при длительности обеззараживания 45 мин. Для контаминации воздушной среды использованы: *S. aureus* ATCC 6538-P, *Mycobacterium terrae* DSM 43227, Бактериофаг MS2.

Исследования, проведенные в трех повторностях, позволили определить, что: эффективность технологии фотокатализа в отношении *S. aureus* составляет 99,99%, в отношении *M. terrae* – 99,90% и в отношении Бактериофага MS2 – 100%.

Таким образом, эффективность обеззараживания воздуха в испытательных камерах объемом 1 м³ в течении 45 мин с использованием технологии фотокатализа для тест-микроорганизмов *S. aureus* ATCC 6538-P, *M. terrae* DSM 43227, Бактериофаг MS2 не имеет достоверных различий ($p \geq 0,05$). При этом полученные результаты свидетельствуют

ют об одинаковой степени чувствительности испытанных тест-микроорганизмов к технологии фотокатализа при обеззараживании воздуха помещений в условиях эксперимента.

Влияние условий культивирования грибов рода *Coccidioides* на характеристики масс-спектров

Муругова А.А., Шаров Т.Н., Половец Н.В.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Цель. Изучить вариабельность масс-спектров штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза при различных условиях культивирования.

Материалы и методы. 25 штаммов возбудителей кокцидиоидомикоза (*Coccidioides immitis* и *Coccidioides posadasii*) в мицелиальной фазе роста культивировали параллельно на трех плотных питательных средах: агар Сабуру с глюкозой, агар Сабуру с хлорамфениколом и циклогексимидом, картофельно-глюкозный агар (HiMedia, Индия) в течение 7 суток при температуре 28 °С. Подготовку проб проводили согласно протоколу Tarumoto N. et al. Масс-спектры регистрировали на приборе Axima Confidence (Shimadzu, Япония). Воспроизводимость результатов анализа была подтверждена путем трехкратных повторов исследования штамма, выращенного на каждой из выбранных питательных сред.

Результаты. В ходе эксперимента по подбору условий культивирования грибов рода *Coccidioides* были получены три варианта масс-спектров. Анализ полученных результатов показал, что оптимальные спектральные характеристики штаммов микромицетов (интенсивность пиков, их воспроизводимость, а также соотношение сигнал/шум) наблюдались после культивирования мицелиальной фазы грибов на агаре Сабуру с глюкозой. При сравнении полученных масс-спектров определены наиболее интенсивные массовые пики, находящиеся в диапазоне от 1,9 до 6,2 кДа. Пики с m/z 1730 и 3500 присутствовали на масс-спектрах 24 и 22 штаммов соответственно, что позволяет считать их характерными для обоих видов *Coccidioides*. Пики с m/z 4100 и 6300 встречались всего у 9 и 3 штаммов соответственно и только при выращивании на агаре Сабуру с глюкозой. Пик с показателем m/z 5300 идентифицировался на масс-спектрах 17 штаммов, причем в двух случаях он присутствовал только в образцах, культивируемых на картофельно-глюкозном агаре, что в целом не позволяет считать его специфичным для видов.

Выводы. Установлено, что культивирование микромицетов на агаре Сабуру с глюкозой позволяет получать стабильно воспроизводимые масс-спектры *C. immitis* и *C. posadasii*. Доказано, что использование этой питательной среды позволяет устранить различия в индивидуальных масс-спектрах штаммов, обусловленные параметрами культивирования, а также выделить специфичные для видов массовые пики. Эта возможность является одним из определяющих условий для автоматической идентификации микроорганизмов с помощью специализированных баз данных.

Вместе с тем установлено, что вне зависимости от условий культивирования существуют различия в масс-спектрах отдельных штаммов *C. immitis* и *C. posadasii*. Данные различия не позволяют разделить два вида между собой, но могут быть использованы при проведении масс-спектрометрической идентификации возбудителей кокцидиоидомикоза до рода.

Работа представлена в рамках НИР №101–3–21, выполняемой по открытому плану.

Получение гуманизованного антитела, нейтрализующего вирус Западного Нила

Несмеянова В.С., Исаева А.А., Протопопова Е.В., Святченко В.А., Волосникова Е.А., Есина Т.И., Локтев В.Б., Щербаков Д.Н.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р.п. Кольцово, Российская Федерация

Вирус Западного Нила (WNV) – флавивирус, принадлежащий антигенному комплексу японского энцефалита, переносимый комарами. Вирус широко распространен в Африке, Европе, Австралии, Азии, США, Канаде, Мексике и странах Карибского бассейна, а также в некоторых районах Центральной и Южной Америки. Маркеры WNV выявлены в 61 субъекте Российской Федерации за период с 1999 по 2020 г. Наблюдение за эпидемической ситуацией подтверждает потенциальную опасность инфицирования населения лихорадкой Западного Нила. Более 50% случаев заражения WNV приходится на тяжелые нейроинвазивные формы инфекции. Специфического лечения или вакцины против WNV не существует. На данный момент профилактики зависит от организованной борьбы с комарами-переносчиками и просвещения населения. Наиболее перспективным инструментом экстренного противодействия инфекции являются препараты на основе моноклональных антител вследствие их высокой специфичности и безопасности.

Цель работы – получить одноцепочечное химерное антитело, обладающее высоким сродством к неонатальному рецептору (FcRn) и способное нейтрализовать WNV.

Проведена работа по внесению точечных мутации в области Fc-фрагмента антител, обеспечивающих увеличение сродства к неонатальному рецептору. Fc-фрагмент антитела, содержащий мутации в двух основных кластерах M252/S254/T256 и H433/N434, обладал наименьшей константой диссоциации в отношении рекомбинантного аналога FcRn, что предположительно приводит к увеличению периода полувыведения антител. В ходе работы был сконструирован интеграционный вектор pVEAL2–900, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую единую рамку трансляции, включающую переменные фрагменты тяжелой и легкой цепей антитела 900 против WNV, а также константный домен антитела человека IgG1 с мутациями M252/S254/T256, H433K/N434F. Полученный вектор был использован для создания стабильного штамма-продуцента CHO-K1–900. После оптимизации условий суспензионного культивирования продуктивность штамма-продуцента CHO-K1–

900 составила 200 мг антитела с 1 л культуральной жидкости. Разработана схема хроматографической очистки антитела 900, включающая аффинную и ионообменную хроматографии, позволяющая получать целевой белок с чистотой >95%. Функциональную активность антитела 900 проверяли с помощью иммуоферментного анализа и анализа вируснейтрализующей активности. Антитело 900 может связываться с антигеном (WNV, шт. Влг. 27924) в разведении 1/218700 и способно нейтрализовать WNV (100 ТЦД₅₀/мл WNV, шт. Влг. 27924) в разведении 1/8100. Протективность антитела 900 в дозе 100 мкг на мышь линии BALB/C ($5 \cdot 10^4$ – инфицирующая доза, ТЦД₅₀/мышь) составляет 83,3% относительно контроля.

Иммунологические методы в лабораторной диагностике мелиоидоза: современное состояние и перспективы

Новицкая И.В., Терешко Д.Л.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Мелиоидоз – острая или хроническая гнойно-септическая инфекция, летальность при которой в случае септического шока достигает 90%. Возбудителем является грамотрицательная палочка *Burkholderia pseudomallei*, которая относится ко II группе патогенных бактериальных агентов и входит в перечень агентов биотерроризма категории В. Критичным для прогноза является своевременное и точное лабораторное подтверждение диагноза, в т.ч. с помощью иммунологических методов, применяемых как на этапе обнаружения антигенов *B. pseudomallei*, так и при выявлении антител. В отечественной бактериологии регламентировано использование реакции агглютинации (РА), РОА, РКОА, МФА, реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) и иммуоферментного анализа (ИФА), зарубежные исследования ориентированы на методы непрямой гемагглютинации (ИНА), иммуофлуоресценции (ИФА), бокового потока (Lateral Flow Technology), вестерн-блоттинга (WB), микрочипирования (mChT), а также иммуоферментного анализа (ELISA).

Нами предпринято изучение диагностических возможностей сконструированных на основе суммарных клеточных антигенов возбудителя мелиоидоза наборов реагентов для РНГА и ИФА на моделях 1430 сывороток случайного отбора лиц, проживающих в отдельных провинциях эндемичной по мелиоидозу территории Вьетнама, 353 сывороток медведей, находящихся на реабилитации после перенесенной мелиоидозной инфекции, а также 50 контрольных образцов сывороток граждан России.

Результаты, полученные с помощью РНГА, отличались стабильностью и четкостью полученных данных. При диагностическом титре от 1:40 до 1:640 уровень серопревалентности населения составил 27%. Титр сывороток переболевших животных в РНГА достигал в отдельных наблюдениях 1:5000. Контрольные образцы сывороток взаимодействовали с антигенами *B. pseudomallei* в титрах от 1:5 до (редко) 1:20.

ИФА в непрямом варианте показал парадоксальный результат, указания на который описаны в литературе: контрольные сыворотки лиц, однозначно не имевших контакта с возбудителем мелиоидоза, демонстрировали с клеточным лизатом *B. pseudomallei* положительные результаты ИФА. Как оказалось, среди эпитопов почти 500 высокоиммуногенных протеинов, продуцируемых возбудителем мелиоидоза, до 50–83% структур являются общими с антигенными детерминантами таких бактерий, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* и даже *Micobacterium tuberculosis*, что объясняет присутствие в макроорганизме соответствующих Т-клеток памяти.

Повышение специфичности ИФА может быть достигнуто как за счет использования в работе высокоочищенных рекомбинантных белков, причем предпочтительнее наиболее иммуногенных изолированных полипептидов во избежание конкурентных взаимодействий при их смешивании, так и в результате внедрения в практику более специфичных современных вариантов ИФА (например, MAC- или CAP-ELISA).

Таким образом, иммунологические методы остаются высоко востребованными и информативными этапами лабораторной диагностики мелиоидоза, а их усовершенствование является необходимым условием успешного исхода лечения больных.

Туляремия на Дону: итоги и перспективы исследований *Francisella tularensis*

Носков А.К.

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

Целью настоящего сообщения является анализ результатов изучения биологии туляремийного микроба, полученных в последние годы на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Сфера деятельности коллектива института включает как решение практических проблем, так и фундаментальные научные исследования.

Осуществляется постоянный мониторинг эндемичных очагов туляремии на территории Ростовской области (РО), а в последние годы и на новых территориях ДНР, ЛНР, Запорожской и Херсонской областей. В период 2022–2023 гг. из различных биологических объектов было изолировано 19 штаммов *Francisella tularensis*, из которых 10 – из РО и 9 – из очагов новых территорий. Изучение свойств выделенных штаммов с помощью бактериологических, биохимических (фосфатазная и β-лактамазная активности), молекулярно-биологических (полимеразная цепная реакция, VNTR- и INDEL-типирование, полногеномный сиквенс), биологического методов показало, что все штаммы являются типичными представителями вида *F. tularensis* подвида *holarctica* биовара EryR. Все исследованные штаммы обладают высокой вирулентностью для белых мышей (DCL-1 м.кл) и по генетическим характеристикам относятся к группе В₁₂. Проведен полногеномный сиквенс 171 штамма туляремийного микроба из коллекции института.

Как известно, для человека характерна малая обсемененность при заражении туляремиальным микробом, поэтому при диагностике туляремии у человека основное значение отводится иммунологическим методам. В лаборатории природно-очаговых и зоонозных инфекций института при лабораторной диагностике туляремии широко используются хромотографические тест-полоски (производства ФБУЗ ГНЦ ПМБ г. Оболensk), которые позволяют уже в течение 10–20 мин выявлять специфические противотуляремиальные антитела (АТ) даже в низких титрах – 1/40. В течение последних лет проведена оценка напряженности противотуляремиального иммунитета у жителей РО и новых территорий (1218 сывороток).

Однако данный подход не позволяет определить, являются ли выявляемые АТ поствакцинальными или постинфекционными, что затрудняет интерпретацию результатов у людей, проживающих в эндемичных очагах. Результаты наших исследований показали, что в сыворотках вакцинированных содержатся АТ, строго специфичные в отношении липополисахарида (ЛПС) туляремиального микроба. Наротив, в сыворотках больных туляремией людей обнаружены два вида иммунологически различных АТ – против ЛПС *F. tularensis* и ЛПС *F. novicida*. Полученные данные легли в основу дифференциального теста для оценки противотуляремиальных АТ у больных или вакцинированных людей.

При изучении роли внеклеточных везикул в пато- и иммуногенезе туляремиальной инфекции определено, что только бактерии с полноценной структурой ЛПС способны к везикулообразованию. Везикулы представлены округлыми и специфичными для *F. tularensis* тубулярными формами, содержащими в составе ЛПС и мажорные белки.

Исследована возможность индукции у туляремиального микроба и близкородственных франциселл бактериофага. Получен стабильный бактериофаг только из франциселл, обладающий литической активностью в отношении франциселл и культур, лишенных CRISPR-системы *Escherichia coli* φ и *Vibrio cholerae* EI Tor.

Результаты наших исследований позволяют предположить, что биология бактерий *in vitro* существенно отличается от свойств *F. tularensis in vivo*. Поэтому перспективной представляется разработка новых экспериментальных моделей, максимально приближенных к организму хозяина. И только тесное сотрудничество специалистов разных профилей – микробиологов, биохимиков, молекулярных биологов – позволит решить многие загадки возбудителя туляремии.

Изменения в структуре российской популяции *Neisseria gonorrhoeae*

Носов Н.Ю.

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Был проведен филогенетический анализ структуры российской популяции *Neisseria gonorrhoeae* за период 2021–2022 гг. В исследовании был использован 91 клинический изолят *N. gonorrhoeae*, поступивший из медицинских органи-

заций дерматовенерологического профиля Российской Федерации. Исследования по мониторингу устойчивости российских штаммов *N. gonorrhoeae*, проводимые ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, показали, что тренд на восстановление чувствительности к тетрациклам, фторхинолонам и пенициллину сменился ростом числа штаммов, резистентных к данным препаратам. Результаты молекулярного типирования данных штаммов показали значительное сокращение числа штаммов, относящихся к геногруппе NG-MAST 807, длительное время являвшейся распространенной на территории России и не имеющей большого набора генетических детерминант лекарственной устойчивости. В то же время в 2022 г. были выявлены штаммы *N. gonorrhoeae*, относящиеся к геногруппе NG-MAST 1407, ранее единично встречавшейся на территории нашей страны. Анализ результатов полногеномного секвенирования данных штаммов показал наличие большого количества единичных нуклеотидных замен в генах *mtrC*, *mtrD*, *mtrE* и *mtrR*, кодирующих белки системы эффлюкса. Данные мутации ответственны за формирование механизмов неспецифического выведения антимикробных препаратов из бактериальной клетки. Для штаммов геногруппы NGMAST 1407 характерна широкая распространенность в странах Европейского союза, что может с высокой долей вероятности свидетельствовать о завозном характере случаев, в результате которых были выделены штаммы *N. gonorrhoeae*, использованные в настоящем исследовании.

Опыт обнаружения *Lactobacillus iners* при воспалительных заболеваниях женского генитального тракта

Оборин Д.А., Годовалов А.П., Карпунина Т.И.

Пермский государственный медицинский университет им. акад. Е.А.Вагнера Минздрава России, Пермь, Российская Федерация

Широкое внедрение методов амплификации нуклеиновых кислот в клиническую микробиологию позволило существенно расширить представления о составе микроорганизмов биотопов человека, но не приблизило к решению вопроса об их клинической значимости. В настоящее время дискутируется роль *Lactobacillus iners* в вагинальной микробиоте. Описаны как пробиотическая активность этого вида лактобактерий (Zheng et al., 2021), так и его участие в развитии дисбиотических состояний (Alimena et al., 2022) и воспалительных заболеваний (Armstrong et al., 2022).

Цель исследования. Оценить встречаемость *L. iners* при воспалительных заболеваниях женского генитального тракта с учетом сопутствующей микрофлоры.

Материалы и методы. В исследование включили 3 группы женщин. 1-ю составили пациентки с неспецифическими воспалительными заболеваниями генитального тракта ($n = 72$), 2-ю – с острой генитальной гонококковой инфекцией ($n = 20$), в 3-ю группу (сравнения) вошли практически здоровые женщины ($n = 18$). Детекцию *L. iners* осуществляли с помощью набора реагентов для полимеразной цепной реакции в реальном времени (Россия). Для оценки влияния

качественных признаков рассчитывали показатель отношения шансов (OR) с расчетом 95%-го доверительного интервала (95% CI), а также использовали χ^2 -критерий. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. *L. iners* были детектированы в образцах пациенток 1-й группы в 48,6%, а во 2-й – 27,8% случаев (в группе сравнения – 12,5%; $p < 0,05$). При расчете коэффициента постоянства вида в вагинальном биотопе показано, что для пациенток 1-й группы *L. iners* является постоянным, для 2-й – добавочным, а в группе сравнения – случайным микроорганизмом. Установлено, что относительный шанс обнаружения *L. iners* в 6,6 раза выше при неспецифических воспалительных заболеваниях, чем у практически здоровых лиц (OR = 6,6; 95% CI 3,36–13,05). С помощью коэффициента Жаккара выявлено, что совместное существование *L. iners* допускают с *Escherichia coli*, причем преимущественно нетипичными вариантами, дрожжеподобными грибами не-albicans видов и с другими лактобактериями. Отмечается устойчивая ассоциация *L. iners* и *Enterococcus faecalis* при неспецифических воспалительных заболеваниях. В то же время у *L. iners* отсутствует экологическая общность с коринебактериями, *Candida albicans*, нейссериями (в т.ч. *Neisseria gonorrhoeae*), представителями родов *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Actinomyces*. Можно предположить, что такие межмикробные отношения обусловлены синтрофией *L. iners* с другими видами. Известно, что геном этих лактобактерий относительно мал и для реализации метаболических потребностей целесообразно взаимодействие с видами, которые могут их обеспечить. Так, например, *E. faecalis*, обладая выраженным ферментативным потенциалом, обеспечивают потребности *L. iners* в L-цистеине, который необходим им для роста (Bloom et al., 2022).

Заключение. В целом более частое обнаружение *L. iners* при неспецифических воспалительных заболеваниях может быть обусловлено особенностями межмикробных взаимоотношений при малосимптомных процессах.

Крымская геморрагическая лихорадка: эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация в Республике Дагестан в 2023 г., прогноз заболеваемости на 2024 г.

Омариева Э.Я., Халимбеков Х.А., Гаджиева П.О.

ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция»
Роспотребнадзора, Махачкала, Российская Федерация

Крымская геморрагическая лихорадка (КГЛ) – особо опасная трансмиссивная вирусная инфекция, представляющая серьезную угрозу глобальному здравоохранению. Возбудитель КГЛ – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ, *Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonairovirus*, семейство *Nairoviridae*, род *Orthonairovirus*) – относится к экологической группе арбовирусов, основным переносчиком которых являются клещи рода *Hyalomma*.

За первое полугодие 2023 г. в республике зарегистрировано 731 случай укуса клещами, что в 2 раза превышает

уровень обращаемости пострадавших в медицинские организации за предыдущие 2 года.

Эпидемиологическая ситуация по КГЛ в Республике Дагестан в 2023 г.

Эпидемические проявления КГЛ в республике регистрируются ежегодно с 2000 г., при этом отмечаются периоды с различной интенсивностью эпидпроцесса (максимальное количество было зарегистрировано в 2019 г. – 14 случаев). Летальные исходы были зарегистрированы в 2013, 2019, 2021, 2022 гг. и в I полугодии текущего года.

В 2023 г. зарегистрировано 4 случая заболевания КГЛ в 4 муниципальных образования республики против 12 случаев в 6 муниципальных образованиях в 2022 г. Случаи заболевания регистрировались среди лиц, имеющих в домашнем хозяйстве крупный рогатый скот и осуществляющих уход за ним, лиц, участвовавших в проведении различных сельскохозяйственных работ, среди отдыхающих в парковых зонах и в зонах неорганизованного отдыха. При этом отмечено вовлечение горных районов республики (Гумбетовский, Ботлихский районы), в которых в предыдущие годы не регистрировались случаи заболевания.

Все случаи лабораторно подтверждены методами полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА) на базе лабораторий ФКУЗ «Дагестанская ПЧС» Роспотребнадзора.

В результате генетического типирования на базе Референс-центра по мониторингу за возбудителем КГЛ в образцах клинического материала от больных КГЛ было установлено, что изолят вируса ККГЛ принадлежит варианту (генотип Европа-1), широко распространенному на территории юга европейской части России.

Мониторинг инфицированности популяции переносчиков вируса ККГЛ

По результатам исследований на базе лабораторий ФКУЗ «Дагестанская ПЧС» Роспотребнадзора методами ИФА и ПЦР на наличие антигена и РНК вируса ККГЛ выявлены положительные результаты: в 2022 г. – 15 проб (0,9% от общего количества), в 2021 г. – 16 проб (1,13%). Зараженные вирусом КГЛ клещи были обнаружены в горных и предгорных районах республики и в Махачкале.

Высокая численность клещей *Hyalomma marginatum*, участие в циркуляции возбудителя КГЛ нескольких видов переносчиков (кроме вида *H. marginatum*, антиген вируса КГЛ был выявлен еще у 5 видов иксодовых клещей), рост уровня инфицированности переносчиков вируса ККГЛ (за 2020–2022 гг. в динамике отмечается рост инфицированных клещей вирусом КГЛ до 3 раз) могут способствовать развитию неблагоприятной эпидемиологической обстановки на территории республики, что требует принятия комплекса мер со стороны органов исполнительной власти, лечебно-профилактической сети и органов надзора.

Эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Республике Дагестан, результаты лабораторных исследований на наличие *Bacillus anthracis* за период с 2012 по 2022 г.

Омариева Э.Я., Гаджиева П.О.

ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция»
Роспотребнадзора, Махачкала, Российская Федерация

Республика Дагестан является одной из неблагополучных территорий в Российской Федерации по заболеваемости сибирской язвой людей и животных. На территории республики в 39 районах зарегистрировано 420 стационарно неблагополучных по сибирской язве пунктов (СНП), что составляет 1,2% от всех СНП по Российской Федерации.

По результатам эпизоотолого-эпидемиологического районирования, проведенного Ставропольским противочумным институтом, территория республики разделена на 4 группы: с низкой, средней, высокой, очень высокой степенью неблагополучия по сибирской язве.

За период с 2012 по 2022 г. в 4 муниципальных образованиях республики зарегистрировано 6 очагов сибирской язвы со спорадической и групповой заболеваемостью (в 33,3% случаев очаги зарегистрированы в районах, отнесенных к 4-й группе, в 50,0% – к 3-й группе, в 16,7% – к 2-й группе) с числом пострадавших 18 человек. Источником инфекции явился вынужденно забитый крупный рогатый скот на личном подворье. В 100% случаев зарегистрирована кожная форма заболевания, что указывает на непосредственный контакт в процессе убоя, разделки мяса скота без предубойного ветеринарного осмотра. Животные не были учтены и привиты против сибирской язвы.

Результаты лабораторных исследований (проведенных в ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция» Роспотребнадзора, ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора) клинического материала и объектов внешней среды позволили установить причинно-следственную связь возникновения очагов, предотвратить распространение инфекции.

Для индикации *Bacillus anthracis* в рамках эпидемиологического расследования очагов очевидна диагностическая ценность существующих методов исследований.

При исследовании клинического материала методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) обнаружена ДНК *B. anthracis* (2012, 2019, 2020, 2021, 2022), непрямым методом флуоресцирующих антител в сыворотке крови больных – специфические противосибиреязвенные антитела в диагностическом титре (2018, 2019, 2020, 2021, 2022), бактериологическим методом – выделен штамм *B. anthracis* (2012, 2019, 2022).

При исследовании проб из объектов окружающей среды ПЦР-методом обнаружена ДНК *B. anthracis* в смывах (2019, 2020, 2021), почве (2022).

В объектах животного происхождения (мясо, шкура, копыта) в 2019, 2020, 2022 гг. ПЦР и бактериологическим методами выделен генетический материал и штамм *B. anthracis*.

Однако отсутствие положительных результатов при исследовании почвы сибиреязвенных захоронений (за период с 2020 по 2022 г. исследовано более 350 проб) существующими методами требует разработки и внедрения в практику методов, повышающих эффективность индикации *B. anthracis* в пробах объектов окружающей среды.

Приоритетной задачей является участие в молекулярно-генетическом мониторинге за возбудителями инфекционных болезней (секвенирование) в рамках федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья», что позволит проводить мониторинг изменчивости патогенов на территории республики и страны.

Ветеринарный мониторинг антибиотикорезистентности энтерококков

Павлова В.С., Макавчик С.А.

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Цель. Провести ветеринарный мониторинг антибиотикорезистентности *Enterococcus faecalis*, выделенных из молока при инфекционных маститах коров.

Материалы и методы. Идентификацию возбудителей осуществляли с помощью тест-системы api 20 Strep (bioMérieux, Франция). Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом. Интерпретация результатов проводилась в соответствии с рекомендациями EUCAST.

Результаты. В период с 2021 по 2022 г. из маститного молока коров было выделено 100 штаммов микроорганизмов. Полученные штаммы были идентифицированы как грамотрицательные бактерии в 32% случаев выделения, грамположительные – 68%, из них 14% – *E. faecalis*.

При интерпретации антибиотикограммы большинство изолятов *E. faecalis* оказались чувствительны к тетрациклину (3%), ампициллину (14%), амоксициллину (14%), а также резистентны к тетрациклину (11%). Доля резистентности к гентамицину, цефалексину, цефотаксиму, эритромицину, клиндамицину, линкомицину, тобрамицину, цефтриаксону и стрептомицину составила 14% случаев выделения.

Заключение. Таким образом, полирезистентность микроорганизмов *E. faecalis* к различным группам антибактериальных средств приводит к ограниченному применению антибиотиков, что существенно сокращает возможности терапии и сказывается на экономическом состоянии сельского хозяйства.

Резистентность к антибиотикам и бактериофагам *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от пациентов в многопрофильном стационаре

Панкова М.Ю., Коробова А.Г., Мещурова С.Ю., Кириллова К.И., Самоходская Л.М.

Медицинский научно-образовательный центр ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация

Цель. Определить чувствительность *Pseudomonas aeruginosa*, выделенных от пациентов многопрофильного стационара, к антимикробным препаратам и бактериофагам.

Материалы и методы. В исследование были включены 23 изолята *P. aeruginosa*, выделенные от пациентов, находившихся на лечении в МНОЦ МГУ им. М.В.Ломоносова с января 2021 г. по июнь 2023 г. с инфекциями мочевых путей (43,5%), интраабдоминальными инфекциями (34,9%), инфекциями нижних дыхательных путей (8,7%), инфекциями кожи и мягких тканей (8,7%), катетер-ассоциированными инфекциями (4,3%). Медиана возраста пациентов была 70 лет (36–89). Чувствительность к антибиотикам определяли стандартными методами. Продукцию карбапенемаз подтверждали модифицированным методом инактивации карбапенемов. Гены карбапенемаз были определены с помощью коммерческого набора «БакРезиста GLA» («ДНК-Технология», Россия). Чувствительность к препаратам бактериофагов («Пиобактериофаг поливалентный очищенный» и «Бактериофаг синегнойный», НПО «Микроген») определяли в соответствии с требованиями методических рекомендаций «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике» (2022), при интерпретации результатов использовали категории чувствительный, слабо чувствительный и резистентный.

Результаты. Чувствительными ко всем изученным антибиотикам были только 34,8% штаммов *P. aeruginosa* (8 из 23). Отмечалась значительная доля изолятов, устойчивых к пиперацилину/тазобактаму (47,8%), цефтазидиму (47,8%), цефепиму (52,2%), цефтазидиму/авиабактам (52,2%), имипенему (56,5%), ципрофлоксацину (56,5%), амикацину (52,2%), к меропенему резистентность была ниже и составила 30,4%.

Всего выделено 13 изолятов *P. aeruginosa*, резистентных к одному из карбапенемов (7 к меропенему, 13 к имипенему), у 10 из 13 обнаружены карбапенемазы, из них у 9 были металло-β-лактамазы VIM и у 1 штамма детектировали сериновые β-лактамазы GES.

Доля *P. aeruginosa*, резистентных к бактериофагам, составила 26% (6 из 23) к поливалентному бактериофагу и 21,7% (5 из 23) к синегнойному бактериофагу, чувствительными к бактериофагам были 4,3 и 21,7% соответственно. Среди изолятов с продукцией карбапенемаз к поливалентному бактериофагу устойчивыми были 15,4% (2 из 13), к синегнойному бактериофагу – 23,1% (3 из 13), однако остальные изоляты были слабо чувствительны к этим препаратам.

Выводы. Доля резистентных *P. aeruginosa* для всех тестируемых антибиотиков превысила 30%, для бактериофагов

она была немного ниже, но значительная часть изолятов была слабо чувствительна к тестируемым бактериофагам.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ им. М.В.Ломоносова «Изучение резистентности возбудителей и разработка персонализированных подходов к выбору и назначению противомикробных препаратов» (0908/006 №123040300035–3).

Разработка и применение рекомбинантного фермента Cas12a для детекции нуклеиновых кислот на основе CRISPR/Cas-системы

Панфёров Е.А., Решетняк Т.В., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Перовская О.Н., Соловьев П.В., Бикетов С.Ф.

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

Системы CRISPR/Cas по своей природе являются защитным механизмом прокариот от внедрения чужеродного генетического материала, в первую очередь при инфицировании бактериофагами. Аббревиатура CRISPR/Cas расшифровывается как «Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR associated genes», что в переводе означает «короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами, и ассоциированные с ними гены».

В настоящее время открыт ряд ферментов (Cas9, Cas12a, Cas12b и др.), которые успешно применяются при редактировании геномов, в экспериментальной клеточной терапии и экспресс-диагностике инфекционных заболеваний (Barrangou et al., 2007).

Одним из перспективных ферментов, который можно использовать для создания диагностических систем нового поколения, является Cas12a (Cpf1). Энзим представляет собой РНК-зависимую ДНК-эндонуклеазу и обнаружен в микробных клетках *Eubacterium rectale*, *Francisella novicida* и *Lachnospiraceae*. Механизм действия Cas12a проявляется в РНК-гид-опосредованной специфической (cis) гидролитической активности в отношении двуцепочечной ДНК при наличии последовательности нуклеотидов 5'-TTT-N-3' или 5'-СТТ-N-3' в области расщепления (PAM-site) с образованием 5'-липких концов на продуктах реакции и неспецифической (trans) нуклеазной активности в отношении одноцепочечных молекул ДНК (олигонуклеотидов). Это свойство фермента может быть использовано для высокоспецифической детекции ДНК инфекционных патогенов.

Наше исследование направлено на конструирование штамма *Escherichia coli*-продуцента рекомбинантного фермента Cas12a, разработку технологии его аффинной очистки и применения.

Для решения этой задачи нами был синтезирован и клонирован в экспрессирующем векторе кодон-оптимизированный ген-эквивалент, кодирующий синтез белка Cas12a в клетках *E. coli*. Высокоактивный фермент очищали из биомассы клеток *E. coli*-продуцента фермента Cas12a при помощи аффинной хроматографии.

Созданный рекомбинантный фермент Cas12a в комплексе со специфической гид-РНК был использован для детекции ДНК *Yersinia pestis* благодаря способности проявлять транс-нуклеазную активность в отношении одноцепочечного флуоресцентного ДНК-зонда (репортера).

Как правило, для детекции на основе CRISPR/Cas предварительно проводится амплификация ДНК-мишени с помощью полимеразной цепной реакции, рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) или петлевой изотермической амплификации (LAMP).

Нами разработана система детекции Cas12a для обнаружения фрагмента хромосомного участка YPO0392 *Y. pestis* после амплификации гена-мишени с помощью LAMP. Для сравнения транс-нуклеазной активности рекомбинантного Cas12a использовали EnGen LbaCas12a (Cpf1) (New England Biolabs, США). Проведенные исследования показали, что по нуклеазной активности полученный нами фермент Cas12a не уступает импортному аналогу, что позволяет использовать его для создания новых диагностических систем на основе CRISPR/Cas.

Оценка чувствительности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам и пробиотикам

Парахина Л.И.¹, Парахина А.И.¹, Пименова Ю.А.¹, Котенева Е.Н.¹, Трошина Д.А.², Евстропов А.Н.¹, Захарова Л.Н.¹

¹ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Новосибирск, Российская Федерация;

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Новосибирской области», Новосибирск, Российская Федерация

Введение. Для лечения бактериальных инфекций применяются различные препараты: антибиотики, бактериофаги, пробиотики. В связи с распространением резистентных штаммов необходимо определение их чувствительности к применяемым препаратам для персонализированного назначения лекарственных средств.

Цель исследования. Оценить чувствительность клинических штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам и пробиотикам.

Материалы и методы. Изучена чувствительность 53 штаммов микроорганизмов (*Escherichia coli* (n = 17); *Klebsiella pneumoniae* (n = 10); *Klebsiella oxytoca* (n = 9); *Pseudomonas aeruginosa* (n = 3); *Proteus mirabilis* (n = 2); *Proteus vulgaris* (n = 1); *Staphylococcus aureus* (n = 4); *Staphylococcus epidermidis* (n = 1); *Staphylococcus kloosii* (n = 1); *Enterococcus faecalis* (n = 5)), выделенных от пациентов с дисбиозом желудочно-кишечного тракта, к антибиотикам, бактериофагам «Секстафаг» и «Бактериофаг клебсилл поливалентный очищенный», к штаммам пробиотических бактерий *Lactobacillus plantarum* 8RA-3, *E. coli* M-17, *Bacillus subtilis* штамм ВКПМ В-10641, *Enterococcus faecium* SF-68, *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745.

Антибиотикорезистентность определяли диско-диффузионным методом в соответствии с рекомендациями EUCAST

(версия 13.0), чувствительность к бактериофагам оценивали в соответствии с клиническими рекомендациями «Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противозидемической практике», антагонистическую активность пробиотических штаммов определяли согласно ОФС.1.7.2.0009.15.

Результаты. Антибиотикорезистентность выявлена у 66% штаммов, из них 34% микроорганизмов были полирезистентными. Резистентность бактерий семейства *Enterobacteriaceae* наблюдалась к норфлоксацину (28,6%), ампициллину (57,1%), гентамицину (92,9%). *Staphylococcus* spp. резистентны к бензилпенициллину (83,3%) и оксациллину (66,6%). Бактерии рода *Enterococcus* резистентны только к стрептомицину (40%). У 26,4% исследованных штаммов выявлена чувствительность ко всем антибиотикам.

100%-я литическая активность «Секстафага» выявлена к *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp. и *P. vulgaris*. Препарат эффективен в отношении 65% штаммов *E. coli*, 67% *P. aeruginosa*, 50% *P. mirabilis*. Только 31% культур *Klebsiella* spp. были чувствительны к «Секстафагу» и клебсиллезному бактериофагу.

Пробиотические штаммы *L. plantarum* и *E. faecium* обладали низкой антагонистической активностью ко всем исследованным микробам. Наибольшая антагонистическая активность пробиотического штамма *E. coli* выявлена к бактериям семейства *Enterobacteriaceae*. *B. subtilis* обладал высокой антагонистической активностью к *S. aureus* и *S. epidermidis*. У *S. boulardii* антагонистическая активность не выявлена.

Выводы. Для обеспечения терапевтического эффекта необходимо оценивать чувствительность патогенов не только к антибиотикам, но и к назначаемым бактериофагам и пробиотическим препаратам.

Эпидемиологическая ситуация по токсокарозу на территории Челябинской области за 2019–2023 гг.

Петрова О.С., Лямкина Д.Д., Смолина Е.В., Сухоручкина М.С.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области», Челябинск, Российская Федерация

Актуальность. Токсокароз человека – личиночный, хронически протекающий тканевой геогельминтоз, характеризующийся длительным и рецидивирующим течением, полиморфизмом клинических проявлений, с преимущественным поражением внутренних органов и глаз.

Основным источником инвазии для человека являются собаки (реже кошки), обсеменяющие почву яйцами гельминтов. Инвазия токсокарами широко распространена среди животных и людей. Пораженность псовых, как основных хозяев токсокар, во всем мире очень высока и достигает в отдельных регионах 90%. Человек не может быть источником заражения, поскольку является экологическим тупиком для токсокар ввиду того, что в организме человека паразит не достигает половозрелой стадии и не выделяет яйца во внешнюю среду, однако личинки, не изменяясь морфологически, могут месяцами и годами оставаться жизнеспособ-

ными. При этом они способны мигрировать в разные органы, образуя очаги воспаления, вплоть до характерного для токсокароза поражения глаз с потерей зрения.

Определяющими факторами широкого распространения токсокароза являются рост числа собак в городах, значительная плодовитость гельминтов и устойчивость яиц к факторам внешней среды. К группам риска относятся: дети 1,5–5 лет, контактирующие с почвой и собаками; дети, страдающие геофагией; люди, имеющие профессиональный контакт с животными и почвой, умственно отсталые и психически больные со склонностью к копро- и геофагии; владельцы приусадебных участков, домашних животных.

Заболееваемость токсокарозом, несмотря на имеющуюся тенденцию к снижению, остается актуальной проблемой, в особенности для населения крупных городов, в т.ч. и для Челябинской области. Так, на территории Российской Федерации в 2019 г. зарегистрировано 959 случаев токсокароза (1,33 на 100 тыс. населения), в 2020 г. – 871 (0,59 на 100 тыс. населения), в 2021 г. – 690 (0,47 на 100 тыс. населения), в 2022 г. – 1164 (0,80 на 100 тыс. населения). В Челябинской области в 2019 г. зарегистрировано 50 случаев токсокароза (1,53 на 100 тыс. населения), в 2020 г. – 26 (0,80 на 100 тыс. населения), в 2021 г. – 10 (0,31 на 100 тыс. населения), в 2022 г. – 16 (1,36 на 100 тыс. населения).

Цель. Проведение анализа серологического контроля за паразитарными инвазиями токсокарами на территории Челябинского городского округа в индикаторной группе детей 3–4 лет.

Материалы и методы исследования. Проведенное исследование носит комплексный характер, включающий эпидемиологический (описательный) и статистический методы исследования в динамике за 5 лет (2019–2023 гг.). Объект изучения – результаты сероконтроля мониторинговых исследований. В результате ретроспективного анализа проведено сравнение учетных данных. Обработка статистических материалов проводилась на персональном компьютере с использованием стандартных прикладных компьютерных программ пакета Microsoft Office (2010), Microsoft PowerPoint (2010).

Результаты исследования. В своей работе специалисты бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Челябинской области» руководствуются МУК 4.2.3533–18 «Иммунологические методы лабораторной диагностики паразитарных болезней». Исследование сывороток крови для выявления иммуноглобулинов класса G к антигенам токсокар проводится методом твердофазного иммуоферментного анализа с использованием разрешенного в России набора реагентов «Токсокара-IgG-ИФА-БЕСТ», современного оборудования.

Ежегодно во втором квартале, согласно плану мониторинговых исследований Управления Роспотребнадзора по Челябинской области, исследуются сыворотки крови от 100 лиц индикаторной группы детей от 3 до 4 лет.

Согласно полученным результатам, с 2019 г. количество положительных находок увеличивалось пропорционально количеству исследованных сывороток крови. В 2019 г. не было положительных находок, в 2020 г. процент положительных находок составил 3%. Наибольший процент положительных находок (25%) приходится на 2021 г., что может быть связано с обязательной самоизоляцией (в связи с пан-

демией SARS-CoV-2), из-за которой с 30.03.2020 многие профилактические мероприятия, такие как своевременная дегельминтизация домашних собак, ограничение численности бродячих собак, гигиеническая составляющая выгула, не соблюдались в достаточной мере. В 2022 и 2023 гг. количество положительных находок уменьшилось по сравнению с 2021 г. на 21% и составило 4% от общего числа исследованных сывороток.

Результаты и обсуждения. В динамике за 5 лет (2019–2023 гг.) случаи положительных находок при исследовании сывороток крови на иммуноглобулины класса G к токсокарам в индикаторной группе сохраняются приблизительно на одном и том же уровне, за исключением 2021 г. Полученные данные серологического контроля и подъем заболеваемости токсокарозом в 2022 г. на территории России и Челябинской области подтверждают актуальность темы.

В связи с этим целесообразно усилить санитарное просвещение населения. Необходимо обеспечение распространения информации как о полиморфизме клинических проявлений с преимущественным поражением внутренних органов и глаз, возможных путях заражения паразитами, так и о профилактических мероприятиях, направленных на источники инвазии, и на факторы передачи. Среди таких мероприятий: необходимость устранения фекального загрязнения собаками во время их выгула; тщательное мытье рук после контакта с почвой и животными; тщательное мытье зелени, ягод, овощей; своевременная дегельминтизация собак; оборудование специальных площадок для выгула собак и их гигиеническое содержание; защита парков и скверов от свободного выгула собак; ограничение численности бродячих собак; защита песочниц пленкой или щитами от посещения их животными; регулярная смена песка в детских песочницах (3 раза в год).

Изучение вклада гена *blaCTX-M* в фенотип антибиотикоустойчивости мультирезистентного госпитального штамма *Klebsiella pneumoniae*

Петросова Д.Т.^{1,2}, Асташкин Е.И.², Хохлова О.Е.², Авдеева В.А.², Фурсова Н.К.²

¹Обнинский институт атомной энергетики – филиал Национального исследовательского ядерного университета «МИФИ» Минобрнауки, Обнинск, Российская Федерация;

²ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

Антибиотикорезистентность возбудителей инфекций человека является одной из главных проблем мирового общественного здравоохранения. Появление в последнее время возбудителей с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) приводит к тяжелому течению инфекций, возникающих в пределах медицинских учреждений, особенно в отделениях с оказанием высокотехнологичной медицинской помощи (отделения реанимации и интенсивной терапии; трансплантологии; онкологического профиля). Одной из главных задач клинических эпидемиологов является изу-

чение патогенных свойств данных возбудителей, путей их распространения и изучение механизмов МЛУ. Одним из подходов изучения резистентности к антибактериальным препаратам является детекция детерминант антибиотикорезистентности. Решая вопрос с конкретным штаммом возбудителя, важно установить не только наличие гена лекарственной устойчивости, но и его нативность (наличие или отсутствие мутаций, делеций и т.д.), функциональную активность и определить его вклад в общий фенотип антибиотикорезистентности. Особое место в формировании МЛУ занимают гены, кодирующие β -лактамазы: *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA-48*, *blaKPC*, *blaNDM* и др.

Целью настоящей работы было изучение вклада гена *blaCTX-M* в антибиотикоустойчивость полирезистентного госпитального штамма *Klebsiella pneumoniae* B-408/21.

Задачей данного исследования было клонировать ген *blaCTX-M* в лабораторный штамм *E. coli* BMH и выяснить его функциональную активность по определению спектра антибиотикорезистентности.

Материалы и методы. Штамм *K. pneumoniae* B-408/21 выделен из аспирата пациента нейрореанимации г. Москвы в 2021 г., идентифицирован как множественно лекарственно устойчивый к антимикробным препаратам 12 функциональных групп. Бактерии культивировали на плотных и жидких питательных средах LB-бульон (BD, США) и Nutrient-агар (Himedia, Индия). Плазмидную ДНК выделяли с помощью набора HiPure Plasmid MiniPrep Kit (TransGen Biotech Co., LTD, Китай). Очистку ПЦП-продуктов проводили с помощью набора Quick Gel Extraction Kit (TransGen Biotech Co., LTD, Китай). Для клонирования гена *blaCTX-M* использовали векторы pAL2-T и pET28b (Evrogen, Россия). В работе были использованы ферменты эндонуклеазы рестрикции AраI и EcoRI, буферные растворы и их ингредиенты (Helicon, Россия). Трансформацию клеток *E. coli* BMH осуществляли как описано ранее (Маниатис, 1976). Минимальные подавляющие концентрации (МПК) 23 препаратов 11 функциональных групп – пенициллинов (ампициллина и амоксициллина-клавулановой кислоты), цефалоспоринов (цефазолина, цефотаксима, цефтазидима, цефепима, цефтриаксона и цефоперазона-сульбактама), карбапенемов (эртапенема и меропенема), аминогликозидов (гентамицина, тобрамицина, амикацина и нетилмицина), фторхинолонов (ципрофлоксацина), тетрациклинов (тетрациклина и тигециклина), хлорамфеникола, фосфомицина, нитрофуранов (нитрофурантоина), сульфаниламидов (триметоприма и котримоксазола) и полимиксинов (колистина) – определяли на приборе VITEK-2 (BioMérieux, Франция), интерпретировали в соответствии с рекомендациями EUCAST (http://www.eucast.org/clinical_breakpoints).

Результаты. С целью изучения функциональной активности гена *blaCTX-M* было проведено его клонирование в штамм *Escherichia coli* BMH. Для синтеза ампликона гена *blaCTX-M* использовали классическую циклическую полимеразную реакцию (ПЦР) с применением специфичных праймеров ISEsplU1 и P2D. Синтезированный ампликон (1000 п.н.) включал в себя последовательность гена *blaCTX-M* с промотором, расположенным перед геном *blaCTX-M* в начале последовательности мобильного элемента ISEspl. Клонирование полученного ампликона

в штамм *E. coli* BMH проводили в два этапа, используя на первом этапе вектор pAL2-T (3000 п.н., маркер – ген устойчивости к ампициллину ApR), на втором этапе – вектор pET28b (5369 п.н., маркер – ген устойчивости к канамицину *KmR*). На первом этапе были получены плазмиды pADCT-2, pADCT-8, pACT2-3 и pACT2-5, в которых ПЦР-анализ с помощью внутренних праймеров (СТХ-M-Fext и СТХ-M-RI) показал наличие клонированного гена *blaCTX-M*. Размер полученных плазмид составил 4000 п.н. На втором этапе рестрикты гибридной плазмиды по сайтам AраI-EcoRI, несущие ген *blaCTX-M* из плазмид предыдущего этапа, были встроены в вектор pET28b. У полученных плазмид pETCT23-1, pETCT23-2, pETDCT2-7 ПЦР-анализом было подтверждено наличие гена *blaCTX-M*. Изучение функциональной активности клонированного гена в штамме *E. coli* BMH pETCT23-1 осуществляли по определению спектра антибиотикорезистентности на приборе VITEK-2. В качестве отрицательных контролей были использованы: штамм *E. coli* BMH, несущий нативную плазмиду pET28b без вставок, и штамм *E. coli* BMH без плазмиды.

Показано, что штамм-трансформант *E. coli* BMH pETCT23-1 имел фенотип, характерный для штаммов, несущих β -лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС-позитивных): был резистентен к пенициллинам (ампициллину) и цефалоспорином (цефотаксиму, цефтазидиму и цефепиму). К другим антибактериальным препаратам этот штамм был чувствителен. Для сравнения, исходный штамм *K. pneumoniae* B-408/21, из которого осуществляли клонирование гена *blaCTX-M*, был охарактеризован ранее как устойчивый к пенициллинам (ампициллину), цефалоспорином (цефазолину, цефтриаксону, цефтазидиму, цефоперазону-сульбактаму и цефепиму), карбапенемам (эртапенему и имипенему), аминогликозидам (гентамицину, тобрамицину, амикацину и нетилмицину), фторхинолонам (ципрофлоксацину), тетрациклином (тетрациклину и тигециклину), хлорамфениколу, фосфомицину, нитрофураном (нитрофурантоину), сульфаниламидам (триметоприму и котримоксазолу) и полимиксином (колистину). Контрольные штаммы были чувствительны ко всем исследуемым препаратам. На основании данных антибиотикорезистентности можно сделать вывод о том, что устойчивость к β -лактамам антибиотикам штамма *E. coli* BMH pETCT23-1 обусловлена наличием клонированного гена *blaCTX-M*.

Таким образом, клонирование гена *blaCTX-M* позволило определить его вклад в общий фенотип антибиотикорезистентности исходного клинического штамма *K. pneumoniae* B-408/21, а именно – определение устойчивости к пенициллинам и цефалоспорином.

Анализ результатов проведения внешнего контроля качества по лабораторной диагностике дифтерии

Пименова А.С., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Чагина И.А., Андриевская И.Ю.

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

На базе ФБУН «МНИИЭМ им. Г.Н.Габричевского» Роспотребнадзора функционирует Референс-центр по мониторингу за корью, краснухой, эпидемическим паротитом, коклюшем и дифтерией, в рамках работы которого осуществляется проведение внешнего контроля качества исследований по лабораторной диагностике возбудителя дифтерии.

Во внешнем контроле качества, который начиная с 2014 г. проводится ежегодно, принимают участия испытательные лаборатории ФБУЗов – центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации (РФ). На данный момент времени в этом мероприятии приняли участие 85 субъектов РФ. Внешний контроль качества проводился дважды на территории 31 субъекта, трижды – на территории 39 субъектов, 4 раза – на территории 10 субъектов, 5 раз – на территории 5 субъектов. В каждый регион направляются 2 контрольных образца с лиофилизированными бактериальными культурами микроорганизмов рода *Corynebacterium* и опросник, содержательная часть которого ежегодно актуализируется.

Анализ результатов проведения внешнего контроля качества исследований по выявлению возбудителя дифтерии бактериологическим методом показывает, что за период 2014–2023 гг. количество регионов, которые верно идентифицировали контрольные образцы, отличалось. Следует отметить, что регионы, неверно идентифицировавшие один контрольный образец, фиксировались каждый год. Кроме того, в 2014, 2015, 2020, 2022 и 2023 гг. отмечались регионы, которые неверно идентифицировали оба контрольных образца.

К наиболее часто допускаемым ошибкам на преаналитическом этапе лабораторного исследования относятся: проведение инструктажа медицинского персонала по правилам взятия и транспортировки биоматериала с нарушениями; использование одного тампона для забора материала при обследовании лиц с подозрением на дифтерию; применение нерекондованных транспортных сред при доставке биоматериала в испытательную лабораторию. Перечисленные ошибки выявлялись начиная с 2014 г. На протяжении последних 5 лет наблюдается тенденция увеличения доли регионов, допускающих эти ошибки.

На аналитическом этапе лабораторного исследования наиболее часто выявляются следующие ошибки: несоблюдение технологии приготовления сред для первичного посева исследуемого материала и чашек для постановки пробы на токсигенность; изучение биохимических свойств бактерий рода *Corynebacterium* не в полном объеме; проведение внутрилабораторного контроля качества питательных сред и наборов реагентов для лабораторной диагностики возбудителя дифтерии с нарушениями. Следует отметить, что

обозначенные ошибки фиксируются на протяжении всего анализируемого периода.

К ошибкам постаналитического этапа лабораторного исследования относится неверное формулирование заключения по результатам анализа. За оцениваемый период данный вид ошибок выявлялся крайне редко.

Таким образом, проведение внешнего контроля качества является важным способом оценки деятельности испытательных лабораторий, занимающихся выявлением возбудителя дифтерии.

Использование фаговых литических систем для получения инактивированных бактериальных вакцин

Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Одним из первых препаратов, разработанных для профилактики инфекционных заболеваний бактериальной природы, были инактивированные вакцины. Их применение актуально и по сей день, особенно в ветеринарии. Классические методы инактивации при помощи температуры (термоинактивированные вакцины) и химических препаратов типа формалина (формолвакцины) имеют существенный недостаток – в процессе обработки клеток многие протективные антигены денатурируют, из-за чего не всегда удается получить полноценный иммунный ответ, а следовательно, и защите организма от инфекции.

Альтернативным вариантом инактивированных вакцин являются бактериальные тени – пустые клеточные оболочки, получаемые путем либо химического лизиса клеток в мягких условиях, либо экспрессии в бактериальных клетках генов литических белков бактериофагов. В последнем случае в бактерию вводят плазмиду, несущую ген (гены) литической системы бактериофага под строго контролируемым индуцибельным промотором. Исходно для лизиса использовали белок E бактериофага ϕ X174, субъединицы которого образуют в бактериальной клеточной стенке туннель, соединяющий наружную и внутреннюю мембраны. Стенки туннеля герметично запирают периплазму, в то время как цитоплазматическое содержимое свободно вытекает из клетки. Позднее для получения теней использовали систему белков лизиса фага лямбда, состоящую из холина (S), эндолизина (R) и спанинов (Rz/Rz1). Нами, в свою очередь, было предложено использовать различные варианты системы литических белков чумного бактериофага Л-413С – как отдельно холин с эндолизином (Y-K), так и в комбинации со спанинами Y-K-LysABC. Совместно с литическими белками часто используют неспецифическую нуклеазу из *Staphylococcus aureus*, которая гидролизует нуклеиновые кислоты, что одновременно убивает клетки, не подвергшиеся лизису, предотвращает перенос генетического материала патогена и снижает вязкость препарата теней.

Цель настоящей работы состояла в использовании фаговых литических систем для получения инактивированных бактериальных вакцин.

Получен набор плазмид, различающихся между собой репликационными (pA15, ColE1, RSF1010), генами устойчивости к антибиотикам (Cm, Km, Sm, Ap, Tc), промоторами (термоиндуцибельный PR фага лямбда, индуцируемые рамнозой (Prha) и арабинозой (Pbad) *Escherichia coli*), генами белков лизиса (E фага ϕ X174, S-R-Rz фага лямбда, Y-K и Y-K-LysABC чумного бактериофага Л-413С) и дополнительными генами-киллерами (стафилококковая нуклеаза SNUC, неспецифическая нуклеаза *Yersinia enterocolitica* YNSN), что позволяет подобрать подходящую литическую систему для большинства грамотрицательных патогенов.

При разработке чумной вакцины на основе теней клеток *Yersinia pestis* наилучший результат был достигнут при применении плазмиды pEYR'-E-Y-K, имеющей в своей основе репликон pA15, ген устойчивости к хлорамфениколу, модифицированный термоиндуцибельный промотор PR фага лямбда и комбинацию литических белков E фага ϕ X174 и Y-K фага Л-413С.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Изучение вирулентных и патогенных свойств штаммов *Burkholderia thailandensis* при пассажах на золотистых хомячках

Плеханова Н.Г., Хабарова И.А., Жукова С.И., Викторов А.Д., Замарина А.Ю., Бартенева М.В., Захарова И.Б.

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Волгоград, Российская Федерация

Burkholderia thailandensis – грамотрицательная аэробная палочка, весьма близкая по морфологии и генетической структуре к возбудителям особо опасных инфекций – сапу и мелиоидозу, в связи с чем и привлекает пристальное внимание исследователей. Длительное время *B. thailandensis* считалась авирулентным микробом, безвредным для человека. Однако в литературе накопилось уже немало фактов, свидетельствующих о том, что *B. thailandensis* способна вызывать у людей как локализованные, так и системные поражения. Ряд авторов связывают подобные случаи с появлением в популяции *B. thailandensis* так называемых вариантов штаммов, характеризующихся особенностью строения капсулы и имеющих высокую степень гомологии с кластером генов патогенности возбудителя мелиоидоза. В связи с этим нами проведена работа по определению вирулентных и патогенных свойств некоторых штаммов *B. thailandensis* из коллекции института на наиболее чувствительной биологической модели – золотистых хомячках.

Из 12 исследованных штаммов *B. thailandensis* 8 были авирулентными в дозе 10^8 м.к., а 4 штамма оказались вирулентными (LD_{50} варьировала от 10^4 до 10^6 м.к.). Для оценки патогенного потенциала данных изолятов было проведено двукратное пассирование их через организм золотистых хомячков с выделением культуры и ее подтверждением в полимеразной цепной реакции, после чего проведена сравнительная оценка вирулентных и патогенных свойств исследу-

емых штаммов. Было показано, что после двух пассажей на хомячках LD_{50} всех 4 штаммов заметно снизилась: у одного штамма – в 4,8 раза, у двух штаммов – в 10 раз, и у одного – более чем в 400 раз. Возрастание вирулентности штаммов приводило к снижению показателя средней продолжительности жизни (СПЖ). СПЖ биопробных животных при заражении пассированными культурами в дозе 10^6 м.к. уменьшилась в сравнении с СПЖ хомячков, инфицированных исходными штаммами, в 2,1–2,8 раза, при введении дозы 10^8 м.к. – в 2,7–3,7 раза.

Изучение патологоанатомической картины павших животных показало, что у хомячков, павших от исходных культур, умеренно выраженные очаги воспаления и некроза тканей отмечались в печени и легких (чаще – в одной доле легких). У животных, умерших от пассированных культур, регистрировались значительно более обширные гнойно-некротические поражения в печени, обеих долях легких, селезенке и почках.

Проведенные исследования показывают явные различия штаммов *B. thailandensis* по вирулентным и патогенным свойствам, что определяет необходимость пересмотра нахождения этого вида в составе IV группы патогенности, а также целесообразность более детального генетического анализа вирулентных штаммов этого микроорганизма.

Работа выполнена в рамках выполнения федерального проекта «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)».

BV-АГАР – питательная среда для выделения и культивирования *Lactobacillus iners* и других представителей вагинальной микробиоты

Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В.

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

Lactobacillus iners – малоизученный представитель вагинальной микробиоты. Из-за невозможности культивирования на питательных средах, традиционно используемых для лактобацилл, его роль в микробиоте влагалища до сих пор недостаточно ясна. Во ФБУН ГНЦ ПМБ разработаны состав и технология промышленного выпуска сухой питательной среды для выделения и культивирования представителей вагинальной микробиоты, включая *L. iners*, получившей название BV-агар.

Питательная среда представляет собой набор, состоящий из основы питательной среды и ростовой добавки. Совокупность компонентов, входящих в состав питательной среды, позволяет культивировать, помимо *L. iners*, широкий спектр представителей вагинальной микробиоты, включая другие виды лактобацилл, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* и такие требовательные патогены, как *Neisseria gonorrhoeae* и *Haemophilus influenzae*. Цистеина гидрохлорид и глутамин в заданных концентрациях являются стимуляторами роста для *L. iners*. Никотинамидадениндинуклеотид является фактором роста, необходимым для *H. influenzae*.

В качестве источника углеводов в питательной среде использован мальтодекстрин, который утилизируют все исследованные штаммы лактобацилл и *G. vaginalis* с образованием кислоты. Наличие в составе среды кислотно-основного индикатора бромкрезолового пурпурового позволяет дифференцировать лактобациллы и *G. vaginalis* от других бактерий и грибов рода *Candida* по изменению цвета среды. В зоне роста *G. vaginalis* и представителей рода *Lactobacillus*, включая *L. iners*, наблюдается изменение цвета среды с пурпурно-красного на желтый, в то время как в зоне роста *C. albicans*, *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* изменения цвета не происходит или цвет среды изменяется с пурпурно-красного на синий.

Питательная среда проста в приготовлении и не требует дополнительного внесения крови. В настоящее время BV-агар проходит процедуру государственной регистрации.

Внедрение новой питательной среды в практику клинических лабораторий при оценке состояния микробиоты влагалища позволит упростить диагностику бактериальных вагинозов и получить новые знания о влиянии *L. iners* на здоровье человека.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Разнообразие wb*-кластеров *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от людей на территории Российской Федерации в 2017–2022 гг.

Подойницына О.А., Кругликов В.Д., Ивлиева О.Н., Евтеев А.В., Ковалевич А.А.

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

Вид *Vibrio cholerae* по структуре соматического О-антигена подразделяется на серогруппы и в настоящее время насчитывает более 200 серологических групп. Участок ДНК, кодирующий ферменты, задействованные в биосинтезе О-антигена, называют кластером *wbe* (для *V. cholerae* O1) либо *wbf* (для *V. cholerae* O139). В отношении *V. cholerae* nonO1/nonO139 данный участок, согласно литературным данным, обозначается как wb*-кластер.

Холерные вибрионы nonO1/nonO139 серогрупп, для которых поверхностные водоемы являются экологической нишей обитания, относятся к биологическим агентам III группы патогенности в соответствии с СанПиН 3.3686–21 и способны вызывать энтериты, гастроэнтериты, а также инфекции с внекишечной локализацией.

В исследование были взяты 22 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенные из клинического материала от больных острыми кишечными и внекишечными инфекциями за период с 2017 по 2022 г.

По результатам полногеномного секвенирования нами проведено сравнение wb*-кластеров указанных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 с последовательностями штаммов холерных вибрионов серогрупп, представленных в базе данных NCBI (номер проекта – PRJDB8600). В результате выявлено, что все wb*-кластеры 22 исследуемых штаммов

отличались друг от друга. Было установлено, что у четырех изучаемых штаммов wb*-кластеры имели полное сходство (99%) с последовательностями wb*-кластеров референсных штаммов *V. cholerae*, принадлежащих к серогруппам O2, O54, O85 и O178. В то же время были выявлены 18 штаммов с wb*-регионами, которые демонстрировали лишь частичное сходство с референсными кластерами и наряду с известными генами кластера содержали неизвестные участки. Такое разнообразие среди последовательностей, кодирующих белки биосинтеза О-антигена, свидетельствует об их высокой вариабельности, которая может быть связана в том числе с адаптационной изменчивостью вибрионов.

Результаты исследований показали возможность определения серогрупповой принадлежности штаммов холерных вибрионов, не относящихся ни к O1-, ни к O139-серогруппам, что может быть использовано при проведении эпидрасследований при вспышках инфекций, возбудителями которых являются холерные вибрионы nonO1/nonO139-серогрупп. Накопление информации о структуре wb*-кластеров может стать в перспективе дополнительным информационным маркером при проведении идентификации штаммов холерных вибрионов, выделенных от больных.

Состав микробиоты ротоглотки у пациентов с пневмонией, ассоциированной с геновариантами вируса SARS-CoV-2 в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области

Полищук И.С., Алешукина А.В., Колпаков Д.С., Березинская И.С.

ФБУН «Научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Введение. Течение пневмоний, ассоциированных с COVID-19, осложняют сопутствующие бактериальные инфекции. Представляет интерес взаимосвязь вируса SARS-CoV-2 с микробиотой ротоглотки, состав которой может оказывать влияние на развитие и течение вирусных инфекций (в т.ч. COVID-19), выступая в качестве барьера, подавляя репликацию вируса, либо являясь источником вторичной бактериальной инфекции.

Цель работы. Сравнение микробиоты ротоглотки пациентов с пневмонией, ассоциированной с геновариантами вируса SARS-CoV-2.

Материалы и методы. Проводили бактериологический посев 103 проб мазков из ротоглотки от лиц, у которых был обнаружен в полимеразной цепной реакции (ПЦР) вирус SARS-CoV-2. Идентификацию выделенных штаммов бактерий осуществляли методом MALDI-TOF на базе масс-спектрометра Microflex Biotyper (BrukerDaltonics, Германия). В образцах методом фрагментного секвенирования по Сэнгеру выявляли геноварианты вируса SARS-CoV-2. Выделение РНК возбудителя осуществляли методом ПЦР с набором реагентов «РИБО-преп» (ЦНИИЭ, «ИнтерЛабСервис», Россия), амплификацию – при помощи набора реагентов Encyclo Plus PCR («Евроген», Россия) на приборе

T100 (BioRad, США). Выявление ДНК осуществляли с помощью электрофореза, результаты учитывали с использованием системы GelDoc (BioRad, США). Секвенирование ампликонов проводили с помощью тест-набора BigDye Terminator v.1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США) на анализаторе ABI PRISM 3500xL (Applied Biosystems, США). С помощью программного обеспечения Sequencing Analysis v.6.0 (Applied Biosystems, США) устанавливали первичную нуклеотидную последовательность кДНК-вирусов SARS-CoV-2. Сравнительный анализ с референсными нуклеотидными последовательностями проводили с помощью программы Mega7.0.

Результаты и обсуждение. Основные геноварианты SARS-Cov-2, выделенные из проб, распределились в убывающей последовательности: южноафриканский ($45,8 \pm 5,6\%$); индийский ($35,8 \pm 4,7\%$) и уханьский ($11,6 \pm 3,2\%$). Полученные результаты совпали с данными мониторинга Роспотребнадзором по Ростовской области в 2020–2022 гг. Было отмечено практически полное отсутствие нейссерий во всех пробах. Потенциальные возбудители воспалений ротоглотки больных с внебольничной пневмонией, ассоциированной с вирусом SARS-CoV-2, относились к родам: *Streptococcus* ($83,0 \pm 3,9\%$, $37,0 \pm 7,3\%$, $18,0 \pm 2,9\%$ соответственно), *Candida* ($44,0 \pm 3,5\%$, $19,0 \pm 4,6\%$, $10,0 \pm 2,7\%$), *Staphylococcus* ($26,0 \pm 4,3\%$, $12,0 \pm 2,6\%$, $27,0 \pm 4,5\%$). Для индийского геноварианта было отмечено увеличение выявления бактерий семейства *Enterobacteriaceae*. Таким образом, у пациентов с внебольничной пневмонией отмечено снижение представителей нормобиоты, что в сочетании с увеличением содержания бактерий семейства *Enterobacteriaceae* и дрожжей рода *Candida* свидетельствовало об иммунодефиците в биотопе при новой коронавирусной инфекции.

Сравнительная оценка белковых основ при разработке модифицированной среды Раппапорта–Вассилиадиса (среда MSRV)

Полосенко О.В., Сёмина А.Ю., Храмов М.В.

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

Бактерии рода *Salmonella* лидируют как возбудители групповых заболеваний (вспышек), вызванных употреблением контаминированных пищевых продуктов. Наиболее частыми возбудителями сальмонеллезов у человека являются *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis* и др.

Для селективного накопления сальмонелл в соответствии с требованиями действующих нормативных документов используют селенитовый бульон, бульон Мюллера–Кауфмана, магниевую среду, RVS-бульон. Для ускоренного выделения подвижных *Salmonella* spp. без этапа селективного обогащения используют полужидкую питательную среду MSRV (среда MSRV) в соответствии с ISO 6579–1. Было принято решение по разработке и внедрению в производственную практику данного препарата, не имеющего в настоящее время отечественного аналога.

Для обеспечения питательных потребностей бактерий при составлении композиций диагностических питательных сред используют разные белковые гидролизаты, поэтому целью исследования явилась сравнительная оценка различных отечественных белковых основ при разработке модифицированной питательной среды Раппапорта–Вассилиадиса (среда MSRV).

Материалы и методы. Для оценки специфической активности питательной среды MSRV были использованы *S. Enteritidis* 11272, *S. Typhimurium* 79, *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309 и 15 тест-штаммов, используемых в качестве микробов-ассоциантов: представители *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Биологические показатели питательной среды определялись после внесения в среду новобиоцина.

При конструировании среды MSRV были использованы отечественные белковые основы: мясной и ферментативный пептоны, панкреатический гидролизат рыбной муки (ПГРМ), гидролизат куриного белка и пептон мясной (Испания).

Результаты. Варианты питательных сред MSRV, содержащие гидролизат куриного белка, ПГРМ и пептон мясной (Испания), обеспечивали при посеве в центр чашек Петри по 0,1 мл микробной взвеси из разведения 10^{-6} через 18–24 ч инкубации при температуре $41,5 \pm 1,5$ °C рост каждого тест-штамма в виде ореола просветления среды с зоной подвижности: *S. Enteritidis* 11272 – 7,5–8,0 см, *S. Typhimurium* 79 – 5,0–6,0 см, *S. Choleraesuis* var. *Kunzendorf* 309 – 5,5–6,0 см.

На вариантах питательных сред, сконструированных на отечественных мясном и ферментативном пептонах, при посеве использованных тест-штаммов ореол просветления, указывающий на подвижность сальмонелл, отличался меньшим на 1,5–2,0 см размером.

При определении показателя ингибиции при посеве всех микробов-ассоциантов все экспериментальные варианты сред обеспечивали хорошие селективные свойства.

Выводы. По предварительному биологическому контролю образца на моделях среды MSRV можно сделать заключение о возможности использования гидролизата куриного белка в качестве белкового компонента наряду с ПГРМ и пептоном (Испания) в качестве белковой основы в составе модифицированной питательной среды Раппапорта–Вассилиадиса.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Ключевая роль питательных сред для обнаружения стафилококков при санитарно-бактериологических исследованиях

Полосенко О.В., Храмов М.В.

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

Патогенез различных заболеваний, вызванных патогенными стафилококками, диктует необходимость микробиологического контроля различных объектов в санитарной и клинической микробиологии.

Галофильность стафилококков способствует тому, что соленые пищевые продукты и концентраты могут быть контаминированы золотистым стафилококком, способным вызывать пищевые отравления. В соответствии с требованиями ГОСТ 31746, ГОСТ 30347 ГОСТ 30347–2016 и другими нормативными документами, установлены методы по выявлению и определению *Staphylococcus aureus* в пищевых продуктах.

Для мониторинга состояния продуктов питания на содержание стафилококков с целью профилактики пищевых отравлений и токсикоинфекций, вызываемых стафилококками, применяют культуральный метод.

Предположительное присутствие стафилококков в питательной среде №8 (для контроля микробной загрязненности) и солевом бульоне определяют по помутнению среды, в бульоне Жиолитти–Кантони – по почернению среды. Редукция теллурида калия в металлический теллур в бульоне Жиолитти–Кантони облегчает идентификацию коагулазоположительных стафилококков уже на этапе первичного исследования.

В настоящее время наиболее актуальны питательные среды для выделения стафилококков и одновременной их идентификации с определением признаков вирулентности. В схемах исследования на присутствие патогенного стафилококка пересевают прежде всего колонии, дающие положительную лецитовителлазную реакцию на таких средах, как агар Байрд–Паркера, маннит-солевой агар и стафилококкагар с добавлением желтка.

Подтверждение принадлежности типичных и/или атипичных колоний к коагулазоположительным стафилококкам проводят с учетом культуральных особенностей: ферментации маннита на маннит-солевом агаре, агаре Фогеля–Джонсона.

Принадлежность выявленных коагулазоположительных стафилококков к *S. aureus* проводят по определению их способности образовывать ацетоин (в реакции Фогеса–Проскауера на среде Кларка) и ферментировать мальтозу в аэробных условиях (на среде Гисса).

Использование вышеуказанных питательных сред успешно решает задачи не только выявления стафилококковой инфекции, но и своевременного и эффективного назначения антибактериальной терапии, диагностики заболевания, выявления бактерионосителей среди работников детских, лечебных учреждений и пищевых объектов, выявления источника заболевания, установления факторов передачи инфек-

ции (исследование пищевых продуктов, воздуха, зараженных предметов и других объектов).

Производственные возможности ФБУН ГНЦ ПМБ по выпуску питательных сред позволяют в полном объеме удовлетворить потребности отечественной клинической и санитарной микробиологии в питательных средах и отказаться от импортных поставок.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Изучение микробиоты толстого кишечника методом 16S рНК метагеномного секвенирования на модели макак-резус

Полякова В.И.¹, Кривонос Д.В.², Корнеенко Е.В.², Пенкин Л.Н.², Сперанская А.С.², Аршба И.М.¹, Ильина Е.Н.²

¹ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии», Сочи, Российская Федерация;

²ФБУН «Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины», Москва, Российская Федерация

Важнейшая роль кишечной микробиоты заключается в поддержании гомеостаза организма, регуляции иммунной, эндокринной и нервной системы, а также защите от патогенных микроорганизмов.

Цель исследования. Изучение разнообразия микробиоты толстого кишечника метагеномным секвенированием гена 16S рНК 17 клинически здоровых особей, содержащихся в НИИ медицинской приматологии.

Методы исследования. ДНК выделялась из образцов фекалий с помощью MagMAX Microbiome Ultra Nucleic Acid Isolation Kit. Образцы ставились на полимеразную цепную реакцию с праймерами на регион V3-V4 гена 16S рНК. Для ряда образцов ($n = 6$) применялось двойное баркодирование индексами Illumina (Nextera) и стандартными баркодами Oxford из Native Barcoding Kit (SQK-DCS109 with EXP-NBD104 или EXP-NBD114). Вставка индексов Illumina осуществлялась повторной амплификацией. После чего проводилось вторичное баркодирование набором для подготовки ДНК библиотек ONT Native Barcoding Kit (SQK-DCS109 with EXP-NBD104 and EXP-NBD114). Таким образом, каждый образец содержал баркоды и Oxford и Illumina. Остальные образцы ($n = 11$) не подвергались вторичной амплификации с индексами Illumina, а сразу баркодировались набором Native Barcoding Kit (SQK-DCS109 with EXP-NBD104 или EXP-NBD114). Для лигирования баркодов, адаптеров и секвенирования использовали набор реагентов SQK-LSK109 (ONT) и вспомогательные реагенты производства NEB или MGI. Секвенирование проводили на приборе Oxford Nanopore GridION.

Результаты исследования. Проведенное секвенирование показало, что микробиота толстого отдела кишечника обезьян преимущественно состоит из бактерий, относящихся к двум типам – *Firmicutes* (68%) и *Bacteroidota* (14,4%), составляющих значительную часть всей микрофлоры у людей. Помимо доминирующих кишечных типов, были вы-

делены следующие: *Actinobacteriota* (9,3%), *Spirochaetota* (2,1%), *Campylobacteriota* (2,1%), *Proteobacteria* (2,1%), а также *Verrucomicrobiota* (1%) и *Desulfobacterota* (1%).

На уровне класса преобладали *Clostridia* (43%), *Bacteroidia* (14,5%), *Bacilli* (20,6%), *Coriobacteriia* (6,2%), *Actinobacteria* (3,1%), *Negativicutes* (3,1%), *Campylobacteria* (2,1%), *Spirochaetia* (2,1%), *Gammaproteobacteria* (1%), *Alphaproteobacteria* (1%), *Verrucomicrobia* (1%), *Desulfumonia* (1%).

На уровне порядка наиболее представлены *Oscillospirales* (24,8%), *Bacteroidales* (14,5%), *Lactobacillales* (13,4%), *Lachnospirales* (11,3%), *Erysipelotrichiales* (6,2%), *Coriobacteriales* (6,2%), *Peptostreptococcales-Tissierellales* (3,1%), *Clostridiales* (3,1%), *Bifidobacteriales* (3,1%).

На уровне семейства наиболее распространены *Lactobacillaceae* (12,3%) и *Lachnospiraceae* (12,3%), а также *Oscillospiraceae* (11,2%), *Ruminococcaceae* (10,1%), *Prevotellaceae* (7,9%), *Erysipelotrichaceae* (4,4%) и *Atopobiaceae* (3,4%).

На уровне родов в составе микробиоты преобладали *Ligilactobacillus* (3,9%), *Oscillospiraceae* UCG-002 (3,9%) и *Faecalibacterium* (3,9%).

Заключение. Таксономический состав микробиоты кишечника обезьян имеет сходство с таковым у людей, что дает возможность изучения связи между составом микробиоты кишечника человека и различными заболеваниями на данной биологической модели.

Совершенствование ПЦР-диагностики инфекционного мононуклеоза у детей

Попкова М.И.¹, Филатова Е.Н.¹, Брызгалова Д.А.¹, Сахарнов Н.А.¹, Соболева Е.А.², Кулова Е.А.³, Уткин О.В.¹

¹ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация;

²ГБУЗ НО «Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Нижний Новгород, Российская Федерация;

³ООО «ТКС», Нижний Новгород, Российская Федерация

Введение. В России полимеразная цепная реакция (ПЦР) является широко используемым в современной клинической практике и эпидемиологическом надзоре за инфекциями лабораторным методом. Однако его информативность при диагностике инфекционного мононуклеоза (ИМ) до сих пор недостаточно изучена. В национальных клинических рекомендациях одним из критериев лабораторного подтверждения ИМ у детей является выявление ДНК вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ) методом ПЦР в крови, слюне. Уточним, что ДНК ВЭБ обнаруживается также и у здоровых вирусоносителей, а материалом для анализа может служить как цельная кровь, так и ее отдельные фракции (плазма, сыворотка, лейкоциты крови). В связи с этим актуален вопрос оптимизации алгоритмов выбора биосубстрата и интерпретации результатов, полученных в качественном и количественном формате ПЦР.

Цель работы. Совершенствование ПЦР-диагностики ИМ у детей на основе количественного определения ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови и слюне.

Материалы и методы. Исследованы лейкоциты крови (ЛЕЙ) и цельная слюна (СЛ) детей в возрасте 1–17 лет с диагнозом ИМ, вызванного ВЭБ (ВЭБ-ИМ, $n = 69$), и условно здоровых детей (ВЭБ-ЗД, $n = 72$). ДНК ВЭБ определяли методом ПЦР в реальном времени на основе реагентов производства ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (Россия). Статистическая обработка данных проведена с использованием языка программирования R и среды RStudio.

Результаты и обсуждение. ДНК ВЭБ обнаружена в СЛ и ЛЕЙ при ВЭБ-ИМ у 100% и $98,6 \pm 1,4\%$, а в группе ВЭБ-ЗД – у $60,0 \pm 7,7\%$ и $42,3 \pm 5,9\%$ детей соответственно. Концентрация ДНК ВЭБ в СЛ при ВЭБ-ИМ находилась в диапазоне $1,3 \cdot 10^3$ – $4,9 \cdot 10^7$ копий/мл, в то время как при ВЭБ-ЗД значения варьировали от недетектируемого уровня до $1,8 \cdot 10^6$ копий/мл, причем не только внутри группы, но и у отдельных лиц ежедневно в течение 14 дней наблюдения. В ЛЕЙ при ВЭБ-ИМ вирусная нагрузка значительно превышала показатели среди ВЭБ-ЗД (2,3 [1,9; 2,8] против 0,5 [0; 0,8] lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток, $p < 0,001$). Впервые установлено пороговое значение вирусной нагрузки ВЭБ в ЛЕЙ на уровне 1,5 lg копий ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток (29 копий/ 10^5 клеток) при приемлемых значениях диагностической специфичности (90%) и чувствительности (88%), что не уступает описанным ранее в литературе характеристикам выявления ДНК ВЭБ в плазме крови. Рассчитанный относительный риск ИМ у детей при вирусной нагрузке выше порогового значения составил 8,8 (95% ДИ 3,0–25,9; $p < 0,001$).

Заключение. Выделение ВЭБ со слюной отличается выраженной нестабильностью во времени, поэтому однократное исследование образца затрудняет оценку клинической и эпидемиологической значимости полученного результата. Впервые определено пороговое значение вирусной нагрузки ВЭБ в лейкоцитах крови детей (1,5 lg ДНК ВЭБ/ 10^5 клеток) в качестве дополнительного лабораторного критерия диагностики ИМ, что позволяет дифференцировать здоровое носительство ВЭБ от острой инфекции. В целом полученные результаты создают предпосылки для стандартизации количественных исследований ДНК ВЭБ в лейкоцитах крови и их внедрения в алгоритм диагностики ИМ у детей.

Клонирование гена карбапенемазы *blaKPC-2* из клинического штамма *Klebsiella pneumoniae*

Потапова А.Б.¹, Фурсов М.В.², Фурсова Н.К.²

¹Биологический факультет ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова», Москва, Российская Федерация;

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

Распространение устойчивости к антимикробным препаратам среди возбудителей нозокомиальных инфекций представляет собой глобальную проблему. *Klebsiella pneumoniae* –

один из основных возбудителей таких инфекций, характеризующийся в последние десятилетия повышенной способностью аккумулировать большое число генетических детерминант антибиотикорезистентности и вирулентности. Клиническую значимость имеет устойчивость *K. pneumoniae* к карбапенемам за счет продукции карбапенемазы.

Целью данной работы было клонирование гена карбапенемазы класса A *blaKPC-2* из клинического штамма *K. pneumoniae* для создания рекомбинантного штамма-продуцента, который будет использован в качестве компонента тест-системы для детекции данного гена.

Штамм *K. pneumoniae* В-8912, выделенный от пациента отделения реанимации нейрохирургического стационара в г. Москве в октябре 2019 г., получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов «ГКПМ-Оболенск». Данный штамм обладал фенотипом экстремальной лекарственной устойчивости (XDR), был устойчив к ампициллину, амоксиклаву, цефоперазону, цефотаксиму, цефтазидиму, цефепиму, азтреонаму, имипенему, меропенему, эртапенеми, тигециклину, ципрофлоксацину, хлорамфениколу, гентамицину, нетилмицину, амикацину, триметоприму-сульфаметоксазолу и фосфомицину, но чувствителен только к колистину [Kuzina et al., 2023. DOI: 10.3390/microorganisms 11020459]. Ген *blaKPC-2*, локализованный на плазмиде рKPC-2 (CP086668), амплифицировали при помощи специфичных олигонуклеотидов, комплементарных фланкирующим участкам гена и содержащих на 5'-концах последовательности сайтов рестрикции эндонуклеаз EcoRI и NcoI. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Phusion High-Fidelity (NEB, США) на амплификаторе C1000 (BioRad, США). Вектор рET28b и ПЦР-продукт NcoI-*blaKPC-2*-EcoRI последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции EcoRI и NcoI, объединяли и лигировали. Лигазную смесь трансформировали в компетентные клетки *Escherichia coli* DH5 α , отбирали трансформанты на среде LB (BD, США) с 50 мг/л канамицина и 100 мг/л ампициллина. Проверку наличия генетической конструкции в клонах трансформантов определяли при помощи ПЦР со специфичными праймерами на ген *blaKPC-2* и на вектор рET28b.

Таким образом, получен рекомбинантный штамм *E. coli* DH5 α рET28b-*blaKPC-2*, который будет использован в качестве позитивного контроля мишени в тест-системе для детекции генов семейства карбапенемаз KPC на основе CRISPR/Cas-технологии.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Создание капсулированной формы пробиотика: исследование антилистериозного потенциала некоторых видов антагонистически активных бактерий в опытах на мышах для включения в состав экспериментального препарата

Похиленко В.Д., Дунайцев И.А., Левчук В.П., Калмантаев Т.А., Чукина И.А., Клыкова М.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Бурмистров Е.А.

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

Условно-патогенные бактерии не становятся болезнетворными до тех пор, пока их количество сбалансировано содружественными бактериями. Поэтому их применение повышает биологическую активность нормальной микрофлоры кишечника, от состояния которой зависит наше здоровье и его восстановление после болезни. При этом важно, чтобы препарат содержал разнообразные штаммы пробиотиков с доказанной эффективностью, а сами бактерии были высокожизнеспособными и защищенными от губительного воздействия на них желудочного сока и пищеварительных ферментов. Одним из таких приемов защиты живых клеток является их капсулирование.

По результатам скрининга *in vitro* более 40 штаммов симбиотических бактерий на антагонистическую активность, скорость пролиферации, адгезивность, устойчивость к желчи, солям, кислотам, на обезвоживание и хранение наиболее перспективными оказались следующие: спорообразующие бациллы – *B. amyloliquefaciens* ЛВП-20 и *B. subtilis* ПСФ-19; энтерококки – *E. mundtii* 28 и *E. faecium* 33.22; молочнокислые бактерии – *Lactobacillus acidophilus* АЦФ, *Lb. brevis* 1063, *Lb. fermentum* 1293–7м, *Lb. rhamnosus* EGO, *Lb. paracasei* 1020, *Lb. pentosus* МНД, *Lb. plantarum* 1351, *Lb. sakei* ИС; пропионовокислые бактерии – *Propionibacterium freudenreichii* ПКБ21; псевдомонады – *Pseudomonas chlororaphis* Vsk-26a3. Все они хорошо переносили инкапсулирование в Са-альгинатные гранулы и оставались живыми на протяжении года как во влажном состоянии, так и после лиофилизации. Однако результаты чашечных опытов по отбору штаммов в состав капсулированного препарата не могут гарантировать положительные результаты на животных моделях. Поэтому опытные образцы Са-альгинатных гранул с указанными выше микроорганизмами были исследованы в эксперименте *in vivo* на мышах, зараженных возбудителем листериоза – штаммом *Listeria monocytogenes* ББ1.

При изучении лечебного эффекта гранулированных образцов использовались мыши линии С57В1, весом 20 ± 1 г. В течение 3 суток мыши получали с питьевой водой стрептомицина сульфат (5 г/л), затем за сутки до заражения тестовой культурой антибиотик отменяли. На 5-е сутки мышам вводили *L. monocytogenes* в дозе $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл интрагастралью. Лечение осуществляли внутривентральным введением по 0,5 мл каждого препарата через 3 ч после зараже-

ния и далее ежедневно на протяжении 3 дней. Контролем служили мыши без лечения препаратами.

По результатам эксперимента *in vivo* полный эрадикационный эффект на листерии дали препараты, содержащие *Lb. paracasei* и *Lb. pentosus*. Этот результат позволяет определиться с выбором перспективных штаммов для следующего этапа исследований по разработке и оценке капсулированной формы пробиотика.

Работы выполнены в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Оценка эффективности бактериоцина субтилозина при выращивании бройлеров

Похиленко В.Д., Чукина И.А., Калмантаев Т.А.

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

Высокая заболеваемость бактериальными инфекциями в сочетании со значительным увеличением частоты появления лекарственно-устойчивых патогенов подталкивает птицеводческую промышленность к использованию в своей практике новых антимикробных стратегий. Одной из них являются бактериоцины, bacteriocin-like-inhibitory substance (BLIS), биосурфактанты, органические кислоты и другие вещества, синтезируемые некоторыми видами симбиотических микроорганизмов.

Бактериоцин субтилозина П19, представляющий собой 3,4 кДа пептид, был получен нами из штамма *Bacillus subtilis* П19 природного происхождения. Синтез бактериоцина осуществлялся в условиях глубинного периодического культивирования штамма. Из культуральной жидкости бактериоцин выделяли методом осаждения на клетках продуцента. Препарат для испытаний представлял собой сухой порошок, содержащий грубый субтилозин с активностью 400 АЕ/мг.

Испытания эффективности опытного препарата бактериоцина проводили на площадке агрохолдинга ООО «Птицефабрика Акашевская» в Республике Марий-Эл. В эксперимент было взято 40 голов цыплят-бройлеров кросса Arbor Acres. Цыплят индивидуально взвешивали и рассаживали в две клетки по 20 голов в каждую (контрольная и опытная группы). Условия содержания и корм соответствовали нормативам кросса. Цыплятам опытной группы добавляли в корм бактериоцин с 1-го по 30-й день включительно. На 38-й день бройлеров взвешивали, забивали, вскрывали, отбирали пробы внутренних органов для исследований на патологию, биохимию и микробиологию. Из внутренних органов двух павших птиц контрольной группы выделили *Escherichia coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus* sp., *Pasteurella multocida*, *Aerococcus viridae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa*. В то же время в микрофлоре внутренних органов одной павшей птицы опытной группы отсутствовали такие грамположительные бактерии, как листерии и стрептококки, на которых субтилозин действует.

Итоги испытаний показали, что применение бактериоцина субтилозин П19 в виде премикса увеличивало прирост

живой массы цыплят в среднем на 5,4%, их сохранность – на 5% и улучшало биохимические показатели крови.

Работы выполнены в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Мультирезистентные штаммы бактерий в составе микробиоты ротоглотки детей в условиях стационара

Примаков Т.Д., Колобов Д.В., Эрдынеева Б.С.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», Чита, Российская Федерация

Проблема устойчивости микроорганизмов к антимикробным препаратам включена в перечень главных проблем здравоохранения (Всемирная организация здравоохранения, 2017 г.). В список устойчивых к действию антибиотиков «приоритетных патогенов», представляющих наибольшую угрозу для здоровья человека, входят энтеробактерии, имеющие β-лактамазы расширенного спектра и карбапенемазы; энтерококки, устойчивые к ванкомицину; стафилококки, устойчивые к метициллину и ванкомицину.

Цель работы. Оценить состав микробиоты и резистентность бактерий, выделенных из ротоглотки детей в условиях стационара.

Материалы и методы. В одном из стационаров г. Читы за 2022 г. выделены 3764 штамма, принадлежащих семейству *Enterobacteriaceae*, родам *Enterococcus* и *Staphylococcus*, с оценкой антибиотикочувствительности. Среди энтеробактерий оценивалась резистентность к полусинтетическим пенициллинам, цефалоспорином, карбапенемам, фторхинолонам, у энтерококков – к полусинтетическим пенициллинам, аминогликозидам, оксазолидонам, гликопептидам (ванкомицину), у стафилококков выявляли резистентность к пенициллинам, цефалоспорином, фторхинолонам, макролидам, ванкомицину.

Результаты. В составе микробиоты верхних дыхательных путей (ВПД) у детей представители нормофлоры составили 37,47%. Преобладала микрофлора желудочно-кишечного тракта (энтерококки и кишечная палочка) – 62,53%. Представители условно-патогенных микроорганизмов внешней среды встречались в 2,47%, грибы – в 4,56%. Среди выделенных микроорганизмов наиболее часто встречались представители семейств стафилококков (47,2%), энтеробактерий (50,6%) и стрептококков (23,9%). Учитывалось, что стафилококки и стрептококки относятся к обязательным микроорганизмам ротоглотки, их присутствие дополнялось нейссериями (6,8%) и коринебактериями (10,56%). Лактобактерии были обнаружены только у 1 ребенка. В числе патогенных микроорганизмов определены *Staphylococcus aureus* – 6,67% (251), *Streptococcus pyogenes* – 0,08% (3), *Pseudomonas aeruginosa* – 2,604% (98). Заселение ВДП измененной кишечной палочкой встречалось в 2,6 раза чаще, чем неизмененной ($p < 0,001$). Среди изолятов энтеробактерий обнаружена резистентность к полусинтетическим пенициллинам (90%), цефалоспорины продуцировали 37% штаммов. К карбапенемам выявлена устойчивость у 17% изолятов, доля резистентных штаммов к фторхиноло-

нам составила 27%. Среди энтерококков пенициллиназы обнаружены у 45% штаммов, резистентность к аминогликозидам – у 47%, к ванкомицину – у 25%, к оксазолидону устойчивость составила 19%. Стафилококки были резистентны к пенициллинам – 70%, цефалоспорином – 33%, ванкомицину – 8%, фторхинолонам – 22% культур.

Выводы. 1) Анализ микроорганизмов, выделенных в 2022 г. из ВДП у детей, прошедших курс лечения в условиях стационара, выявил преобладание дисбиотических изменений, когда микробиота ВДП заполняется представителями микрофлоры желудочно-кишечного тракта. 2) Резистентность микроорганизмов к антимикробным средствам отличалась высокой частотой встречаемости – $\geq 50\%$ к 10 антимикробным средствам из 18 исследованных, при этом 6 антибиотиков относятся к группе β -лактамов.

Оценка каталазной активности редких дрожжей кишечника человека

Прокопьев В.В.

ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России, Барнаул, Российская Федерация;
ООО КДЛ «Здоровье», Барнаул, Российская Федерация

В настоящее время отмечается рост количества работ, посвященных изучению микрофлоры различных биотопов человека. Причиной этого можно считать появление и широкую доступность таких исследовательских инструментов, как масс-спектрометрия и секвенирование нового поколения, позволивших с высокой точностью идентифицировать различных представителей микробиома. Несмотря на то, что большинство работ посвящено изучению бактериального компонента микробиома, увеличивается и количество исследований микромицетов.

Обнаружение в патологическом материале редких грибов ставит перед врачами клинических специальностей вопрос о роли найденных микроорганизмов в патогенезе того или иного заболевания. Для решения данной задачи необходима оценка факторов патогенности и возможных пробиотических свойств найденных микроорганизмов.

Каталазную активность можно косвенно отнести к факторам патогенности, т.к. данный фермент помогает микроорганизмам противостоять повреждающему действию перекиси водорода и оксидативному стрессу в целом.

В настоящей работе была исследована каталазная активность ряда редко встречающихся дрожжей кишечника человека.

В работе были исследованы аскомицетные дрожжи *Pichia fermentans* (3 штамма), *Pichia kluyveri* (1 штамм), *Pichia cactophila* (1 штамм), *Wickerhamiella pararugosa* (1 штамм), *Coniohaeta hoffmannii* (1 штамм), *Brettanomyces bruxellensis* (2 штамма). Все штаммы были получены при культуральном исследовании кала пациентов с патологией желудочно-кишечного тракта и из кала здоровых людей, проходящих плановый медицинский осмотр.

Идентификация дрожжей проводилась на основе их морфологических, биохимических и культуральных свойств.

Видовая принадлежность была подтверждена при помощи масс-спектрометра Microflex производителя Bruker Daltonik GmbH H&Co.

Для полуколичественной оценки каталазной активности в 72-часовую культуру на Сабуро-бульоне добавляли 1 мл свежеприготовленной смеси твина-80 с перекисью водорода и оставляли на 5 мин при комнатной температуре. Далее измеряли высоту столбика пены от уровня жидкости до верхнего края пены. Также была оценена термостабильность каталазы после 2 ч экспозиции при 68 °С.

Было обнаружено, что наиболее выраженной каталазной активностью обладают *P. fermentans*, *P. kluyveri*, *P. cactophila*, которые образовывали столбик от 45 до 100 мм. *B. bruxellensis* не проявлял каталазной активности. *W. pararugosa* и *C. hoffmannii* показывали высоту столбика 12 и 6 мм соответственно. Среди всех исследованных микромицетов только *W. pararugosa* обладал термостабильной каталазой.

Способность исследованных представителей рода *Pichia* к выраженной каталазной активности косвенно подтверждает высокий патогенный потенциал этих грибов, что находит отражение в описанных клинических случаях заболеваний, вызванных данными микроорганизмами.

Роль других исследованных микромицетов требует дальнейшего изучения.

Видовой состав колиформных бактерий, выделенных из пищевых продуктов и продовольственного сырья

Проскурнин Р.В., Самодед Т.Н., Гайдар Е.С., Гезима А.А.

ФБУЗ «ЦГиЭ в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе», Симферополь, Российская Федерация

Бактерии группы кишечной палочки (БГКП), или колиформные бактерии, являются санитарно-показательными микроорганизмами и указывают на вероятность присутствия в пробе патогенных бактерий. К появлению БГКП в пищевых продуктах и продовольственном сырье могут привести несоблюдение технологических параметров на этапах производства, а также нарушение правил гигиены при производстве и хранении.

Пищевое сырье может быть загрязнено колиформными бактериями из различных источников, включая воду, почву, воздух, фекальное загрязнение животного сырья. Дальнейшая переработка пищевого сырья сопровождается перекрестной контаминацией и попаданием возбудителей в готовые к употреблению продукты.

Цель исследований. Индикация БГКП в продовольственном сырье и пищевых продуктах с дальнейшей идентификацией до вида.

Материалы и методы. Объектом исследования являлись образцы пищевых продуктов и продовольственного сырья из сети розничной торговли, загрязненные колиформными бактериями. На протяжении 2022 г. и первого квартала 2023 г. при исследовании продовольственного сырья и пищевых продуктов колиформные бактерии обнаружены в 130 образцах: мясе и мясных продуктах (21); мясе птицы

(34); готовых кулинарных продуктах (70), кондитерских изделиях (5).

Исследования на наличие БГКП проводили в соответствии с ГОСТ 31747–12 «Продукты пищевые. Методы выявления и определения количества бактерий группы кишечных палочек». Для дальнейшей индикации и идентификации колиформных бактерий материал из подтверждающей среды (бриллиантовый зеленый лактозный желчный бульон) высевался на среду Эндо.

После изучения культурально-морфологических и биохимических свойств обнаруженных БКГП изолировано 169 штаммов микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*. Видовую принадлежность выделенных штаммов определяли с использованием наборов «ЭнтероТест-24» («Эрба», Чехия), предназначенных для биохимической идентификации *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных палочек.

Результаты. При видовой идентификации 169 штаммов колиформных бактерий изолированы 17 видов семейства *Enterobacteriaceae*: *Enterobacter cloacae* – 52 штамма, *Raoultella planticola* – 16, *Cedecea davisae* – 14, *Kluyvera cryocrescens* – 9, *Enterobacter asburiae* – 9, *Escherichia coli* – 9, *Citrobacter koseri* – 9, *Enterobacter aerogenes* и *Klebsiella pneumoniae* – по 8 штаммов, *Serratia fonticola*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens* – по 7 штаммов, *Serratia plymthica* – 5, *Serratia grimesii* – 5, *Citrobacter freundii* – 3, *Enterobacter amnigenus* – 2, *Citrobacter werkmanii* – 1.

Вывод. В процессе испытаний в образцах были идентифицированы микроорганизмы родов *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Raoultella*, *Cedecea*, *Kluyvera*. Из 169 штаммов, выделенных при идентификации БГКП, большая часть, а именно 69 штаммов, относилась к роду *Enterobacter*, что составило 40,8%; 24 (14,2%) – к роду *Serratia*, 16 (9,5%) – к роду *Raoultella*, 14 (8,2%) – к роду *Cedecea*, 9 (5,3%) – к роду *Kluyvera*, 9 (5,3%) – к роду *Escherichia*, 15 (8,8%) – к роду *Klebsiella*, 13 (7,6%) – к роду *Citrobacter*.

Таким образом, наиболее часто продовольственное сырье и пищевые продукты были контаминированы микроорганизмами рода *Enterobacter*.

Обращает на себя внимание, что большая часть образцов БГКП представлена одним видовым штаммом, однако порядка 19% образцов содержали более двух изолятов колиформных бактерий в одном образце и 4% были контаминированы 3 видами колиформных бактерий.

Обоснованность применения *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ-P-Turbo-GFP (b) в качестве индикатора кормления иксодовых клещей *in vitro*

Рамзаева Ю.С., Василенко Е.И., Коняева О.А., Мироненко Е.А., Волюнкина А.С.

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

Искусственное кормление клещей является важным инструментом для изучения механизма передачи патогенных агентов в отсутствие позвоночного хозяина.

Ранее нами проводились работы по проверке эффективности применения систем искусственного кормления с использованием силиконовых мембран и капиллярных трубочек. В качестве экстракта кормления использовали гепаринизированную кровь барана, в которую добавляли в качестве индикаторного микроорганизма *Escherichia coli* NebStable со встроенным плазмидным вектором P-Turbo-GFP (b).

Эшерихии не относятся к клещевым трансмиссивным инфекциям, при попадании в организм клеща они частично гибнут в результате воздействия на них бактерицидной активности гемолимфы. В итоге не у всех питавшихся клещей методами *in vitro* подтверждено попадание патогена внутрь.

Целью работы является получение штамма специфического возбудителя инфекционного заболевания, толерантного к биохимическим процессам в организме клещей семейства Ixodidae, пригодного для оценки эффективности процесса искусственного кормления клещей *in vitro*.

Туляремия является трансмиссивной инфекцией, в организме иксодовых клещей *Francisella tularensis* обладает рядом адаптационных свойств, способна образовывать капсулоподобное вещество, защищающее бактериальную клетку от неблагоприятного воздействия различных биологических жидкостей, химических веществ, фагоцитоза.

В качестве индикаторной культуры, используемой для оценки эффективности кормления иксодовых клещей в условиях *in vitro*, была получена трансформированная плазмидным вектором P-Turbo-GFP (b) культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Из суточной культуры *F. tularensis* 15 НИИЭГ готовили компетентные клетки. Суспензию трансформировали плазмидным вектором P-Turbo-GFP (b) на электропораторе Gene Pulser Xcell Electroporation system (BioRad). Затем суспензию бактерий вносили в питательную среду, инкубировали при 37 °С в течение 2 ч и высевали на чашки с FT-агаром, содержащим ампициллин (50 мкг/мл). Учет селекции плазмидосодержащих клонов проводили через 2–4 дня.

Контроль наличия участка GFP (b) в трансформатах проводили с помощью специфических праймеров. Амплифицировали целевой участок методом полимеразной цепной реакции на приборе C1000 Thermal Cycler (BioRad). Учет результатов проводили электрофоретически на основе специфичных праймеров к гену искомой плазмиды.

Полученная культура *F. tularensis* 15 НИИЭГ-P-Turbo-GFP (b) будет использована в качестве индикатора кормления иксодовых клещей в экспериментальных исследованиях по использованию систем искусственного кормления *in vitro*.

Детекция и типирование боррелий в клещах, снятых с людей

Решетняк Т.В.¹, Щит И.Ю.¹, Бикетов С.Ф.¹, Говорунов И.Г.¹, Козлова Т.В.²

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

²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Тульской области», Тула, Российская Федерация

Климатические и антропогенные факторы способствуют распространению клещей – переносчиков возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов (ИКБ) в европейской части России. В связи с этим актуальной задачей эпиднадзора является не только мониторинг численности и инфицированности клещей, но и определение видового состава возбудителей ИКБ, определяющих этиологию и эпидемиологию болезни Лайма.

Целью данной работы было обнаружение и идентификация патогенных боррелий в клещах, снятых с людей после их присасывания.

Клещей исследовали методом полимеразной цепной реакции в реальном времени с использованием праймеров и TaqMan-зонда, гомологичных фрагменту гена 23S rRNA *Borrelia burgdorferi* (Щит И.Ю., 2021).

В 2014–2016 гг. из Тульской области поступило для анализа 2017 клещей, наибольшее количество из Ефремовского (71%), Плавского (16%) и Суворовского (9%) районов. Инфицированность клещей боррелиями составляла 6–9%. Видовой состав возбудителей был следующим: *B. afzelii* – 45%, *B. garinii* – 34%, предположительно *B. japonica* – 1%, не удалось типировать – 20%.

В 2017–2022 гг. из г.о. Серпухов Московской области для анализа поступило 657 клещей (13% были заражены возбудителями клещевого боррелиоза). Видовой состав возбудителей: *B. afzelii* – 32%, *B. garinii* – 19%, *B. burgdorferi sensu stricto* – 7%, *B. valaisiana* – 2%, не удалось типировать – 39%.

Таким образом, определен видовой состав возбудителей иксодовых клещевых боррелиозов, циркулирующих в природных биотопах части районов Тульской и Московской областей.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Результаты изучения синергии меропенема и новых антибактериальных веществ в отношении *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii*

Рогачева Е.В., Краева Л.А.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация

В силу ряда известных причин с каждым годом в мире растет доля бактерий с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ). Статистика последних лет показыва-

ет устойчивую тенденцию: во многих регионах мира самыми опасными из оппортунистических патогенов становятся госпитальные штаммы *Klebsiella pneumoniae* и *Acinetobacter baumannii* с МЛУ. При инфекциях кровотока в течение месяца погибает 20% больных, а при нозокомиальных пневмониях летальность достигает 50%. Это приводит к вынужденной терапии пациентов максимальными дозами антимикробных препаратов, что влечет за собой ряд неблагоприятных последствий. Предлагаемый подход комбинированного действия антибактериальных препаратов может стать основой для новых решений в терапии опасных инфекционных заболеваний, особенно в снижении токсического действия препаратов на организм.

Цель исследования. Изучить способность ингибиторов β-карбоангидразы потенцировать действие известных антибактериальных препаратов при их совместном применении, а также уменьшению минимальной ингибирующей концентрации (МИК) основного антибиотика.

Материалы и методы. Уровень резистентности изолятов определяли методом серийных разведений с контрольным антибиотиком меропенемом методом серийных разведений в бульоне Мюллера–Хинтон с определением МИК в соответствии со стандартной операционной процедурой Европейского комитета по тестированию чувствительности к антимикробным препаратам (EUCAST). Измерение синергии антибиотика и синтезированного вещества PAZ-056 проводилось с помощью метода «шахматной доски». PAZ-056 исследовали в концентрациях 3; 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875 и 0,09 мкг/мл. Антибиотик исследовали в концентрациях 40; 20; 10; 5; 2,5 и 1,25 мкг/мл. В качестве контроля использовали ДМСО (для проверки стерильности растворителя), агар Мюллера–Хинтон и инокулюм с рН-индикатором в объеме 100 мкл. Эксперимент проводился в трех повторностях.

Результаты. Антибактериальный синергетический эффект в отношении *K. pneumoniae* был отмечен при следующих комбинациях: 1,5 мкг/мл меропенема и 0,75 мкг/мл PAZ-056, для *A. baumannii*: 0,75 мкг/мл и 1,5 мкг/мл соответственно. Полученные результаты указывают на открывающиеся перспективы использования комбинированных препаратов с пониженной, но эффективной концентрацией действующих веществ для борьбы с устойчивыми штаммами грамотрицательных бактерий.

Выводы. Явление синергизма между синтезированными соединениями и официальными антибиотиками с утраченной эффективностью позволяет конструировать комплексы с высокой антибактериальной активностью. Сочетанное использование препаратов позволяет добиваться бактерицидного эффекта при значительном снижении концентрации антибиотика и незначительном снижении концентрации соединений. Таким образом, можно сделать вывод о том, что использование комбинаций антибактериальных препаратов является перспективным направлением терапии инфекций, вызванных антибиотикоустойчивыми штаммами.

Получение рекомбинантных субъединиц рицина

Рогозин М.М., Марьин М.А., Хлынцева А.Е.,
Калмантаева О.В., Евтюхова А.Е., Карцева А.С.,
Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

Рициновый токсин (РТ) является потенциально опасным биологическим оружием в связи с его высокой токсичностью, доступностью и легкостью получения и хранения. Поэтому разработка эффективных тест-систем и специфических терапевтических препаратов, в частности моноклональных антител к РТ, является актуальным направлением. Создание подобных препаратов требует получения антигенов РТ, однако высокая токсичность РТ по отношению к эукариотическим клеткам не позволяет проводить иммунизацию животных для получения моноклональных антител. Перспективным подходом к получению антигенов РТ является создание рекомбинантных субъединиц А (РТА) и В (РТВ) рицина.

Цель исследования. Получить рекомбинантные РТА и РТВ в бактериальной системе экспрессии на основе *Escherichia coli* и вектора рЕТ 22b (+).

Материалы и методы. Последовательность, кодирующую РТА и РТВ, получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы ДНК, выделенную из листьев *Ricinus communis*. Модифицированные последовательности субъединиц несли сайты рестрикции NcoI (РТА) и HindIII (РТВ) на 5'-концевой части и стоп-кодон с сайтом рестрикции XhoI на 3'-концевой части. Последовательности РТА и РТВ клонировали в вектор рЕТ 22b (+) (Novagen). Штамм *E. coli* DH12S трансформировали методом электропорации, скрининг единичных колоний проводили методом ПЦР с последующим секвенированием. Экспрессию рекомбинантных белков проводили в *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS. Используя жидкую питательную среду 2xYT (с добавлением 0,5% глюкозы, 20 мкг/мл хлорамфеникола и 100 мкг/мл ампициллина) на орбитальном термостатируемом шейкере при 37 °С и 200 об./мин до достижения оптической плотности (OD₆₀₀) = 0,6–0,8 бактериальной взвеси, индукцию синтеза белка активировали добавлением изопропил-β-D-1-тиогаалактопиранозидом с последующим культивированием при 25 °С в течение 3 ч. Очистку рекомбинантных белков (РТА и РТВ) проводили методом аффинной хроматографии с использованием сорбента cOmpete His-Tag purification resin на системе АКТА Pure. Аминокислотные последовательности РТА и РТВ были проанализированы методом хромато-масс-спектрометрии на приборе OrbiTrap Elite (Thermo Scientific, Германия). Анализ масс-спектрометрических данных проводили с помощью коммерческой программы PeaksStudio 7.5.

Результаты. В результате проведенной работы были получены плазмиды, несущие кодирующие последовательности рЕТ 22b_РТА и рЕТ 22b_РТВ. Целостность рамки считывания и соответствие нуклеотидной последовательности полученных плазмид были подтверждены секвенированием. Электрофоретическое разделение белков в полиакрила-

мидном геле показало, что РТА (30 кДа) и РТВ (32 кДа) соответствуют своей молекулярной массе. Масс-спектрометрический анализ пептидов выявил высокую идентичность РТА и РТВ, которая составила 90 и 77% соответственно. Выход белка составил: РТА – 25 мг/л; РТВ – 15 мг/л.

Выводы. Полученные РТА и РТВ могут быть использованы для разработки моноклональных антител, специфичных к субъединицам РТ, и диагностических тест-систем.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Динамика изменения белкового спектра *Brucella abortus* при культивировании *in vitro*

Родионов И.С., Лукашевич Д.Е., Котенева Е.А.,
Пономаренко Д.Г.

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

Ряд исследований показывают, что длительное культивирование штаммов бруцелл на питательных средах может приводить к изменению их метаболизма и аттенуации. Снижение степени вирулентности связано с утратой некоторых патогенных свойств, таких как способность незаметно проникать в клетки хозяина и выживать внутри фагоцитов.

Цель исследований. Провести сравнительный анализ экспрессии белковых молекул у культуры *Brucella abortus* C-689, выделенной из пробы патологического материала и культивированной *in vitro* на питательной среде путем пассажей, с помощью автоматической системы электрофореза Experion.

Материалы и методы. Последовательные пересевы штамма *B. abortus* C-689 проводились на триптон-соевый агар каждые 48 ч, экстракцию тотального протеома клеток бруцелл проводили через каждые 5 пассажей. Для исследования использовали 7 образцов штамма *B. abortus* C-689 (1, 5, 10, 15, 20, 25 и 30 пересевов). Каждый из этих образцов был суспендирован в буфере для экстракции тотального протеома с 8М мочевиной / 2М тиомочевинной, а также в буфере с 6М гуанидина тиоцианатом. Далее образцы были очищены хлороформ-метанольным способом очистки белка и растворены в буфере (4,5М мочевины, 2М тиомочевина, 100мМ DTT, 0,4% Triton X-100). Далее образцы были обработаны в соответствии с протоколом для чипов Experion Pro260 Chips (BioRad) и помещены в автоматизированную систему электрофореза Experion.

При определении общей концентрации белка в пассажах мы видим приблизительно одинаковую концентрацию во всех пассажах, кроме 25-го, что можно объяснить одинаковым забором образца для исследования. После электрофореза образцов в буфере с мочевиной/тиомочевинной и гуанидином наблюдалась похожая картина распределения белков в соответствии с их молекулярной массой. На электрофореграмме видно нарастание низкомолекулярных белков с молекулярной массой ±10 кДа, что возможно, связано с адаптацией штамма к благоприятным условиям питатель-

ной среды. Похожий вывод можно сделать и о концентрациях белков выше 30 кДа: концентрация белка постепенно увеличивается с 1-го по 25-й пассаж, в 25-м пассаже резко падает и начинает расти уже в 30-м пассаже. Предварительно можно предположить, что в 25-м пассаже происходит адаптация штамма *B. abortus* C-689 к культивированию на искусственных питательных средах, это предположение подкрепляется электрофореграммой, на которой видно, что в 25-м пассаже происходит качественное изменение спектров как высоко-, так и низкомолекулярных белков.

Дальнейшие исследования будут проводиться с помощью метода тандемной масс-спектрометрии для идентификации экспрессированных белков.

Использование метода ELISpot-анализа для количественного определения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к субъединице А шигатоксина *Escherichia coli* 2-го типа

Романенко Я.О., Иващенко Т.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Шкуратова М.А., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

ELISpot-анализ является высокочувствительной модификацией метода иммуноферментного анализа (ИФА), позволяющей определять число клеток, секретирующих определенный тип цитокина или иммуноглобулина на уровне единичной клетки. Ранее нами была получена человеческая гибридома E9D4, продуцирующая моноклональные антитела к субъединице А шигатоксина *Escherichia coli* 2-го типа.

Цель исследования. Определить количество антителопродуцирующих гибридом методом ELISpot-анализа.

Материалы и методы. В качестве исследуемого образца служила гибридома E9D4, специфичная к субъединице А шигатоксина 2-го типа. Постановка анализа проводилась в двух повторах. Стерильный 96-луночный планшет с гидрофильной мембраной подготавливали за 18 ч до начала эксперимента. Для этого наносили на мембрану планшета антиген субъединицы А шигатоксина 2-го типа в количестве 1 мкг на лунку и инкубировали 18 ч. По завершению инкубации планшет промывали 2 раза стерильным PBS-0,05% с добавлением Tween-20. Далее в планшет вносили культуральную среду Hybri-Care (ATCC® 46-X™) без добавления FBS, содержащую клетки гибридом E9D4 в концентрациях $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10$ клеток/мл, инкубировали при температуре 37 °C, 5% CO₂ и влажности 80% в течение 24 ч. По завершению инкубации планшет отмывали 2 раза стерильным PBS-0,05% с добавлением Tween-20 по 200 мкл на лунку. Затем добавляли конъюгированные с биотином антитела против человеческого IgG и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшет тщательно отмывали 2 раза стерильным PBS-0,05% с добавлением Tween-20 по 200 мкл на лунку. Далее в лунки планшета добавляли по 80 мкл Tertairy Solution и инкубировали при комнатной

температуре еще 1 ч. По окончании инкубации планшет отмывали 3 раза стерильным PBS-0,05% с добавлением Tween-20 по 200 мкл на лунку и 1 раз дистиллированной водой, а затем в планшет вносили по 80 мкл на лунку проявляющего буфера Blue Developer Solution и инкубировали 15–20 мин до образования пятен. Реакцию останавливали добавлением дистиллированной воды и оставляли до полного высыхания. Визуализацию и подсчет пятен проводили с использованием анализатора ImmunoSpot серии 6 Cellular Technology и программным обеспечением ImmunoSpot 7.0 (Cellular Technology Analyzers, Shaker Heights, OH).

Результаты исследования. Нами было показано, что гибридома E9D4 в максимальной концентрации $1 \cdot 10^5$ клеток на лунку к А субъединице шигатоксина 2-го типа образовала 666 пятнообразующих единиц. В минимальной концентрации гибридома E9D4 $1 \cdot 10^2$ клеток на лунку к А-субъединице шигатоксина 2-го типа образовала 126 пятнообразующих единиц. Таким образом, можно сделать вывод, что гибридома E9D4 обладает способностью синтезировать моноклональные антитела к субъединице А шигатоксина 2-го типа.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Комбинации моноклональных антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, ингибирующие взаимодействие с ACE2-рецептором

Романенко Я.О., Иващенко Т.А., Марьин М.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

С начала пандемии COVID-19 в декабре 2019 г. до окончания пандемии в мае 2023 г. геном SARS-CoV-2 претерпел множество мутаций. Появление новых вариантов вируса SARS-CoV-2 привело к многочисленным волнам, способствуя сохранению на сегодняшний день числа госпитализаций. Большинство геномных мутаций сосредоточены в S-белке, который состоит из двух субъединиц: аминоконцевой субъединицы S1, на которой находится рецептор-связывающий домен (RBD), и мембраносвязывающей субъединицы S2. RBD является главной мишенью для создания вакцин и получения лекарственных препаратов на основе моноклональных антител (МКА). Поскольку SARS-CoV-2 представляет собой РНК-содержащий вирус с высокой частотой мутаций, ожидается, что использование коктейлей антител станет важной стратегией эффективного лечения COVID-19. Группой авторов была получена панель мышиных моноклональных антител (мМКА): 5C3, 1E6, 3F11 и человеческих моноклональных антител (чМКА) C6D7-RBD, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2.

Цель исследования. Определить способность комбинации мМКА 5C3, 1E6, 3F11 с чМКА C6D7-RBD оказывать ингибирующее влияние на взаимодействие белка ACE2 с белком RBD.

Материалы и методы. Оценку нейтрализующей активности проводили в тесте, демонстрирующем блокировку антителом взаимодействия белка RBD с белком ACE2. Рекомбинантный белок RBD иммобилизовали в лунки 96-луночного планшета в концентрации 1 мкг/лунку. Свободные валентности пластика блокировали 1%-м раствором BSA. Затем в лунки вносили по отдельности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 в концентрациях от 100 до 0,78125 мкг/мл. Далее каждое из мМКА комбинировали с уже исследованным чМКА С6D7-RBD (в концентрации 10 мкг/мл ингибирующая активность составляла 97%). Комбинации МКА 5С3 + С6D7-RBD, 1Е6 + С6D7-RBD и 3F11 + С6D7-RBD смешивали в соотношении 1:1 по 10 мкг/мл и титровали с двукратным серийным шагом разведения. Далее в лунки добавляли раствор рекомбинантного белка человеческого ACE2, конъюгированного с пероксидазой хрена. После каждого внесения нового образца планшет инкубировали при температуре 37 °С в течение 1 ч. После инкубации планшет отмывали трижды ФСБ-Tween-20. Далее в лунки вносили по 100 мкл проявочного раствора на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина. Реакцию оценивали по интенсивности окрашивания раствора в синий цвет на планшетном спектрофотометре (BioRad xMark) при длине волны 655 нм.

Результаты исследования. Установлено, что по отдельности мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 в максимальной концентрации 100 мкг/мл ингибируют взаимодействие белка ACE2 с белком RBD на 91, 62 и 73%. В минимальной концентрации 0,7 мкг/мл ингибирующая активность составила 0, 10 и 14%. Комбинации мМКА 5С3, 1Е6, 3F11 с чМКА С6D7-RBD показали увеличение эффективности ингибирования белка ACE2 с белком RBD. Нейтрализующая активность в концентрации 10 мкг/мл составила 98, 80 и 74%, в концентрации 0,004 мкг/мл – 60, 50, 36% соответственно.

Вывод. Полученная панель мМКА 5С3, 1Е6 и 3F11 обладает ингибирующей активностью и может быть использована для конструирования химерных МКА.

Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 3.1.3.

Непрерывное медицинское образование в подготовке медицинского микробиолога

Романов В.А., Малафеева Э.В.

ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация

Непрерывное медицинское образование (НМО) – современная форма образования медицинских работников, призванная решить проблему повышения качества оказания медицинской помощи населению страны. НМО, являясь современным дополнительным профессиональным образованием, осуществляется в соответствии с Федеральным законом №273-ФЗ от 29.12.2012 «Об образовании в Российской Федерации».

В работе проанализирован десятилетний опыт проведения циклов НМО на кафедре микробиологии с вирусологией и иммунологией ЯГМУ для медицинских микробиологов.

Обучение на циклах НМО проводится ежегодно в течение 5 лет, в связи с этим на кафедре разработан ряд программ по актуальным вопросам бактериологии и микробиологии с ежегодным обновлением тематики. Особое значение и высокую востребованность имеют циклы по актуальным темам микробиологии: молекулярно-генетический метод диагностики инфекций; питательные среды, их применение в бактериологии; антибиотикорезистентность в практике бактериолога; современные методы идентификации микроорганизмов; вакцины и методы профилактики инфекций; работы с биологическими агентами I–IV групп патогенности. Изучение современных направлений медицинской микробиологии позволяет специалистам совершенствовать имеющиеся знания и получать новые компетенции, необходимые для профессиональной деятельности. Положительной стороной работы циклов НМО является интеграция в образовательный процесс информационных, телекоммуникационных, дистанционных технологий, что позволяет специалистам, вне зависимости от места проживания, полноценно использовать лекционный материал по актуальным темам микробиологии. Медицинские микробиологи могут приобретать новые знания в удобное для них время, при этом минимально страдает их рабочий график и можно самостоятельно выбрать занятия по интересующим темам. Прохождение циклов в рамках НМО заканчивается компьютерным тестированием, основанным на использовании контрольно-оценочных средств (тестов, микробиологических кейсов) и специальных программ, позволяющих с высокой объективностью оценить знаний врачей по выбранным темам. В то же время дистанционное обучение отличается использованием современных мультимедийных технологий обучения, что требует от специалистов достаточной компьютерной грамотности. Наряду с этим на циклах НМО приобретаются не только теоретические знания, но и новые умения и навыки, что трудно сделать при дистанционном обучении. В системе НМО необходимо добиться сочетания различных методических подходов в освоении профессиональных компетенций. Целесообразно сочетать непосредственное («контактное») обучение на кафедре (практические занятия, семинары и обсуждения) с дистанционным обучением (электронные лекции, вебинары). Обучение на циклах НМО способствует приобретению новых современных знаний и повышению квалификации медицинских микробиологов, что в конечном итоге обеспечивает эффективную борьбу с инфекционной патологией человека.

Оценка чувствительности к антибиотикам штаммов бактерий *Escherichia coli* в условиях электромагнитного излучения радиочастотного диапазона Wi-Fi

Рыбалко С.Ю., Постникова О.Н., Малыгина В.Ю.

Медицинская академия им. С.И.Георгиевского ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И.Вернадского», Симферополь, Российская Федерация

Устойчивость патогенных микроорганизмов к антибиотикам является сегодня одной из наиболее серьезных угроз для здоровья человечества и продовольственной безопасности, а широкое распространение устройств с использованием электромагнитного излучения (ЭМИ) роутера Wi-Fi, в сочетании с неопределенностями в оценке опасности для здоровья человека по существу представляет собой небывалый по размаху эксперимент, который человечество проводит на себе.

Целью работы являлось изучение влияния ЭМИ Wi-Fi на чувствительность к антибиотикам бактерий *Escherichia coli*. Для достижения поставленной цели была оценена антибиотикочувствительность штаммов *E. coli* в отношении разных групп антибиотиков и ее изменение в условиях действия ЭМИ диапазона Wi-Fi. В качестве материала исследования были выбраны три штамма кишечной палочки: референтный штамм *E. coli* ATCC25922, уropатогенный (УП) штамм и УП-штамм, обладающий гемолитической активностью (УПГА). Резистентность бактерий определяли в отношении антибиотиков с бактерицидным характером действия и бактериостатиков. Антибиотикочувствительность *E. coli* определяли диско-диффузионным методом и методом серийных разведений, позволяющим оценить минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) с помощью микропланшетного спектрофотометра. Воздействие электромагнитным излучением осуществляли непосредственно в термостате в течение 24 ч культивирования бактерий с антибиотиками при помощи роутера с частотой 2,5 ГГц.

Были получены следующие результаты: амоксициклав показал достоверное увеличение зоны ингибирования роста в опытной группе по сравнению с контролем для штаммов *E. coli* ATCC25922 и УП, для штамма УПГА достоверной разницы не выявлено. Офлоксацин показал достоверное уменьшение зоны подавления роста для опытной (облученной) группы УП штамма, а цефотаксим – достоверное увеличение зоны ингибирования роста для опытной группы для штамма ATCC25922; для штаммов УП и УПГА достоверного различия между опытной и контрольной группой обнаружено не было. Для оценки МИК были выбраны антибиотики, показавшие свою лабильность при действии ЭМИ Wi-Fi, – амоксициклав, офлоксацин и цефотаксим. В результате эксперимента было установлено достоверное снижение МИК антибиотиков цефотаксима (штамм ATCC25922) и амоксициклава (штаммы ATCC25922 и УП) в опытных группах. Повышение МИК было выявлено для офлоксацина в опытных группах. Таким образом, изменение эффективности данных антибиотиков при действии ЭМИ Wi-Fi носило разнонаправленный характер: амоксициклав и цефотаксим увеличи-

вали эффективность действия на бактерии в опытных группах, а офлоксацин уменьшал, что, возможно, определяется различными мишенями и механизмом действия данных антибиотиков.

Источник финансирования – грант РФФ 23–15–20014.

Система тестов для упрощенной дифференцировки стафилококков

Рябинин И.А.

ФГБОУ ВО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Российская Федерация

Идентификация стафилококков с использованием традиционных приемов отличается рядом сложностей, обусловленных значительным видовым составом рода *Staphylococcus*, а также слабыми дифференцирующими свойствами некоторых биохимических тестов. В частности, при ображивании многих широко доступных сахаров большая часть представителей рода может быть положительной (фруктоза), отрицательной (ксилоза, арабиноза) либо часто присутствуют вариации признака внутри одного вида (лактоза). В связи с этими обстоятельствами остается актуальной разработка подхода к дифференцировке *Staphylococcus* spp. путем постановки ограниченного набора тестов с однозначной трактовкой результата для наиболее частых и значимых видов.

Цель исследования – предложить набор фенотипических тестов для дифференцировки *Staphylococcus* spp. на основе реального разнообразия этих микроорганизмов в диагностической практике по данным масс-спектрометрического исследования.

Выполнен анализ банка MALDI-масс-спектров микроорганизмов, собранного в ходе видовой идентификации клинических изолятов бактерий и микроскопических грибов за 5-летний период. Из 64 признанных представителей рода *Staphylococcus* и выделенного из него в 2020 г. рода *Mammaliococcus* обнаружены штаммы 30 видов. Наиболее частыми видами стафилококков оказались *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. capitis*, *S. hominis* и *S. warneri*. Штаммы *S. lugdunensis* оказались немногочисленными, но этот представитель включен в круг дифференцируемых видов по причине высокой вирулентности среди других коагулазонегативных стафилококков. Из редких видов в систему идентификации включили *S. auricularis*, *Mammaliococcus* (*S.*) *sciuri* и *S. saprophyticus*. Для выявления *S. aureus* предлагается использовать традиционные тесты – определение свободной плазмокоагулазы, лецитиназы, продукции пигмента, анаэробное ображивание маннита; для идентификации коагулазонегативных видов – гемолиз, чувствительность к новобицину, щелочная фосфатаза, «фактор слипания» (фиксированная коагулаза), уреазы, ображивание маннозы, способность к росту при 10% NaCl. Для более надежного различения *S. warneri* и *S. hominis* система может быть дополнена β-глюкозидазным тестом.

Предложенная система тестов будет полезна в микробиологических лабораториях, которые еще не оснащены MALDI-

TOF-масс-спектрометрами или автоматическими анализаторами биохимических свойств микроорганизмов.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ №16–54–53109.

Клинический анализ крови как диагностический навигатор оценки тяжести COVID-19

Санькова М.В., Полуэктова В.Б.

ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Российская Федерация

Даже после официального окончания пандемии COVID-19 возбудитель инфекции продолжает циркулировать среди населения и вызывать тяжелые формы этого заболевания. Успешное лечение осложненного течения COVID-19 во многом зависит от ранней правильной оценки состояния пациентов и коррекции проводимой у них терапии. Особым диагностическим навигатором для принятия верного стратегического решения может служить клинический анализ крови, который является наиболее доступным базовым лабораторным тестом в клинической практике.

Цель исследования. Изучить предиктивные возможности клинического анализа крови при COVID-19 для экспресс-оценки тяжести состояния пациентов.

Материал и методы. На базе НИИ СП им. Н.В.Склифосовского проведено обследование 122 пациентов с подтвержденным диагнозом «COVID-19, тяжелое течение», поступивших на 6–8-й день заболевания. В зависимости от исхода заболевания сформированы две сопоставимые по полу группы сравнения (группа 1 – выжившие, группа 2 – умершие). Оценивались количественные и качественные показатели клинического анализа крови. Исследование соответствовало принципам Хельсинкской декларации.

Результаты. Для полноценного понимания патогенетических механизмов и прогнозирования рисков течения COVID-19 необходима комплексная оценка всех показателей клинического анализа крови. Тяжелое течение COVID-19 на 2-й неделе заболевания характеризуется наличием выраженной лимфопении и повышенной скорости оседания эритроцитов. Риск летального исхода существенно возрастает при сочетании лимфопении $<0,74$ тыс./мкл с нейтрофилиозом и повышением нейтрофильно-лимфоцитарного соотношения $>6,24$, ассоциированном с площадью повреждения легочной ткани и присоединением вторичной бактериальной инфекции. Ухудшение состояния пациентов с COVID-19 отмечается при развитии цитопенического синдрома, возникающего вследствие как прямого повреждения клеток вирусом SARS-CoV-2 и его токсического воздействия, так и гиперпродукции цитокинов и нарастающей в процессе заболевания гипоксии. Возникновение анемии и снижения количества моноцитов и эозинофилов приводит к супрессии адаптивного иммунитета и усугублению гипоксии органов, что существенно ухудшает прогноз заболевания. Значимый фактор, влияющий на исход COVID-19 – присоединяющаяся тромбо-

цитопения, которая является результатом не только угнетения образования тромбоцитов, но и в большей степени аномальной коагулопатии, имеющей место при осложненном течении заболевания. Патология системы свертывания крови в сочетании с системным васкулитом становится основным фактором, предопределяющим развитие полиорганной недостаточности и высокий риск летального исхода.

Заключение. Установленные слагаемые неблагоприятного исхода COVID-19 позволят рано выявлять пациентов с тяжелым и прогностически неблагоприятным течением заболевания и своевременно определять оптимальную тактику их лечения.

Диспротеинемия при остром бруцеллезе

Саркисян Н.С.

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

Исследования белковых фракций сыворотки крови – один из наиболее распространенных биохимических анализов, позволяющих получить более полную картину клинико-физиологического состояния организма. При многих заболеваниях наблюдается изменение соотношения белковых фракций (диспротеинемия) при нормальном содержании общего белка.

Целью исследования было изучение белкового профиля сыворотки крови у больных острым бруцеллезом.

Материалы и методы. Исследовали клинический материал (сыворотка крови) от 65 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом «острый бруцеллез», поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза ГБУЗ СК «Городская клиническая больница №2» г. Ставрополя и Республиканский центр инфекционных болезней, профилактики и борьбы со СПИДом им. С.М.Магомедова, Республика Дагестан. В контрольную группу включены 32 человека, не болевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции. Все больные острым бруцеллезом имели среднюю степень тяжести течения болезни в фазе компенсации. Все обследуемые дали информированное добровольное согласие на участие в настоящих исследованиях.

Провели анализ концентрации общего белка на биохимическом анализаторе Cobas c311; фракционный состав белков сыворотки крови с использованием системы для электрофореза (SAS-1+ SAS-2). Анализ полученных протеинограмм проводили с применением программного обеспечения Platinum 6.1.111. Для статистического анализа использовали *t*-критерий Стьюдента, уровень достоверности принимали равным при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Показатели α -1- и α -2-фракции глобулинов в сыворотке крови больных превышали показатели в группе контроля ($4,3 \pm 0,24\%$, $9,73 \pm 0,49\%$), составляя $7,04 \pm 0,23\%$, $10,93 \pm 0,38\%$ ($p < 0,05$). Увеличение α -глобулинов при бруцеллезной инфекции можно связать с наличием различной степени экссудативно-воспалительного процесса, вызывающего увеличение содержания в крови гаптоглобина, мигрирующего при электрофорезе

вместе с α -глобулинами. Наблюдалось также снижение концентрации общего белка в крови до 51,7 г/л (63,7–75,8 г/л), альбумина до 39,7 г/л (45,8–55,6 г/л) и повышение в крови относительного количества глобулинов в среднем до 20,8% (11,7–28,6%) в основном за счет α - и γ -глобулиновых фракций. Количество β -глобулинов было в пределах нормы (8–15%). Повышение γ -глобулиновой фракции и появление М-пика в γ -зоне у больных острым бруцеллезом связано с иммуновоспалительными реакциями, активацией антителогенеза и концентрацией их в сыворотке крови.

Заключение. У больных бруцеллезом со средней степенью тяжести течения на фоне общей интоксикации (у 81,5% больных температурная реакция достигала фебрильных цифр – 38–39 °С) наблюдается диспротеинемия: отмечалось повышение в крови уровня глобулинов, в основном за счет α - и γ -глобулиновых фракций, умеренное снижение концентрации общего белка в крови, гипоальбуминемия, снижение альбумино-глобулинового коэффициента.

Изучение плазмидных типов *Salmonella Enteritidis* в Приморском крае в 2022 г.

Сафина И.Н., Запорожец Т.С., Показеева Ю.Н., Яковлев А.А., Щелканов М.Ю.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

Во многих странах мира, многих федеральных округах нашей страны, в т.ч. и в Приморском крае, ведущее значение в формировании заболеваемости сальмонеллезом имеет *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Enteritidis*. Формирование заболеваемости населения связано с употреблением в пищу зараженных *S. Enteritidis* яиц, мяса бройлеров и других продуктов, содержащих в качестве отдельных компонентов продукты птицеводства.

В исследовании использованы 84 штамма *S. Enteritidis*, выделенные в 2022 г. в Приморском крае от больных людей при спорадической заболеваемости, из продуктов питания и внешней среды.

При изоляции, серотипировании и определении плазмидов изучаемых штаммов установлено, что популяция *S. Enteritidis*, циркулировавшая в Приморском крае в 2022 г., была гетерогенной по плазмидным характеристикам. Спорадическая заболеваемость населения этиологически связана с 7 основными штаммами с плазмидными типами (38:2,3 MDa, 38 MDa, 38:1,4 MDa, 38:26 MDa, 38:30 MDa, 50:38 MDa) и бесплазмидными, среди которых дифференцированы 3 доминирующих плазмидовара: 38 MDa, 38:1,4 MDa, 50:38 MDa. Также выявлено 16 штаммов с редко встречающимися или ранее не встречавшимися плазмидными типами: 38:4,4:3:1:2,3 MDa, 60:38:30:4,4 MDa, 2,6:2,0 MDa, 70:50:38 MDa, 30:1,4 MDa, 38:4,4 MDa, 3,8:3,0:2,6:1,8 MDa, 38:30:1,4 MDa, 38:20 MDa, 38:3,0:1,4 MDa, 38:18 MDa, 50:38:1,4 MDa, 3,8 MDa, 60:40:38:2,2:1,4 MDa, 39:20 MDa, 39:30:20 MDa.

При установлении антибиотикочувствительности выявлено, что изучаемые штаммы *S. Enteritidis* проявляют устойчи-

вость к налидиксовой кислоте (хинолоны), тетрациклину и левомицитину. В то же время большинство исследуемых плазмидоваров остаются высокочувствительными к ципрофлоксацину и имипенему, из чего можно сделать вывод, что популяция *S. Enteritidis*, независимо от плазмидного типа, представляет собой однородную группу по антибиотикочувствительности в Приморском крае.

Все выделенные и изученные штаммы *S. Enteritidis* хранятся в коллекции лаборатории кишечных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова, г. Владивосток, и в дальнейшей работе будут секвенированы.

Работа выполнена в рамках Государственного задания ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора, г. Владивосток, «Мониторинг сальмонеллезной инфекции на Дальнем Востоке» [Номер государственного учета НИР 1230306000019–1].

Молекулярно-генетические маркеры возбудителя в диагностике *Helicobacter pylori*-инфекции

Сварваль А.В., Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Кафтырева Л.А.

ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Развитие и степень тяжести поражений у инфицированных *Helicobacter pylori* лиц зависят от таких факторов, как вирулентность штаммов, восприимчивость организма-хозяина, а также от факторов окружающей среды. Описан ряд генов (*cagA*, *iceA*, *vacA* (s-, m-, i-регионы), *babA2*), экспрессия которых приводит к морфологическим изменениям эпителиальных клеток, стимулируя развитие различных патологических процессов.

Целью нашего исследования явилось изучение полиморфизма молекулярно-генетических маркеров возбудителя в диагностике *H. pylori*-инфекции.

Материалы и методы. Изучены 53 штамма *H. pylori*, выделенные от 34 взрослых пациентов с хроническим гастритом (ХГ) и 19 пациентов с язвенным поражением двенадцатиперстной кишки (ЯДК). Бактериологическому исследованию подлежали биоптаты слизистой оболочки желудка. Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «Хеликопол II» (НПФ «Литех», Москва). Амплификацию осуществляли в термоциклере Bio-Rad C1000 Thermal Cycler (США). Статистический анализ проводили с использованием ресурса «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>).

Результаты. Ген *cagA* был обнаружен в 64% клинических изолятах. Анализ распределения *cagA*-позитивных штаммов *H. pylori* не выявил статистически значимых различий между группами пациентов с ХГ (55,8%) и ЯДК (78,9%). Гены *iceA* и *vacA* в различных аллельных вариантах выявлены у всех штаммов *H. pylori*. Генотип *vacA* s1 доминировал у штаммов, выделенных от больных ЯДК – 94,7 против 70,6% при ХГ ($p < 0,05$). Доля штаммов *H. pylori* генотипа s1/m2 у пациен-

тов с ЯДК (52,6%) значимо превышала таковую у пациентов с ХГ (20,6%). Генотип *vacA s2/m2 H. pylori* встречался преимущественно у больных ХГ ($p = 0,04$). Все *cagA*-позитивные штаммы являлись носителями аллеля *vacAs1*, тогда как ни один штамм аллеля *s2 cagA*-позитивным не был. Доля штаммов генотипа *cagA+/vacAs1 H. pylori* у больных ЯДК составляла 78,9% (15 из 19) против 55,9% (19 из 34) у больных ХГ ($p = 0,09$). Подавляющее большинство штаммов (10 из 11) генотипа *cagA-/vacAs2* выделены от больных ХГ. Несмотря на то, что генотип *iceA1* штаммов *H. pylori* преобладал у пациентов с ЯДК (47,4%), а генотип *iceA2* – у пациентов с ХГ (47,1%), статистически значимой разницы между группами не выявлено. Ген *babA2* был выявлен у 92,5% штаммов *H. pylori*. Суммарные результаты генотипирования по четырем детерминантам вирулентности (*cagA*, *iceA*, *vacA* и *babA2*) выявили 17 вариантов профилей (комбинированных генотипов) у 53 штаммов *H. pylori*. Среди всех комбинированных генотипов преобладали варианты *cagA+/iceA2/vacAs1m1/babA2+* и *cagA+/iceA1/vacAs1m1/babA2+*, которые объединяли по 8 (15%) штаммов соответственно.

Выводы. Анализ генетического полиморфизма клинических штаммов *H. pylori* выявил неоднородность популяции возбудителя хеликобактериоза в Санкт-Петербурге. Показано, что частота встречаемости генов *cagA*, *iceA*, *babA2* и *vacA*, а также их комбинированных генотипов различается у штаммов *H. pylori*, выделенных у больных ХГ и ЯДК.

Работа выполнена в соответствии с отраслевой научно-исследовательской программой Роспотребнадзора в рамках НИР «Динамический мониторинг превалентности и анализ полиморфизма молекулярно-генетических маркеров H. pylori-инфекции в диагностике и эпидемиологических исследованиях хеликобактериоза».

Получение рекомбинантного штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3) /pET-eae Rv, продуцента гибридного белка EaeRv

Светоч Т.Э., Панферцев Е.А., Копылов П.Х., Карцев Н.Н.

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

Шигатоксин-продуцирующие штаммы *Escherichia coli* (STEC) вызывают пищевые инфекции, широко распространены во всем мире, смертность от них достигает 5–15%. Официально зарегистрированных вакцинных препаратов против STEC-инфекции человека в настоящее время нет. Поэтому очевидна актуальность научных разработок в этом направлении.

Целью нашей работы было получение рекомбинантного штамма – продуцента гибридного белка EaeRv, предполагаемого кандидата в компоненты субъединичной вакцины.

Среди многочисленных антигенов вирулентности STEC наиболее значимыми являются шигатоксины I и II типов и интимин. Интимин, кодируемый геном *eaeA*, обеспечивает адгезию бактерий к клеткам кишечника. Для повышения иммуногенных свойств интимина мы сконструировали гибридный

белок, содержащий на C-концевом домене липопротеин Rv0934 *Micobacterium tuberculosis*, обладающий протективными и адьювантными свойствами. Для клонирования последовательности части гена *eaeA* (1170 п.о) и *rv* (*pstS1*-periplasmic phosphate-binding lipoprotein, 1125 п.о) в составе экспрессирующего вектора pET32b (+) (Novagen) был осуществлен дизайн праймеров, содержащих сайты для эндонуклеаз рестрикции NdeI, HindIII и XhoI. Амплифицированные последовательности клонировали в экспрессирующем векторе pET32b (+) под T7-промотором таким образом, чтобы получить рекомбинантный белок с полигистидиновой концевой последовательностью, необходимой для иммунодетекции и последующей очистки белка методом аффинной хроматографии.

После аналитической индукции лизаты всех клонов, выбранных для электрофоретического анализа в ДСН-ПААГ, содержали белок с предполагаемой молекулярной массой 78 кДа. Анализ субклеточных фракций показал, что рекомбинантный белок содержался главным образом в виде нерастворимых телец включения. В настоящее время проводится выделение белка в препаративных количествах методом аффинной хроматографии.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Системный и интестинальный иммунный ответ у мышей BALB/c на комбинированный детоксицированный эшерихиозный липополисахарид

Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Перескокова Е.С., Комбарова Т.И., Коробова О.В., Борзилов А.И.

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

Разработка эффективных и безопасных препаратов, предназначенных для профилактики кишечных инфекций у человека и животных, остается одной из актуальных проблем медицины и ветеринарии. Поэтому в последние десятилетия исследователи России, США, Евросоюза и других стран максимум внимания уделяют вопросам разработки вакцин против носительства *Escherichia coli* O157: H7 и других шигатоксин-продуцирующих эшерихий (STEC – *E. coli* O104: H4, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: H2) у крупного рогатого скота и против эшерихиозной инфекции у человека. Липополисахариды (ЛПС) STEC-штаммов играют важную роль в патогенезе геморрагического колита и гемолитико-уремического синдрома: они отвечают за развитие гастроинтестинальных синдромов у больных.

Цель работы – изучить иммуногенные и протективные свойства комбинированного препарата детоксицированных ЛПС (дЛПС) O157, O104, O26 и O111 как возможных компонентов прототипа субъединичной вакцины.

Материалы и методы. В эксперименте использовали две опытные группы животных. 1-ю группу иммунизировали комбинированным препаратом дЛПС (O157+O104+O26), трех-

кратно, в разовой дозе 25 мкг/мышь. 2-ю группу иммунизировали препаратом дЛПС (O157+O104+O26+O111) внутрибрюшинно в дозе 25 мкг/мышь и внутрижелудочно в дозе 50 мкг/мышь. Заражение животных 1-й группы осуществляли внутрибрюшинно смертельными дозами штаммов *E. coli* O157: H7, *E. coli* O104: H4, *E. coli* O26: H11. 2-ю группу мышей заражали интрагастрально 4 штаммами *E. coli* O157: H7, *E. coli* O104: H4, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: H2 в дозе 109 м.к. Оценку гуморального иммунитета иммунизированных животных осуществляли по титру специфических IgG-антител (против каждого дЛПС) в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа. Интестинальный иммунитет (деколонизацию) оценивали по концентрации патогенов в фекалиях на 4, 7, 10, 12, 14-е сутки после заражения.

Результаты. В опыте на 1-й экспериментальной группе мышей показана высокая протективность иммунитета, индуцированного комбинированным препаратом дЛПС (100%-я выживаемость животных). Эти данные коррелируют с показателями гуморального иммунитета: средний титр IgG-антител против отдельных дЛПС составлял 1:6400–1:400. Во 2-й группе мышей, зараженных интрагастрально штаммами *E. coli* O157: H7, *E. coli* O104: H4, *E. coli* O26: H11, *E. coli* O111: H2, продемонстрирована относительно низкая эффективность мукозального (антиколонизационного) иммунитета: концентрация патогенов в фекалиях животных снижалась в 1,3–3,8 раза по сравнению с контрольными животными.

Заключение. Представленные результаты свидетельствуют о том, что с помощью внутрибрюшинной иммунизации комбинированным препаратом дЛПС формируется высокопротективный системный иммунитет у мышей линии BALB/c. В то же время четырехкомпонентный комбинированный препарат дЛПС индуцировал у животных слабый интестинальный иммунитет.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Разработка пилотной технологии получения нетоксичных иммуногенных препаратов липополисахаридов *Escherichia coli* O157: H7 и *Escherichia coli* O104: H4

Светоч Э.А.¹, Карцев Н.Н.¹, Ерусланов Б.В.¹, Борзилов А.И.¹, Дунайцев И.А.¹, Борзенков В.Н.¹, Комбарова Т.И.¹, Коробова О.В.¹, Перескокова Е.С.¹, Жумакаев Р.Х.¹, Калмантаев Т.А.¹, Левчук В.П.¹, Хатюшин Ю.И.¹, Клыкова М.В.¹, Бурмистров Е.А.¹, Жиглецова С.К.¹, Буданова Н.Ю.¹, Алхазова Б.И.², Коробова Е.В.², Мироненко А.А.², Науменко О.И.², Апарин П.Г.², Ледов В.А.²

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

²ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Москва, Российская Федерация

Лечение геморрагического колита (ГК) и гемолитико-уремического синдрома (ГУС), вызываемых шигатоксин-проду-

цирующими штаммами *Escherichia coli*, остается серьезной проблемой для практической медицины, поскольку этиотропная терапия при этой инфекции противопоказана. Одним из решений проблемы лечения ГУС и ГК является создание вакцинных препаратов.

Цель исследований. Разработка пилотной технологии получения детоксицированных (нетоксичных) препаратов липополисахаридов (ЛПС) *E. coli* O157: H7 и *E. coli* O104: H4 и испытание их иммуногенных и протективных свойств.

Материалы и методы. Оптимальный режим глубинного культивирования штаммов-продуцентов ЛПС O157 и O104 отработывали на среде на основе солянокислотного гидролизата казеина. Дотоксицированные препараты ЛПС (дЛПС) из бактериальной массы получали по методу Westphal с последующей обработкой их ДНКазой и РНКазой, центрифугированием и мягким щелочным воздействием. Специфичность химической структуры выделенных дЛПС определяли с помощью спектрометрии ядерного магнитного резонанса, а молекулярную массу – с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Токсичность дЛПС испытывали на кроликах. Оптимальные схемы иммунизации отработывали на мышах линии BALB/c. Животных иммунизировали внутрибрюшинно (в/б), заражали в/б и интрагастрально. У иммунизированных животных перед заражением определяли титры IgG- и IgA-антител в сыворотке крови и фекалиях.

Результаты. В многочисленных экспериментах показано, что глубинное культивирование штаммов *E. coli* O157: H7 и *E. coli* O104: H4 на среде на основе солянокислотного гидролизата казеина в ферментерах объемами 10 и 100 л в течение 8–10 ч позволяет наработать бактериальную массу для выделения из нее высокомолекулярных препаратов дЛПС, обладающих иммуногенными и протективными свойствами. Трехкратная в/б иммунизация мышей BALB/c в разовой дозе 50 мкг индуцирует у них образование высоких титров IgG-антител в сыворотке крови (1:1600–1:6400 и выше) и защищает животных от заражения смертельными дозами гомологичных штаммов *E. coli* O157: H7 и *E. coli* O104: H4. Аналогичными иммуногенными и протективными свойствами обладал и комбинированный препарат (дЛПС O157+O104).

При в/б иммунизации мышей повышенными (разовыми) дозами (100 или 150 мкг) препараты дЛПС O157 и дЛПС O104 индуцировали у животных интестинальный иммунитет: в фекалиях животных обнаруживали IgA-антитела, а концентрация патогенов в содержимом кишечника на 7–11-й дни после интрагастрального заражения животных штаммами *E. coli* O157: H7 и *E. coli* O104: H4 снижалась в 6–10 раз.

Заключение. Разработана и апробирована пилотная технология глубинного культивирования штаммов-продуцентов *E. coli* O157: H7 и *E. coli* O104: H4, а также выделения и очистки дЛПС. Показано, что как отдельные дЛПС O157 и дЛПС O104, так и их комбинированный препарат (дЛПС O157+O104) способны индуцировать у лабораторных животных как системный, так и интестинальный иммунитет.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Иммуногенные и протективные свойства детоксицированных липополисахаридов *Salmonella Enteritidis* при сальмонеллезной инфекции у мышей C57BL/6j

Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Перескокова Е.С., Комбарова Т.И., Коробова О.В., Борзилов А.И.

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

Salmonella Enteritidis – один из основных возбудителей сальмонеллеза у людей. Пищевая инфекция, вызываемая *S. Enteritidis*, диагностируется во многих странах мира, в т.ч. в Российской Федерации. В связи с угрозой все большего распространения множественной лекарственной устойчивости среди бактериальных патогенов, включая возбудителей сальмонеллеза, актуальным становится создание эффективных вакцин против сальмонеллезной инфекции у человека и сельскохозяйственных животных.

Цель исследований. Изучить иммуногенные и протективные свойства детоксицированных липополисахаридов (дЛПС) *S. Enteritidis* на мышинной модели сальмонеллезной инфекции.

Материалы и методы. Бактериальную массу штамма *S. Enteritidis* AV116 получали глубинным культивированием на полусинтетической среде в течение 12 ч. Из нее методом Westphal и последующей очистки был получен препарат ЛПС. С целью детоксикации ЛПС по липиду А препарат подвергали мягкому щелочному гидролизу. В эксперименте опытные мыши были разделены на 5 групп. Мыши в 1-й и 2-й группах были иммунизированы трехкратно, внутривентриально (в/вр) дЛПС, с интервалом между инъекциями антигена 10 суток, в разовых дозах 50 и 100 мкг/мышь. Мышей 3-й и 4-й групп иммунизировали по той же схеме смесью дЛПС в разовых дозах 50 и 100 мкг/мышь и убитой нагреванием культурой *S. Enteritidis* AV116 в количестве 10^8 м.к. Животных 5-й группы иммунизировали в/вр только убитыми клетками *S. Enteritidis* AV116 в дозе 10^8 м.к. Спустя 14 суток после последней иммунизации животных заражали штаммом *S. Enteritidis* 92 R1Fg в дозе 5 LD₅₀. За животными наблюдали в течение 14 суток после заражения. Гуморальный ответ у иммунизированных мышей оценивали по титру специфических IgG-антител в сыворотке крови животных методом иммуноферментного анализа.

Результаты. Показано, что препарат дЛПС при трехкратной иммунизации мышей в разовых дозах 50 и 100 мкг/мышь индуцировал у животных слабый защитный эффект: он лишь увеличивал среднюю продолжительность жизни животных на 2 дня по сравнению с контрольной группой. В то же время животные, иммунизированные смесью дЛПС и убитых клеток *S. Enteritidis* AV116, после заражения смертельной дозой *S. Enteritidis* 92 R1Fg остались живыми в 90% (3-я группа) и 80% (4-я группа) случаев. Этот протективный эффект коррелирует с высокими титрами специфических IgG-антител (1:6400–1:3200) в сыворотке крови животных. В 5-й группе животных, иммунизированных только убитыми клетками *S. Enteritidis* AV116, гибель составляла 50%.

Заключение. Из проведенной работы можно сделать вывод, что для защиты мышей от экспериментальной сальмонеллезной инфекции необходимо формировать у них как гуморальный, так и клеточный иммунитет.

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 3.3.

Бактериологическое исследование мочи при бессимптомной бактериурии у беременных женщин

Семечкин Н.В.¹, Романов В.А.¹, Данилик О.Н.¹, Новосадова И.Г.², Ершова М.Г.³, Акентьева С.А.³

¹ФГБОУ ВО «Ярославский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ярославль, Российская Федерация;

²ГБУЗ МО «Балашихинская областная больница», Московская область, Балашиха, Российская Федерация;

³ГБУЗ ЯО «Инфекционная клиническая больница», Ярославль, Российская Федерация

Бессимптомная бактериурия (ББ) у беременных женщин, вызванная различными видами бактерий, в т.ч. *Streptococcus agalactiae*, является одной из причин сепсиса у новорожденных и детей раннего возраста в результате их инфицирования собственными матерями. В настоящем исследовании представлены результаты бактериологических исследований мочи беременных женщин при ББ с определением чувствительности выделенных штаммов к антибиотикам.

Изучена высеваемость различных видов бактерий, включая *S. agalactiae*, при ББ у беременных женщин и определена чувствительность выделенных культур микроорганизмов к основным антибиотикам. С этой целью проведен анализ результатов бактериологических исследований 2559 образцов мочи от беременных женщин. Мочу засеивали на хромогенную среду UriSelect 4 Medium с последующей идентификацией видов бактерий с помощью общепринятых тестов и определением чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом. Идентификацию *S. agalactiae* осуществляли с помощью стрепто-латекс-теста либо CAMP-теста с культурой *Staphylococcus aureus*. Статистический анализ проводился на основе вычисления показателя χ^2 с применением программного пакета Statistica 12.0.

Проведенные исследования показали, что в 317 (12,4%) из 2559 исследованных образцов мочи выявлена ББ, изолировано 330 штаммов микроорганизмов. Показана высокая значимость *Escherichia coli* при бессимптомной бактериурии у беременных женщин, в меньшей мере – *Enterococcus* spp. *S. agalactiae* выделен у 108 беременных женщин (4,2% из общего числа исследуемых), при этом в 50 (16%) случаях выявлена ББ, вызванная *S. agalactiae*. Обнаружены также ассоциации *S. agalactiae* с иными микроорганизмами. Продемонстрирована высокая чувствительность штаммов *S. agalactiae* к клиндамицину, в меньшей степени к левофлоксацину, хлорамфениколу и, особенно, к эритромицину.

Проведенные исследования продемонстрировали значимость *E. coli*, *Enterococcus* spp. и *S. agalactiae* в развитии ББ у беременных женщин, определяя риск возникновения сеп-

сиса у их новорожденных детей. При антибиотикопрофилактике ранней перинатальной инфекции, вызванной *S. agalactiae* и иными микроорганизмами, необходимо учитывать результаты определения чувствительности выделенных штаммов микроорганизма к антибиотикам.

Характеристика штаммов *Brucella melitensis*, выделенных на территории Республики Дагестан

Сердюк Н.С., Жаринова Н.В., Кузнецова И.В., Жилченко Е.Б., Белозерова О.Н., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Карпетян М.Г.

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

Наиболее актуальной из зоонозных инфекций для традиционно занятой в сфере животноводства Республики Дагестан (РД) остается бруцеллез. Неустойчивая эпидемическая ситуация по бруцеллезу связана с нарастающим эпизоотическим неблагополучием среди сельскохозяйственных животных в индивидуальном секторе. Вышесказанное, в свою очередь, требует изучения фенотипических и генетических свойств бруцелл с целью оценки риска возникновения эпидемических проявлений бруцеллеза в различных административных районах РД.

Целью нашей работы было изучение методом MLVA-14 генотипов *Brucella melitensis*, циркулирующих на территории РД с 2001 по 2015 г.

В работе использовали 26 штаммов, выделенных из клинического материала на территории РД, 5 штаммов, изолированных в Ставропольском крае, и референсный штамм 16М из базы данных MLVA <http://microbesgenotyping.i2bc.paris-saclay.fr/databases> (cited 01.03.2019).

Культуры имели типичные морфологические и культуральные свойства. Наиболее эффективными антибиотиками в отношении *B. melitensis*, выделенных на территории РД, оказались доксициклин, ципрофлоксацин, офлоксацин, тетрациклин, левофлоксацин. Устойчивых штаммов в нашем исследовании выявлено не было.

Метод MLVA-14-типирования позволил установить, что 26 штаммов *B. melitensis* представлены 19 MLVA-типами. Анализ дендрограммы выявил деление исследуемых штаммов, включая группу сравнения, на 3 кластера.

Кластер I образован референтным штаммом 16М (США) и С-537 (Дагестан, 2011 г.), MLVA-профиль которого идентичен американскому.

В кластер II вошли 13 штаммов, выделенных на территории РД (2011–2014 гг.), 4 – Ставропольского края (2001–2002, 2014–2015 гг.). Одинаковый генетический профиль со штаммами из Ставропольского края имеют штаммы С-531 и С-532, выделенные в 2011 г в Рутульском и Хунзахском районах РД. Остальные группы данного кластера сформированы штаммами, изолированными на территории южных районов РД в 2012–2014 гг. и различающимися между собой одним тандемным повтором в локусах Bruce11, Bruce42, Bruce43, Bruce7, Bruce16 и 1–2 повторами в локусе Bruce4.

Кластер IIIА образован штаммами из Шамильского района (2012 г.), отличающимися между собой на 1 тандемный повтор в локусе Bruce4, С-579 (Нагайский район, 2015 г.) отличается от них на 1 тандемный повтор в локусах Bruce4 и Bruce7 и наиболее близок к изоляту из Китая (2014 г.), имея разницу в 1 повтор в локусах Bruce12, Bruce43, Bruce18, Bruce4, Bruce9, Bruce16.

В кластер IIIБ вошли 6 штаммов (2012 г.), выделенных на территории северных и центральных районов РД, 3 – южных районов и 1 – Ставропольского края, отличающиеся друг от друга 1 повтором в локусах Bruce18, Bruce4, Bruce16.

Анализируя дендрограмму, можно сделать вывод, что изоляты, выделенные на территории РД, не имеют четкой кластеризации по временному или географическому критерию, что свидетельствует о постоянной циркуляции штаммов *B. melitensis* на данной территории, обуславливающей длительное эпизоотическое неблагополучие по бруцеллезу среди мелкого рогатого скота.

Определение жизнеспособности коллекционных штаммов *Francisella tularensis* в лиофильном состоянии и при низкотемпературном замораживании в криопробирках

Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Жаринова Н.В., Карпетян М.Г., Белозерова О.Н.

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

Туляремийный микроб, относящийся к факультативным анаэробам, не способен расти на простых питательных средах. В процессе эволюции он приспособился к существованию в организме теплокровных животных, где полностью удовлетворяет свои пищевые потребности. В связи с этим любые включаемые в коллекцию штаммы должны неизменно содержаться в тех условиях, в которых они были изначально выделены в виде чистой культуры, а для этих целей необходимо использование современных методов, позволяющих сохранять микроорганизмы в неизменном виде. Наиболее распространенными способами поддержания штаммов являются методы долгосрочной консервации (лиофилизация и криоконсервация).

Цель исследования – оценить выживаемость штаммов *Francisella tularensis* в процессе длительного хранения (лиофилизация и криоконсервация) с учетом сроков и условий хранения.

В работе использовали 10 штаммов *F. tularensis* из коллекции ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора в лиофилизированном состоянии и в криопробирках, имеющих различные сроки хранения (от 1 года до 5 лет).

Штаммы хранили в криопробирках «Криобанк», содержащих по 25 бусин, каждая из которых является носителем микроорганизмов в количестве, достаточном для засева 1 чашки. В качестве криопротектора использовали трехкомпонентную сахарозо-желатиновую среду с тиомочевинной.

Пробирку помещали в низкотемпературный холодильник при $-75...-80$ °С.

Лиофилизацию производили в лиофильной сушке Labconco Free Zone Triad 7400030 во флаконах объемом 5,0 мл, содержащих 1 мл микробной взвеси с конечной концентрацией 10^9 КОЕ/мл. Лиофилизированные культуры штаммов *F. tularensis* ресуспендировали 0,9%-м раствором натрия хлорида.

Учет результатов проводили визуально через 48–72 ч инкубации посевов при температуре 37 °С. Оценивали по основным биологическим показателям: скорости роста колоний, стабильности их культурально-морфологических свойств.

Для выращивания культур франциселл использовали коммерческую сухую среду Ft-агар (ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск). Оценка культурально-морфологических свойств показала, что на Ft-агаре в чашках все штаммы формировали гладкие блестящие полусферические с медовым оттенком колонии в S-форме диаметром 1,0–1,5 мм.

Все изученные штаммы *F. tularensis* сохранили свою жизнеспособность, через год хранения в условиях низкотемпературного замораживания жизнеспособность в среднем составила $62,3 \pm 2,5\%$, после лиофилизации – $70,1 \pm 1,7\%$; через 5 лет хранения в условиях низкотемпературного замораживания – $59,1 \pm 1,8\%$, после лиофилизации – $51,4 \pm 3,6\%$.

Таким образом, предлагаемые методы длительного хранения штаммов *F. tularensis* при низкой температуре и при лиофильном высушивании в течение длительного периода времени (5 лет) позволяют практически полностью сохранить жизнеспособность с относительно небольшими физическими и материальными затратами в исследовательских коллекциях и взаимодополняют друг друга.

Оптимизация метода MLVA25-типирования для дифференциации штаммов *Yersinia pestis* основного подвида средневекового биовара

Сидорин А.С., Карапетян Л.А.,
Коврижников А.В., Ерошенко Г.А.

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

Одним из наиболее высокоразрешающих методов молекулярного типирования и определения филогеографической принадлежности штаммов *Yersinia pestis* является MLVA (multilocus variable number tandem repeat (VNTR) analysis). Оценка эффективности различных VNTR локусов в MLVA25-анализе важна для разработки ускоренного и менее затратного способа дифференциации штаммов *Y. pestis* разных подвигов и биоваров, распространенных в различных очагах чумы.

Целью данной работы была оптимизация метода MLVA25 для дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из природных очагов чумы Восточной Европы и Центральной Азии.

Материалы и методы. В работе использованы полногеномные последовательности 226 штаммов *Y. pestis* средневекового биовара основного подвида из 31 очага чумы стран СНГ, полученных в 1923–2003 гг., а также полногеномные последовательности 32 штаммов других филогенетических линий. Поиск локусов VNTR осуществляли в программе MEGA 7 и с использованием авторского скрипта. Степень варибельности локусов оценивали посредством расчета индекса аллельного полиморфизма (h).

По результатам молекулярно-генетических исследований выявлены высоковарибельные локусы ($h > 0,25$), обладающие наибольшей разрешающей способностью для штаммов *Y. pestis* средневекового биовара: ms01, ms46, ms56, ms62, ms70. При пересчете индекса h для штаммов средневекового биовара основного подвида 10 локусов (ms04, ms20, ms38, ms40, ms41, ms44, ms45, ms51, ms54, ms69) представлены в 1 варианте повтора ($h = 0$). Таким образом, использование данных локусов для дифференциации штаммов средневекового биовара нецелесообразно. Среди них локусы ms04, ms20, ms38, ms41 и ms45 имеют процент встречаемости варианта повтора среди штаммов других филогенетических линий по отношению к штаммам средневекового биовара 19, 16, 3, 0 и 9% соответственно. Из этого следует, что варианты аллеля в этих локусах на 81, 84, 97, 100 и 91% являются уникальными только для штаммов средневекового биовара. Данный набор локусов может быть использован для идентификации и дифференциации бактерий *Y. pestis* ssp. *pestis* bv. *medievalis*.

Полученные результаты могут быть использованы для оптимизации метода MLVA-типирования и дифференциации штаммов *Y. pestis* средневекового биовара из различных природных очагов чумы в Восточной Европе и Центральной Азии.

Ретроспективное исследование сывороток крови от лихорадящих больных в Ставропольском крае (2007–2013 гг.) на наличие ДНК возбудителя лихорадки Ку

Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Васильева О.В.,
Волынкина А.С., Ульшина Д.В., Зайцева. О.А.

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

Лихорадка Ку – природно-очаговое зоонозное заболевание, характеризующееся полиморфизмом клинических признаков, способное вызывать у человека тяжелые осложнения. Болезнь не приводит к высокой смертности, однако при поздней диагностике и отсутствии специфического лечения может принимать хроническое течение, приводящее к инвалидизации.

Лихорадка Ку имеет сходную клиническую картину с различными вирусными и бактериальными инфекциями, диагностика коксиселлеза затруднена полиморфизмом симптоматики. Поэтому необходимо проводить дифференциальную диагностику лихорадки Ку со следующими болезнями –

бруцеллез, туляремия, Конго-Крымская гемморагическая лихорадка (ККГЛ), пневмонии различной этиологии.

Официально лихорадка Ку в Ставропольском крае регистрируется с 2016 г. За этот период зарегистрировано 270 случаев заражения *Coxiella burnetii* в 13 административных районах, больные выявляются ежегодно. Большинство случаев заболевания протекали в среднетяжелой форме, выявлено 2 случая (2017, 2018 гг.) с легкой формой.

Цель работы – ретроспективное исследование сывороток крови от лихорадящих больных в Ставропольском крае на наличие ДНК возбудителя лихорадки Ку.

Материалы и методы. Исследовано 540 образцов крови от лихорадящих больных, отрицательных на наличие РНК и антител (IgM, IgG) к вирусу ККГЛ. Индикацию возбудителя лихорадки Ку осуществляли с использованием набора реагентов «АмплиСенс *Coxiella burnetii*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Москва, Россия).

Результаты. ДНК возбудителя *C. burnetii* обнаружена в 35 (6,5%) пробах клинического материала из 9 административных районов (Нефтекумский – 9 (25,7%), Буденновский – 6 (17,2%), Ипатовский – 5 (14,3%), Курский – 3 (8,6%), Благодарненский – 3 (8,6%), Советский – 2 (5,7%), Апанасенковский – 2 (5,7%), Арзгирский – 1 (2,8%), Красногвардейский – 1 (2,8%)) и краевой столицы г. Ставрополя – 3 (8,6%). Таким образом, в 2007–2013 гг. отмечались случаи заболевания лихорадкой Ку (в среднем 5 случаев в год). Незарегистрированные больные проживали в трех ландшафтно-географических зонах: полупустынной – 15 (42,9%), степной – 15 (42,9%) и лесостепной – 5 (14,2%).

Выводы. Официальные данные о заболеваемости лихорадкой Ку не отражают реальную картину, это связано в первую очередь с трудностью клинической диагностики и отсутствием настороженности врачей к этой болезни. Диагноз лихорадки Ку практически невозможно поставить без лабораторного подтверждения вследствие отсутствия патогномичных симптомов. По результатам проведенного ретроспективного исследования были выявлены положительные пробы на наличие ДНК возбудителя *C. burnetii* с 2007 г., что подтверждает гиподиагностику заболеваемости лихорадкой Ку.

Таким образом, необходимо повысить настороженность медицинских работников первичного звена здравоохранения на неблагоприятных по лихорадке Ку территориях в отношении следующих групп людей: длительно лихорадочных, с внебольничной пневмонией и больных из профессиональной группы риска.

Оценка инфекционных рисков последствий чрезвычайной ситуации на левом берегу реки Днепр

Ситникова А.Л.¹, Пеньковская Н.А.², Листопад С.А.², Зинич Л.С.¹, Тихонов С.Н.¹

¹ФГКУЗ «ПСЧ Республики Крым» Роспотребнадзора, Симферополь, Российская Федерация;

²Межрегиональное управление Роспотребнадзора по Республике Крым и городу Севастополю, Симферополь, Российская Федерация

Разрушение дамбы Каховской ГЭС (06.06.2023) привело к затоплению части территории Херсонской области, при этом пострадали социально и эпидемически значимые объекты: мосты, автомобильные дороги, кладбища, канализационные и водопроводные системы. Правительственной комиссией Российской Федерации по предупреждению и ликвидации чрезвычайных ситуаций и обеспечению пожарной безопасности создавшаяся обстановка в Херсонской области отнесена к чрезвычайной ситуации федерального характера (14.06.2023). С целью мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний в зоне бедствия с 12.06.2023 к работе была привлечена мобильная микробиологическая лаборатория Роспотребнадзора (ФГКУЗ «Противочумная станция Республики Крым» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе»).

Проведена оценка риска возникновения инфекционных заболеваний в Херсонской области, определен перечень возбудителей для лабораторной диагностики. К возбудителям инфекционных заболеваний, которые могут реализовываться водным путем и вспышки которых возможны в связи с подтоплениями, отнесены: *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Adenovirus F*, *Rotavirus A*, *Astrovirus*, *Norovirus* 2-го генотипа, *Vibrio cholerae*, энтеропатогенная *Escherichia coli*, энтеровирусы, полиовирусы, вирус гепатита А.

Холера: последняя вспышка холеры в Херсонской области была в 1994 г., но в водных объектах (пресной и морской воды) имеются благоприятные условия для сохранения и размножения токсигенных холерных вибрионов при их заносе, что подтверждалось ранее неоднократным выделением *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Полиомиелит: в связи с низким уровнем вакцинации, регистрацией подтвержденного случая острого полиомиелита (2021 г., Ровенская область, Украина) не исключено распространение полиовирусов.

Туляремия: существуют стойкие природные очаги туляремии, в т.ч. и в левобережной части Херсонской области (о. Бирючий, Генический район).

Лептоспироз: зарегистрированы стойкие природные очаги лептоспирозов с ежегодной регистрацией случаев заболеваний (от 2 до 54 человек в год). Ранее регистрировались вспышки заболевания, связанные с покосом травы и уборкой урожая на подтопленных полях.

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН): Херсонская область является эндемичной по ЛЗН. Разлив р. Днепр и образование заводей со стоячей водой в сочетании с высокой темпе-

ратурой воздуха летом могут благоприятствовать увеличению численности переносчиков и возникновению вспышек заболевания у людей.

Сибирская язва (СЯ): на территории Херсонской области зарегистрировано 273 стационарно неблагополучных пункта по СЯ (на левобережной территории 180 пунктов). При подтоплении захоронений животных возможно загрязнение морской воды и поверхностных слоев земли. Так, в курортном поселке Железный порт (Голопристанский район) между действующим детским пансионатом и морем находится сибирезвенный скотомогильник (в 1951 г. в районе был значительный падеж крупного рогатого скота). Относительная удаленность от Черного моря составляет 50 м. Есть риск подмывания скотомогильника и распространения инфекции.

Херсонская область энзоотична по лихорадке Ку, иксодовым клещевым боррелиозам.

Возможна циркуляция возбудителей бруцеллеза. Так, в 2010 г. в Харьковской области выявлено 6 зайцев с положительными результатами исследования на бруцеллез. В 2008 г. в селе Матроска Измаиловского района Одесской области возбудитель был выявлен в местной реке Репид. В июле 2020 г. подтвержден бруцеллез собак в г. Волноваха (Донецкая область).

Также следует учитывать риски террористических актов. В рамках антитеррористической готовности предусмотрена возможность исследования материала на чуму и тропические инфекции.

Для своевременной индикации и реагирования на биологические угрозы предусмотрена долгосрочная поддержка Херсонской области со стороны Межрегионального управления Роспотребнадзора по Республике Крым и городу Севастополю, ФГКУЗ «ПЧС Республики Крым» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе».

Получение рекомбинантного эндолизина, активного против клинических штаммов *Staphylococcus aureus*

Скрябин Ю.П., Фурсова А.Д., Шишкова Н.А., Абаев И.В.

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

Одной из альтернатив антибиотикам в борьбе против устойчивых микроорганизмов являются эндолизины. Стафилококковые эндолизины показывают хорошую активность против устойчивых штаммов *Staphylococcus aureus* и являются перспективным направлением исследований.

Целью исследования является разработка получения и очистки препарата рекомбинантного эндолизина, способного лизировать клинические штаммы *S. aureus*.

Материалы и методы. Штамм-продуцент создан на базе штамма *Escherichia coli* BL21 (DE3) путем трансформации вектором pET21a_LysSA18, несущим ген эндолизина LysSA18. Экспрессия проводилась в присутствии 1мМ ИПТГ при разных температурах культивирования (19–37 °С) и вре-

мени инкубации (2–18 ч) в среде LB. Разрушение клеток проводили методами ультразвуковой дезинтеграции и замораживанием/оттаиванием. Для очистки использовали металл-хелатную и ионообменную хроматографию.

Результаты. Использование штамма *E. coli* BL21 (DE3) и экспрессионного вектора pET21a позволило получить высокоэффективную экспрессионную систему, в которой предусмотрен жесткий контроль базального уровня экспрессии целевого белка. Время инкубации, температуру и состав питательной среды варьировали для повышения выхода растворимого продукта. Из использованных методов разрушения клеток штамма-продуцента метод замораживания/оттаивания был более оптимальным для дальнейшей очистки рекомбинантного эндолизина за счет меньшего количества сопутствующих белков. Ренатурация эндолизина из телец включения не дала результатов, поэтому для очистки использовались методы, позволяющие очищать белок в нативной форме. Перспективным направлением очистки LysSA18 является ионообменная хроматография. Была показана стабильность литических свойств рекомбинантного эндолизина при разных условиях хранения. Для оценки кинетики литической активности рекомбинантного эндолизина LysSA18 разработана методика экспресс-тестирования с использованием микропланшетного спектрофотометра. Показана высокая эффективность эндолизина LysSA18 против клинических штаммов MRSA и MSSA.

Заключение. Полученные результаты показывают перспективность разработки рекомбинантного эндолизина LysSA18 против устойчивых штаммов *S. aureus*. Следующим этапом исследования является оптимизация условий культивирования для повышения выхода растворимой фракции и оптимизация очистки методом ионообменной хроматографии.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Гены вирулентности *Escherichia coli* в клинических штаммах, выделенных от онкологических больных в 2022–2023 гг.

Слукин П.В.¹, Горемыкина Е.А.¹, Багирова Н.С.², Хохлова О.Е.¹, Фурсова Н.К.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;
²ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н.Блохина» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Escherichia coli, вызывающие внекишечные инфекции, характеризуются наличием у них значительного числа генов вирулентности, ассоциированных с факторами патогенности. Целью данной работы было идентифицировать наборы генов вирулентности в штаммах *E. coli*, выделенных из разных источников от онкологических больных.

Материалы и методы. Штаммы *E. coli* ($n = 93$) получены из мочи ($n = 25$), крови ($n = 21$), желчи ($n = 19$), отделяемого ран ($n = 12$), кишечника ($n = 9$), перинеальной жидкости

($n = 3$), мягких тканей ($n = 1$), пунктата ($n = 1$), смывов с кожи ($n = 1$) и эндопротеза ($n = 1$) от пациентов отделения реанимации и интенсивной терапии НМИЦ онкологии им. Н.Н.Блохина в 2022–2023 гг. Методом полимеразной цепной реакции со специфичными праймерами в штаммах *E. coli* детектировали гены адгезинов (А) – фимбрий типа 1 (*fimH*), Р-фимбрий (*papGI*, *papGII*, *papGIII*), S-фимбрий (*sfaS*), F1C-фимбрий (*focG*), yfc-фимбрий (*yfcV*), Afa/Dr-адгезина (*afa/draBC*) и основного белка курли-волокон (*csgA*); гены токсинов (Т) – гемолизина (*hlyA*), цитотоксического некротического фактора (*cnf1*), вакуолизирующего токсина (*vat*) и уропатогенного специфического белка (*usp*); гены рецепторов сидерофоров (С) – сальмохелина (*iroN*), иерсиниабактина (*fyuA*) и азробактина (*iutA*); гены факторов защиты от иммунной системы макроорганизма (П) – протеазы внешней мембраны (*ompT*), липопротеина наружной мембраны (*traT*) и транспортеров капсулы 2-й и 3-й группы (*kpsMTII*, *kpsMTIII*).

Результаты и обсуждение. В каждом изучаемом штамме *E. coli* идентифицированы от 1 до 16 генов вирулентности: у большинства штаммов выявлены гены *csgA* (99%) и *fimH* (90%). Показано, что более половины штаммов, выделенных из желчи, несли гены *yfcV*, *fyuA*, *iutA*, *traT*, *ompT*, *kpsMTII* и *usp*; изолированных из мочи – *fyuA*, *iutA*, *traT*, *ompT*, *kpsMTII* и *usp*; полученных из отделяемого ран – *fyuA*, *traT* и *ompT*; выделенных из кишечника – *iutA*, *traT* и *ompT*. При этом каждый из перечисленных наборов генов вирулентности в полном составе идентифицирован только у 1–3 штаммов соответствующей группы. Отмечено, что в штаммах, выделенных из крови, все гены вирулентности, кроме *csgA* и *fimH*, встречались менее чем у половины штаммов каждый, при этом у 8 штаммов из 21 присутствовали только гены *csgA* и *fimH*.

Анализ сочетания групп факторов вирулентности в штаммах показал, что среди штаммов, выделенных из мочи и желчи (60 и 58% соответственно), преобладали несущие хотя бы по одному гену из групп А, Т, С и П; среди штаммов, выделенных из кишечника (56%), – только несущие гены групп А, С и П; среди штаммов, выделенных из крови (43%), – только имеющие гены группы А, а среди штаммов, выделенных из отделяемого ран ($\approx 30\%$ каждая), – несущие гены всех трех вышеуказанных групп.

Заключение. Анализ профилей генов вирулентности внекишечных *E. coli* представляется важным и необходимым элементом эпидемиологического анализа, позволяющим оценивать распространение возбудителей госпитальных инфекций и совершенствовать систему их контроля.

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Антибактериальное действие образцов легированных металлов, модифицированных ионами Zn

Слукин П.В., Игнатов С.Г.

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

Биообрастание морских судов может являться путем переноса и последующего распространения патогенных микроорганизмов. В настоящее время разрабатываются международные правила и руководства для управления рисками, связанными с этим путем распространения патогенов, но широкое их применение и внедрение все еще находятся в зачаточном состоянии. Переносу патогенов в результате биологического обрастания судов уделяется мало внимания, несмотря на растущее количество доказательств, подчеркивающих потенциальную важность этого пути.

В работе использованы образцы сплавов, легированные 5% Zn. В исследовании бактерицидной активности образцов без и с 5% Zn использован метициллинрезистентный штамм *Staphylococcus aureus*. Определение КОЕ проводили методом десятичных разведений в физрастворе. Оказалось, что бактерицидная активность образцов легированных металлов, модифицированных ионами Zn, зависит от первоначальной концентрации бактерий. При первоначальной концентрации 10^8 и 10^7 КОЕ/мл бактерии полностью элиминировались через 24 ч инкубирования с образцами. При увеличении КОЕ до 10^9 на мл образцы с 5% Zn не показали бактерицидной активности. Контрольные образцы (без модификации 5% Zn) не показали бактерицидной активности при концентрации 10^7 – 10^9 КОЕ/мл.

Антибактериальная активность, опосредованная активными формами кислорода, индуцированная рентгеновским и ультрафиолетовым облучением, в пленках TiCaCON

Слукин П.В., Игнатов С.Г.

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

Актуальным направлением является разработка костных имплантатов, обладающих биосовместимостью, способностью к биоминерализации и подавлению инфекции.

Возникновение инфекций после установки имплантата часто приводит к повторному хирургическому лечению из-за неэффективности антибактериальной терапии. Поэтому чрезвычайно привлекательным решением этой проблемы была бы возможность инициировать бактериальную защиту имплантата внешним воздействием.

Здесь мы представляем экспериментальное исследование, основанное на генерации активных форм кислорода (АФК) поверхностью имплантата в ответ на рентгеновское

облучение. Сравнивали влияние ультрафиолетового (УФ) и рентгеновского облучения поверхности имплантата на образование АФК и связанную с этим бактерицидную активность. Для этого использовали пленки TiCaCON, легированные кремнием, с наночастицами. После кратковременного (5–10 с) малодозового рентгеновского и УФ-облучения в течение 1 ч пленки Fe/TiCaCON-Si продемонстрировали превосходную антибактериальную активность в отношении полирезистентного госпитального штамма *Escherichia coli* U20.

Наше исследование ясно показывает, что наночастицы железа являются многообещающей альтернативой широко используемым наночастицам серебра в антибактериальных покрытиях, а рентгеновские лучи потенциально могут быть использованы для подавления воспаления в случае постимплантационных осложнений.

Бактерицидное и фунгицидное действие титановых пластин, модифицированных ионами металлов

Слукин П.В., Игнатов С.Г.

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

Титановые имплантаты хорошо разработаны и применяются для восстановления структур и функций костной системы, например для фиксации переломов, исправления деформаций, замены суставов и заполнения костных пустот. Ортопедические титановые имплантаты включают в себя различные протезы суставов и остеосинтетические материалы (проволоки, штифты, винты и пластины). Растущее количество данных продемонстрировало, что клинические проблемы, связанные с отторжением имплантатов в ортопедической хирургии, в основном обусловлены инфекциями. Разработка имплантатов с антибактериальными свойствами является одной из наиболее эффективных стратегий профилактики и лечения инфекций, связанных с имплантатами, и особенно полезна для уменьшения бактериальной адгезии и ингибирования образования биопленки. Покрытие поверхности и ее модификация являются наиболее часто используемыми методами предоперационной подготовки имплантатов. В последние десятилетия большое количество исследований было сосредоточено на антибактериальном покрытии, модификации поверхности и антимикробных агентах для нанесения на поверхность имплантата. На сегодняшний день разработано несколько материалов с антибактериальными свойствами, таких как наночастицы серебра (AgNP), меди (Cu), полимеры (например, хитозан), углеродные наноструктуры и антимикробные пептиды.

В исследовании использованы титановые пластины, модифицированные атомами меди (Cu), железа (Fe), цинка (Zn) и серебра (Ag). В работе использованы клинические изоляты штаммов *Escherichia coli* K261, *E. coli* U20, *Staphylococcus aureus* CSA154 и *Candida albicans* B2528/20. Для штаммов *E. coli* K261 и *E. coli* U20 показано бактерицидное действие образцов, модифицированных медью, цинком и серебром, тогда как для грибов *C. albicans* B2528/20 фун-

гицидной активностью обладали ионы серебра. Данные ионы металлов предотвращали образование биопленок для штаммов *E. coli* K261 и *E. coli* U20.

Оценка бактерицидной и фунгицидной активности тканевых наноповоротностей с покрытием нитридом бора и наночастицами железа и серебра в отношении клинических штаммов микроорганизмов

Слукин П.В., Игнатов С.Г.

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

В связи с высокой конкуренцией в текстильной отрасли становится актуальным создание многофункциональных материалов, сочетающих в себе несколько нужных характеристик. Нанесение наночастиц (НЧ) на поверхность ткани может придать ей дополнительные желательные характеристики, такие как антибактериальная активность, гидрофобность и термостойкость, что позволяет значительно расширить область их применения и увеличить срок службы. Среди различных НЧ, которые используются для модификации текстиля, правильным выбором являются НЧ на основе гексагонального нитрида бора (h-BN).

Для оценки бактерицидной активности использовались штаммы *Escherichia coli* U20 и *Staphylococcus aureus* MW2. Для штаммов *E. coli* K261 и *E. coli* U20 показано бактерицидное действие следующих модификаций образцов ткани:

- амино-модифицированных сферическими частицами BN;
- карбокси-модифицированных сферическими частицами BN;
- амино-модифицированных гибридными сферическими частицами BN-ZnO;
- амино-модифицированных гибридными сферическими частицами BN-Ag;
- карбокси-модифицированных сферическими частицами BN;
- амино-модифицированных гибридными сферическими частицами BN-Ag.

Более того, данные образцы предотвращали образование биопленок бактериями *E. coli* U20.

Самодезинфицирующиеся поликапролактоновые нановолокна с наночастицами Ag

Слукин П.В., Игнатов С.Г.

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

Цель этого исследования заключалась в разработке экологически безопасного и масштабируемого метода производства самодезинфицирующихся нановолокон ткани. Это

было достигнуто за счет иммобилизации наночастиц серебра (НЧ Ag) на обработанных плазмой поверхностях биоразлагаемых поликапролактоновых (PCL) нановолокон.

Бактерицидные и фунгицидные свойства PCL-Ag были протестированы в отношении грамотрицательных и грамположительных бактерий (*Escherichia coli* U20, *Staphylococcus aureus* MW2), патогенных грибов (*Candida albicans* ATCC90028, *Candida parapsilosis* ATCC90018 и *Candida auris* CBS10913) и их способности образовывать биопленки.

Результаты показали, что нановолокна PCL-Ag проявляют значительную антимикробную активность в отношении широкого спектра патогенных микроорганизмов. Планктонные культуры патогенов полностью элиминировались после 6 ч инкубации в присутствии PCL-Ag для грамотрицательных и 24 ч инкубации для грамположительных патогенов и патогенных грибов. Полностью подавлялось биоплекообразование. Включение Ag NP в нановолокна PCL привело к созданию самодезинфицирующегося материала, который можно использовать в различных областях, включая повязки на раны, очистку воды и фильтрацию воздуха.

Оценка терапевтической эффективности полисахарид-деполимеразы Dep_kpv79 на инфекционной модели личинок *Galleria mellonella*

Слукин П.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В.

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

Обладая важными аспектами врожденного иммунного ответа, свойственного млекопитающим, насекомые все чаще используются для моделирования инфекционных заболеваний. Ряд авторов предлагают использовать личинки большой восковой моли (*Galleria mellonella*) в качестве инфекционной модели для оценки вирулентности бактерий и тестирования антибактериальных препаратов. Мы использовали эту модель для изучения терапевтической эффективности рекомбинантной полисахарид-деполимеразы Dep_kpv79, расщепляющей капсульные полисахариды (КПС) K57-типа *Klebsiella pneumoniae*. Деполимеризация КПС может быть ценной терапевтической стратегией для борьбы с инфекциями, вызванными *K. pneumoniae*.

Деполимеразу Dep_kpv79 выделяли из полученного ранее штамма-продуцента *Escherichia coli* BL21 (DE3) /pET22b-kpv79, выращенного в жидкой питательной среде с индукцией изопропил- β -D-тиогалактопиранозидом. Очистку проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии с последующим диализом и лиофилизацией. Личинок инфицировали в гемоцель бактериальной взвесью штамма *K. pneumoniae* KPB550 или этими же бактериями одновременно с деполимеразой (2 мкг на инъекцию, однократно). За личинками наблюдали в течение 7 дней, ежедневно регистрируя их гибель. Эффективность деполимеразы оценивали по двум параметрам: величине ЛД₅₀ клеток *K. pneumoniae* и выживаемости личинок после введения фиксированной дозы *K. pneumoniae* KPB550 ($1 \cdot 10^6$ КОЕ на инъекцию).

Проведенные эксперименты показали существенное снижение вирулентности (70-кратное увеличение ЛД₅₀) клеток *K. pneumoniae* KPB550, обработанных деполимеразой Dep_kpv79, по сравнению с необработанными бактериями. В эксперименте по выживаемости было установлено, что в контрольной группе все личинки ($n = 30$), инфицированные культурой *K. pneumoniae* KPB550, погибли в течение суток, тогда как однократная доза фермента Dep_kpv79, вводимого вместе с бактериальной суспензией, предотвращала гибель личинок *G. mellonella* от *K. pneumoniae*-инфекции. Инъекция 2 мкг деполимеразы одновременно с инфицирующими бактериями обеспечила выживаемость 93,3% личинок ($n = 30$) в течение всего срока наблюдения. Следует отметить, что при инъекции одной деполимеразы все личинки ($n = 10$) также оставались живы в течение всего срока наблюдения.

Таким образом, эксперименты на личинках *G. mellonella* продемонстрировали безвредность и терапевтический потенциал K57-специфичной деполимеразы Dep_kpv79.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Делеция в гене *csgA* курли-отрицательных штаммов уропатогенных *Escherichia coli*

Слукин П.В., Подгорная Н.Н., Фурсова Н.К.

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

Курли-волокна, один из факторов вирулентности уропатогенных *Escherichia coli*, участвуют в адгезии, а также формируют основной компонент матрикса биопленок. Курли-волокна формируются из большого числа субъединиц белка CsgA, который состоит из 150 аминокислотных остатков (а.о.) и подразделяется на 3 домена: сигнальный Sec-домен (1–20 а.о.), секреторный N22-домен (21–42 а.о.) и основной R1-R5-домен, имеющий β -складчатую структуру (43–150 а.о.).

Материалы и методы. Уропатогенные штаммы *E. coli* ($n = 32$), выделенные от людей в 2005–2019 гг., получены из «ГКПМ-Оболенск», номера доступа В-8431, В-8550, В-8772, В-8737, В-9006, В-8972, В-8973, В-9003, В-9015, В-8963, В-8964, В-8965, В-9013, В-9014, В-8736, В-8734, В-8552, В-8728, В-8957, В-8430, В-8433, В-8962, В-8729, В-9001, В-8432, В-8732, В-8735, В-9008, В-8730 и В-8731. Фенотипический анализ наличия курли-волокон проводили на среде LB (Becton, Dickinson and Company, США) с красителем конго красным (Sigma-Aldrich, США) согласно методике Bokranz et al., 2005. Полногеномные последовательности штаммов размещены в базе данных GenBank: SERV00000000, SERR00000000, JAHWEX00000000, JABUNK00000000, JAHWEZ00000000, JAHWEN00000000, JAHWES00000000, JAHWFE00000000, JAHWFJ00000000, JAHWEJ00000000, JAHWEO00000000, JAHWER00000000, JAHWFH00000000, JAHWFI00000000, JAHWEB00000000, JAHWEC00000000, SERU00000000, JABUNJ00000000, JAHWEG00000000, SERT00000000, SERY00000000, JAHWEQ00000000,

JABUNI000000000, JAHWFF000000000, SERX000000000, JAHWDZ000000000, JABUNL000000000, JAHWFC000000000, JAHWED000000000 и JABUNH000000000. Первичные нуклеотидные последовательности генов *csgA* из полногеномных последовательностей сравнивали с референс-последовательностью EU554557 с помощью web-сервиса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение. Фенотипический анализ показал, что 20 штаммов имели курли-положительный, а 12 штаммов – курли-отрицательный фенотип. Анализ первичных нуклеотидных последовательностей гена *csgA* выявил наличие делеции 3 нуклеотидов (91–93 п.н.) в этом гене у 12 курли-отрицательных штаммов, что привело к утрате одной аминокислоты (31 а.о.), входящей в секреторный N22-домен. Это позволило предположить, что курли-отрицательный фенотип данных штаммов связан с нарушением секреции белка CsgA из клетки. Кроме того, у 10 курли-отрицательных штаммов в гене *csgA* идентифицированы дополнительно еще 3 мутации (Ala61Thr, Asp110Asn и Thr112Glu) в R1-R5-домене, которые, по-видимому, не влияют на курли-фенотип.

Заключение. Делеция 3 нуклеотидов в участке гена *csgA*, соответствующем секреторному домену CsgA-белка курли-волокон, как один из механизмов формирования фенотипического разнообразия по признаку наличия курли-волокон, может быть использована в качестве молекулярной мишени при изучении эпидемиологии штаммов UPEC, а также при разработке антибиопленочных препаратов и вакцин.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Вариабельность первичной структуры гена *chuA*, кодирующего рецептор гемоглобина, в штаммах разных клональных групп уропатогенных *Escherichia coli*

Слукин П.В., Фурсова Н.К.

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

Анализ клональной принадлежности штаммов *Escherichia coli*, определяемой на основе сочетания их принадлежности к O-серогруппе, филогруппе по Clermont и сиквенс-типу по схеме Ahtman, позволяет связать микробиологические характеристики штаммов с эпидемическими. При этом идентификация клональных групп подразумевает анализ большого количества маркеров, что не всегда удобно в практической работе. Одним из генов, на основе которого выполняется анализ по Clermont, является ген *chuA*. Этот ген кодирует белок внешней мембраны – рецептор гемоглобина, который считается фактором вирулентности уропатогенных *E. coli*, способствующим поглощению бактериями железа в составе гема. Наличие гена *chuA* является одним из маркеров *E. coli*, характерных для филогрупп B2, D, F и E по Clermont.

Материалы и методы. Уропатогенные штаммы *E. coli* ($n = 20$), выделенные от людей в 2005–2019 гг., получены из коллекции «ГКПМ-Оболенск», номера доступа B-8550,

B-8431, B-8772, B-8737, B-9006, B-8972, B-8973, B-9003, B-9015, B-8773, B-8957, B-8430, B-8433, B-8962, B-8958, B-8959, B-8960, B-8961, B-8729 и B-9001. Для всех штаммов определены полные нуклеотидные последовательности генов, номера доступа в базе данных GenBank SERR000000000, SERV000000000, JAHWEX000000000, JABUNK000000000, JAHWEZ000000000, JAHWEN000000000, JAHWES000000000, JAHWFE000000000, JAHWFJ000000000, JAHWEV000000000, JAHWEG000000000, SERT000000000, SERY000000000, JAHWEQ000000000, JAHWEI000000000, JAHWEK000000000, JAHWEL000000000, JAHWEM000000000, JABUNI000000000 и JAHWFF000000000 соответственно. Штаммы отнесены к 4 клональным группам: O2-B2-ST141 ($n = 2$), O75-B2-CC14 ($n = 3$), O2/O6-B2-ST73 ($n = 4$) и O25-B2-ST131 ($n = 11$). Первичные нуклеотидные последовательности генов *chuA* в изучаемых геномах сравнивали с референс-последовательностью из уропатогенного штамма *E. coli* 536 (GenBank – AF280396) с помощью web-сервиса BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Результаты и обсуждение. Анализ первичной нуклеотидной последовательности гена *chuA* в изучаемых штаммах уропатогенных *E. coli* показал высокую консервативность данного гена: из 1983 нуклеотидов только 11 варьировали, причем во всех случаях замены нуклеотидов не приводили к аминокислотным заменам. Кроме того, нуклеотидные замены коррелировали с клональной принадлежностью штамма: O2-B2-ST141 (t214c, g657a и a936c), O75-B2-CC14 (t214c, g657a, a936c, g1854a и g1857a), O2/O6-B2-ST73 (t214c и t1740c), O25-B2-ST131 (c21t, t214c, g657a, c771t, t891a, c1332t, g1437a, g1854a и g1857a).

Заключение. Наличие корреляции между нуклеотидной последовательностью гена *chuA* и клональной принадлежностью штамма *E. coli* позволяет упростить методику его скрининговой идентификации и ускорить эпидемический анализ случаев инфекции. Выявленная высокая консервативность гена вирулентности *chuA* уропатогенных *E. coli*, возможно, позволит использовать этот ген в качестве молекулярной мишени при разработке вакцин.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки России (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Опыт использования полногеномного секвенатора Genolab M

Соломенцев В.И., Шишкина Л.А., Соломенцева А.Е., Лебедева А.Ю., Богун А.Г.

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

Секвенирование следующего поколения (NGS) является одной из наиболее быстро развивающихся технологий в молекулярной биологии. Помимо секвенирования полных геномов, этот метод позволяет анализировать состав микробных сообществ (метагеномика) и изучать совокупность РНК-транскриптов и профиль экспрессии генов (транскриптомика). Наиболее распространенными платформами NGS в настоящее время являются Illumina (США) и BGI/MGISEQ

(Китай), однако эти платформы имеют серьезные различия в процессе пробоподготовки, принципах генерации кластеров и процессе секвенирования и, как следствие, используют принципиально разные наборы реактивов. В настоящее время большое количество коммерческих наборов для пробоподготовки оптимизировано под технологию Illumina, в то же время сложности с поставками секвенаторов этой компании определяют необходимость поиска альтернатив. В 2022 г. на российском рынке стал коммерчески доступен секвенатор GenoLab M производства GeneMind Biosciences (Китай), работающий, как и Illumina, по технологии секвенирования путем синтеза.

В нашем исследовании мы проанализировали совместимость секвенатора Genolab M с различными наборами для пробоподготовки, доступными на российском рынке. По результатам более 50 запусков секвенатора Genolab M нами отмечена высокая совместимость данной платформы с наиболее распространенными комплектами индексов-праймеров – Nextera и TruSeq, что позволяет использовать широкий спектр наборов для подготовки ДНК-библиотек, в т.ч. от отечественных производителей.

Мониторинг распространения и анализ филогенетических линий возбудителя новой коронавирусной инфекции – еще одно актуальное направление секвенирования следующего поколения. Нами были проведены исследования с использованием как коммерческих наборов для секвенирования QIAseq DIRECT SARS-CoV-2 Kits (Quiagen, Германия), более не доступных в России, так и оптимизированного нами протокола, включающего обогащение вирусного генома с помощью панели праймеров ARTIC 3 (последовательности находятся в свободном доступе) и последующей подготовки ДНК-библиотек набором Raissol SG GM Plus от российской компании «Сесана». Сравнительный анализ показал сопоставимые результаты при меньшей стоимости пробоподготовки при использовании Raissol SG GM Plus.

Высокая совместимость секвенатора Genolab M важна при проведении транскриптомных исследований из-за ограниченного количества решений в области пробоподготовки для бактериальной транскриптомики, существующих в данный момент на российском рынке. Нами был проведен анализ транскриптомов бактериальных культур с использованием набора Zymo-Seq RiboFree Total RNA Library Kit (Zymo Research, США), оптимизированного под платформу Illumina, в ходе которого удалось получить данные высокого качества.

Таким образом, использование полногеномного секвенатора Genolab M позволяет получать геномные и транскриптомные данные высокого качества с использованием доступных в настоящее время на рынке наборов пробоподготовки.

Выявление нетипичных эритромицинчувствительных геновариантов возбудителя туляремии в Ростовской области

Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Махмудов Р.С., Носков А.К.

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

Туляремия относится к природно-очаговым инфекциям, эндемичные очаги которой широко распространены в северном полушарии земного шара, включая Россию. В последние годы регистрируется тенденция к расширению ареала циркуляции туляремийного микроба с появлением штаммов, не характерных для данного региона. Как известно, туляремийный микроб склонен к обитанию в умеренных широтах земного шара. Вместе с тем существенное потепление климата будет сопровождаться постепенным вовлечением северных территорий, изменением паразитарной системы и возможным изменением фенотипических и генетических свойств возбудителя. Поэтому изучение вопросов филогеографии туляремийного микроба представляет не только практический, но и научный интерес, так как позволяет оценить эволюционные процессы *Francisella tularensis* в современных условиях.

На основании обширного исследования чувствительности/устойчивости к эритромицину штаммов из различных регионов Олсуфьевым Н.Г. было предложено использовать этот маркер для разделения подвида *holarctica* на три биоэры: bv. I EryS, bv. II EryR и bv. *japonica* (штаммы, выделенные в Японии). Установлено, что на территории России циркулируют в основном штаммы EryR, а штаммы EryS встречаются на Дальнем Востоке и Сибири. Тем не менее до 1980 г. небольшое количество эритромицинчувствительных штаммов обнаруживали на северо-западе и в центре европейской части Российской Федерации. Современная схема генетического типирования *F. tularensis* subsp. *holarctica* определяет 4 основные филогенетические группы в пределах этого подвида (B.4, B.6, B.12 и B.16). Группа B.12 представлена исключительно EryR-штаммами, тогда как штаммы с маркером EryS распределены по другим группам. Распространение штаммов группы B.12 носит глобальный характер, в частности, на европейской территории они преобладают в Восточной Европе, а в Западной Европе доминируют представители группы B.6. В Центральной Европе циркулируют штаммы как генотипа B.12, так и B.6. Группу B.16 формируют штаммы *F. tularensis* subsp. *holarctica* bv. *japonica*. Групповая принадлежность российских EryS штаммов пока не определена. Для выявления филогенетических связей штаммов *F. tularensis* из природных очагов как России, так и Европы было проведено MLVA-типирование по 5 VNTR-локусам с последующим кластерным анализом. Примечательным является факт присутствия в европейском кластере двух штаммов, выделенных в Целинском районе Ростовской области в 1996 и 2017 гг. Установлено, что оба штамма принадлежат к подгруппе B.7 группы B.6 (EryS). Предполагается, что их появление на территории Ростовской области связано с существованием восточно-европейского маршрута перелетных птиц.

Биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу

Сотникова М.А., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Борзилов А.И., Мокриевич А.Н., Павлов В.М.

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

Целью работы было охарактеризовать биологические свойства штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена *sodB*, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу.

В работе использовались: штаммы *F. tularensis* 15 НИИЭГ и 15/sodBII, мыши линии BALB/c, мышинные макрофагоподобные клетки линии J774.1A

Результаты. Пониженный уровень экспрессии гена *sodB* в штамме *F. tularensis* 15/sodBII по сравнению с 15 НИИЭГ не влиял на захват макрофагами бактерий, но замедлял их внутриклеточное размножение в 2 раза.

Мутация в гене *sodB* снижает вирулентность штамма 15/sodBII по сравнению с 15 НИИЭГ примерно в 10 раз. При сублетальных дозах заражения мышей линии BALB/c штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ в организме животных в течение первых 7 суток происходит размножение туляремийного микроба, а затем, по мере формирования иммунного ответа, количество бактерий в организме снижается к 21-м суткам, тогда как у штамма 15/sodBII наблюдалась сниженная обсемененность печени и селезенки на всех этапах формирования иммунного ответа по сравнению с вакцинным штаммом.

Титры специфических антител у групп мышей, иммунизированных штаммами 15/SodBII и 15 НИИЭГ в дозах 80 КОЕ и 160 КОЕ соответственно, составили 1/80 и 1/160 соответственно. Оба штамма формировали у мышей достаточный уровень протективного иммунитета, позволяющий им выжить после заражения высоковирулентным штаммом Schu S4 в дозе $1 \cdot 10^3$ КОЕ. После заражения иммунных мышей штаммом Schu S4 в группе животных, иммунизированных штаммом 15/SodBII, к 15-м суткам вес животных вернулся к исходным значениям, а в группе, иммунизированной штаммом 15 НИИЭГ, вес животных не достиг исходного значения.

Сравнение обсемененности печени и селезенки мышей на 7-е сутки после заражения штаммом Schu S4 показало повышенную защиту от размножения возбудителя в органах мышей, иммунизированных штаммом 15/SodBII, по сравнению со штаммом 15 НИИЭГ.

Суммируя полученные данные, можно сказать, что у мышей, иммунизированных штаммом *F. tularensis* 15/sodBII, наблюдали пониженную реактогенность, и несколько лучшую протективность от заражения высоковирулентным штаммом *F. tularensis* Schu S4 по сравнению со штаммом *F. tularensis* 15 НИИЭГ.

Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

Сотникова М.А., Хлопова К.В., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М.

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

Целью нашей работы было исследование влияния состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ: сравнительный анализ уровней матричных РНК генов *sodB*, *sodC* и *iglC* на разных фазах роста *F. tularensis*, ростовые и морфологические параметры туляремийного микроба, а также начальные этапы диссеминации вакцинного штамма по организму экспериментальных мышей линии BALB/c.

Результаты. Изучаемый штамм в обоих средах рос без лаг-периода. Время удвоения оптической плотности (скорость роста) культур в жидкой питательной среде (ЖПС) было достоверно выше, чем в ВНИ. На поздней фазе роста культуры уровень мРНК гена *iglC* более выражен для среды ВНИ, чем для ЖПС. Количество мРНК гена *sodB* в бактериях на ранней фазе роста в ВНИ было несколько увеличено по сравнению с поздней фазой, тогда как в ЖПС количество мРНК гена *sodB* было практически одинаково на всех фазах роста. Достоверные отличия уровней мРНК гена *sodB* были выявлены на поздней фазе роста в ЖПС и ВНИ. Количество мРНК гена *sodC* в бактериях на ранней и поздней фазах роста в ВНИ было практически идентичное, тогда как в ЖПС оно было несколько повышено на поздней фазе роста по сравнению с ранней фазой.

Анализ структуры окрашенных фуксином мазков культур на 6 и 24 ч роста показал существенное отличие образцов, отобранных из среды ВНИ по сравнению с ЖПС. Окрашенный мазок бактерий 15 НИИЭГ, приготовленный из ночной агаровой культуры, образует клеточные агрегаты с минимальным количеством изолированных клеток. В процессе роста бактерий в среде ВНИ к 6-му часу роста эти агрегаты распадаются на мелкие фрагменты с образованием протяженных вытянутых структур, а к 24 ч культивирования образуют вытянутые тяжи с минимальным количеством конгломератов. В мазках образцов из бактериальной культуры, растущей в ЖПС, к 6-му часу наблюдалась пониженная агрегация по сравнению с агаровой культурой, а к 24 ч начинали возникать тяжеподобные структуры.

Полученные данные по обсемененности селезенки мышей на 3-и сутки после заражения животных дозой $1 \cdot 10^2$ КОЕ показали достоверную разницу для культур, выращенных в средах ВНИ и ЖПС, что позволяет сделать вывод о более быстрой диссеминации бактерий от места введения до селезенки мышей для культуры, выращенной в ВНИ.

Настоящее исследование показывает, что условия роста *F. tularensis* влияют на диссеминацию вакцинного штамма по организму экспериментальных животных и что при разработке среды для выращивания бактерий необходимо учитывать данный факт.

Перестройки резистома микробных сообществ тела человека в ходе терапии COVID-19

Старикова Е.В.¹, Галева Ю.С.¹, Федоров Д.Е.¹, Корнеенко Е.В.¹, Селезнева О.В.², Зорук П.Ю.², Климина К.М.², Веселовский В.А.², Олехнович Е.И.², Морозов М.Д.², Болдырева Д.И.², Сперанская А.С.¹, Янушевич О.О.³, Маев И.В.³, Крихели Н.И.³, Левченко О.В.³, Андреев Д.Н.³, Соколов Ф.С.³, Фоменко А.К.³, Девкота М.К.³, Андреев Н.Г.³, Заборовский А.В.³, Царегородцев С.В.³, Евдокимов В.В.³, Говорун В.М.¹, Ильина Е.Н.¹

¹Научно-исследовательский институт системной биологии и медицины Роспотребнадзора, Москва, Российская Федерация;

²ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины им. академика Ю.М.Лопухина» ФМБА России, Москва, Российская Федерация;

³Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И.Евдокимова Минздрава России, Москва, Российская Федерация

Распространение устойчивости бактерий к антимикробным препаратам является одной из глобальных проблем современности. Антибиотики широко применяются в медицине, ветеринарии и сельском хозяйстве, вследствие чего происходит накопление генов устойчивости к антибиотикам в микробных экосистемах, в т.ч. в микробных сообществах тела человека. Применение методов высокопроизводительного секвенирования позволяет исследовать резистом как совокупность генов устойчивости к антибиотикам в микробном сообществе.

В данном исследовании мы оценивали изменения, которые происходили в резистомах ротоглотки и кишечника пациентов в ходе терапии COVID-19. Для оценки состава генов антибиотикорезистентности (АР) мы разработали таргетную пользовательскую панель, позволяющую анализировать 4937 последовательностей детерминант АР в биологических образцах. Мы также проанализировали таксономический состав образцов путем секвенирования переменных последовательностей ампликонов гена 16s рНК.

В ходе работы нам удалось выявить по 7 «коровых» генов АР, присутствующих в большинстве образцов и кишечника. Три из этих генов являлись «коровыми» как для ротоглотки, так и кишечника, а именно гены *ermB*, *mefA* и *msrD*, ассоциированные с устойчивостью к макролидам, линкозамидам и стрептограминам и встречающиеся у бактерий рода *Streptococcus*.

Также в ходе исследования мы выявили 2 резистотипа в образцах кишечника, различающиеся по количеству и составу генов АР. Выявленные резистотипы соотносятся с кишечными энтеротипами, выявленными на основании данных секвенирования ампликонов гена 16s рНК. Мы обнаружили, что у половины исследуемых пациентов произошла смена резистотипа в течение первой недели терапии. Также у части пациентов произошла смена энтеротипа.

Таким образом, резистом подвержен временным изменениям, особенно под воздействием лекарственной нагрузки. Дальнейшее изучение микробных сообществ тела человека

позволит выявить причины и механизмы изменений, происходящих с резистомом в течение времени.

Данная работа была выполнена при поддержке ГЗ ЕГИСУ НИОКТР №122040100011–0, ГЗ ЕГИСУ НИОКТР №122030900064–9.

Молекулярно-генетическая характеристика гена *LMP-1* вируса Эпштейна–Барр у ВИЧ-инфицированных пациентов

Суслов Н.А.¹, Сахарнов Н.А.², Минаева С.В.³, Филатова Е.Н.², Попкова М.И.², Уткин О.В.²

¹Нижегородский государственный университет им. Н.И.Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация;

²ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н.Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация;

³ГБУЗ НО «Нижегородский областной центр по профилактике и борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», Нижний Новгород, Российская Федерация

lmp-1 – это ген вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), кодирующий поздний латентный трансмембранный белок 1 (LMP-1), который принимает активное участие в развитии ВЭБ-ассоциированных заболеваний. Ген *lmp-1* обладает большим полиморфизмом, что потенциально может влиять на протекание ассоциированных заболеваний у иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных лиц.

Цель. Выполнить молекулярно-генетическую характеристику фрагмента С-терминальной области гена *lmp-1* ВЭБ у ВИЧ-инфицированных пациентов.

Материалы и методы. Объектами исследования служили изоляты ВЭБ, выделенные из лейкоцитов 35 взрослых пациентов с ВИЧ-инфекцией, проходивших лечение в ГБУЗ НО «НОЦ СПИД» (г. Нижний Новгород). Нуклеотидные последовательности *lmp-1* расшифровывали методом секвенирования по Сэнгеру, использовали аппарат Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems, США) и реагенты, рекомендованные производителем. Для выравнивания и филогенетического анализа последовательностей использовали программу MEGA 11 (Mega Software, США). Поиск референсных последовательностей осуществляли в международной базе данных GenBank.

Результаты. Более половины изолятов (65,7%, 23/35) показывали наибольшую близость к геноварианту дикого типа В95.8. С меньшей частотой выявлялся геновариант NC (North Carolina) – 14,3% (5/35). В равных малых процентах были выявлены изоляты, которые образовывали кластеры с геновариантами China1 (8,6%, 3/35) и Med- (Mediterranean-) (8,6%, 3/35). Кроме того, был обнаружен изолят, кластеризовавшийся с геновариантом Alaskan, что составило 2,8% (1/35) всех последовательностей.

Определено генетическое родство между нижегородскими и сербскими изолятами, относящимися к геноварианту NC, что совпадает с данными, полученными нами ранее.

Так же, как и при результатах, полученных нами ранее от больных инфекционным мононуклеозом, геноварианты NC *Imp-1* у ВИЧ-инфицированных содержали замену D250N, не описанную в российских изолятах.

В анализируемых изолятах также стоит отметить часто встречающуюся пару мутаций, приводящих к аминокислотным заменам, – G212S/S366T, которая может иметь функциональное значение. Данная пара замен обнаружена в штаммах NC (5/5), China 1 (3/3), Alaskan (1/1) и Med- (2/3). По данным литературы, наличие точечных мутаций STAR-регионов LMP-1, нарушающих HOS-мотивы, вызывает повышение уровня активации NF-κB и протеинкиназы-B при наличии двойных (G212S/S350A, G212S/S366T) и тройной (G212S/S350A/S366T) мутаций.

Выводы. В результате анализа было выявлено доминирование геноварианта дикого типа B95.8. Найденная пара нуклеотидных замен, приводящих к мутациям G212S/S366T, требует дальнейшего изучения, так как потенциально способна вызывать трансформирующий эффект в клетках-носителях, что актуально для иммунокомпрометированных лиц с ВИЧ-инфекцией, особенно для носителей геновариантов ВЭБ с наиболее высокой трансформирующей активностью – China1 и Med+.

Анализ бактериоциногенных штаммов *Enterococcus* spp.

Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Тазина О.И., Кисличкина А.А., Сизова А.А.

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

Введение. Многие энтерококки продуцируют бактериоцины (энтероцины) – антимикробные пептиды, использование которых в качестве биоконсервантов в пищевой промышленности имеет хорошие перспективы. Отличительной особенностью энтероцинов является узкий спектр антимикробной активности, направленной, как правило, на близкородственные грамположительные виды бактерий, в частности на роды *Listeria*, *Enterococcus*, в т.ч. VRE, а также возбудителей порчи мясной продукции – бактерии родов *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Weissella*, *Clostridium*, *Staphylococcus*. При этом антимикробный эффект бактериоцинов не затрагивает основную массу нормофлоры, в то же время оставляя жизнеспособными близкородственные виды, имеющие гены иммунности против них, тем самым формируя расы микроорганизмов, адаптированных к изменяющимся условиям микрофлоры человека, хотя сама связь между бактериоцинами и факторами вирулентности молочнокислой микрофлоры далеко не изучена. Следует учитывать, что уникальной особенностью энтерококков является возможность нести в своем геноме гены сразу нескольких бактериоцинов – мультибактериоциногенные штаммы. Изучение подобных штаммов позволяет выявлять индукцию бактериоцинов при различных условиях культивирования.

Цель работы. Выявить разнообразие бактериоцинов у энтерококков, выделенных от людей и животных.

Материалы и методы. Энтерококки из клинического материала пациентов человека (клинический материал и/или культуры) были получены из Национального медицинского исследовательского центра нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации. Энтерококки от птиц выделяли из клинического материала, присланного из птицефабрик для проведения бактериологических исследований из разных регионов России (Центральный, Северо-Западный, Южный, Приволжский федеральные округа). Видовую идентификацию осуществляли с использованием анализа методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), масс-спектрально. Экстракцию белков проводили по протоколу компании Bruker Daltonics GmbH. Использовался также метод прямого нанесения культуры на планшет-мишень. Результаты суммировали с помощью программы FlexAnalysis (Bruker Daltonics GmbH). При отборе штаммов-продуцентов энтероцинов изначально проводился микробиологический скрининг на тест-штаммах листерий, стафилококков и клостридий с последующим скринингом с использованием ПЦР-анализа известных генов энтероцинов. После отбора штаммов по наличию бактериоцинов 30 штаммов были депонированы в музей ГНЦ ПМБ с присвоением номеров SCPM-O-B-8926–SCPM-O-B-8956 с последующим полногеномным секвенированием. Полногеномное секвенирование проводили с использованием прибора Illumina MiSeq (Illumina, США) и MGISeq-2000 (MGI Tech Co., Ltd, Китай) в соответствии с инструкцией производителя. Для Illumina библиотеки ДНК MiSeq были подготовлены с использованием набора для подготовки ДНК-библиотек Nextera, а полногеномное секвенирование было выполнено в соответствии с протоколами производителя с использованием набора реагентов MiSeq v3 (300 циклов). Геномы собирали de novo без первичной фильтрации с использованием программы Unicycler v. 0.4.7 с настройками по умолчанию. Для MGISeq-2000 библиотеки ДНК были подготовлены с использованием набора для подготовки ДНК-библиотеки MGIEasy FS, а полногеномное секвенирование было выполнено в соответствии с протоколами производителя с использованием набора для высокопроизводительного секвенирования MGI-Seq 2000RS PE200. Геномы были собраны de novo без первичной фильтрации с использованием программы SPAdes v. 1.13.1 с настройками по умолчанию. Окончательные сборки были аннотированы с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.

Собранные геномы подвергали скринингу на наличие генов, кодирующих устойчивость к антибиотикам, с использованием геномных инструментов *in silico* ResFinder 4.1. Для поиска генов вирулентности использовали VirulenceFinder 2.0. Поиск генов бактериоцинов проводили с помощью программы Bagel 4.

Программное обеспечение Wombac 2.0 использовалось для генерации SNP корового генома в собранных геномах. Поиск профагов проводили с помощью программы Prophage Hunter.

Результаты. Анализ полученных данных свидетельствует, что полное совпадение результатов ПЦР-анализа (из набора проверенных праймеров энтероцинов) и алгоритмов Bagel-4 отмечено у 9 штаммов. Для остальных штаммов от-

мечено или частичное совпадение, или полное расхождение. Следует отметить штамм SCPM-O-B-8926, который помимо известных энтероцинов bacteriocin 31 и SE-K4 имеет мотив со значительным совпадением с *Clostin* 574 (клострицином) – бактериоцином, ранее обнаруженным только у *Clostridium perfringens*. Также сразу 4 штамма (SCPM-O-B-8935, SCPM-O-B-8936, SCPM-O-B-8937 и SCPM-O-B-8944) обладают *Staphylococcins* C55 – двупептидным бактериоцином, присущим только стафилококкам. Штамм SCPM-O-B-8954 несет гены 4 бактериоцинов, один из которых – *Enterocin* SE-K4 – относится к энтероцину II класса, а остальные три представляют I класс – *Enterocin* NKR-5-3A, *Sactipeptides*, *Thiopeptide*. Мотивы генов, присущих энтероцинам (UviB, LAPs, Proreptin 2), но не относящиеся ни к одному из известных, обнаружены в штаммах SCPM-O-B-8945, SCPM-O-B-8954, SCPM-O-B-8955, SCPM-O-B-8956.

Выводы. 80% (24/30) штаммов имеют более одного бактериоцина, т.е. являются мультибактериоциногенными, из них 11 (37%) имеют гены 2 бактериоцинов, 12 (40%) – 3 бактериоцинов и 1 – гены 4 бактериоцинов. Выявлены гены бактериоцина стафилококков – *Staphylococcins* C55, ранее не выявляемые у энтерококков.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Молекулярная характеристика штаммов *Escherichia albertii*, выделенных при кишечной инфекции от перепелок

Теймуразов М.Г., Карцев Н.Н., Абаимова А.А., Тазина О.И.

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

Введение. *Escherichia albertii* – грамтрицательная палочка, неподвижная, не образующая спор, факультативно анаэробная, лактозоотрицательная, принадлежащая к семейству *Enterobacteriaceae*. *E. albertii* впервые была выделена при случаях диареи у детей из Бангладеш, предварительно неправильно идентифицирована как *Hafnia alvei* и классифицирована как новый вид *Escherichia* в 2003 г. Зачастую *E. albertii* ошибочно идентифицируется как энтеропатогенные (EPEC) или энтерогеморрагические *Escherichia coli* (EHEC) из-за генетического и фенотипического сходства с этими возбудителями. Например, *E. albertii* обычно несет ген *eae*, кодирующий интимин – важный фактор вирулентности, также присущий патогенным подгруппам кишечной палочки. Это, вероятно, привело к ошибочной недооценке числа инфекций, вызванных *E. albertii*. Например, при нескольких вспышках гастроэнтерита возбудитель был ошибочно диагностирован как EPEC вместо *eae*-положительной *E. albertii*. Большой проблемой остается отсутствие четкой дифференциальной диагностики, т.к. нет простого и точного диагностического протокола, в особенности типирования методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), MLST- и O-генотипирования. Штаммы *E. albertii* выделяют из различных животных источников, таких как домашняя птица,

свиньи, кошки, собаки, летучие мыши и еноты, а также сырое мясо животного происхождения, однако его естественные резервуары и пути передачи человеку остаются неопределенными. Тем не менее анализ возможных источников указывает, что именно птицы могут быть наиболее значимым резервуаром для этого патогена. Проводимые исследования направлены на выявление носительства *E. albertii* у птиц, но не на обнаружение инфекции, вызванной данной бактерией. Мы впервые в России описываем выделение изолятов *E. albertii* из кишечника птиц перепелиной фермы с признаками кишечной инфекции и характеристику полученных культур.

Цель работы. Выделение и молекулярная характеристика штаммов *E. albertii*, выделенных при кишечной инфекции от перепелок.

Материалы и методы. Живые перепелки поступили из перепелиной фермы в количестве 25 голов. В анамнезе было указано на значительный падеж поголовья в возрасте от 10 до 20 дней жизни с признаками поражения желудочно-кишечного тракта. Перепелок умертвили под хлороформным наркозом, после чего были произведены высевы на питательные среды. Содержимое кишечника высевали петлей 10 мкл на поверхность агар Эндо и далее распределяли по поверхности среды новыми петлями методом Дригальского до изолированных колоний. Выросшие колонии оценивали культурально-морфологически, после чего анализировали масс-спектрально. Штаммы *E. albertii* идентифицировали путем поиска специфичных для *E. albertii* генов, таких как ген малатдегидрогеназы (*mdh*), ген лизиноспецифического переносчика (*lysP*) и ген белка теплового шока (*clpX*) с помощью мультиплексной ПЦР. Предварительная денатурация 95 °C – 5 мин; 25 циклов: денатурация 95 °C – 1 мин, отжиг 55 °C – 1 мин, элонгация 72 °C – 1 мин. Финальная элонгация 72 °C – 3 мин. Идентификацию гена интимина – *eae* (общего между *E. albertii* и EPEC) – в культурах *E. albertii* осуществляли в соответствии с методикой референс-лаборатории Европейского союза по изучению *E. coli* «Идентификация и характеристика вероцитотоксин-продуцирующих *Escherichia coli* (VTEC) методом ПЦР-амплификации в реальном времени основных генов вирулентности и генов, ассоциированных с серогруппами, в основном ассоциированными с тяжелыми инфекциями человека». Цитолетальный токсин, вызывающий растяжение клеток (CDT), и фактор, ингибирующий цикл клетки (*cif*), – типы цикломодулинов патогенных эшерихий, не связанные с какими-то конкретными филогруппами, – исследовали с помощью специфичных праймеров (*cdtB-II*, *cdtB-III*, *cdtB-V*, *cdtB-I*, *cdtB-IV*, *cif*). Предварительная денатурация 95 °C – 5 мин; 35 циклов: денатурация 95 °C – 30 с, отжиг – 30 с, элонгация 72 °C – 30 с. Финальная элонгация 72 °C – 5 мин. Биохимическую идентификацию *E. albertii* и оценку антибиотикочувствительности проводили с использованием карт GN на приборе Vitek2 Compact. Антибиотикочувствительность изучали диск-диффузионным методом с использованием дисков НИЦФ (Санкт-Петербург), с автоматическим учетом результатов на приборе Scan 500 (Interscience).

Результаты. Выделенные культуры на агаре Эндо были лактозоотрицательными и первоначально рассматривались

как *E. coli* / *Salmonella* spp., т.к. не было выявлено значительных культурально-морфологических отличий от колоний штаммов *E. coli* и при этом птица являлась носителем сальмонелл. Масс-спектральный анализ не дал однозначной трактовки, с близкими значениями ID как для *E. albertii*, так и для *E. coli*.

Vitek2 при использовании карт GN показал, что все культуры относятся к *E. coli* с вероятностью >90%. При этом было определено, что условно они делятся на 2 группы по нетипичным для *E. coli* дифференцирующим признакам. Нехарактерные для *E. coli* признаки 1-й группы: AGAL (α -галактозидаза), BGAL (β -галактозидаза), BGUR (β -глюкуронидаза) – большинство культур, для второй группы – AGAL, BGAL, BGUR, PHOS (фосфотаза). Дальнейшая характеристика антибиотикорезистентности с использованием прибора Vitek2 и диск-диффузионного метода показала, что они отличаются и по антибиотикочувствительности. Отличие двух клональных групп *E. albertii* было в их отношении к антибиотикам ампициллину и амоксициллину/клавулоновой кислоте: в 1-й группе культуры чувствительны к ним, во 2-й – резистентны. В остальном профиль антибиотикорезистентности совпадал, культуры оказались резистентны к фторхинолонам (ципрофлоксацин, норфлоксацин), полимиксидам (колистин), аминогликозидам (амикацин, гентамицин, тайгециклин), фосфомицину. Исследование с помощью PCR-RT набора AmpliSens® Escherichiosis-FL показало, что все выделенные культуры *E. albertii* относятся к патогруппе ЕРЕС (энтеропатогенные эшерихии) и содержат ген *eae* (кодирующий интимин), кроме одной культуры, не содержащей этого гена. ПЦР на наличие специфичных для *E. albertii* генов *mdh*, *lysP* и *clpX* была положительной для всех культур, подтверждая, что они относятся к виду *E. albertii*. По результатам исследования все штаммы содержат гены *cdtB-II*, *cdtB-III*, *cdtB-V*, *cdtB-I*, *cdtB-IV*.

Выводы. В процессе исследования установлено, что по молекулярно-генетическим и фенотипическим свойствам выделенных штаммов у перепелок было не менее 2 клональных групп *E. albertii*, отличающихся по антибиотикорезистентности, биохимическим показателям и наличием гена *eae* (интимин). У всех штаммов присутствовали гены CDT-токсинов и отсутствовали гены шигатоксинов. Описанная инфекция, по-видимому, является первым доказательством того, что *E. albertii* может служить причиной смерти у промышленной птицы.

Оценка эффективности и безопасности мундтицина Р436 в качестве пищевого биоконсерванта

Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Тазина О.И., Кисличкина А.А., Светоч Э.А., Карцева А.С.

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

Введение. Применение бактериоцинов преимущественно сосредоточено в пищевой промышленности. Получение бактериоцинов с достаточной степенью чистоты, концентрации

и известной композицией неактивных компонентов, несомненно, упростит процедуру регламентации новых препаратов на рынке пищевых продуктов, а также позволит расширить область использования подобных продуктов, в частности в медицине и ветеринарии. Мы описываем мундтицин Р436, применяя критерии безопасности QPS к самому штамму-производителю и соответствие безопасности и эффективности полученного продукта в качестве пищевой добавки.

Цель работы. Оценка мундтицина Р436 с применением критериев соответствия его к требованиям к пищевым добавкам.

Материалы и методы. Штамм *Enterococcus mundtii* был депонирован в коллекции ГНЦ ПМБ «ГКПМ-Оболонск», №SCPM-O-B-8925. Полногеномное секвенирование проводили с использованием прибора Illumina MiSeq. Окончательные сборки были аннотированы с использованием NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline. Поиск генов бактериоцинов проводили с помощью программы Bagel 4. Для глубинного культивирования использовали: 5 г/л мясного экстракта, 5 г/л кислотного гидролизата казеина («Питательные среды», Оболонск). Стерильный сорбент CM Sephadex C-25 (Sigma, Швеция) вносили в объеме 10% в биореактор с питательной средой непосредственно перед культивированием. Использовали биореактор Sartorius Biostat В plus (Германия) с рабочим объемом 8 л. Культивирование вели при температуре 32 °С, с перемешиванием 120 об./мин. После культивирования биомассу вместе с сорбентом перекачивали в бутылку и автоклавились при 0,5 атм 20 мин. Далее сорбент собирали на фильтрационном сите, пропуская через него биомассу, промывали 6 объемами деионизованной воды, 2,5 л 0,1М Na₂HPO₄ pH 7,4 с 10% этанола и переносили на хроматографическую колонку ХК 50/60 (Sytiva). Хроматографию вели на хроматографе АКТА Pilot (Cytiva) с детекцией при длине волны А280 и скоростью 25 мл/мин. Сорбент промывали буфером А: 0,1М Na₂HPO₄ pH 7,4 с 10% этанола, до выхода на базовую линию. Далее промывали 6 CV буфером В: 0,1М глициновый буфер, pH 9,5, далее промывали сорбент буфером С 0,1М CH₃COONa, pH 5,0–6 CV. Элюцию мундтицина проводили 6 CV буфера D: 0,1М CH₃COONa, 0,5М NaCl, 20% этанола, 10% глицерина, pH 5,0. В собранной фракции определяли активность спот-методом на тест-штамме *Listeria monocytogenes* ATCC 19111.

Для определения антимикробной активности тестировали 321 штамм, в т.ч. *Enterococcus* spp., полученных из коллекции ATCC (штаммы VanA, VanB, VanC1,2), листерии – ATCC ($n = 5$), ГКПМ-Оболонск ($n = 54$), штаммы, выделенные нами из пищевых продуктов ($n = 33$). Штаммы клостридий – ATCC ($n = 11$) и выделенные из клинического материала ($n = 51$). Штаммы, вызывающие порчу мяса, получены из DSMZ ($n = 15$). Штаммы энтерококков, лактобацилл, педиококков, weissell получены нами из лабораторной коллекции.

Для имитации мясной продукции, обсемененной листериями, использовали тушки цыплят-бройлеров, искусственно обсемененных *L. monocytogenes* ATCC 19111 с концентрацией $\times 10^6$ КОЕ. Тушки хранили в двух температурных режимах – 4 °С и комнатная температура (20–23 °С). Исходную концентрацию бактериоцина Р436 (180 нг/мл с удельной активностью 232727 УЕ/мл) разбавляли деионизованной водой

до конечных концентраций 20, 40, 80 и 160 нг/мл по 50 мл каждой. Через 0,5, 1, 3, 24 ч отбирали по 2 образца из группы для определения степени обсемененности листериями. Положительным контролем были образцы тушек, обсемененные *L. monocytogenes* ATCC 19111 и не обработанные мундтицином Р436.

Результаты. Штамм *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 не содержит гены резистентности к антибиотикам, факторы вирулентности, присущие энтерококкам, профаги и биогенные амины. Совокупность полученных результатов указывает, что штамм является безопасным, отвечая критериям QPS. Одностадийной очисткой нам удалось получить около 230 (среднее значение и стандартное отклонение 24 проведенных экспериментов составляло 250 ± 50 мг) мг/объем мундтицина Р436 с чистотой >70%. Минимальная подавляющая концентрация (МПК) листерий, полученных из пищевых продуктов, составила в среднем 25,9 нг/мл, МПК листерий, выделенных от больных, – 14,7 нг/мл, МПК штаммов листерий из внешней среды – 23,3 нг/мл. Значения МПК для энтерококков, в т.ч. VRE, колебались от 2,5 до 40 нг/мл. Для *Clostridium perfringens* значения МПК были выше на порядок, в среднем составив 150 нг/мл. Также мундтицин Р436 был активен в отношении всех проверенных грамположительных штаммов, вызывающих порчу мясной продукции в нанограммовых концентрациях.

При опрыскивании обсемененных листериями тушек мундтицином в концентрации 160 нг/мл и хранении при температуре 4 °С уже через 30 мин произошла полная элиминация возбудителя с поверхности тушки и рост *L. monocytogenes* ATCC 19111 не наблюдался в течение всего опыта (сутки). При той же температуре тушки, обработанные мундтицином в концентрациях 40 и 80 нг/мл, показали снижение контаминации листериями к окончанию опыта (24 ч) более чем на 4 порядка ($2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл, контроль – $1,3 \cdot 10^3$ и $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл соответственно для концентраций 80 и 40 нг/мл). Результаты по образцам, хранящимся при комнатной температуре, оказались хуже – наименьшая концентрация отмечена через 3 ч после начала опыта для всех трех концентраций мундтицина – $5 \cdot 10^2$ КОЕ/мл (160 нг/мл); $4,1 \cdot 10^2$ КОЕ/мл (80 нг/мл); $1 \cdot 10^3$ КОЕ/мл (40 нг/мл) против $2 \cdot 10^7$ КОЕ/мл в контроле. Через 24 ч после начала опыта концентрация листерий увеличилась в среднем на 2 порядка – $1 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (160 нг/мл); $2 \cdot 10^5$ КОЕ/мл (80 нг/мл); $3,3 \cdot 10^4$ КОЕ/мл (40 нг/мл), но была при этом на 3 порядка ниже, чем в контроле ($5 \cdot 10^7$ КОЕ/мл).

Выводы. Полученный штамм-продуцент мундтицина Р436 *E. mundtii* SCPM-O-B-8925 безопасен для человека ввиду отсутствия факторов вирулентности и антибиотикорезистентности и может использоваться в качестве промышленного штамма-продуцента. Разработанная схема культивирования и очистки позволяет увеличить исходную продуктивность бактериоцина более чем в 3 раза, с чистотой после одностадийной очистки >70% и общей концентрацией 250 мг, выделенных из 8 л. Обладает антимикробной активностью для клинически значимых микроорганизмов, таких как листерии, клостридии, энтерококки, выделенные из различных источников, а также для грамположительных микроорганизмов, ответственных за порчу мясных продуктов. Модельные эксперименты по деконтаминации листерий

с поверхности тушек птицы мундтицином Р436 показали элиминацию листерий при концентрации 160 нг/мл и снижение уровня листерий на 3 порядка при концентрациях 40 и 80 нг/мл.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Использование биологической модели золотистых хомячков для оценки эффективности субъединичных противосибиреязвенных вакцин

Тимофеев В.С., Бахтева И.В., Хлопова К.В.

Сибирская язва – особо опасное заболевание, вызываемое спорообразующей грамположительной бактерией *Bacillus anthracis*. Одной из интересных особенностей этой инфекции является дифференциальная чувствительность к ней разных таксономических групп животных. Наиболее чувствительны к заболеванию копытные травоядные животные. Учитывая то, что копытные составляют основу сельского хозяйства, а также то, что от них заболевание может передаваться человеку, изучение механизмов патогенеза сибирской язвы, определение биологических свойств штаммов *B. anthracis* и разработка методов вакцинопрофилактики и лечения сибирской язвы скота и человека остаются актуальными. Однако почти все лаборатории, изучающие сибирскую язву, вынуждены использовать в своей работе не копытных и/или приматов, имитирующих человека, а более доступные биологические модели – мелких грызунов и кроликов. Для оценки протективности противосибиреязвенных вакцин из модельных животных используются в основном морские свинки и кролики. Но эти животные (и их содержание) сравнительно дороги, в связи с чем требуется разработка более доступной биологической модели.

Задача данной работы – оценить возможность использования биологической модели золотистых хомячков для оценки эффективности субъединичных противосибиреязвенных вакцин.

Результаты. В ходе работы мы вакцинировали три вида мелких грызунов – мышей С57BL/6, морских свинок и золотистых хомячков – двумя вариантами рекомбинантных вакцин: rPA63 (рекомбинантный протективный антиген) и rLF1PA4 (рекомбинантный белок, состоящий из слитых I домена летального фактора и IV домена протективного антигена *B. anthracis*), двукратно, с интервалом 21 день, в дозировке 50 мкг белка/мышь и 100 мкг/животное для морских свинок и хомячков с полным (первая иммунизация) и неполным (вторая иммунизация) адьювантом Фрейнда (ФА) в объемном соотношении 1:1. Через 21 день после второй иммунизации у животных были взяты образцы крови для иммунологических исследований, а через 28 дней животных заразили штаммом *B. anthracis* 71/12 в дозировках от 50 до 50000 спор/животное для морских свинок и сирийских хомячков и от 5 до 5000 спор/животное для мышей С57BL/6. Мы обнаружили, что в группах, вакцинированных rLF1PA4, титры антител составили 389 120 (102 400–819 200) у морских свинок, 450 560 (204 800–819 200) у хомячков и

12 800 (400–76 800) у мышей; в группах, вакцинированных rPA63, – 409 600, 655 360 (204 800–819 200) и 51 200 (800–102 400) соответственно. Титры у невакцинированных животных и у контрольной группы, иммунизированной только ФА, были <1000. Протективность вакцин мы оценивали по LD₅₀ заражающего штамма. Для rLF1PA4 LD₅₀ был 2,8•10⁵ (1,4•10⁵–7,1•10⁶) для золотистых хомячков и 63 (16–251) для мышей. Для морских свинок показатель не определен, так как все животные выжили. Для rPA63 LD₅₀ составил >9•10⁵ для морских свинок, 5•10³ (1,3•10³–3,2•10⁴) для золотистых хомячков и 25 (6–100) для мышей.

Выводы. Мы показали, что золотистых хомячков можно использовать для оценки эффективности рекомбинантных вакцин против сибирской язвы, так как с точки зрения выработки антител и защиты сирийские хомячки более сопоставимы с морскими свинками, чем с мышами. Модель сирийских хомячков, заражаемых вакцинным штаммом с двумя плазмидами, таким как штамм 71/112, может оказаться более полезной, чем традиционная модель заражения иммунных мышей одноплазмидными штаммами, при этом она намного дешевле, чем модель морских свинок.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Этиология пневмоний

Тимофеева Н.Ю.^{1,2}, Сармосова М.Г.², Гаврилова Э.С.^{1,2}

¹Чувашский государственный университет им. И.Н.Ульянова, Чебоксары, Российская Федерация;
²БУ «Центральная городская больница» Министерства здравоохранения Чувашской Республики, Чебоксары, Российская Федерация

Введение. Пневмония – это острое инфекционно-воспалительное заболевание респираторных отделов легких, дающее очаговые, сегментарные или тотальные поражения легочной ткани. По условиям инфицирования пневмонии подразделяют на внебольничные и госпитальные (нозокомиальные). Более 100 возбудителей могут привести к развитию внебольничной пневмонии, включая бактерии, вирусы, грибы, но наиболее часто пневмонии бывают пневмококковые (*Streptococcus pneumoniae*), стафилококковые (*Staphylococcus aureus*), микоплазменные (*Mycoplasma pneumoniae*), фридлендеровские (*Klebsiella pneumoniae*) и т.д.

Цель исследования. Оценить результаты культурального исследования мокроты пациентов с внебольничными пневмониями.

Материалы и методы. В работу включены результаты исследований анализов мокроты на микрофлору 140 пациентов с внебольничными пневмониями, госпитализированных за первое полугодие 2023 г. в пульмонологическое отделение городской больницы. Среди них 61% (85 человек) мужчин и 39% (55 человек) женщин. Все пациенты были разделены на 5 групп в зависимости от возраста: молодые (от 18 до 44 лет) – 26 мужчин и 5 женщин, среднего возраста (от 45 до 59 лет) – 20 мужчин и 18 женщин, пожилого возраста (от 60 до 74 лет) – 29 мужчин и 16 женщин, старческого

возраста (от 75 до 90 лет) – 10 мужчин и 15 женщин, долгожители (старше 90 лет) – 1 женщина.

Результаты. В ходе исследования установлено, что в 65% случаев в мокроте не было обнаружено возбудителей инфекции. В остальных 35% случаев выявлены следующие микроорганизмы: *S. aureus* – 16,3%, *K. pneumoniae* – 24,5%, *Candida albicans* – 22,5%, *Staphylococcus epidermidis* – 4%, *Enterococcus faecium* – 6%, *S. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enretobacter cloacae*, *Bacillus cereus*, *Corynebacterium xerosis*, *Bacillus subtilis* group, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli* и *Proteus mirabilis* – по 2%, смешанной этиологии – 8%. При этом среди молодых людей выявляемость составила 23 и 89%, среднего возраста – 20 и 27,8%, среди пожилых – 31 и 43,75%, среди пациентов старческого возраста – 60 и 53,3% среди мужчин и женщин соответственно. При этом стоит отметить, что выявляемость *C. albicans* была зафиксирована преимущественно среди лиц пожилого и старческого возраста, что, вероятно, связано с особенностями иммунитета пациентов этой возрастной категории, а именно развитием физиологической иммуносупрессии у пожилых, взятием мокроты на анализ после начала приема антибиотиков и попаданием в мокроту условно-патогенной микрофлоры.

Выводы. Таким образом, при культуральном исследовании мокроты у пациентов с внебольничными пневмониями были выявлены различные возбудители, преимущественно *S. aureus*, *K. pneumoniae*, а также условно-патогенная микрофлора.

Образование биопленки *Klebsiella pneumoniae* на абиотическом субстрате

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

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

В настоящее время возрастает роль *Klebsiella pneumoniae* в инфекционной патологии человека. Инфекции, вызванные этим микроорганизмом, бывают локальными и генерализованными, могут являться причиной внутрибольничных инфекций со способностью к формированию биопленок (БП).

Цель работы – изучить способность клинических штаммов *K. pneumoniae*, принадлежащих к классической и гипермукоидной группам, формировать БП на абиотических поверхностях.

В работе использованы клинические штаммы *K. pneumoniae*, выделенные в ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора при исследовании проб мокроты больных во время эпидемии COVID-19. По фенотипическому признаку штаммы разделены на классические и гипермукоидные. Для моделирования БП *K. pneumoniae* использовали запатентованный метод адгезии клеток к поверхности покровных стекол и формирование БП в динамике. Визуализацию осуществляли методами световой и люминесцентной микроскопии. Жизнеспособность планктонной и биопленочной форм *K. pneumoniae* учитывали по наличию роста на агаре.

При культивировании *K. pneumoniae* в LB-бульоне (107 м.к./мл) через 1–2 суток штаммы сформировали БП,

представленную подвижными палочками зеленого цвета во всех полях зрения всей площади покровного стекла, в отпечатках БП на агаре – типичный сплошной рост. При культивировании в физиологическом растворе через 2 суток микропрепарат БП был представлен в виде подвижных палочек в небольшом количестве, на 4-е сутки отмечалось группирование клеток, на 7-е – микропрепараты состояли из единичных подвижных палочек, небольших групп по 5 клеток и скоплений клеток в конгломераты во всех полях зрения. В противоположность этому гипермукоидный штамм отличался единичными конгломератами. Конгломераты состояли из палочек зеленого цвета, наслоенных друг на друга, между клетками просматривалось вещество мутно-зеленого цвета. На фиксированных и окрашенных Конго-красным и фуксином препаратах видны бактерии *K. pneumoniae* красного цвета, между ними – экзополисахарид (ЭПС) розового цвета, однако отличие было в количестве и размерах конгломератов. У штамма классической группы в микропрепарате обнаруживались единично расположенные палочки красного цвета, группы клеток во всех полях зрения, конгломераты большого размера с красными клетками и окрашенным в розовый цвет ЭПС. У штамма гипермукоидной группы микропрепарат представлен единично расположенными клетками во всех полях зрения, группами клеток не во всех полях зрения и конгломератами с окрашенным в розовый цвет ЭПС. Возможно, что слизиобразная субстанция у гипермукоидного штамма затрудняет его фиксацию на стекле и смывается во время приготовления препарата. На отпечатках БП на агаре наблюдали сплошной рост, типичный для каждого штамма.

Таким образом, классические и гипермукоидные штаммы *K. pneumoniae* формируют БП в питательной и голодной среде в разные сроки. Можно предположить, что на протяжении недели в голодной среде происходит адгезия клеток на покровных стеклах, наслаивание клеток друг на друга и формирование БП. Данный способ позволяет наблюдать в динамике за процессами образования БП, и в дальнейшем его можно использовать для изучения десорбции БП в моно- и смешанных культурах.

Использование модели бубонной чумы при тестировании кандидатных вакцинных препаратов в УББ-2 лаборатории

Трунякова А.С., Вагайская А.С., Мазурина Е.М., Дентовская С.В., Анисимов А.П.

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

Важным этапом в процессе создания вакцинных препаратов является демонстрация защитной эффективности, обычно включающая заражение вакцинированных и контрольных интактных животных вирулентными штаммами, воспроизводящими заболевание. На ранних стадиях разработки, когда перспективные вакцины-кандидаты должны быть первоначально охарактеризованы и доработаны, риск и сложность, связанные с использованием вирулентных тест-заражающих

штаммов при оценке протективности на модели животных, могут быть снижены за счет воспроизведения чумной инфекции в условиях лаборатории УББ-2 (УББ –уровень биологической безопасности), а не УББ-3, с использованием стандартных аттенуированных штаммов. Ранее проведенные исследования показали, что аттенуированные $\Delta rpgM$ -штаммы *Yersinia pestis*, не обладающие способностью получать железо из биологических жидкостей, восстанавливают вирулентность для мышей и морских свинок при парентеральном введении гемина или неорганического железа перед заражением.

Целью работы было определить применимость модели бубонной чумы у мышей при совместном введении $\Delta rpgM$ -штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ с декстраном железа для исследования протективности препарата бактериальных теней (БТ) *Y. pestis* KM260 (12) $\Delta rpxM$, полученных с использованием холин-эндолизинной системы чумного диагностического бактериофага Л-413С и гена E бактериофага $\phi X174$ в комплексе с капсульным антигеном (F1) и V-антигеном (LcrV) чумного микроба.

Две группы беспородных мышей были иммунизированы двукратно подкожно препаратом БТ в комплексе с антигенами F1 и V или PBS в качестве отрицательного контроля (вводили на 0-й и 14-й дни). БТ, F1- и V-антиген индуцировали у вакцинированных животных образование специфических IgG-антител со средними титрами 9600, 6400 и 350 соответственно.

На 28-й день после повторной иммунизации мышам ввели подкожно 105 КОЕ штамма *Y. pestis* EV НИИЭГ и ежедневно внутрибрюшинно вводили по 4,0 мг декстрана железа на протяжении 5 дней. Все мыши контрольной группы, иммунизированные только PBS, пали на 4–10-е сутки после заражения (средние сроки гибели – 7,8 суток). Как и ожидалось, иммунизация БТ и антигенами F1 и V обеспечила 100%-ю защиту животных от гибели после заражения. Не наблюдали значительных изменений веса после заражения у животных иммунизированной комплексом БТ с F1- и V-антигенами, в то время как у животных контрольной группы признаки заболевания и потеря веса появилась на 2-е сутки после заражения и вес снижался до гибели.

Полученные результаты подтверждают, что БТ *Y. pestis* KM260 (12) $\Delta rpxM$ в комплексе с F1- и V-антигенами чумного микроба защищают от гибели беспородных мышей, подкожно зараженных вирулентным штаммом *Y. pestis* 231 или вакцинным штаммом EV НИИЭГ, при условии введения декстрана железа.

Таким образом, в присутствии внутрибрюшинно вводимого декстрана железа штамм *Y. pestis* EV НИИЭГ можно использовать для воспроизведения бубонной чумы с выраженными патологоанатомическими изменениями и гибелью мышей в условиях УББ-2.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение №075–15–2019–1671).

Оценка иммуногенной и протективной активности штамма *Yersinia pseudotuberculosis* 85pCad+ с делецией гена *surA*

Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Гапельченкова Т.В., Светоч Т.Э., Дентовская С.В.

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

Наружная мембрана грамотрицательных бактерий содержит множество белков, помогающих поддерживать структурную целостность клеточной оболочки. Одним из них является белок SurA (Survival protein A), впервые идентифицированный как фактор, играющий важную роль в выживании клеток *Escherichia coli* в стационарной фазе роста. Показано, что парвулин-подобный домен белка обладает пептидил-пролил-изомеразной активностью, а N-концевой домен – шаперонной активностью. Установлено, что именно шаперонная функция связана с ролью SurA в патогенезе инфекций, вызываемых некоторыми видами бактерий. Например, делеция гена *surA* оказывает плейотропный эффект на бактериальную клетку *Yersinia pseudotuberculosis*, ведущий к аттенуации штамма для мышинной модели инфекции, что отчасти может быть связано с ролью белка в биогенезе наружной мембраны, а именно утратой мутантным штаммом инвазина Inv, необходимого возбудителю псевдотуберкулеза для процесса инвазии.

Штамм *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+ с делецией гена *surA* был получен методом конъюгативного переноса с использованием суицидного вектора pCVD442. Для предотвращения потери штаммами *Y. pseudotuberculosis* плазмиды кальцийзависимости pCad при любых манипуляциях в среду добавляли хлорид кальция до концентрации 2,5 мМ. Вирулентность сконструированного мутанта *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+Δ*surA* определяли по величине LD₅₀ по сравнению с исходным штаммом *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+ для беспородных мышей, зараженных подкожно, внутрибрюшинно и перорально.

Штамм 85pCad+Δ*surA* был авирулентен при любых способах введения. Все мыши в течение срока наблюдения (21 сутки) после введения максимальных доз (2•10⁸ КОЕ) не проявляли признаков заболевания, тогда как мыши, зараженные исходным вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+, начинали погибать уже на 3-и сутки. При подкожном и пероральном введении штамма 85pCad+Δ*surA* уровень специфических IgG-антител у мышей держался на достаточно низком уровне и составлял 600 ± 490 и 267 ± 65 соответственно, а при внутрибрюшинном введении достигал 1400 ± 890.

Штамм 85pCad+Δ*surA* обеспечивал 100%-ю защиту животных при последующем заражении вирулентным штаммом *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+ в дозе 5•10⁷ КОЕ при подкожном и 3•10⁷ КОЕ при пероральном способе введения. При внутрибрюшинном введении 3•10⁷ КОЕ вирулентного штамма уровень защиты составлял 70 и 100% в зависимости от использованной иммунизирующей дозы.

Таким образом, протективная активность сконструированного мутанта *Y. pseudotuberculosis* 85pCad+Δ*surA* остава-

лась на высоком уровне при подкожном, пероральном и внутрибрюшинном способах введения. Поэтому целесообразным является использование данного мутанта в качестве основы при конструировании кандидата в вакцинные штаммы против инфекций, вызываемых штаммами *Y. pseudotuberculosis*.

Изучение влияния экзометаболитов микробиоты кишечника человека с разной степенью дисбиоза на ростовые свойства штаммов *Vibrio cholerae*

Федотова И.С.¹, Миронова Л.В.¹, Григорова Е.В.², Белькова Н.Л.²

¹ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация;

²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», Иркутск, Российская Федерация

Микробиота кишечника человека выполняет функцию защиты от патогенов. Изучение особенностей ее влияния на штаммы *Vibrio cholerae* различной геномной организации *in vitro* может быть ключом к построению модели их взаимоотношений и применению ее в области профилактики холеры.

Цель. Исследовать в эксперименте ростовые свойства штаммов *V. cholerae* в присутствии экзометаболитов микробиоты кишечника человека с разной степенью дисбиоза.

Материалы и методы. В работе был использован биологический материал (фекалии); определение степени дисбиоза проводилось при помощи отраслевого стандарта «Дисбактериоз кишечника. Протокол ведения больных». Дизайн исследования заключался в независимом анаэробном культивировании 11 фекальных проб на среде АК1 с добавками в течение 24 ч, последующей стерилизации культуральной жидкости фильтрованием и пассаже одного токсигенного и двух нетоксигенных штаммов *V. cholerae* в фильтрах в сопровождении контролей. В контрольных точках эксперимента (0, 6, 24 ч) были произведены высевы на щелочной агар и отбор среды для экстракции ДНК осаждением и проведения qPCR.

Результаты. Анализ результатов бактериологического исследования показал, что 1-я и 2-я степени дисбиоза определены для 5 фекальных проб в каждом случае, 3-я степень – в одной пробе. В 10 пробах выявлено пониженное содержание бифидобактерий, при этом титр лактобактерий в 9 случаях был в пределах нормы. В 8 пробах зафиксирован низкий титр *Escherichia coli* с нормальной ферментативной активностью, в одной пробе обнаружен высокий титр гемолитической *E. coli*. Условно-патогенные бактерии *Enterobacter cloacae* и *Klebsiella pneumoniae* отмечали при 2-й и 3-й степени дисбиоза кишечной микробиоты. Повышенное содержание *E. cloacae* было обнаружено в двух пробах, в то время как *K. pneumoniae* – в трех.

В ходе экспериментального изучения было показано полное подавление ростовых свойств штаммов *V. cholerae* совокупностью экзометаболитов 8 проб биологического матери-

ала 1-й и 2-й степеней дисбиоза, что подтверждалось в qPCR отсутствием нарастания циклов (ct) в контрольных точках эксперимента. При культивировании вибрионов на питательной среде с экзометаболитами других трех проб с 1, 2 и 3-й степенями дисбиоза, пониженным титром *E. coli* с нормальной ферментативной активностью (3 пробы) и бифидобактерий (2 пробы) и повышенным содержанием *E. cloacae* (1 проба) наблюдалось нарастание концентраций холерного вибриона, все вибрионы после пассажа имели типичный фенотип на щелочном агаре, циклы qPCR соответствовали таковым контрольных проб без метаболитов.

Установлено подавление ростовых свойств *V. cholerae* экзометаболитами отдельных проб микробиоты кишечника человека независимо от выявленной степени дисбиоза. Поиск биологических агентов, влияющих на ростовые свойства штаммов *V. cholerae* в эксперименте продолжается.

Активность эндолизина LysSA18 в отношении клинических метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*

Фурсова А.Д., Скрябин Ю.П., Шишкова Н.А., Абаев И.В.

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

Бактериальная антибиотикорезистентность является глобальной проблемой, которая требует поиска альтернативных подходов. Одним из клинически значимых среди устойчивых к антибактериальным препаратам видов является *Staphylococcus aureus*. Кодированные бактериофагами эндолизина, способные разрушать клеточные стенки бактерий, становятся перспективным инструментом в борьбе с инфекционными заболеваниями. Создание антистафилококковых препаратов на основе эндолизинов является актуальной задачей практической медицины.

Целью данного исследования является характеристика литических свойств эндолизина LysSA18 против клинических метициллинрезистентных штаммов *S. aureus*.

Материалы и методы. В ходе исследования была проведена оптимизация продукции эндолизина штаммом-продуцентом *Escherichia coli* BL21 (DE3) pET21 α _LysSA18 при разных вариантах температуры инкубации (19–37 °C), времени инкубации (2–18 ч), а также проведено тестирование кинетики литической активности эндолизина LysSA18 с использованием микропланшетного спектрофотометра xMark (BioRad, США). Литическую эффективность эндолизина определяли методом высева серийных разведений (КОЕ/мл).

Результаты. Наибольший выход белка наблюдался при повышенной температуре культивирования и времени инкубации >6 ч. Увеличение времени инкубации увеличивает выход эндолизина LysSA18, но также приводит к его переходу в тельца включения и потере активности белка. Восстановить литические свойства белка при растворении осадка не удалось. Таким образом, был выбран режим инкубации, сохраняющий активность белка, при котором растворимая фракция преобладала над нерастворимой: 25–27 °C,

2–4 ч. Также в ходе исследований было установлено, что эндолизин LysSA18 эффективно лизирует клинические метициллинрезистентные штаммы *S. aureus*. Снижение показателя КОЕ/мл составило 106–107 относительно контрольного образца. При проверке стабильности хранения эндолизина LysSA18 было показано, что он сохраняет литическую активность при комнатной температуре (26 °C) в течение 12 ч, а при 4 °C – >48 ч.

Выводы. Рекомбинантный эндолизин LysSA18 эффективен против клинических метициллинрезистентных штаммов *S. aureus* и сохраняет литическую активность при комнатной температуре продолжительное время. Данный белок является перспективной разработкой в качестве антистафилококкового агента.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Молекулярная эпидемиология ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в хирургических и реанимационных отделениях стационаров Республики Северная Осетия – Алания

Хабалова Н.Р., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Лялина Л.В., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Бутаев А.К., Бутаева Л.М., Хапсаева М.Э.

ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Российская Федерация; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Северная Осетия – Алания», Владикавказ, Российская Федерация

Исследования, проведенные на базе ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора в 2015–2022 гг., показали, что ведущими возбудителями инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в отделениях хирургии и реанимации многопрофильных стационаров Республики Северная Осетия – Алания являются *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*.

Среди штаммов *P. aeruginosa* MDR-фенотип был выявлен у 40,7% от числа всех исследованных штаммов, к XDR-фенотипу относились 27,1% штаммов.

Полимеразная цепная реакция в режиме реального времени не выявила у штаммов *P. aeruginosa* наиболее распространенные гены, кодирующие продукцию карбапенемаз (металло- β -лактамаз генетических групп VIM, IMP и NDM).

MDR-фенотип был выявлен у 31,7% от числа всех исследованных штаммов *Staphylococcus* spp. У 11,4% был выявлен XDR-фенотип. 15,6% штаммов относились к MRSA.

Устойчивость штаммов *E. coli* к цефалоспорином III поколения была вызвана продукцией β -лактамаз расширенного спектра, а устойчивость к карбапенемам – продукцией карбапенемаз. 6,2% штаммов относились к XDR-фенотипу.

23,1% устойчивых к цефалоспорином 3-го поколения штаммов *K. pneumoniae* продуцировали β-лактамазы расширенного спектра, а 9,0% устойчивых к карбапенемам штаммов – карбапенемазы. Более 40,0% устойчивых штаммов *K. pneumoniae* относились к MDR-фенотипу.

Молекулярно-генетические методы исследования выявили, что штаммы *E. coli*, устойчивые к ампициллину, продуцируют β-лактамазу широкого спектра TEM-1.

Установлено, что устойчивость к цефалоспорином III–IV поколения у штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* была обусловлена продукцией β-лактамаз расширенного спектра, относящихся к генетической группе CTX–M-1.

Электрофорез в пульсирующем электрическом поле показал, что штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae* характеризовались внутривидовой гетерогенностью по спектру резистентности к антимикробным препаратам и PFGE-профилям.

Результаты полногеномного секвенирования показали, что штаммы *K. pneumoniae* – ведущие возбудители инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, выделенные от пациентов хирургических и реанимационных отделений многопрофильных стационаров Республики Северная Осетия – Алания, относились к сиквенс-типу 1082. Данный сиквенс-тип характеризуется высоким потенциалом к пандемическому распространению и ранее был выделен в медицинских организациях во многих странах.

Состав аэробной микробиоты при инфекциях верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов г. Челябинска

Хайдаршина Н.Э.¹, Катаева Е.И.¹, Бахарева Л.И.², Бурмистрова А.Л.¹

¹ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, Российская Федерация;

²ГАУЗ «Городская клиническая больница №6 г. Челябинск», Челябинск, Российская Федерация

Введение. Инфекции в верхних отделах респираторного тракта составляют значительную часть в структуре всех оппортунистических процессов. Их особенностью является изменение состава нормобиоты в целом.

Цель. Описать состав аэробной микробиоты верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов г. Челябинска при оппортунистических инфекциях данной локализации.

Материалы и методы. Анализ выполнен с помощью автоматизированной системы регистрации и учета результатов исследований «Микроб-2». Данные собраны за период 2020–2022 гг. Клинические образцы отбирались у амбулаторных больных с инфекцией верхних дыхательных (слизистая носоглотки, зева), которые наблюдались в одной из поликлиник Metallургического района г. Челябинска, возраст 18–60 лет. Материал высевали на кровяной агар условно-количественным методом; изоляты идентифицировали по стандартной биохимических тестов.

Результаты. В ходе исследования из материала пациентов с инфекцией верхних дыхательных путей выделены 317 штаммов разных видов микроорганизмов.

В составе ведущих представителей микробиоты обнаружены: *Staphylococcus aureus* (39%), *Streptococcus pneumoniae* (11%), *Candida albicans* (7%), *Staphylococcus epidermidis* (7%), *Klebsiella pneumoniae* (7%), *Staphylococcus haemolyticus* (5%), *Escherichia coli* (3%). Остальные виды выделены в единичных случаях, в сумме составляя 19%. К ним относились 39 видов условно-патогенных бактерий, а именно: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae* и *Haemophilus parainfluenzae*, *Burkholderia cepacia*, *Citrobacter freundii* и др.

Микробиота верхних дыхательных путей – это ассоциация более 40 различных видов прокариот, которые относятся к аэробной и анаэробной группе. Нами выделены двух-, трех- и четырехкомпонентные комбинации аэробных представителей бактерий.

Чаще выделялись двухкомпонентные ассоциации аэробов – 237 культур (89% от числа всех полученных ассоциаций). Из них к ведущим симбионтам относились: *S. aureus* + *C. albicans* (14%), *S. pneumoniae* + *S. aureus* (9%), *K. pneumoniae* + *S. aureus* (6%); *K. pneumoniae* + *C. albicans* (4%). Остальные сочетания (56%) встречались в единичных случаях.

Трехкомпонентные культуры выделены в количестве 29, что составило 11%. Шесть ассоциаций (2%) включали виды *S. pneumoniae* + *S. aureus* + *C. albicans*, остальные встречались в единичных вариантах, в сумме составляя 8%.

Четырехкомпонентная ассоциация аэробных представителей нормобиоты была выделена однажды, что составило 0,4% от всех исследованных за описанный период. В нее вошли следующие виды: *S. pneumoniae*, *E. coli*, *Candida parapsilosis*, *S. aureus*.

Выводы. Ведущие представители нормобиоты слизистой верхних дыхательных путей при оппортунистических инфекциях – *S. aureus* и *S. pneumoniae*, которые выделялись с частотой 39 и 11% соответственно. Они обнаружены в составе двухкомпонентной культуры (89%), трехкомпонентной (11%), четырехкомпонентной комбинации (0,4%).

Антибиотикорезистентность возбудителей инфекций мочевыводящих путей в современной медицинской практике

Хацкая С.В., Собирова Л.Д.

Ташкентская медицинская академия, Ташкент, Узбекистан

Актуальность. Одной из частых причин назначения антибиотикотерапии (АБТ) является инфекция мочевыводящих путей (ИМВП). От верного выбора антибактериального препарата при ИМВП зависит скорость и эффективность излечения пациента. Выбор АБТ при лечении ИМВП должен диктоваться предполагаемым возбудителем. Однако необходимо начинать лечение до получения результатов посева мочи, поэтому в терапии ИМВП используется эмпирическое лечение антибиотиками широкого спектра действия. Это приводит к очень быстрому росту антимикробной резистентности (АМР).

Цель исследования. Проанализировать частоту встречаемости и устойчивость возбудителей к антибактериальным препаратам, выделенных из культуры мочи пациентов с ИМВП с апреля 2022 г. по ноябрь 2022 г.

Материалы и методы. Исследование проводилось на базе бактериологической лаборатории кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Ташкентской медицинской академии. Анализировали результаты посева мочи 90 амбулаторных больных. Материал был собран в стерильную посуду до антибиотикотерапии и посеян методом Голда на чашки Петри со средой Эндо и кровяным агаром. Затем проводили идентификацию выделенного возбудителя по культуральным, морфологическим, ферментативным и антигенным свойствам. Антибиотикочувствительность определяли диско-диффузионным методом. Статистическую обработку проводили с использованием программного обеспечения MS Excel.

Полученные результаты. Рост микроорганизмов наблюдалось у 97,8% больных ($n = 90$). Наиболее распространены из всех выделенных уропатогенов были семейства энтеробактерии (52,3%) и кокковые бактерии (46,6%). В единичном случае обнаружены неферментирующие бактерии (1,1%). Из представителей семейства энтеробактерий преобладал *Enterobacter* spp. (67,4%), *Escherichia coli* (17,4%), в одинаковом соотношении были *Citobacter* spp. и *Klebsiella* spp. (4,3%), *Proteus* spp. (6,5%). Среди коковых бактерий большую долю составили *Staphylococcus haemolyticus* (63,4%), *Streptococcus* spp. (17,7%), в равном количестве *Staphylococcus aureus* и *Staphylococcus epidermidis* (9,8%).

У всех представителей коковых бактерий отмечена устойчивость к макролидам – >60% случаев. Необходимо подчеркнуть, что восприимчивость этих представителей к оксигинолонам была от 41,2 до 55,6%, к сульфониламидам – 66,7% (широко используются в лечении ИМВП). В то же время *S. epidermidis* и *S. aureus* были высокочувствительны к аминогликозидам (71,1%).

К цефалоспорином были устойчивы все представители семейства энтеробактерий в 60% случаев, зато восприимчивы к оксигинолонам от 43,5 до 80% и сульфониламидам – 71,4%. *Enterobacter* spp. чувствителен к аминогликозидам (60,7%), но резистентен к препаратам группы тетрациклина и макролидов (>50%). У *Proteus* spp. наблюдалась устойчивость к макролидам, тетрациклину и рифампицину вместе с левомецетином (66,7%).

Выводы

Высокорезистентными по отношению к макролидам и аминогликозидам были кокковые микроорганизмы.

Лидирующую позицию по резистентности к цефалоспорином занимают представители семейства *Enterobacteriaceae*.

Основными возбудителями ИМВП, по нашим данным, были *Enterobacter* spp. и *S. haemolyticus*.

Вышеуказанные сведения следует учитывать клиницистам в стратегии рациональной фармакотерапии ИМВП.

Разработка безопасного протокола лиофилизации микроорганизмов в аппарате камерного типа Alpha 2–4 LSCplus

Хвойнова И.Г., Архипенко С.С., Юденич С.В., Токмакова Е.Г.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация

В процессе лиофилизации патогенных микроорганизмов в сушках камерного типа имеется риск контаминации внутреннего объема камеры и окружающей среды, что ограничивает применение аппаратов данного типа и предполагает использование дополнительных укрытий (Червякова и соавт., 2014).

Цель исследования – оценка возможности разработки биологически безопасной процедуры лиофилизации бактерий в аппарате Alpha 2–4 LSCplus.

Коллекция Иркутского противочумного института укомплектована аппаратом данной модели в августе 2018 г. После ряда экспериментов по высушиванию стерильной защитной сахарозо-агаро-желатиновой среды был определен оптимальный протокол высушивания по принципу «двух камер». Продукт предварительно замораживали при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ в низкотемпературном холодильнике в течение 18–24 ч, а затем помещали на охлажденную полку в камере аппарата. Окончательный вариант программы включает 7 этапов:

I этап – заморозка (температура полки $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, давление 1000 mbar, продолжительность 20 мин);

II – начальная лиофилизация ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, нагнетание жесткого вакуума до 0,1 mbar, 5 мин);

III–VI – основная сушка: III (прогрев полки до $+8\text{--}9\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,1 mbar, 20 мин); IV (прогрев полки до $+20\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,1 mbar, 20 мин); V (прогрев полки до $+30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,1 mbar, 20 мин) этапы; VI ($+30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,08 mbar, 4 ч);

VII этап – переходный ($+35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,08 mbar, 5 мин);

VIII – досушивание ($+35\text{ }^{\circ}\text{C}$, 0,08 mbar, 2 ч).

Продолжительность полного цикла лиофилизации без учета периода в низкотемпературном холодильнике – 7,5 ч.

Пробные сушки бактериальной массы (всего пять) непатогенного штамма *Escherichia coli* M-17 провели в 2019 г. После каждого цикла контролировали обсемененность внутренних поверхностей камеры двукратно: до обработки 70%-м этанолом и после. Забирали смывы со стенки (проба №1), дна (проба №2) камеры, полки и внутренней поверхности крышки аппарата (проба №3) с последующим посевом на чашки агара Хоттингера. Всего было протестировано по 15 смывов до и после обработки. Смывы, взятые перед дезинфекцией, в 14 случаях были стерильны, после обработки – в 12 случаях. В трех контаминированных пробах выросшие колонии морфологически отличались от *E. coli* – были выпуклыми и имели лимонную пигментацию. В одной пробе выросли две полупрозрачные округлые колонии, которые были подвергнуты ускоренной идентификации масс-спектрометрическим методом. Результат идентификации – псевдомонас, максимальный числовой показатель для первой колонии 1,921, для второй – 1,95.

Чистота лиофилизированной культуры была удовлетворительной, остаточная влажность в пределах нормы (0,8–2,1%).

Таким образом, применение разработанного нами протокола лиофилизации бактерий в аппарате камерного типа Alpha 2–4 LSCplus обеспечило отсутствие контаминации высушиваемым микроорганизмом внутреннего пространства камеры и подтвердило возможность ее биологически безопасной эксплуатации.

Оптимизация процесса спорообразования непатогенных бациллярных штаммов-продуцентов сибиреязвенного протективного антигена

Хлопова Г.М., Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Тимофеев В.С.

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

Сибирская язва – особо опасная инфекция, вызываемая бактерией *Bacillus anthracis*. Основой профилактики этой инфекции является вакцинация животных и людей из группы риска. До сих пор в качестве противосибиреязвенных вакцин применяются преимущественно живые вакцинные штаммы. Однако ввиду их остаточной реактогенности и высоких требований к обеспечению биологической безопасности производства живых вакцин перспективным направлением считается разработка субъединичных противосибиреязвенных вакцин, главным компонентом которых являются рекомбинантные иммуногенные белки *B. anthracis*, ключевым из которых является протективный антиген. Одним из подходов к снижению количества целевого белка, выпадающего в тельца включения и нуждающегося в рефолдинге, является использование бациллярных непатогенных штаммов-продуцентов. Для длительного хранения бациллярные культуры из вегетативной формы переводят в спорую. При переходе вегетативной клетки в спорую существует риск элиминации введенной плазмиды. Степень риска потери плазмиды зачастую зависит от условий проведения споруляции и состава питательного субстрата.

Цель работы. Оптимизировать процесс спорообразования штаммов *B. anthracis* СТИ-Rif и *B. subtilis* RIK1285, несущих экспрессирующий вектор pNCMO2 и pBE-S с проклонированным геном протективного антигена *B. anthracis*, изучить необходимость внесения маркерного антибиотика в среду культивирования для сохранности плазмид и оценить риск элиминации целевого вектора.

Результаты. Споруляция проводилась на плотной питательной среде (ППС) с дефицитом питательных веществ «голодный агар» (ГА). Споруляция одновременно проводилась на ГА без антибиотика и на ГА с концентрацией канамицина (Km) 25, 20, 16 и 14 мкг/мл. Наибольшая концентрация зрелых и термостабильных спор – $9 \cdot 10^8$ – $2,5 \cdot 10^9$ КОЕ/мл – была при использовании ГА без антибиотика, но 35–40% всех спор при этом утратили целевой вектор. При использовании ГА с концентрацией Km 25 и 20 мкг/мл потеря вектора

не наблюдается, но спорообразование проходит дольше (7–12 суток против 5–7 без антибиотика), при этом концентрация полученных спор после смыва с ППС снижается до $4,5 \cdot 10^5$ – $1,5 \cdot 10^6$ КОЕ/мл, а также снижается их термостабильность. Снижение концентрации Km до 14–16 мкг/мл позволяет сохранить приемлемую концентрацию спор – $1 \cdot 10^8$ – $1 \cdot 10^9$. При этом количество клеток, потерявших целевые плазмиды, не превышает 15%. Полученные споры термостабильны и пригодны для дальнейшей лиофилизации и длительного хранения.

Заключение. Снижение в процессе спорообразования штаммов *B. anthracis* СТИ-Rif и *B. subtilis* RIK1285, несущих экспрессирующий вектор pNCMO2 и pBE-S с проклонированным геном протективного антигена *B. anthracis* концентрации антибиотика на 20–30% от используемой при культивировании штамма позволяет получить оптимальный результат с точки зрения концентрации споровой суспензии, ее жизнеспособности и количества клеток, сохранивших экспрессирующую плазмиду.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Потенциальная роль полиморфизма факторов патогенности сибиреязвенного микроба в дифференциальной вирулентности его штаммов для лабораторных животных

Хлопова К.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Евсеева В.В., Гончарова Ю.О., Тимофеев В.С.

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

Сибирская язва – особо опасный антропозооноз, вызываемый грамположительной споробразующей бактерией *Bacillus anthracis*. Этот вид крайне мономорфен генетически и фенотипически. Тем не менее существует ряд публикаций, в которых авторы разделяют штаммы *B. anthracis* по самому главному фенотипическому свойству, вирулентности, и пытаются найти причины этих различий – от разницы в географическом происхождении до разницы в копияности плазмид вирулентности. Но ни в одной из таких работ не исследовано влияние на вирулентность MVLSpXO1-генотипа, то есть аллельного профиля генов токсинообразования, расположенных на плазмиде pXO1.

Цель работы. Определить различия по вирулентности для лабораторных животных штаммов *B. anthracis*, отличающихся по аллельному профилю генов токсинообразования.

Результаты. Мы действительно обнаружили, что вирулентность штаммов *B. anthracis* для лабораторных животных значимо отличалась в зависимости от генотипа MLSTpXO1. Так, для мышей штаммы, принадлежащие генотипу MVSTpXO1-G5, распространенному в Арктике, Южной Сибири и на Алтае, были наиболее вирулентными. Гибель мышей, зараженных этими штаммами, была в среднем в 2 раза выше, чем, в других группах, и составила 87%.

Для золотистых хомячков наиболее вирулентным оказался MVLSTpXO1-GT3, распространенный в степной зоне бывшего СССР. Гибель хомячков после заражения этим штаммом также была достоверно выше, чем в других группах, в 1,6–2,8 раза и составила 56%.

В следующем эксперименте мы изучали различие в вирулентности штаммов с разным MVLSTpXO1-генотипом для морских свинок. В связи с более высокой по сравнению с мышами и хомячками чувствительностью свинок к сибиреязвенной инфекции, которая не позволяет оценить различия в вирулентности, мы использовали модель, в которой сравнивается вирулентность для интактных и вакцинированных животных. Для получения иммунных животных морских свинок предварительно вакцинировали препаратом рекомбинантного протективного антигена PA63 в дозе 100 мкг белка/свинку, подкожно, двукратно с интервалом 21 сутки. На 28-е сутки после иммунизации иммунных и интактных животных заражали штаммами *B. anthracis* LP4Ya (GT2) и LP5Ya (GT5). Мы обнаружили, что достоверная разница между вакцинированными и интактными животными (30 и 80% гибели соответственно) наблюдается лишь у морских свинок, зараженных штаммом LP4Ya, но не штаммом LP5Ya (37 и 50% гибели соответственно).

Заключение. Таким образом, на трех биологических моделях мы показали, что различия последовательности основных факторов патогенности *B. anthracis* могут влиять на ее вирулентные свойства. К сожалению, у нас нет оснований экстраполировать данные, полученные на мелких грызунах, на крупных копытных, являющихся основными хозяевами сибирской язвы в природе. Но ввиду отсутствия возможности проведения экспериментов над копытными и даже соответствующих полевых наблюдений даже наши данные могут послужить лучшему пониманию биологии сибиреязвенного микроба.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Разработка магноиммуносорбентов для селективного концентрирования токсинов бактериальной природы на основе магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами

Хлынцева А.Е.¹, Шкуратова М.А.¹, Жарникова И.В.², Геогджаян А.С.², Русанова Д.В.², Калмантаева О.В.¹, Зенинская Н.А.¹, Шемякин И.Г.¹, Фирстова В.В.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, Ставрополь, Российская Федерация

Одной из основных задач практического здравоохранения Российской Федерации является эпидемиологический мониторинг за инфекционными заболеваниями, уменьшение возможности их распространения и разработка эффективных мер профилактики. Поэтому на приоритетном месте стоят вопросы разработки и совершенствования технологий

изготовления препаратов, позволяющих в короткие сроки определить причину эпидемических осложнений и провести противоэпидемические мероприятия. Идентификация патогенов проводится молекулярно-генетическими и иммунологическими методами. Эффективность ряда методов индикации и выделения возбудителей инфекционных заболеваний и их антигенов, токсинов может быть значительно увеличена после предварительного их концентрирования с отделением от контаминирующей микрофлоры и примесей. Эта цель может быть достигнута путем применения методов иммуносорбции, особое место среди которых занимают методы с использованием сорбентов с магнитными свойствами. Магносорбенты (МС) служат в качестве твердой фазы для селективного концентрирования на их поверхности патогенов. Использование высокоаффинных и специфичных моноклональных антител (МКА) повышает чувствительность и специфичность магноиммуносорбентов (МИС).

Целью работы являлась разработка МИС для селективного концентрирования токсинов бактериальной природы с последующей детекцией в иммуноферментном анализе (ИФА).

В работе использовали магносорбенты на основе двухвалентного оксида железа (МС1) и магносорбенты на основе сульфата железа (МС2), полученные сотрудниками ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора. Для разработки магноиммуносорбентов с последующей детекцией в ИФА использовали пары высокоаффинных и специфических МКА к легкой цепи ботулотоксина типа А (1G4 и 1F9), МКА к тяжелой цепи ботулотоксина типа А (2B11 и 1F8) и МКА к А-субъединице шигатоксина 2-го типа *Escherichia coli* Stx2A (16B4 и 15B4), полученные и охарактеризованные сотрудниками ФБУН ГНЦ ПМБ. Полученные МИС тестировали в ИФА. Наилучшие результаты получены при постановке ИФА с МИС на основе МС1. Данные МИС показали аналитическую чувствительность (25 мкг токсина) и воспроизводимость.

Работа выполнена в рамках Государственного задания НИОКР 1.1.14.

Диски индикаторные картонные с противомикробными лекарственными средствами

Холодков С.В., Котляр М.А.

ЗАО «ЭКОлаб», Электрогорск, Российская Федерация

Основные принципы антибактериальной терапии – избирательная токсичность препарата в отношении патогенного микроорганизма и относительная безопасность для организма человека или животного. Для их выполнения большое значение имеет использование только тех антибиотиков, которые обладают гарантированным подавляющим действием против конкретных микроорганизмов.

Диски индикаторные картонные с противомикробными лекарственными средствами (ПЛС) предназначены для определения чувствительности микроорганизмов к ПЛС диск-диффузионным методом в клинической лабораторной диагностике *in vitro* для принятия решений по лечению инфекционного заболевания.

Диск-диффузионный метод определения чувствительности основан на способности ПЛС диффундировать из питательных ими картонных дисков в питательную среду, угнетая рост микроорганизмов, посеянных на поверхности агара.

Для исследований используют чистые культуры микроорганизмов, выделенные из клинического материала.

Микроорганизмы по отношению к конкретному виду антибиотика могут характеризоваться как чувствительные, условно-устойчивые и устойчивые. Чувствительными микроорганизмами являются те, что подавляются рекомендованными дозами антибактериального препарата. Условно-устойчивые для подавления требуют увеличение дозы. Активность устойчивых патогенных микроорганизмов не подавляется даже повышенными дозами антибиотика.

Чувствительность микрофлоры к антибиотикам индивидуальна: у разных людей бактерии могут реагировать на одни и те же антибиотики по-разному. Поэтому назначение антибактериальных препаратов на основании лишь среднестатистической картины не всегда дает желаемый лечебный эффект. Любой антибиотик – это серьезное лечебное средство, обладающее побочными действиями. В частности, при его применении гибнут не только патогенные бактерии, но и полезные микроорганизмы.

Основной целью определения чувствительности микроорганизмов к ПЛС является прогнозирование их эффективности при лечении инфекций у конкретных пациентов.

Диско-диффузионный метод является одним из старейших и остается наиболее распространенным методом оценки антибиотикочувствительности в обычных бактериологических лабораториях. Метод подходит для исследования большинства бактериальных патогенов, в т.ч. и для наиболее распространенных бактерий со сложными питательными потребностями. Метод является универсальным для широкого круга антимикробных препаратов и не требует обязательного использования специального оборудования.

В настоящее время в ЗАО «ЭКОлаб» идет освоение производства набора «Диски индикаторные картонные с противомикробными лекарственными средствами» («ДИ-ПЛС»).

Набор выпускается в 133 вариантах комплектации, которые включают практически все антибиотики, применяемые в лечебной практике на территории России. Во все комплекты входят диски с противомикробными лекарственными средствами в количестве 100 штук, упакованные во флакон вместимостью 10,0 мл.

Резистом основных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у больных г. Красноярск

Хохлова О.Е.¹, Камшилова В.В.², Акушева Д.Н.³, Ларионова И.А.³, Федюкович Н.В.², Авдеева В.А.¹, Евсеева М.А.¹, Кисличкина А.А.¹, Богун А.Г.¹, Фурсова Н.К.¹

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

²КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи им. Н.С.Карповича», Красноярск, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф.Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Российская Федерация

Цель – исследование механизмов резистентности к антимикробным препаратам возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у госпитализированных больных.

Изучены ESKAPE-патогены: MRSA ($n = 18$), *Enterococcus faecium* ($n = 10$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 37$), *Acinetobacter baumannii* ($n = 21$), *Klebsiella pneumoniae* ($n = 85$), выделенные от больных КГБУЗ «КМКБСМП им. Н.С.Карповича» за период 201–2022 гг. Идентификация – бактериологический метод, MALDI-TOF. Антибиотикорезистентность – метод «двойных дисков»; инактивации карбапенемов, Vitec, серийных разведений, полимеразная цепная реакция. Полногеномное секвенирование – на платформе Illumina MiSeq с использованием Nextera DNA Library Preparation Kit и MiSeq Reagent Kits v3 (Illumina, США). Штаммы MRSA характеризовались: PVL-, ST239/spat37,t74/SCCmecIII(3A) – aac(6')-aph(2''), aph(3')-III, ant(9)-Ia, ant(4')-Ib, bleO, aadD, ermA, dfrB(H31N), tetM/K, cat(pC194), gyrA(S84L), grlA(S80F), rpoB(H481N), norC, mepR/A, arlS, mgrA, sdrM, LmrS, kdpD, sepA; ST8/spat8,t24/SCCmecIVc – aac(6')-aph(2''), aph(3')-III, aadD, ermC, msrA, lnuA, qacA, FosB, murA(G257D), gyrA(S84L), grlA(S80F), arlR, mepA/R, mgrA, LmrS, norC, kdpD, sepA, sdrM; ST22/spat223,t32/SCCmecIV(2B) – tetK, kdpD, arlR, arlS, mepR, mgrA, norC, sdrM, sepA, gyrA(S84L), grlA(S80F), gyrA(S84L), parE(P587S); ST188/spat189/SCCmecIVa(2B) – ant(4')-Ib, aph(2'')-Ia, aadD, ermB, lnuA, dfrE, grlA(S80F), gyrA(S84L), mgrA, norA, mepR, sdrM, arlR, kdpD; ST398/spat011/SCCmecVc(5C2&5) – ermC, aac(6')-aph(2''), tetK,M, lsaE, lnuB. Штаммы *E. faecium*: ST80 – vanA/B, aac(6')-aph(2''), aph(3')-III, ermB, msrC, tetL, bbp5 (G66E, P667S, T172A, D204G, L177I, E100Q, V24A, A216S, R34Q, E525D, E85D, N496K, E629V, S27G, A499T, K144Q, T324A, M485A, A68T), gyrA(S83I), parC(S80I), efmA; ST872, ST1886 – vanA. Штаммы *K. pneumoniae*: ST395, ST23, ST512, ST745, ST307 ST147, ST377 – blaSHV-182,33,40,26, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, blaOXA-1, blaOXA-48, blaKPC-2, blaLEN9, blaNDM, ant(2'')-Ia, aac(6')-Ib-cr, aadA1, aph(6)-Id, rmtB, aph(3'')-Ib, ant(20')-Ia, aac(60)-Ib-cr, qnrS1, oqxA, oqxV, gyrA (D87N), mph, fosA, KpnF,E,H,G, rsmA, emrR, oqxA/B, ompK37 (I70M; I128M), ompK36 (A217S; N218H; L59V; N304E; F198Y; L229V; L191Q; N49S). Штаммы *P. aeruginosa*: ST654 – blaPAO, blaGES-5, blaIMP-1, blaVIM-2, aph(3'')-Iib,la, aac(6')-Ib-cr, aadA10, crpP, tetG, fosA, OqxA, OqxV, crpP. Штаммы *A. baumannii*: ST2 –

blaPER-1, blaGES-11, blaCARB-14, blaCTX-M-124, aph(3')-lib, la, Vib, aadA1, msrE, qacE.

Установлено распространение среди пациентов г. Красноярска ESKAPE-патогенов, относящихся в т.ч. к глобальным клонам и характеризующихся широким спектром маркеров антибиотикорезистентности в геномах.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ, соглашение № 075-15-2019-1671.

Биологическая роль микробных биоценозов в полости рта. Их значение в этиологии кариеса

Цветков Ю.А., Цветков А.В., Бессонов С.Н.

ФГБОУ ВО «Ярославская государственная медицинская академия», Ярославль, Российская Федерация

Актуальность темы. В развитии большинства патологических состояний и заболеваний полости рта микроорганизмы представлены в роли этиологического фактора. Исходя из этого, главным лечебно-профилактическим направлением является борьба с этими возбудителями. Несмотря на постоянно совершенствующиеся методы борьбы с микробами, структура этих заболеваний существенно не меняется, в связи с чем возникает необходимость формирования нового взгляда на роль микроорганизмов в этиологии кариозного процесса.

Цель. Изучить взаимосвязь между распространенностью и интенсивностью кариозного процесса и особенностями микробиоценоза полости рта.

Результаты. Несмотря на то, что среди многообразных групп микроорганизмов полости рта выделены патогенные представители, вызываемая ими патология не имеет характерных признаков инфекционного процесса (наличие этиологического фактора, заразность, инфекционность, контагиозность). Объяснение этому кроется, по-видимому, в том, что все эти «патогенные» представители являются частью самой многообразной по видовому составу нормальной микрофлоры полости рта, включающей в свой состав более 800 видов. Считается, что выделяемые этими бактериями активные органические кислоты и т.д. вызывают деминерализацию, постепенно нарушают зубную ткань. Биотоп зубного налета имеет определенную защитную роль: в его состав входит большое количество ионов и минералов, солей кальция и фтора, которые необходимы для обновления эмали. Именно поэтому, по данным некоторых авторов, происходит минерализация и кальцификация пломб, располагающихся на боковых и пришеечных участках зубов. По статистике, наиболее частая локализация первичного кариеса – бороздки и фиссуры жевательной поверхности маляров и премоляров. Но количество зубного налета там значительно ниже, чем на других участках. Связано это с механическим очищением в процессе жевания. Избыточное накопление биотопа зубной бляшки в некоторой степени связано со снижением жевательной нагрузки из-за уменьшения количества грубой пищи в рационе современного человека, в результате которой должно происходить механическое очищение от излишнего зубного налета. Примером могут являться возникаю-

щие атрофические периодонтиты единичных зубов, исключенных из процесса жевания в результате удаления антагонистов. Еще одним характерным примером первичности физиологических нарушений в этиологии кариеса является достоверно более высокая частота этой патологии у беременных, особенно в период формирования костного скелета плода, а также в период лактации. Все это, естественно, связано с недостатком кальция и многих других микроэлементов, необходимых для поддержания целостности эмали.

Выводы. Возможности проявления микроорганизмами защитных свойств, как и патогенности, определяются состоянием всего организма и тканей полости рта в частности. Дальнейшие исследования микрофлоры полости рта и сложных и противоречивых взаимоотношений микроорганизмов между собой («кворум-сенсинг» – коллективное поведение бактерий) и с организмом человека наверняка преподнесут приятные сюрпризы и помогут отрегулировать физиологический баланс в нашем организме.

Бактериофаги бактерий рода *Francisella*

Цимбалистова М.В., Мелоян М.Г., Павлович Н.В.

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

Бактериофаги широко используются при лабораторной диагностике, профилактике и лечении различных инфекционных заболеваний, и интерес к их изучению в последние годы возрастает. На протяжении многих лет разными исследователями предпринимались попытки индукции бактериофага у возбудителя туляремии, однако до настоящего времени получить стабильный препарат туляремийного бактериофага не удавалось.

Целью нашей работы явилось изучение возможности выделения активного бактериофага у штаммов *Francisella tularensis* различных подвидов и близкородственных франциселл. Индукцию бактериофагов проводили с использованием различных физических и химических факторов воздействия на бактерии (температура, ультрафиолетовое облучение, хлороформ). В качестве индикаторных были исследованы как гомологичные, так и гетерологичные штаммы туляремийного микроба и франциселл. Оценку активности полученных препаратов проводили с помощью спот-теста.

В результате из вирулентного штамма *F. tularensis* subsp. *mediasiatica* 543 после обработки клеток хлороформом был получен препарат, обладающий литическим действием на родительский штамм, однако он не оказывал подобного действия на бактерии авирулентного изогенного мутанта (543 cap-) или *F. novicida*. При этом зарегистрирована низкая воспроизводимость данного методического подхода, а наши попытки размножить бактериофаг в бульоне не увенчались успехом. При изучении франциселл *F. novicida* (Utah 112 и D9876), *F. philomiragia* после обработки бактерий хлороформом выделены 3 препарата, которые формировали негативные зоны не только при нанесении на родительские штаммы, но и в отношении всех изученных франциселл и вирулентных штаммов *F. tularensis* трех подвидов. Оценка длительности хранения препаратов в течение 1 года 8 мес.

при 4 °С (срок наблюдения) продемонстрировала сохранность их литической активности. Исследование полученных препаратов с помощью электронной микроскопии показало, что франциселлезные фаги имеют одинаковое строение корпускул: полигональную головку и короткий отросток. Известно, что бактерии, не обладающие CRISPR/Cas-системой геномного редактирования, являются универсальными индикаторными штаммами для различных бактериофагов. Как оказалось, франциселлезные бактериофаги активно лизируют клетки *Escherichia coli* φ и *Vibrio cholerae* Эль-Тор, у которых данная система отсутствует. Интересно, что именно на этих индикаторных штаммах нам удалось показать размножение и длительное сохранение исследуемых фагов.

Таким образом, из близкородственных франциселл выделены бактериофаги, лизирующие не только родительские штаммы, но и культуры туляремиального микроба и CRISPR/Cas-отрицательные культуры кишечной палочки и холерного вибриона.

Оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus* на модели культуры клеток

Цырулина О.А., Темякова С.Ю., Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Чемисова О.С.

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

Vibrio vulnificus является условно-патогенным микроорганизмом, который может вызывать первичный сепсис при употреблении в пищу сырых зараженных моллюсков, особенно у людей с ослабленным иммунитетом или сопутствующими заболеваниями печени. Известно, что данный возбудитель продуцирует ряд биологически активных соединений, в т.ч. токсинов, отнесенных к факторам вирулентности и патогенности *V. vulnificus*. К таковым относятся цитолизин VVH и MARTX. Общепринятой моделью для изучения биологической активности бактериальных токсинов является культура клеток позвоночных. В отечественной литературе отсутствуют сведения об использовании перевиваемых линий клеток позвоночных в качестве мишеней для оценки токсических свойств факторов вирулентности возбудителя *V. vulnificus*. Поэтому целью настоящего исследования явился сравнительный анализ цитотоксического действия штаммов *V. vulnificus* с различным набором генов вирулентности в отношении культуры клеток позвоночных.

В исследование было взято 25 коллекционных штаммов *V. vulnificus*, выделенных в 1984–2022 гг., из которых 4 – клинические. Для сравнительного изучения биологической активности токсинов были взяты культуры клеток L-929 (фибробласты мышей) и HeLa (клетки карциномы шейки матки человека). В работе по оценке их действия использовали супернатанты бульонных культур испытуемых штаммов. Панели с культурой клеток после обработки токсинсодержащими супернатантами инкубировали 24–48 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Полногеномное секвенирование исследуемых штаммов проводили на платформе Illumina MiSeq.

Поиск генов факторов патогенности осуществлялся с помощью программы Contig Searcher 1.0 (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора).

В полученных полногеномных сиквенсах штаммов *V. vulnificus* был произведен поиск генов, которые, согласно литературным данным, ассоциированы с патогенностью *V. vulnificus*, а именно *rtxA1* и *vvhA*. При этом ген порообразующего холестерина-зависимого гемолизина VVH присутствовал у всех, взятых в работу штаммов. Ген *rtxA1*, кодирующий высокомолекулярный цитотоксин MARTX, входящий в состав RTX-кластера, присутствовал у 13 штаммов (у 4 клинических, 1 выделенного из рыбы и 8 штаммов, изолированных из объектов окружающей среды).

При изучении цитотоксической активности штаммов *V. vulnificus* наиболее чувствительной оказалась культура клеток HeLa. Однако не все исследуемые штаммы вызывали изменение морфологии и гибель клеток, а в подавляющем большинстве обладающие геном *rtxA1*. У части штаммов, как оказалось, при действии супернатанта в титре 1:100 на культуру клеток регистрировали восстановление монослоя через 48 ч. Можно предположить, что такой эффект обусловлен низкой концентрацией токсинов.

Таким образом, цитотоксический эффект, опосредованный цитолизинем MARTX, который вызывает проницаемость мембраны клеток-хозяина, их округление и гибель, наиболее эффективно можно выявить на культуре клеток HeLa.

Характеристика микробиоты кожи в условиях применения местных глюкокортикостероидов в составе однокомпонентных и комбинированных мазей

Червинец Ю.В., Червинец В.М., Леонтьева А.В., Беляев В.С., Терехов В.М., Тимановский А.С., Чубарова Е.А.

ФГБОУ ВО «Тверской государственный медицинский университет» Минздрава России, Тверь, Российская Федерация

Цель исследования. Оценка влияния топических глюкокортикостероидов в составе моно- и многокомпонентной мазей на состав микробиоты кожи лабораторных кроликов.

Материалы и методы. В исследовании использовали 12 кроликов (советская шиншилла). У животных в области холки выбривали участок 2 × 2 см. Кролики были поделены на 3 группы (по 4 особи в каждой): 1-я группа – контрольная без обработки мазями; у 2-й группы поверхность кожи обработана поликомпонентной мазью (бетаметазон 0,05 г + гентамицин 0,1 г + клотримазол 1 г); у 3 группы применялась мазь с бетаметазоном (0,05%) с обработкой кожи путем намазывания тонким слоем. Длительность обработки: 2-я группа – 7 дней, 3-я группа – 12 дней. Затем с контрольных и обработанных участков кожи брали мазки и вносили в 1 мл физраствора. В дальнейшем проводили посев на дифференциально-диагностические среды (Сабура, кровяной агар, M118). В рамках эксперимента был использован классиче-

ский бактериологический метод с последующим биохимическим анализом чистых изолятов (API, BioMérieux). Количество микроорганизмов оценивалось в lg КОЕ/мл. Статистический анализ проводился с использованием критерия Стьюдента.

Результаты. В контрольной группе наблюдались следующие показатели количества микроорганизмов: *Staphylococcus* spp. – $1,95 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл, *Candida* spp. – $1,74 \pm 0,4$ lg КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – $1,8 \pm 0,8$ lg КОЕ/мл, *Enterobacter* spp. – $3,3$ lg КОЕ/мл, *Staphylococcus aureus* – 2 lg КОЕ/мл, *Klebsiella* spp. – $2,5 \pm 0,8$ lg КОЕ/мл ($p < 0,05$).

В группе, получавшей поликомпонентную мазь (группа №2), отмечено значительное снижение количества как нормобиоты, так и условно-патогенных микроорганизмов в сравнении с контрольной и 3-й группами: *Staphylococcus* spp. – $1,05 \pm 0,25$ lg КОЕ/мл, *Candida* spp. – 1 lg КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – $0,85 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл, *Enterobacter* spp. – $0,7$ lg КОЕ/мл ($p < 0,05$). *S. aureus*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus epidermidis* не высеивались.

В группе №3, получавшей монокомпонентную терапию, наблюдалось увеличение в несколько раз количества микроорганизмов: *Staphylococcus* spp. – $4,18 \pm 0,2$ lg КОЕ/мл, *S. aureus* – $3,6 \pm 0,3$ lg КОЕ/мл, *S. epidermidis* – $4,3$ lg КОЕ/мл, *Candida* spp. – $4,3$ lg КОЕ/мл, *Micrococcus* spp. – $4,15 \pm 0,1$ lg КОЕ/мл ($p < 0,05$). Представители *Enterobacter* spp. и *Klebsiella* spp. не высеивались.

Выводы. В группе экспериментальных кроликов, получавших поликомпонентную мазь, было зафиксировано равномерное уменьшение количества бактериальной и грибковой микробиоты в сравнении с другими группами. Предполагается, что использование многокомпонентного препарата приводит к уменьшению числа представителей как нормобиоты кожи, так и условно-патогенных микроорганизмов вследствие содержания в препарате антибактериального и противогрибкового компонентов, что сохраняет баланс между этими нишами в данном биотопе. Эта закономерность может быть использована в клинической практике при выборе тактики лечения заболеваний кожи.

Получение рекомбинантного белка экзоспориума *Bacillus anthracis* для разработки диагностических тест-систем

Шевяков А.Г., Панферцев Е.А.

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

Сибирская язва – серьезное, потенциально смертельное заболевание, вызываемое бактерией *Bacillus anthracis*. Заболеванию преимущественно подвергаются травоядные, реже другие млекопитающие, включая человека и птиц. Вспышки сибирской язвы обусловлены как существованием эндемичных очагов заболевания, так и случайным вскрытием сибиреязвенных могильников. Благодаря способности *B. anthracis* образовывать высокоустойчивые к внешним условиям споры патоген может сохранять жизнеспособность и вирулентность в течение десятилетий. Особенную угрозу

в этом плане представляют неучтенные сибиреязвенные могильники и места падежа больных животных. Через мясо травоядных, питавшихся на месте сибиреязвенного могильника, споры могут попасть в организм человека и вызвать заболевание.

Для обнаружения спор *B. anthracis* в образцах почвы используют микробиологические методы культивирования на селективных средах. Этот метод требует длительного времени и обладает низкой чувствительностью. Ускорить процесс детекции спор в образцах возможно при сочетании иммуномагнитной сепарации и быстрых молекулярных методов (изотермической амплификации LAMP).

Для синтеза иммуномагнитных частиц необходимо иметь специфичные и высокоаффинные антитела. Наиболее часто в качестве антигена *B. anthracis* используют белок EA1. Однако этот белок не является конститутивным для спорной формы бактерий. Его сохранность в почве вместе со спорами не исследована. В качестве антигена для получения моноклональных антител нами был выбран высокоиммуногенный белок BclA. В гликозилированной форме BclA образует волокнистую оболочку экзоспориума и защищает спору от неблагоприятных условий внешней среды.

Ген *bclA* (1086 п.о.), кодирующий синтез белка BclA, амплифицировали из геномной ДНК штамма *B. anthracis* СТИ-1 с помощью полимеразной цепной реакции и клонировали в плазмиду pET-40. Результирующая рамка считывания содержала октагистидиновую метку на С-концевом участке белка для аффинной хроматографии на Ni-NTA сефарозе. Штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) трансформировали рекомбинантной плазмидой pET-40-*bclA*, индуцировали экспрессию рекомбинантного белка добавлением изопропил-β-d-1-тиогалактопиранозидом. Рекомбинантный белок BclA накапливался в цитоплазме в растворимой форме. Электрофореграмма хроматографически очищенного белка показала основную фракцию в области 35 кДа в восстанавливающих и ~100 кДа в нативных условиях. Согласно литературным данным, в нормальных условиях белок BclA образует тримеры, что согласуется с экспериментальным результатом.

Иммунная сыворотка, полученная в результате введения сорбированного на гидроокиси алюминия рекомбинантного BclA мышам линии balb/c, специфически взаимодействует со спорами *B. anthracis* СТИ-1. Таким образом, рекомбинантный белок BclA может использоваться для получения моноклональных антител с помощью гибридомной технологии и гипериммунных поликлональных сывороток.

Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

Шишкова Н.А., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А.

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

Для профилактики туляремии в России используют живую туляремийную вакцину, созданную на основе штамма

Francisella tularensis 15 НИИЭГ. У вакцинированных людей формируется длительный иммунитет, защищающий от заражения возбудителем туляремии. В литературе имеются сведения о потере протективных свойств вакцинного штамма при хранении и в процессе производства вакцинного препарата, а также описаны случаи гиперреакций у людей после иммунизации. Поэтому создание новой живой туляремийной вакцины с минимальными побочными действиями и стабильно наследуемыми иммуногенными свойствами является актуальной задачей. Для решения данной проблемы созданы молекулярные инструменты и методики, позволяющие целенаправленно изменять геном вакцинного штамма *F. tularensis*. Генетические структуры в клетки *F. tularensis* вводят, как правило, методом трансформации. Известны три варианта трансформации бактерий *F. tularensis* плазмидной ДНК: с помощью электропорации, замораживания-оттаивания и химического метода (для подвида *novicida*).

Целью настоящей работы являются повышение эффективности криотрансформации вакцинного штамма туляремийного микроба и выявление факторов, влияющих на данный процесс. Нами также было проведено сравнение эффективности трансформации клеток *F. tularensis* 15 НИИЭГ методами электропорации и криотрансформации.

Для криотрансформации в бактериальную суспензию вносили 2 мкл раствора ДНК плазмиды рМС1 и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Пробирку с трансформационной суспензией замораживали в жидком азоте в течение 5 мин, после чего прогревали 5 мин при температуре 37 °С. К прогретой суспензии добавляли 500 мкл питательной среды FTB, перемешивали и затем пробирку инкубировали в течение 2 ч при температуре 37 °С. Высевы из исходной суспензии и 10-кратных разведений в забуференном физрастворе (ЗФР) проводили по 0,1 мл на три чашки, содержащие См. В настоящей работе мы использовали двухкомпонентный трансформационный раствор, включающий ионы магния и сульфата аммония. Эффективность криотрансформации в пересчете на 1 мкг плазмиды рМС1 составила $5,6 \cdot 10^{-4}$ от числа колоний, выросших на чашках в отсутствие селективного давления. Удельная эффективность на 1 мкг одного и того же препарата плазмидной ДНК методов криотрансформации и электропорации в клетки вакцинного штамма *F. tularensis* 15 НИИЭГ была практически идентичной, что указывает на возможность взаимозаменяемости этих подходов в большинстве случаев. Уменьшение объема трансформационной смеси, использованной для замораживания-оттаивания, приводит к увеличению эффективности криотрансформации.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Конструирование продуцента А-субъединицы шигатоксина второго типа *Escherichia coli* разными продуцентами

Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.

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

Продуцирующие шигатоксин (Stx) *Escherichia coli* (STEC) являются возбудителями пищевой токсикоинфекции, которая может приводить к тяжелым осложнениям, таким как геморрагический колит, гемолитико-уремический синдром (ГУС) и неврологические расстройства. Прогрессирование заболевания происходит за счет продукции бактериями какого-либо одного или сразу двух типов структурно и функционально схожих токсинов: Stx1 и Stx2, причем шигатоксин 2-го типа более токсичен и чаще связан с ГУС. Получение отдельных субъединиц Stx-белков необходимо для использования их в целях разработки диагностических средств или тестирования терапевтических препаратов.

Цель данной работы состояла в получении наиболее эффективного продуцента рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина 2-го типа *E. coli*.

Материалы и методы. Гены белка Stx2A, полученные методом ПЦР-амплификации ДНК штамма *E. coli* O157: H7, клонировали в экспрессионные векторы pET-22b (+) (Novagen), pLATE51 (Thermo Scientific) и pET SUMO (Invitrogen). Полученные плазмиды трансформировали в клетки штаммов NiCo21 (DE3) (NEB) и *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS (Novagen). Культивирование бактерий осуществляли в 1 л питательной среды 2xYT при 37 °С в течение 4 ч. Далее снижали температуру в шейкере с колбами, содержащими клетки с плазмидами pLATE51 и pET SUMO, до 25 °С и вводили во все среды IPTG-индуктор, продолжали культивирование в течение 3 ч. Клетки собирали центрифугированием, бактериальные осадки лизировали по стандартному протоколу. Осветленный лизат подвергали хроматографической очистке. Чистоту белка оценивали по результатам электрофореза в полиакриламидном геле. Измерение концентрации белка осуществляли с помощью методов спектрофотометрии.

Результаты. Плазмида pET-22b (+) способствовала синтезу целевого белка в периплазму, за счет чего снижалась токсичность А-субъединиц Stx. Однако периплазматическое пространство занимает ~4% от объема клетки, поэтому выход целевого белка оказался соизмерим с таковым при синтезе токсина в цитоплазму. Поэтому конечный выход белка зависел от биомассы клеток, получаемой с литра культуры. Наибольшая биомасса (около 7,5 г) была получена в образце штамма *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, несущем плазмиду pET SUMO. Наиболее чистый белок содержался в образце, экспрессируемом штаммом *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS с плазмидой pET SUMO, что обеспечивалось несколькими стадиями очистки, а также за счет удаления гексагистидиновой метки при разрезании протеазой SUMO сохранялась нативная аминокислотная последо-

вательность. Также данный образец демонстрировал выход ~2 мг/л, что превышало выход выделенного белка из других образцов.

Вывод. Наиболее эффективным продуцентом А-субъединицы шигатоксина 2-го типа *E. coli* является штамм *E. coli* Rosetta (DE3) pLysS, несущий плазмиду pET SUMO.

Работа выполнена в рамках гранта Минобрнауки РФ (соглашение от 31.10.2019 №075–15–2019–1671).

Исследование биоматериала на иерсиниозы из природных очагов Алтайского края за период 2013–2023 гг.

Щукина М.А.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Алтайском крае», Барнаул, Российская Федерация

Основными источниками инфекции являются дикие и синантропные грызуны, домашние и сельскохозяйственные животные.

Для оценки эпизоотологической ситуации на территориях природных очагов отделением особо опасных инфекций проводится бактериологическое исследование кишечника мелких млекопитающих, отловленных на территории Алтайского края.

В период 2013 г. – первое полугодие 2023 г. было выделено 186 культур возбудителей иерсиниозов.

В 2013 г. было выделено 3 культуры *Yersinia enterocolitica* IA от землеройки, сибирской красной и темной полевки.

В 2014 г. было выделено 40 культур, которые были подтверждены на базе Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Культуры были идентифицированы как 17 штаммов *Y. enterocolitica* IA, 3 штамма *Y. enterocolitica* IB, 3 штамма *Yersinia frederiksenii*. 33 культуры были выделены из материала от сибирской красной полевки, 2 штамма – от материала землеройки, 2 штамма – от мыши лесной, 1 культура от экономки, 1 культура от европейской рыжей полевки, 1 культура от полевки экономки.

В 2015 г. была выделена 21 культура *Y. enterocolitica* IA, 1 культура *Y. frederiksenii*. От сибирской красной полевки было выделено 11 штаммов, 7 культур от полевки обыкновенной, 3 культуры от мыши лесной, 1 культура от полевки экономки.

В 2016 г. был резкий спад выделения культур возбудителей иерсиниозов. Возможные причины кроются в неблагоприятных природных, климатических условиях для грызунов. Единственная культура *Yersinia pseudotuberculosis* была выделена из мыши лесной, добытой в Чарышском районе, село Сентелек.

В 2017 г. было выделено 9 культур из материала, добытого из предгорных районов Алтайского края. По биохимическим свойствам было выделено 6 культур *Y. enterocolitica* IB, 2 культуры *Y. enterocolitica* IA, 1 культура *Y. frederiksenii*.

В 2018 г. выделено 6 штаммов *Y. enterocolitica* IA. Территориально штаммы были найдены в округе г. Барнаула, Усть-Пристанском районе, Советском районе. 4 культуры

были выделены из материала от сибирской красной полевки, две – от землеройки.

В 2019 г. выделено 26 культур от материала мышевидных грызунов: 23 культуры *Y. enterocolitica* IA и 3 культуры *Y. enterocolitica* IB.

В 2020 г. отделением выделено 20 культур *Y. enterocolitica* IA и одна культура *Yersinia aldovae*.

За период с 2021 по 2022 г. было выделено 46 культур *Y. enterocolitica* IA.

За первое полугодие 2023 г. отделением особо опасных инфекций было выделено 13 культур возбудителей иерсиниозов. Из них одна культура – *Y. enterocolitica* IB, остальные – *Y. enterocolitica* IA.

Ежегодное выделение культур возбудителей иерсиниозов подтверждает состояние активных очагов данной инфекции.

Модификация генов структурных деполимераз и изменение капсульной специфичности *Acinetobacter baumannii*-бактериофагов рода *Friunavirus* путем CRISPR/Cas9-редактирования

Щурова А.С.^{1,2}, Зверева С.Д.^{1,2}, Попова А.В.¹

¹ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболенск, Московская область, Российская Федерация;
²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Российская Федерация

Цель. Изменение капсульной специфичности и спектра литической активности вирулентных *Acinetobacter baumannii*-бактериофагов рода *Friunavirus* путем замены участков генов, кодирующих ферментативно-распознающие домены структурных деполимераз, с использованием системы CRISPR/Cas9.

Материалы и методы. В качестве модельных объектов для замены фрагментов генов, кодирующих структурные деполимеразы, были выбраны два вирулентных бактериофага, относящихся к роду *Friunavirus* семейства *Autographiviridae*: фаг vB_AbaP_AS11 (AS11, номер доступа в GenBank: NC_041915), инфицирующий штамм *A. baumannii* 28 (капсульный тип K19), и фаг vB_AbaP_AS12 (AS12, номер доступа в GenBank: NC_041914), инфицирующий штамм *A. baumannii* 1432 (капсульный тип K27). В ходе работы использовали молекулярно-биологические, генно-инженерные, биоинформатические и микробиологические методы.

Результаты. Были разработаны схемы редактирования геномов *A. baumannii*-фагов AS11 и AS12 с помощью системы CRISPR/Cas9 и гомологичной рекомбинации, позволяющие осуществлять замену фрагментов генов, кодирующих ферментативно-распознающие части структурных деполимераз, в геномах данных фагов непосредственно в ходе инфекции. Были определены переходные области между консервативными N-концевыми доменами и ферментативно-распознающими частями деполимераз AS11_gp45 и AS12_gp42 и выбраны пары протоспейсеров в геномах акцептор-

ных фагов. Получены генетические конструкции с компонентами системы CRISPR/Cas9 и системой рекомбинации и донорные плазмиды, содержащие плечи для гомологичной рекомбинации, фланкирующие участки генов, кодирующих ферментативно-распознающие части деполимераз, а также последовательности направляющих РНК и ген красного флуоресцентного белка RFP для селективного отбора. Была проведена серия экспериментов по осуществлению обмена участков генов, кодирующих ферментативно-распознающие домены деполимераз, между геномами фагов AS11 и AS12. В ходе работы штаммы *A. baumannii* 28 и 1432, электропорированные необходимыми для редактирования генетическими конструкциями, инфицировали соответствующими фагами с разной множественностью инфицирования. Были получены рекомбинантные фаговые частицы с измененной капсульной специфичностью:

– на основе генома фага AS11 со вставкой фрагмента гена деполимеразы фага AS12, специфичные к K27 капсульному типу *A. baumannii* (изначально фаг AS11 специфичен к K19-типу *A. baumannii*);

– на основе генома фага AS12 со вставкой фрагмента гена деполимеразы фага AS11, специфичные к K19 капсульному типу *A. baumannii*.

Были получены чистые линии рекомбинантных фагов с измененной K-специфичностью, а также препараты фаголизатов для последующего изучения литических, молекулярно-генетических и антибактериальных свойств рекомбинантных фагов, а также оценки их профилактической и терапевтической активности на моделях ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных.

Заключение. *A. baumannii* является одним наиболее значимых возбудителей внутрибольничных инфекций во всем мире. Разработанная стратегия CRISPR/Cas9-редактирования геномов вирулентных фагов открывает возможность изменения спектра их антибактериальной активности/капсульной специфичности для создания коллекции рекомбинантных бактериальных вирусов с разнообразными рецептор-связывающими белками – структурными деполимеразными, активными в отношении различных капсульных типов данного патогена.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант №20–75–10113).

Современные данные о микробиоме пищевых производств – что нового?

Юшина Ю.К., Грудистова М.А., Зайко Е.В., Махова А.А.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М.Горбатова» РАН, Москва, Российская Федерация

Микробное разнообразие мясных продуктов варьирует в зависимости от гигиены производства, качества используемой воды и микробиоты кишечника животного (Rouger A., 2017). Охлажденное мясо – скоропортящийся продукт с большим количеством питательных веществ, что делает его отличной средой для размножения психрофильных бактерий (Vihavainen E.J., 2010). Контаминация пищевой продукции через поверхности объектов производственной

среды в процессе производства вызывает постоянную обеспокоенность.

Целью данного исследования являлось изучение микробного сообщества и таксономического состава бактерий абиотических и биотических объектов производственной среды птицеперерабатывающего предприятия.

Изучены смывы с 17 образцов – 2 тушки птицы и 15 объектов производственной среды птицеперерабатывающего предприятия. Уровень количества мезофильных аэробных и факультативно анаэробных микроорганизмов (КМАФАнМ) для всех образцов не превышал 10^6 КОЕ/см², наиболее высокие значения показателя (10^5 – 10^6 КОЕ/см²) наблюдались как для технологического, так и для вспомогательного оборудования. Наибольшая загрязненность наблюдалась в производственных помещениях, где осуществляли убой и переработку птицы, особенно на участке удаления пера, при этом микрофлора на данном участке была представлена наиболее разнообразно – 15 видов бактерий. Высокими значениями КМАФАнМ характеризовались и участки в конечных точках технологического процесса, что указывает на риск перекрестного заражения продукции, подготовленной к выпуску. Было отобрано 98 колоний микроорганизмов с различными фенотипическими признаками. Идентификацию проводили методом времяпролетной масс-спектрометрии MALDI-TOF MS. Выделенные 58 видов бактерий были представлены 26 родами, из которых 7 родов относились к грамположительным (*Enterococcus*, *Exiguobacterium*, *Lactococcus*, *Macrococcus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Vagococcus*), 1 род – к грамвариабельным (*Erysipelothrix*), 18 родов – к грамотрицательным микроорганизмам.

Среди грамотрицательных бактерий максимально обширно был представлен род *Pseudomonas* (20 видов). В смывах с тушек птицы также были идентифицированы *Ps. brenneri*, *Ps. fluorescens*, *Ps. orientalis* и *Ps. tolaasii*. Род *Pseudomonas* известен своей метаболической универсальностью и генетической пластичностью, включает психротрофные виды, способные расти при низких положительных температурах. Были также обнаружены микроорганизмы рода *Acinetobacter* (тип *Proteobacteria*), которые занимают первое место среди возбудителей раневой инфекции (36%), обладают выраженной способностью к образованию биопленок (*A. baumannii*) и повышенной резистентностью к антибиотикам.

Оценку разнообразия микроорганизмов проводили путем определения последовательностей переменного фрагмента гена 16S рРНК. Таксономический анализ показал, что во всех образцах выделялись четыре ключевые группы бактерий филумов *Proteobacteria*, *Firmicutes*, *Actinobacteriota* и *Bacteroidota*. Среди них обнаружены бактерии, вызывающие порчу, а также способные к биопленкообразованию, а также патогены человека и животных: рода *Arcobacter*, *Corinobacteria*, *Listeria*.

Заключение. Под влиянием производственных условий на абиотических поверхностях производственной среды формируются устойчивые консорциумы, в состав которых входят патогены и микроорганизмы, вызывающие порчу, что ставит вопрос о поиске принципиально новых подходов к дезинфекции производственных поверхностей.

Комплексный подход к определению пищевых вирусов: возможности и перспективы

Юшина Ю.К., Сатабаева Д.М., Зайко Е.В.

ФГБНУ «Федеральный научный центр пищевых систем им. В.М.Горбатова», Москва, Российская Федерация

Болезни пищевого происхождения являются одной из основных проблем общественного здравоохранения во всем мире. Кишечные вирусы являлись причинами нескольких вспышек связанных с потреблением зараженных продуктов питания. Однако из-за отсутствия в большинстве стран, включая Россию, регламентированного контроля над присутствием патогенных вирусов в пищевых продуктах, остается большой пробел в статистике распространенности вирусов в продуктах питания (Rowe G.F., 2016). Исследование продуктов питания на наличие вирусов является сложной процедурой, которая требует эффективного подхода по извлечению вирусных частиц, надежных методов экстракции РНК вирусов и точных молекулярных методов идентификации генетического материала (Anonimus, 2013). В настоящее время на территории России отсутствуют простые и доступные методы оценки распространенности вирусов в пищевых продуктах. Таким образом, главной задачей работы стояло оценка эффективности различных подходов выявления вирусов из пищевых матриц (Borchardt M.A. et al., 2003; Kirby A.E. et al., 2015).

Эффективность подходов оценивали путем искусственного контаминирования образцов малины, двухстворчатых моллюсков и свиной печени менговирусом. Экстракцию вирусных частиц проводили согласно положениям МР №786–00419779–22 «Методические рекомендации по выявлению возбудителей вирусных инфекций в пищевой промышленности».

В результате проведенной апробации методик было установлено, что эффективность экстракции менговируса из малины составила 14,26%, из устриц – 7,99%, из печени – 8,33%. Эффективность экстракции вируса >1% считается положительным результатом. Таким образом, апробированные методы позволяют эффективно извлекать пищевые вирусы из различных пищевых матриц.

Затем была проведена оценка распространенности вирусов в пищевых продуктах. Образцы малины, клубники и устриц были исследованы на наличие норовируса геногрупп GI и GII, образцы свиной печени – на наличие гепатита E. Выявление проводили путем постановки одноэтапной полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией на приборе Gene up (bioMérieux, Франция) в режиме реального времени с гидролизуемыми зондами. Для определения норовируса использовали набор для обнаружения норовируса геногруппы II (NoVGII) (bioMérieux, Франция), для определения вируса гепатита E использовали набор для обнаружения вируса гепатита E (HEV) (bioMérieux, Франция), для обнаружения менговируса – набор для обнаружения менговируса (bioMérieux, Франция).

Норовирус GII был обнаружен в образцах устриц на уровне 7,7% от исследуемых образцов, в образцах клубники – на уровне 4,5% от исследуемых образцов. В образцах мали-

ны этот вирус отсутствовал. Во всех исследуемых образцах норовирус геногруппы GI обнаружен не был. Гепатит E ни в одном из образцов свиной печени также обнаружен не был.

Отсутствие надежных методов диагностики и регламентированного контроля за распространением патогенных вирусов в пищевых продуктах создает дополнительный риск для здоровья населения. Проведенная работа позволила установить эффективные подходы по выявлению вирусов из пищевых матриц, а оценка отдельных пищевых категорий показала распространенность норовируса в продуктах питания.

Анализ субвидового типирования сальмонелл из очагов групповой заболеваемости кишечными инфекциями по Республике Саха (Якутия)

Ядрихинская В.К.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)», Якутск, Российская Федерация

В настоящее время сальмонеллез сохраняет свою актуальность при формировании вспышечной заболеваемости острых кишечных инфекций (ОКИ) и занимает третье место (после ОКИ вирусной этиологии) в структуре очагов групповой заболеваемости с фекально-оральным механизмом передачи инфекции по Российской Федерации (РФ). При этиологической расшифровке установлено, что в большинстве очагов выделена *Salmonella Enteritidis* (сальмонелла группы D), которая сохраняет доминирующее положение во все года. В Республике Саха (Якутия) уровень заболеваемости сальмонеллезом за последние десятилетия превышает показатели по РФ в 1,3–2,6 раза. В этиологической структуре сальмонеллеза в 2022 г., как и в предыдущие годы, преобладают сальмонеллы группы D (*S. Enteritidis*), удельный вес которых составил 93% (в 2021 г. – 89,0%), группы B – 2% (в 2021 г. – 9,4%), сальмонеллы группы C – 5% (в 2021 г. – 1,6%). Основным путем распространения инфекции среди населения по-прежнему остается алиментарный, преобладающими факторами передачи – пищевые продукты, в основном продукция из мяса птицы.

Цель работы – провести анализ встречаемости PFGE-типов бактерий рода *Salmonella* по результатам молекулярно-генетического субтипирования сальмонелл, выделенных на базе бактериологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Саха (Якутия)» с 2016 по 2022 г.

По данным референс-центра по мониторингу за сальмонеллезными инфекциями ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, в многолетней динамике этиологической структуры сальмонеллезом по РФ у людей тройку преобладающих серотипов сальмонелл составляют *Salmonella Enteritidis*, *S. Typhimurium* и *S. Infantis*. Они же являются и ведущими сероварами сальмонелл, выделенных из пищевых продуктов и объектов окружающей среды. Из них *S. Enteritidis* яв-

ляется абсолютным доминантом, *S. Typhimurium* и *S. Infantis* характеризуются варьированием в соотношении встречаемости и преобладанием того или иного серовара в определенные годы.

По данным результатов субвидового типирования по РФ, наибольшее количество PFGE-типов обнаружено среди *S. Enteritidis*. Среди штаммов *S. Enteritidis*, выделенных у людей, наиболее распространенным оказался субтип JEGX01.0001-JEGA26.0001 (>22% случаев выделения). Этот же тип чаще всего встречался в изолятах из продуктов питания и объектов окружающей среды. Следующим по частоте встречаемости являлся субтип JEGX01.0005-JEGA26.0006. Среди *S. Infantis*, выделенных у людей, наиболее распространенным был субтип JFXX01.0074-JFXA26.0066. Среди *S. Typhimurium* ведущих субтипов не выявлено.

По Республике Саха (Якутия) при расследованиях пищевых вспышек заболеваемости сальмонеллезом доминируют также *S. Enteritidis* с субтипами JEGX01.0001-JEGA26.0001, выделенные у людей и из продуктов питания (30,4 и 75,0% случаев выделения соответственно). Следующие по частоте встречаемости субтипы у людей – JEGX01.0046-JEGA26.0012 и JEGX01.0009-JEGA26.0011 (по 21,7% случаев выделения), в меньшем количестве – JEGX01.0006-JEGA26.0001 (17,4%), в единичных случаях – JEGX01.0045-JEGA26.0001 и JEGX01.0001-JEGA26.0081. В образцах из пищевых продуктов встречаются PFGE-типы JEGX01.0044-JEGA26.0052 и JEGX01.0001-JEGA26.0038. Среди *S. Infantis*, выделенных из пищевых продуктов, преобладающих PFGE-типов не выявлено, все относятся к различным субтипам – JFXX01.0018-JFXA26.0012, JFXX01.0015-JFXA26.0011, JFXX01.0121-JFXA26.0119, JFXX01.0001-JFXA26.0004 и JFXX01.0115-JFXA26.0114. В исследуемые годы штамм *S. Typhimurium* не являлся возбудителем вспышечной заболеваемости.

Таким образом, в Республике Саха (Якутия), как и в РФ, в анализируемые годы в субвидовой характеристике сальмонелл из очагов групповой заболеваемости преобладали изоляты *S. Enteritidis* с ведущим субтипом JEGX01.0001-JEGA26.0001, как в материале от людей, так и из пищевых продуктов.

Новые подходы к эпидемиологической оценке риска заражения кишечными инфекциями в зонах водопользования морских прибрежных акваторий

Яковлев А.А., Матосова Е.В., Бынина М.П., Еськова А.И., Дробот Е.И., Щелканов М.Ю.

ФГБНУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.П.Сомова» Роспотребнадзора, Владивосток, Российская Федерация

В настоящее время качество морской воды регламентируется Сан.Пин 2.1.5. –2582–10. В документе представлены индикаторные микроорганизмы, по которым судят о состоянии водных объектов в плане микробной загрязненности и, соответственно, о возможности их использования в ре-

креационных целях. Между тем уникальным свойством патогенных бактерий является их фенотипическая пластичность, благодаря которой даже под влиянием сублетальных стрессовых нагрузок они реализуют свои адаптационные стратегии, сохраняющие их жизнеспособность и патогенный потенциал. Большинство грамотрицательных микроорганизмов формируют устойчивые (дормантные) клеточные фенотипы, характеризующееся низкой метаболической активностью, отсутствием репродуктивности, медленной транскрипцией генов при сохранении дыхания и целостности мембран. Эти временные клеточные фенотипы, в отличие от своих вегетативных предшественников, обладают чрезвычайно высокой устойчивостью к воздействию физических и химических факторов, не растут на обычных питательных средах и не обнаруживаются традиционными микробиологическими методами. Отсутствие внимания к дормантным формам возбудителей инфекций человека приводит к недооценке общего количества жизнеспособных бактерий в клинических материалах или образцах окружающей среды при проведении эпидемиологических или санитарно-гигиенических исследований. В дормантном состоянии бактерии не выявляются как индикаторы фекального загрязнения, но после специальных реверсивных подходов или при попадании в организм они способны рекультивироваться и вызывать инфекционные заболевания. К сожалению, механизмы, позволяющие бактериям переходить в дормантное состояние и выходить из него, пока недостаточно хорошо изучены. На сегодняшний день список бактерий, способных формировать дормантные клеточные фенотипы, постоянно увеличивается. Поэтому повышение эффективности санитарно-микробиологического контроля объектов окружающей среды, в т.ч. морских экосистем, является одной из проблем современной эпидемиологии.

На основании микробиологических, молекулярно-генетических исследований микроорганизмов, а также их морфологических и морфометрических характеристик при экспериментальных исследованиях проб морской воды прибрежных зон Японского моря нами установлена возможность существования *Salmonella enterica* в дормантном состоянии в морской воде.

Перспективность дальнейших исследований связана с разработкой инновационных подходов к эколого-микробиологическому мониторингу морских экосистем, включающих идентификацию и количественную оценку санитарно-индикаторных и морфологически близких видов бактерий кишечной группы, находящихся в некультивируемых формах.

Микробиологические характеристики проб биоматериала пациентов с обширными ожогами при поступлении в специализированный ожоговый центр

Ярец Ю.И.

ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Проанализированы результаты микробиологического исследования раневого отделяемого (РО), крови, мочи, отделяемого дыхательных путей (ОДП), полученных от 195 пациентов с обширными ожогами, поступивших в отделение реанимации ожогового центра ГУЗ «Гомельская городская клиническая больница №1» в период 2014–2020 гг. Пациенты подгруппы 1 ($n = 117$, 60%) поступали из дома машиной скорой помощи в день получения травмы. В подгруппе 2 ($n = 78$, 40%) присутствовал предшествующий этап госпитализации в районную больницу с переводом в ожоговый центр в течение 1–4 суток с момента травмы.

В 20,5% случаев ($n = 40$) микроорганизмы из всех видов биоматериала не высевались. Из РО у 155 пациентов выделялись монокультуры (51%, $n = 80$) и ассоциации (49%, $n = 75$). В этой группе в 12% ($n = 19$) случаев были положительными пробы крови, высевались только монокультуры. У пациентов с термоингаляционной травмой ($n = 66$) в ОДП микроорганизмы обнаруживались в 73% случаев ($n = 48$): 46% ($n = 22$) – монокультуры, 54% ($n = 26$) – ассоциации. Результаты посева мочи у 73% пациентов были отрицательными ($n = 113$), у 27% ($n = 42$) выделены монокультуры (19%, $n = 8$) и ассоциации (81%, $n = 34$).

Из РО в подгруппе 2 чаще высевались *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, в подгруппе 1 – *Staphylococcus aureus*, коагулазонегативные стафилококки (КНС) ($\chi^2 = 31,56$; $p < 0,001$). В подгруппе 2 микробиота из РО чаще высевалась в количестве ≤ 105 КОЕ/мл (21,6%, $n = 25$) и > 105 КОЕ/мл (39,6%, $n = 46$) ($\chi^2 = 27,48$; $p < 0,001$). Из крови в подгруппе 1 выделены только КНС, в подгруппе 2 – чаще *P. aeruginosa*, *A. baumannii*. Из ОДП в подгруппе 1 микроорганизмы выделялись только в монокультуре из среды обогащения. В подгруппе 2 чаще определялись ассоциации, включающие *Klebsiella pneumoniae* (71,4%, $n = 20$, $\chi^2 = 24,49$; $p < 0,001$), в 58,5% случаев ($n = 31$) – в количестве ≤ 105 КОЕ/мл (20,8%, $n = 11$) и > 105 КОЕ/мл (37,7%, $n = 20$) ($\chi^2 = 20,33$; $p < 0,001$). Различий в составе микробиоты мочи в подгруппах 1 и 2 не было.

Анализ свойств изолятов показал различия между подгруппами 1 и 2. Более высокий уровень резистентности, в том числе к трем и более антибиотикам, образование биопленки, наличие факторов персистенции (антикомплиментарная, антилизоцимная, антиинтерфероновая активность), высокая адгезивная и протеазная активность предполагали госпитальное происхождение изолятов в подгруппе 2. Другими признаками госпитальных штаммов являлось присутствие генов вирулентности: *exoS* (34,5%, $n = 10$) и *exoU* (51,7%, $n = 15$) у *P. aeruginosa*; *rmpA*, *K2A* или *magA* у *K. pneumoniae* (71,4%, $n = 10$); *ompA* у *A. baumannii* (93,3%, $n = 42$); *gelE* и *fsrABC* (91,8%, $n = 45$) у *Enterococcus faecalis*.

Чувствительность к антибиотикам, отсутствие персистентных свойств и некоторых генов вирулентности, выделение только из среды обогащения являлись критериями контаминации биоматериала в подгруппе 1.

Полученные результаты определяют дифференцированный подход к микробиологическому обследованию и эмпирической стартовой антибактериальной терапии у пациентов с обширными ожогами с необходимостью учета порядка госпитализации в специализированное отделение ожоговой реанимации.

Микробиота острых и хронических ран на различных стадиях инфекционного процесса

Ярец Ю.И.

ГУ «Республиканский научно-практически центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Проанализированы клинические и микробиологические показатели острых ран (ОР) и хронических ран (ХР) 405 пациентов. Микробиологический посев раневого отделяемого выполняли секторным методом, результат представляли в КОЕ/мл.

На наиболее ранних сроках ОР (до 4 суток, $n = 92$) не регистрировались клинические признаки воспаления, в 76% случаев высевались только грамположительные бактерии. Несмотря на потенциальную патогенность *Staphylococcus aureus*, количественные характеристики (> 105 КОЕ/мл: 47,6%, $n = 20$), отсутствие клинических признаков инфекции свидетельствует о контаминации и не требует проведения системной антибактериальной терапии. Воспалительный статус ран сроком ОР 5–21 суток ($n = 48$) во всех случаях сопровождался выделением из раневого отделяемого монокультур и ассоциаций. Наряду с грамположительными бактериями (*S. aureus* и *Enterococcus faecalis*), в ранах обнаруживались грамотрицательные бактерии – *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*; *Enterobacterales* – *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*. Для ОР сроком 5–21 суток ($n = 36$) без клинических признаков воспаления было характерно отсутствие роста микробиоты в 55,5% ($n = 20$) случаев.

В ХР без признаков воспаления ($n = 141$) частота отрицательных результатов посевов снижалась с увеличением срока раны – с 50% ($n = 13$) для ран сроком 22–28 суток до 11,8% ($n = 13$) для ран сроком > 2 мес. Монокультуры преобладали на более поздних сроках ран – > 7 нед. (56,3 и 55,2%); частота обнаружения ассоциаций была минимальной для ран сроком 22–28 суток (11,5%, $n = 3$). На других сроках ассоциации высевались в 25–35% случаев. ХР были чаще колонизированы монокультурами *S. aureus*, CoNS, *E. faecalis*; из ран сроком > 2 мес. также высевались *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*. В единичных случаях обнаруживались *E. coli*, *E. cloacae*, *Candida albicans*. Состав ассоциаций колонизированных ран был представлен широким спектром видов: грамположительные бактерии совместно с *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*

iwoffii, *Enterobacter agglomerans*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella planticola*, *E. cloacae*, *E. coli*.

Микробные ассоциации высевались из критически колонизированных ран в диапазоне от 50% ($n = 10$) до 81,8% ($n = 18$) случаев в зависимости от давности раны. Отмечен вклад *P. aeruginosa*, *A. baumannii* и *P. mirabilis* в видовой состав ассоциаций. Монокультуры критически колонизированных XP ($n = 22$) были представлены *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa*. Инфекция определялась у 24,6% XP сроком 22–28 суток ($n = 15$), с увеличением длительности существования ран ее частота постепенно снижалась. Микробиота инфицированных ран была представлена в основном ассоциациями (от 50 до 100%), видовой состав которых был схожим с таковой в критически колонизированных ранах.

При интерпретации результатов микробиологического посева необходимо учитывать срок существования раны и разделять понятия «контаминированная», «колонизированная», «критически колонизированная», «инфицированная» рана в связи с наличием патогенетической роли бактерий в нарушении процесса заживления и для определения дальнейшей тактики лечения ран.

Иммунофенотип лейкоцитов крови у пациентов с ранами на различных стадиях инфекционного процесса

Ярец Ю.И.

ГУ «Республиканский научно-практически центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

Методом проточной цитофлуориметрии выполнено исследование иммунофенотипа лейкоцитов крови у 105 пациентов с хроническими ранами (основная группа, срок ран >3 нед.) на различных стадиях инфекционного процесса: колонизация ($n = 39$), критическая колонизация ($n = 37$) и инфекция ($n = 29$). Для дифференциации стадий инфекционного процесса учитывали общепринятые рекомендации, а также использовали собственные клинико-микробиологические и морфологические критерии. Группу сравнения составили 22 пациента с острыми ранами (срок раны до 4 суток), у которых в ранах не обнаруживались микроорганизмы.

В основной группе выявлены более высокие значения Т-лимфоцитов ($Z = 2,1$; $p = 0,03$) и более низкие значения НК-клеток ($Z = 2,7$; $p = 0,006$), а также регистрировались более низкие значения ранних маркеров активации на Т-хелперах и Т-цитотоксических лимфоцитах ($Z = 1,9$; $p = 0,04$; $Z = 4,2$; $p < 0,01$) и более высокие поздние маркеры активации Т-клеток (CD3+HLADR+) ($Z = 5,4$; $p < 0,01$). Экспрессия HLADR на В-лимфоцитах (CD19+) в основной группе характеризовалась широким разбросом результатов (от 0,9 до 26,4%) и была ниже, чем в группе сравнения ($Z = 2,7$; $p = 0,006$). В основной группе обнаружены более низкие значения CD15+/CD18+/CD11a+ и CD15+/CD18+/CD11c+ клеток, чем в группе сравнения. Наиболее высокими показателями CD15+/CD18+/CD11a+ нейтрофилов характеризовались пациенты с хроническими ранами, имеющими признаки инфекции, минимальными – с колонизированными рана-

ми ($H = 83,4$; $p < 0,001$). Показатели CD15+/CD18+/CD11c+ клеток в зависимости от стадий инфекционного процесса значимых различий не имели ($H = 2,36$; $p = 0,31$). Выявлены различия в показателях CD15+/CD18+/CD11a+ и CD15+/CD18+/CD11c+ клеток в зависимости от структуры микробиоты ран. Наиболее высокие значения CD11a и CD11c на нейтрофилах регистрировались при наличии в ранах монокультур *Staphylococcus aureus*, наиболее низкие – при выделении из ран монокультур *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*. Указанные различия присутствовали на всех стадиях инфекционного процесса. Экспрессия HLADR на В-лимфоцитах (CD19+/HLADR+) также имела различия в зависимости от структуры микробиоты ран и была выше в случаях обнаружения в ранах монокультур *S. aureus*, составляя в среднем 13,2% (9; 16). Наличие в ранах монокультур *P. aeruginosa*, *A. baumannii* сочеталось с более низкими относительными значениями CD19+/HLADR+ клеток: 1,9% (1; 6) ($Z = 6,3$; $p < 0,001$). У пациентов основной группы регистрировались более низкие значения экспрессии CD11b на Т-лимфоцитах ($Z = 3,6$; $p < 0,01$), а также CD71 на нейтрофилах, лимфоцитах и моноцитах, однако различий в зависимости от стадии инфекционного процесса и видового состава микробиоты не установлено.

Выявленный дисбаланс функционирования иммунных клеток в крови является отражением нарушения воспалительной фазы раневого процесса в условиях инфекции. Полученные различия в экспрессии маркеров лейкоцитов могут быть использованы в качестве критериев прогрессирования инфекционного процесса, а также оценки этиологической значимости бактерий, выделенных из ран.

Изучение нового химиотерапевтического средства для лечения инфекционных заболеваний

Буковская Ю.А.¹, Гостев В. А.², Черных Т.Ф.¹, Генералов И.И.³

¹ФГБОУ ВО «СПХФУ» МЗ РФ, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

²ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, Санкт-Петербург, Российская Федерация;

³ФГБОУ ВО «ВГМУ» МЗ РБ, Витебск, Республика Беларусь

Ускоренный темп развития резистентности микроорганизмами не позволяет своевременно создавать новые антимикробные препараты. Устойчивость микроорганизмов к противомикробным агентам, согласно данным ВОЗ, представляет большую угрозу для человечества. Во всем мире от инфекционной патологии погибает огромное количество людей, причиной смертей которых являются резистентные формы микроорганизмов. Перспективными соединениями, обладающими различными биологическими эффектами (антибактериальным, противогрибковым, противомаларийным, противоопухолевым, противовоспалительным, антиоксидантным, антигистаминным), являются производные ксантона (Kye-Simeon Masters et al., 2012).

В лаборатории органического синтеза Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтиче-

ского университета получают новые продукты, производные 4,4а-дигидроксантона и их модификации (Chernov N.M. et al., 2017).

Цель исследования. Изучение нового продукта органического синтеза – производного ксантона 4,4а-дигидроксантон – в отношении стандартных и резистентных штаммов микроорганизмов, а также определение острой и хронической токсичности фармакологической субстанции.

Материалы и методы. В исследованиях использовали стандартные штаммы *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Corynebacterium glutamicum*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* и *Aspergillus niger* методами серийного разведения и диффузии в агар на соответствующих (дифференциально-диагностических и элективных) питательных средах. В качестве препаратов сравнения служили антибиотики ванкомицин, обладающий выраженной антистафилококковой активностью и доксициклин, схожий по структуре с дигидроксантонами.

В исследование включена коллекция микроорганизмов, собранная в 2011–2020 гг. из 30 медицинских центров в 11 городах России, выделенных у пациентов при инфекциях нижних дыхательных путей, инфекциях кровотока, а также инфекциях кожи и мягких тканей. Реидентификацию восстановленных суточных культур, выращенных на кровяном агаре, проводили с помощью MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex LT с использованием программного обеспечения Biotyper («Bruker Daltonics», Германия). Коллекция депонирована в ФГБУ ДНКЦИБ ФМБА России, г. Санкт-Петербург. Чувствительность к исследуемому образцу оценивали методом серийных микроразведений с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) в бульоне Mueller-Hinton («Bio-Rad», Франция) в соответствии с международным стандартом ISO 20776-1:2019. Для анализа результатов МПК использовали платформу WHONET 2020 (версия 20.17.5). Рассчитывали следующие параметры: распределение и диапазон МПК, МПК₅₀, МПК₉₀, средняя геометрическая МПК (МПКСГ).

Результаты. Было доказано, что производное 4,4а-дигидроксантон обладает малой активностью в отношении исследованных грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов (МЦК 125–250 мкг/мл), дрожжевых и мицелиальных грибов (МФК – 3,9–7,8 мг/мл). При исследовании антимикробного действия в отношении *Staphylococcus aureus* установлено, что соединение оказывало выраженное статическое (МСК – 2 мкг/мл) и микроцидное (МЦК – 4 мкг/мл) антистафилококковое действие, идентичное с активностью ванкомицина (МЦК – 2 мкг/мл) и превышающее активность антибиотика доксициклина (МЦК – 8 мкг/мл). Препараты сравнения являлись стандартными образцами для анализа (хчда).

При исследовании к неповторяющимся клиническим изолятам метициллинрезистентных *St. aureus* (methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA), $n = 162$, метициллинрезистентных *St. epidermidis* ($n = 47$), ванкомицин-резистентных *Enterococcus faecium* ($n = 90$), положительным по гену *mecA* и устойчивым к цефокситину установлено, что МПК₅₀ и МПК₉₀ составляла 32–64 мкг/мл и 128 мкг/мл соответственно для всех анализируемых групп микроорганизмов. Низкая активность рассматриваемого соединения может быть связана с недостаточной его очисткой. Тем не менее, ввиду низкой токсичности (III класс опасности), данное соединение может быть использовано для химической модификации при получении более эффективных соединений-derivатов с высоким уровнем антимикробной активности.

Заключение. Определена антимикробная активность к музейным и резистентным штаммам микроорганизмов. Установлено, что в опытах *in vitro* данное соединение обладает высокой активностью к *Staphylococcus aureus* (МСК – 2 мкг/мл и МЦК – 4 мкг/мл), идентичной с активностью ванкомицина и превышающей активность доксициклина, и низкой активностью к клиническим изолятам метициллинрезистентных *Staphylococcus aureus*.

Исследуемое соединение относится к малотоксичным соединениям. Исследования продолжаются.

Содержание

Фаговые эндолизины стафилококков: клонирование, получение и очистка

Абаев И.В. 5

Компьютерное моделирование олигонуклеотидов для выявления *Streptococcus dysgalactiae* методом полимеразной цепной реакции в реальном времени

Абашин И.Ю., Козырева Н.Г. 5

Влияние микрофлоры кисломолочных напитков на состав микробиома ротовой полости

Аккузина С.Г., Вотинцев Р.А. 6

Использование протеомного анализа в практике микробиологической лаборатории научно-исследовательского института при изучении свойств бактерий

Алешукина А.В., Голошва Е.В., Маркова К.Г., Полищук И.С., Мартышова И.Б., Березинская И.С. 7

Количественная полимеразная цепная реакция при диагностике туберкулеза – возможности и перспективы

Альварес Фигероа М.В., Литай И.С., Целешюте К.Д., Биктимирова К.Г. 7

Санитарно-микробиологическая оценка качества воды озера Первое в Челябинске

Андреева С.В., Алексеева К.В. 8

Санитарно-микробиологический контроль качества воды Шершнёвского водохранилища в Челябинске

Андреева С.В., Егорова Д.А. 8

Санитарно-микробиологический контроль качества воды озера Смолино в Челябинске

Андреева С.В., Халиман А.А. 9

Мониторинг стабильности диагностической листериозной сыворотки в условиях транспортирования

Андреевская Н.М., Коновалова Ж.А., Вершинская И.Б., Дихтярева И.А., Баертуева И.И. 9

Роль антибиотикорезистентных *Staphylococcus haemolyticus* в этиологической структуре внебольничных пневмоний, ассоциированных с COVID-19

Анисимова А.С., Аронова Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Павлович Н.В., Носков А.К. 10

Усовершенствованный набор реагентов «ИФА-антиХламидия» для выявления антител к *Chlamydia trachomatis*

Анискина Ж.В., Бурлак М.В. 10

Изучение процессов везикуляции у туляремийного микроба

Аронова Н.В., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Анисимова А.С., Мелоян М.Г. 11

Сложности дифференциации стрептококков группы Mitis на примере *Streptococcus oralis*

Афанасьева О.М., Бржозовская Е.А., Грубер И.М. 12

Динамика выделения этиологически значимых стрептококков и гемофильной палочки у пациентов детского многопрофильного неинфекционного стационара

Ахматова С.Н., Могилевский Д.П., Новикова О.В., Папина И.И., Борисова И.В., Булатова Г.М., Гудкова Т.С., Некрасова Т.В. 12

Формирование биопленки *Yersinia pestis* в организме *Citellophilus tesquorum* в зависимости от календарного возраста блох и сезона года

Базанова Л.П., Токмакова Е.Г. 13

Наноллипидный гель с антимикробными пептидами

Базиков И.А., Мадху Гупта, Рамеш К. Гоял, Мальцев А.Н., Ефременко А.А. 13

Антибиотикорезистентность *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из клинического материала и окружающей среды (водоассоциируемых штаммов)

Байракова А.Л., Лахтин В.М. 14

Конструирование нетоксичного варианта шигатоксина второго типа Stx2

Баннов В.А., Попова А.В., Светоч Э.А., Карцев Н.Н. 15

Изучение стабильности микробных культур в процессе культивирования

Барькова М.Р., Кисличкина А.А., Сизова А.А., Соломенцев В.И., Мухина Т.Н., Богун А.Г. 15

Серотиповая структура *Streptococcus pneumoniae* у детей дошкольного возраста в Республике Татарстан

Баязитова Л.Т., Зарипова А.З., Тюпкина О.Ф., Чазова Т.А., Родионова М.С., Исаева Г.Ш., Анамов Р.И. 16

К вопросу о чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов возбудителя чумы, изолированных в Тувинском природном очаге

Белькова С.А. 17

ГИС-технологии – актуальное направление обучения на программах ДПО в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бердникова Т.В., Прислегина Д.А., Жарникова Т.В., Борздова И.Ю., Таран Т.В., Заикина И.Н. 17

Применение современных питательных сред в лабораторной диагностике инфекционных болезней на курсах ДПО в ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора

Бердникова Т.В., Жарникова Т.В., Борздова И.Ю., Катунина Л.С., Курилова А.А., Таран Т.В., Заикина И.Н. 18

Современные подходы к диагностике сочетанных очагов туляремии на территории Алтая

Бжитских Е.Е., Рождественский Е.Н., Базарова Г.Х., Полковников Е.С., Красавина Н.Ю., Киреев А.А. 18

Бактериологическое исследование аутопсийного материала при пневмониях с летальным исходом болезни – значимое направление микробиологического мониторинга

Бондаренко А.П., Троценко О.Е., Огиенко О.Н., Голубева А.О., Костюк О.В., Запругалова Л.А., Бобровникова М.Ю. 19

Сравнительный анализ некоторых свойств клинических штаммов микроорганизмов в соответствии с уровнем их чувствительности к биоцидам

Бондарь С.В., Федорова Л.С., Гаджиев К.И., Ильякова А.В., Ковальчук С.Н., Архипова А.Л. 20

Мышиная модель летальной пневмококковой пневмонии

Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Перескокова Е.С., Ганина Е.А. 20

Оценка профилактической и терапевтической активности фаговой деполимеразы, специфичной к капсульным полисахаридам K9-типа *Acinetobacter baumannii*, на септической модели ацинетобактерной инфекции у лабораторных животных

Борзилов А.И., Шнейдер М.М., Перескокова Е.С., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Мирошников К.А., Воложанцев Н.В., Попова А.В. 21

Особенности применения среды Пизу в бактериологической диагностике дифтерии

Борисова О.Ю., Чагина И.А., Гадуа Н.Т., Пименова А.С., Полосенко О.В., Храмов М.В., Требунских И.П., Сидорова Н.А., Алексеева И.Н. 21

Особенности изоляции патогенных лептоспир и их идентификация современными методами

Бренёва Н.В., Киселева Е.Ю., Шаракшанов М.Б., Будаева С.Е., Балахонов С.В. 22

Оптимизация пробоподготовки клеток дрожжей <i>Saccharomyces cerevisiae</i> для определения иммуномодулятора – двуспиральной РНК – в клетках дрожжей Буданова Н.Ю., Аитов Р.С., Дунайцев И.А., Жиглецова С.К., Клыкova М.В., Коробова Н.А., Кондрашенко Т.Н. 22	Перспектива местного использования препарата коллоидного наносеребра против антибиотикорезистентных штаммов у беременных с хроническим тонзиллофарингитом Гапон М.Н., Иванова Е.А., Логинов И.А., Тагиров З.Т. 30
Бактериофаги и их ферменты как средство борьбы с антибиотикорезистентными энтерококками Бузиков Р.М., Казанцева О.А., Шадрин А.М. 23	Мобильная лаборатория молекулярной диагностики в санитарно-эпидемиологической службе Республики Татарстан Гараева Л.Т., Серазетдинова Ф.И., Закирова О.М., Буава В.Г. 31
Глубинное культивирование продуцента бактериальных теней с целью изготовления противочумной вакцины Бурмистров Е.А., Жумакаев Р.Х., Дунайцев И.А., Волошин А.Г., Клыкova М.В., Иванов С.А., Дентовская С.В., Сомов А.Н., Анисимов А.П. 24	Мониторинговые исследования арбовирусных инфекций на территории Запорожской области Герасимова А.Д., Елхова А.В., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В. 32
Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков для штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i>, выделенных от пациентов с COVID-19 Буткевич В.В., Тапальский Д.В., Колчанова Н.Э., Петровская Т.А., Залуцкая О.М., Зайцева В.Н., Филонюк В.А., Жаворонок С.В. 24	Антибиотикорезистентность стафилококков, выделенных из мокроты пациентов отделения профессиональной аллергологии и иммунореабилитации с бронхолегочной патологией Гизатуллина Л.Г., Масыгутова Л.М., Кудакеева Р.Х., Кабирова Э.Ф. 32
Плазмидный вектор с широким кругом хозяев для производства «бактериальных теней» грамотрицательных патогенов Вагайская А.С., Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П. 25	Чувствительность к антибактериальным препаратам стрептококков различных видов в многопрофильном стационаре г. Москвы Глушкова Е.В., Кайтуков А.О., Никитин Н.В., Дымент Е.А., Крыжановский В.Г., Салмина Т.А., Брико Н.И. 33
Прототип полигостальной трехкомпонентной вакцины для профилактики чумы Вагайская А.С., Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Мазурина Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П. 25	Особенности лабораторной диагностики туляремии в зависимости от формы заболевания Гнусарева О.А., Сирица Ю.В., Васильева О.В., Курчева С.А., Зайцева О.А., Ткаченко Н.О., Волынкина А.С. 33
Опыт применения методов метагеномного секвенирования для детекции и идентификации возбудителей бактериальных инфекций Васильева О.В., Ульшина Д.В., Зайцева О.А., Волынкина А.С., Писаренко С.В., Сирица Ю.В., Гнусарева О.А. 26	Формирование биопленок штаммами <i>Staphylococcus aureus</i> и <i>Escherichia coli</i> в зависимости от состава питательных сред Годовалов А.П., Шиканова Е.С. 34
Активность деполимеразы Dep_kpv74 и полимиксина против биопленок <i>Klebsiella pneumoniae</i> Веревкин В.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В. 27	Антибиотикорезистентность <i>eska</i>-микроорганизмов, выделенных из мочи пожилых пациентов стационара г. Ростов-на-Дону Голошва Е.В., Маркова К.Г., Полищук И.С. 34
Оценка чувствительности микроорганизмов рода <i>Salmonella</i>, выделенных из продуктов птицеводства в Санкт-Петербурге, к антимикробным препаратам Ветрова Л.С., Смирнова Е.В., Кафтырева Л.А. 27	Применение MVLST-анализа для поиска предкового генотипа эволюционной линии В вида <i>Bacillus anthracis</i> Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Миронова Р.И., Тимофеев В.С. 35
Мониторинг контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов Курской области в 2017–2022 гг. Волгина И.В., Сопина В.А., Ковальчук М.Л., Гребенюков К.В. 28	Разработка иммуноферментной тест-системы для выявления специфических антител к возбудителю туляремии и оценка ее диагностической эффективности Горбатов А.А., Соловьев П.В., Баранова Е.В., Мочалов В.В., Миронова Р.И., Бикетов С.Ф. 36
Микробиологический мониторинг носительства <i>Staphylococcus aureus</i> среди населения г. Набережные Челны за 2020–2022 гг. Галиуллина Ч.Ф., Чумакова Р.И., Хайсаров М.К. 28	Частота выделения и антибиотикорезистентность неферментирующих грамотрицательных бактерий в стационарах Нижнего Новгорода Гординская Н.А., Борискина Е.Б., Шкуркина И.С. 36
Анализ патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории Российской Федерации в 2018–2022 гг. Галкина А.Ю., Герасимова А.Д., Гусев Е.А., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В. 29	Характеристика планктонных и биопленочных культур клинических штаммов <i>Candida auris</i> Горемыкина Е.А., Слукин П.В., Мицевич И.П., Детушев К.В., Мухина Т.Н., Храмов М.В., Круглов А.Н., Фурсова Н.К. 37
Получение бактериальных теней <i>Listeria monocytogenes</i> с использованием химических реагентов и оценка их протективности для мышей линии BALB/c Гапельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Иванов С.А., Дентовская С.В. 29	Инновационные направления в деятельности микробиологической лабораторной службы по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Краснодарского края Гречаная Т.В. 37
Влияние делеций генов <i>iglC</i>, <i>sodC</i>, <i>sodB</i>, <i>recA</i> и <i>recD</i> на протективные и иммунологические свойства штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ на примере лабораторных морских свинок Гапельченкова Т.В., Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Борзилов А.И., Павлов В.М. 30	Иммунобиологическая активность микробной ассоциации бактерий и дрожжей Гурина С.В., Ананьева Е.П., Тихомирова О.М. 38

Изучение патогенных свойств штаммов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории Волгоградской области в 2022 г. Гусев Е.А., Герасимова А.Д., Галкина А.Ю., Лучинин Д.Н., Молчанова Е.В. 39	Резистентность к фторхинолонам бактерий <i>Bacillus cereus complex</i>, выделенных из аэрозолей атмосферного воздуха Емельянова Е.К., Андреева И.С., Пучкова Л.И., Сафатов А.С. 48
Микробиом – двуликий Янус: источник фармакологических ингредиентов и резервуар генов лекарственной устойчивости Даниленко В.Н. 39	Чувствительность к рифампицину природных изолятов коков из аэрозолей атмосферного воздуха Емельянова Е.К., Андреева И.С., Пучкова Л.И., Ребус М.Е., Сафатов А.С. 49
Определение активности и стабильности полисахарид-деполимеразы Der_krv74 при различных значениях pH и температуры Денисенко Е.А., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В. 40	Частота встречаемости устойчивости к дезинфицирующим средствам у антибиотикорезистентных изолятов <i>Micobacterium tuberculosis</i> Еремеева Н.И., Скорняков С.Н., Гончар А.С. 49
Обоснование выбора штамма чумного микроба для получения бактериальных теней Дентовская С.В., Вагайская А.С., Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Мазурина Е.М., Анисимов А.П. 41	Омиксные технологии в изучении вирулентности возбудителя чумы Ерошенко Г.А., Балькова А.Н., Коврижников А.В., Конанов Д.Н., Сперанская А.С., Лукина-Гронская А.В., Ильина Е.Н. 50
Индикация продукции эксфолиативного токсина А у клинических штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> методом времяпролетной масс-спектрометрии на масс-спектрометрах серии Microflex Bruker Детушев К.В., Скрыбин Ю.П., Абаев И.В. 41	Сохранение жизнеспособности <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> в смешанных биопленках с морскими бактериями в условиях долгосрочного культивирования Еськова А.И., Яковлев А.А., Щелканов М.Ю. 50
CRISPR-Cas-системы в клинических изолятах <i>Klebsiella pneumoniae</i> Детушева Е.В., Кисличкина А.А., Скрыбин Ю.П., Фурсова Н.К. 42	Резистентность к антибиотикам штаммов <i>Escherichia coli</i>, выделенных из продуктов пищевого происхождения Жамборова М.Х., Хоанг Тхи Ай Ван, Макарова М.А. 51
Оценка антимикробной активности и возможности формирования устойчивости к секнидазолу у возбудителей бактериального вагиноза Детушева Е.В., Кукес И.В., Фурсова Н.К. 42	Определение степени диссоциации штаммов возбудителя бруцеллеза после длительного хранения в лиофилизированном состоянии Жаринова Н.В., Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Белозерова О.Н., Хачатурова А.А., Пономаренко Д.Г., Карапетян М.Г. 51
Изменение спектра возбудителей респираторных инфекций в Рязанской области в период распространения коронавирусной инфекции Евдокимова О.В., Настевич Ю.А., Боброва Т.П. 43	Электрооптические исследования бактериальных суспензий в процессе их лизиса Жумакаев Р.Х., Волошин А.Г., Дунайцев И.А., Дентовская С.В., Клыкова М.В., Бурмистров Е.А., Анисимов А.П. 52
Биологические свойства природного ΔprmA мутанта <i>Francisella tularensis</i> subsp. <i>mediasiatica</i> Евсеева В.В., Бахтеева И.В., Тимофеев В.С. 44	Совершенствование технологий мониторинга за возбудителями инфекционных заболеваний на юге российского Дальнего Востока Запорожец Т.С., Беседнова Н.Н., Щелканов М.Ю. 53
Генетические особенности клинических штаммов <i>Klebsiella pneumoniae</i> и выявление микроцинов Евсеева М.А., Авдеева В.А., Багирова Н.С., Григорьевская З.В., Петухова И.Н., Кисличкина А.А., Служин П.В., Сизова А., Светоч Э.А., Фурсова Н.К., Хохлова О.Е. 44	Современные методы преодоления резистентности возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в эндоскопии Иванов А.В. 53
Использование транскриптомного анализа для изучения ответа возбудителя холеры на воздействие тяжелых металлов Евтеев А.В., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Темякова С.В., Ковалевич А.А., Герасименко А.А. 45	Обеспечение стерильности препарата бактериальных теней <i>Yersinia pestis</i> Иванов С.А., Вагайская А.С., Дентовская С.В., Анисимов А.П. 54
Масс-спектрометрический анализ пептидов рицина для идентификации токсина в биологических образцах Евтюхова А.Е., Сурин А.К., Рогозин М.М., Карцева А.С., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. 45	Комбинация моноклональных антител, способная нейтрализовать действие летального токсина <i>Bacillus anthracis</i> Иващенко Т.А., Романенко Я.О., Хлынцева А.Е., Марьин М.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Рогозин М.М., Шкуратова М.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. 54
Нетуберкулезные микобактерии и микобактериозы в Архангельской области в 2010–2020 гг. Елисеев П.И., Марьяндышев А.О. 46	Микробиологический и экологический мониторинг почвенных очагов сибирской язвы в Сибирском и Дальневосточном федеральных округах (2018–2022 гг.) Ивачева М.А., Кравец Е.В., Дугаржапова З.Ф., Балахонов С.В. 55
Выявление антигенов вируса Западного Нила с помощью Dot-иммуноферментного анализа Елхова А.В., Корсакова И.И., Яковлев А.Т. 47	Видовое разнообразие таксонов микроорганизмов в составе микробиоты дыхательных путей у пациентов с COVID-19 Исаева Г.Ш., Чумарев Н.С., Валиуллина И.Р. 55
ПЦР-РВ – важный инструмент в решении проблемы деструктивной пневмонии у детей Елькина М.А., Яцышина С.Б., Беседина М.В., Толстова Е.М., Зайцева О.В., Хаспеклов Д.В., Турищев И.В. 47	Интеграция масс-спектрометрических методов исследования в систему лабораторной диагностики возбудителей особо опасных и природно-очаговых инфекций Калинин А.В., Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Абрамович А.В. 56

Получение мышинных моноклональных антител против рекомбинантной А-субъединицы шигатоксина <i>Escherichia coli</i> 2-го типа Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Шкуратова М.А., Марьян М.А., Силкина М.В., Комбарова Т.И., Шемьякин И.Г., Фирстова В.В.	57	Snapper: идентификация сайтов метилирования с помощью технологии секвенирования Oxford Nanopore Конанов Д.Н., Бабенко В.В., Балькова А.Н., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А., Сперанская А.С., Ильина Е.Н.	65
Чувствительность к антибиотикам клинических изолятов возбудителей, выделенных от пациентов Городской клинической больницы №1 г. Краснодара Качанова О.А., Панченко Д.И., Нарбекова С.И.	57	Использование дескриптивного анализа при контроле качества экспериментальной среды для культивирования листерий по ростовым свойствам Коновалова Ж.А., Ивашкова О.Н., Дихтярева И.А., Войченко Н.А., Кузнецов В.И.	66
Монофазная <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> 4, [5],12: i:- – новый возбудитель пищевых вспышек в европейских странах. Особенности лабораторной диагностики Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н., Жамборова М.Х., Полев Д.Е., Сайтова А.Т., Смирнова М.В., Мельцер А.А.	58	Разработка импортозамещающего бульона Мюллера–Хинтон Косилова И.С., Домотенко Л.В.	66
Применение метода MALDI-TOF для эффективного контроля молочнокислых продуктов на основе живых лактобацилл Кириленко М.А., Кузнецов О.Ю.	59	Влияние биологических свойств штаммов <i>Bacillus anthracis</i> на выработку цитокинов клетками крови человека <i>in vitro</i> Котенева Е.А., Цыганкова О.И., Щербаклова В.Ю., Абрамович А.В., Калинин А.В., Родионов И.С.	67
Реконструкция полной последовательности генома штамма <i>Yersinia pestis</i> subsp. <i>microti</i> bv. <i>talassica</i> B-7074 (A-1807) Кисличкина А.А., Сизова А.А., Платонов М.Е., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.	59	Оценка санитарно-микробиологического состояния родников, расположенных на территории города Саратова Кошелева И.С., Мамонова И.А., Кузьянов Д.А., Эрдниев Л.П., Гусев Ю.С.	68
Биоинформатический анализ полного генома штамма <i>Yersinia alsatica</i> SCPM-O-B-7604 Кисличкина А.А., Сизова А.А., Скрыбин Ю.П., Соломенцев В.И., Богун А.Г., Дентовская С.В., Анисимов А.П.	60	Обнаружение генов β-лактамаз расширенного спектра и карбапенемаз в изолятах, обнаруженных в пищевых продуктах Кожкарева И.И., Катаева Л.В., Степанова Т.Ф.	68
Таксономическая структура и антибиотикорезистентность штаммов микроорганизмов, выделенных от пациентов детского возраста в хирургическом отделении Областной детской клинической больницы Ковалева Т.С., Шураева Н.Н., Солина В.А.	60	Модифицированные фосфатом кальция F1- и LcrV-антигены <i>Yersinia pestis</i>, иммобилизованные на плоских микрокристаллах глутамина, проявляют повышенную иммуногенность для мышей и морских свинок Красильникова Е.А., Платонов М.Е., Копылов П.Х., Иванов С.А., Шайхутдинова Р.З., Трунякова А.С., Гпельченкова Т.В., Вагайская А.С., Мазурина Е.М., Дентовская С.В., Анисимов А.П.	69
<i>Pseudomonas</i>Analysier – программное обеспечение для генетического типирования штаммов <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.В.	61	Белки наружной мембраны <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> как мишени для терапии псевдотуберкулеза Красильникова Е.А., Трунякова А.С., Гпельченкова Т.В., Шайхутдинова Р.З., Светоч Т.Э., Дентовская С.В.	70
Сравнительное INDEL-типирование штаммов <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, выделенных на территории Российской Федерации и Донецкой Народной Республики в период с 2006 по 2023 г. Ковалевич А.А., Водопьянов А.С., Писанов Р.В.	62	Использование микрокамер для оценки развития клеток бактерий методом фазово-контрастной микроскопии Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.	70
Резистентность бактерий к дезинфицирующим веществам: молекулярно-генетические механизмы формирования и методы мониторинга Ковальчук С.Н., Архипова А.Л., Бондарь С.В., Конанов Д.Н., Кривонос Д.В., Федорова Л.С., Ильина Е.Н.	62	Возможность изучения покоящихся (некультивируемых) клеток бактерий рода <i>Shigella</i> с помощью электронной микроскопии Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.	71
Особенности лабораторной диагностики менингококкового менингита у детей дошкольного возраста г. Минска Кожемякина А.А., Сивец А.М., Астапов А.А., Галькевич Н.В.	63	Некультивируемые (покоящиеся) клетки в структуре популяции бактерий рода <i>Lactobacillus</i> Кузнецов О.Ю., Кириленко М.А.	71
Определение L-аспарагиназной активности в бесклеточных фракциях <i>Vibrio cholerae</i> радиальной энзимодиффузией в агарозном геле Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.	63	Динамика изменчивости структуры популяции <i>Francisella tularensis</i> в природных очагах туляремии на Алтае Куликалова Е.С., Борзенко М.А., Мазепа А.В., Зарва И.Д., Сынгеева А.К., Холин А.В., Полковников Е.С., Базарова Г.Х., Мищенко А.И., Балахонов С.В.	72
Частота распространения условно-патогенных бактерий рода <i>Escherichia</i> в кишечнике пациентов с ревматоидным артритом Колеватых Е.П., Потехина С.В., Юрлов А.А.	64	Изменение микробиоты кожи рук на фоне использования медицинских перчаток Леонтьева А.В., Ганина Е.Б., Воробьева Ю.В., Кундасова Е.П.	72
Оценка вирулентности природных штаммов <i>Francisella tularensis</i> на мышинной модели туляремии Комбарова Т.И., Миронова Р.И., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Мокриевич А.Н., Борзилов А.И., Павлов В.М.	65	Создание нового подхода к диагностике туберкулеза в ветеринарии Литау И.С., Альварес Фигероа М.В.	73
		Влияние экологических факторов на заболеваемость детей COVID-19 в период военного конфликта Лихобабина О.А., Махмутов Р.Ф., Пошехонова Ю.В., Лихобабин А.А.	74

Многофакторный подход в изучении риска осложнения эпизоотолого-эпидемиологической ситуации по сибирской язве на территории Волгоградской области Логвин Ф.В., Герасименко Д.К., Рязанова А.Г., Мезенцев В.М., Семенова О.В., Аксенова Л.Ю., Еременко Е.И., Головинская Т.М., Печковский Г.А., Олейникова К.А.	74	Изучение инфицированности <i>Culex pipiens f. molestus</i> вирусом Западного Нила при его вертикальной передаче в экспериментальных условиях Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Герасимова А.Д., Галкина А.Ю., Гусев Е.А.	84
Возможности диагностики клостридиальной инфекции Логонова О.П., Шевченко Н.И.	75	Сравнительная оценка антибиотикорезистентности условно-патогенных бактерий из водоемов г. Ростова-на-Дону и сточных вод Морозова М.А., Седова Д.А., Калюжин А.С.	84
Характеристика уропатогенов у пациентов с сахарным диабетом Логонова О.П., Шевченко Н.И., Русаленко М.Г.	75	Молекулярно-генетический мониторинг штамма Омикрон на территории Челябинской области Москвина Т.И., Лебедева Я.Е., Кузенкова Т.В., Федорова И.О.	86
Изучение антибактериального действия биологически активных соединений гидрометаллатранов Лукьянова С.В., Войченко Н.А., Гефан Н.Г., Оборина Е.Н., Гриценко И.М., Адамович С.Н.	76	Изменение профиля экспрессии генов адаптивного ответа при <i>Helicobacter pylori</i>-инфекции Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков Д.В., Новиков В.В.	87
Генетические особенности мутанта <i>Burkholderia pseudomallei</i>, устойчивого к действию бензалкония хлорида Лучинин Д.Н., Устинов Д.В., Молчанова Е.В., Захарова И.Б.	77	Оценка чувствительности эталонных штаммов микроорганизмов к технологии фотокатализа при обеззараживании воздуха Мукабенов Ф.А., Еремеева Н.И.	88
Бактериальные тени в составе чумных вакцинных препаратов Мазурина Е.М., Копылов П.Х., Дентовская С.В., Анисимов А.П.	77	Влияние условий культивирования грибов рода <i>Coccidioides</i> на характеристики масс-спектров Муругова А.А., Шаров Т.Н., Половец Н.В.	89
Классическая и молекулярная диагностика эшерихиозов: достижения в науке и перспективы внедрения в практику Макарова М.А.	78	Получение гуманизированного антитела, нейтрализующего вирус Западного Нила Несмеянова В.С., Исаева А.А., Протопопова Е.В., Святченко В.А., Волосникова Е.А., Есина Т.И., Локтев В.Б., Щербачев Д.Н.	89
Бактериологический метод в персонализации антибиотикотерапии Малафеева Э.В., Гульнева М.Ю., Семечкин Н.В.	78	Иммунологические методы в лабораторной диагностике мелиоидоза: современное состояние и перспективы Новицкая И.В., Терешко Д.Л.	90
Особенности некоторых биологических свойств штаммов, необходимых для конструирования брюшнотифозной молекулярной вакцины Маматкулов А.И., Сабиров Ж.Р., Маматкулов И.Х.	79	Туляремия на Дону: итоги и перспективы исследований <i>Francisella tularensis</i> Носков А.К.	90
Фенотипические особенности микробиологических свойств бактерий рода <i>Stenotrophomonas</i> Марияш С.С., Зайцева Е.А., Лебедева Е.Г., Петренко Е.А.	79	Изменения в структуре российской популяции <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Носов Н.Ю.	91
Определение противоменингококковых антител к менингококку серогруппы А у новорожденных Мартыненко И.Г., Юнусова Р.Ю., Скирда Т.А., Бичурер А.М., Комбарова С.Ю.	80	Опыт обнаружения <i>Lactobacillus iners</i> при воспалительных заболеваниях женского генитального тракта Оборин Д.А., Годовалов А.П., Карпунина Т.И.	91
Получение химерных антител к ботулотоксину типа А Марьин М.А., Зенинская Н.А., Хлынцева А.Е., Рогозин М.М., Фирстова В.В.	80	Крымская геморрагическая лихорадка: эпидемиологическая и эпизоотологическая ситуация в Республике Дагестан в 2023 г., прогноз заболеваемости на 2024 г. Омариева Э.Я., Халимбеков Х.А., Гаджиева П.О.	92
Использование экспериментальной динамической модели для изучения биопленкообразования бактерий в морской воде Матосова Е.В., Бынина М.П., Ляпун И.Н., Щелканов М.Ю., Яковлев А.А.	81	Эпидемиологическая обстановка по сибирской язве в Республике Дагестан, результаты лабораторных исследований на наличие <i>Bacillus anthracis</i> за период с 2012 по 2022 г. Омариева Э.Я., Гаджиева П.О.	93
Характеристика биологических свойств <i>Enterococcus faecalis</i>, резистентных к линезолиду Матушинец А.О., Пушилина А.Д., Коменкова Т.С., Зайцева Е.А.	82	Ветеринарный мониторинг антибиотикорезистентности энтерококков Павлова В.С., Макавчик С.А.	93
Мониторинг хронической инфекции легких, вызванной <i>Staphylococcus aureus</i>, у пациентов с муковисцидозом Медведева О.С., Аветисян Л.Р., Чернуха М.Ю.	82	Резистентность к антибиотикам и бактериофагам <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, выделенных от пациентов в многопрофильном стационаре Панкова М.Ю., Коробова А.Г., Мещурова С.Ю., Кириллова К.И., Самоходская Л.М.	94
Опыт использования автоматического анализатора для быстрой диагностики мочевых инфекций Мещурова С.Ю., Коробова А.Г., Самоходская Л.М.	83		
Инаktivация вируса Западного Нила, полученного в культуре перевиваемых клеток линии <i>Vero</i>, с использованием мертиолята натрия Молчанова Е.В., Лучинин Д.Н., Галкина А.Ю., Гусев Е.А., Герасимова А.Д.	83		

Разработка и применение рекомбинантного фермента Cas12a для детекции нуклеиновых кислот на основе CRISPR/Cas-системы Панфёрцев Е.А., Решетняк Т.В., Щит И.Ю., Шевяков А.Г., Перовская О.Н., Соловьев П.В., Бикетов С.Ф.	94	Создание капсулированной формы пробиотика: исследование антилистериозного потенциала некоторых видов антагонистически активных бактерий в опытах на мышах для включения в состав экспериментального препарата Похиленко В.Д., Дунайцев И.А., Левчук В.П., Калмантаев Т.А., Чукина И.А., Клыкова М.В., Борзилов А.И., Коробова О.В., Комбарова Т.И., Бурмистров Е.А.	104
Оценка чувствительности патогенных и условно-патогенных микроорганизмов к антибиотикам, бактериофагам и пробиотикам Парахина Л.И., Парахина А.И., Пименова Ю.А., Котенева Е.Н., Трошина Д.А., Евстропов А.Н., Захарова Л.Н.	95	Оценка эффективности бактериоцина субтилозина при выращивании бройлеров Похиленко В.Д., Чукина И.А., Калмантаев Т.А.	105
Эпидемиологическая ситуация по токсокарозу на территории Челябинской области за 2019–2023 гг. Петрова О.С., Лямкина Д.Д., Смолина Е.В., Сухоручкина М.С.	95	Мультирезистентные штаммы бактерий в составе микробиоты ротоглотки детей в условиях стационара Примак Т.Д., Колобов Д.В., Эрдынеева Б.С.	105
Изучение вклада гена <i>blaCTX-M</i> в фенотип антибиотикоустойчивости мультирезистентного госпитального штамма <i>Klebsiella pneumoniae</i> Петросова Д.Т., Асташкин Е.И., Хохлова О.Е., Авдеева В.А., Фурсова Н.К.	96	Оценка каталазной активности редких дрожжей кишечника человека Прокопьев В.В.	106
Анализ результатов проведения внешнего контроля качества по лабораторной диагностике дифтерии Пименова А.С., Борисова О.Ю., Гадуа Н.Т., Чагина И.А., Андриевская И.Ю.	98	Видовой состав колиформных бактерий, выделенных из пищевых продуктов и продовольственного сырья Проскурнин Р.В., Самодед Т.Н., Гайдар Е.С., Гезима А.А.	106
Использование фаговых литических систем для получения инактивированных бактериальных вакцин Платонов М.Е., Дентовская С.В., Анисимов А.П.	98	Обоснованность применения <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ-Р-Turbo-GFP (b) в качестве индикатора кормления иксодовых клещей <i>in vitro</i> Рамзаева Ю.С., Василенко Е.И., Коняева О.А., Мироненко Е.А., Волынкина А.С.	107
Изучение вирулентных и патогенных свойств штаммов <i>Burkholderia thailandensis</i> при пассажах на золотистых хомячках Плеханова Н.Г., Хабарова И.А., Жукова С.И., Викторов А.Д., Замарина А.Ю., Бартенева М.В., Захарова И.Б.	99	Детекция и типирование боррелий в клещах, снятых с людей Решетняк Т.В., Щит И.Ю., Бикетов С.Ф., Говорунов И.Г., Козлова Т.В.	108
BV-АГАР – питательная среда для выделения и культивирования <i>Lactobacillus iners</i> и других представителей вагинальной микробиоты Подкопаев Я.В., Домотенко Л.В.	99	Результаты изучения синергии меропенема и новых антибактериальных веществ в отношении <i>Klebsiella pneumoniae</i> и <i>Acinetobacter baumannii</i> Рогачева Е.В., Краева Л.А.	108
Разнообразие <i>wb*</i>-кластеров <i>Vibrio cholerae</i> nonO1/nonO139, выделенных от людей на территории Российской Федерации в 2017–2022 гг. Подойницына О.А., Кругликов В.Д., Ивлиева О.Н., Евтеев А.В., Ковалевич А.А.	100	Получение рекомбинантных субъединиц рибина Рогозин М.М., Марьин М.А., Хлынцева А.Е., Калмантаева О.В., Евтюхова А.Е., Карцева А.С., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.	109
Состав микробиоты ротоглотки у пациентов с пневмонией, ассоциированной с геновариантами вируса SARS-CoV-2 в г. Ростове-на-Дону и Ростовской области Полищук И.С., Алешукина А.В., Колпаков Д.С., Березинская И.С.	100	Динамика изменения белкового спектра <i>Brucella abortus</i> при культивировании <i>in vitro</i> Родионов И.С., Лукашевич Д.Е., Котенева Е.А., Пономаренко Д.Г.	109
Сравнительная оценка белковых основ при разработке модифицированной среды Раппапорта–Вассилиадиса (среда MSRV) Полосенко О.В., Сёмина А.Ю., Храмов М.В.	101	Использование метода ELISpot-анализа для количественного определения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к субъединице А шигатоксина <i>Escherichia coli</i> 2-го типа Романенко Я.О., Иващенко Т.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Марьин М.А., Шкуратова М.А., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.	110
Ключевая роль питательных сред для обнаружения стафилококков при санитарно-бактериологических исследованиях Полосенко О.В., Храмов М.В.	102	Комбинации моноклональных антител к RBD S-белка вируса SARS-CoV-, ингибирующие взаимодействие с ACE2-рецептором Романенко Я.О., Иващенко Т.А., Марьин М.А., Карцева А.С., Силкина М.В., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В.	110
Изучение микробиоты толстого кишечника методом 16S рНК метагеномного секвенирования на модели макак-резус Полякова В.И., Кривонос Д.В., Корнеев Е.В., Пенкин Л.Н., Сперанская А.С., Аршба И.М., Ильина Е.Н.	102	Непрерывное медицинское образование в подготовке медицинского микробиолога Романов В.А., Малафеева Э.В.	111
Совершенствование ПЦР-диагностики инфекционного мононуклеоза у детей Попкова М.И., Филатова Е.Н., Брызгалова Д.А., Сахарнов Н.А., Соболева Е.А., Кулова Е.А., Уткин О.В.	103	Оценка чувствительности к антибиотикам штаммов бактерий <i>Escherichia coli</i> в условиях электромагнитного излучения радиочастотного диапазона Wi-Fi Рыбалко С.Ю., Постникова О.Н., Малыгина В.Ю.	112
Клонирование гена карбапенемазы <i>blaKPC-2</i> из клинического штамма <i>Klebsiella pneumoniae</i> Потапова А.Б., Фурсов М.В., Фурсова Н.К.	103	Система тестов для упрощенной дифференцировки стафилококков Рябинин И.А.	112

Клинический анализ крови как диагностический навигатор оценки тяжести COVID-19 Санькова М.В., Полуэктова В.Б.	113	Получение рекомбинантного эндолизина, активного против клинических штаммов <i>Staphylococcus aureus</i> Скрябин Ю.П., Фурсова А.Д., Шишкова Н.А., Абаев И.В.	121
Диспротеинемия при остром бруцеллезе Саркисян Н.С.	113	Гены вирулентности <i>Escherichia coli</i> в клинических штаммах, выделенных от онкологических больных в 2022–2023 гг. Слукин П.В., Горемыкина Е.А., Багирова Н.С., Хохлова О.Е., Фурсова Н.К.	121
Изучение плазмидных типов <i>Salmonella Enteritidis</i> в Приморском крае в 2022 г. Сафина И.Н., Запорожец Т.С., Показеева Ю.Н., Яковлев А.А., Щелканов М.Ю.	114	Антибактериальное действие образцов легированных металлов, модифицированных ионами Zn Слукин П.В., Игнатов С.Г.	122
Молекулярно-генетические маркеры возбудителя в диагностике <i>Helicobacter pylori</i>-инфекции Сварваль А.В., Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Кафтырева Л.А.	114	Антибактериальная активность, опосредованная активными формами кислорода, индуцированная рентгеновским и ультрафиолетовым облучением, в пленках TiCaCON Слукин П.В., Игнатов С.Г.	122
Получение рекомбинантного штамма <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3) /pET-eae Rv, продуцента гибридного белка EaeRv Светоч Т.Э., Панферцев Е.А., Копылов П.Х., Карцев Н.Н.	115	Бактерицидное и фунгицидное действие титановых пластин, модифицированных ионами металлов Слукин П.В., Игнатов С.Г.	123
Системный и интестинальный иммунный ответ у мышей BALB/c на комбинированный детоксицированный эшерихиозный липополисахарид Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Перескокова Е.С., Комбарова Т.И., Коробова О.В., Борзилов А.И.	115	Оценка бактерицидной и фунгицидной активности тканевых нанопервохностей с покрытием нитридом бора и наночастицами железа и серебра в отношении клинических штаммов микроорганизмов Слукин П.В., Игнатов С.Г.	123
Разработка пилотной технологии получения нетоксичных иммуногенных препаратов липополисахаридов <i>Escherichia coli</i> O157: H7 и <i>Escherichia coli</i> O104: H4 Светоч Э.А., Карцев Н.Н., Ерусланов Б.В., Борзилов А.И., Дунайцев И.А., Борзенков В.Н., Комбарова Т.И., Коробова О.В., Перескокова Е.С., Жумакаев Р.Х., Калмантаев Т.А., Левчук В.П., Хатюшин Ю.И., Клыкова М.В., Бурмистров Е.А., Жиглецова С.К., Буданова Н.Ю., Алхазова Б.И., Коробова Е.В., Мироненко А.А., Науменко О.И., Апарин П.Г., Ледов В.А.	116	Самодезинфицирующиеся поликапролактоновые нановолокна с наночастицами Ag Слукин П.В., Игнатов С.Г.	123
Иммуногенные и протективные свойства детоксицированных липополисахаридов <i>Salmonella Enteritidis</i> при сальмонеллезной инфекции у мышей C57BL/6j Светоч Э.А., Ерусланов Б.В., Карцев Н.Н., Борзенков В.Н., Перескокова Е.С., Комбарова Т.И., Коробова О.В., Борзилов А.И.	117	Оценка терапевтической эффективности полисахарид-деполимеразы Dep_kpv79 на инфекционной модели личинок <i>Galleria mellonella</i> Слукин П.В., Красильникова В.М., Воложанцев Н.В.	124
Бактериологическое исследование мочи при бессимптомной бактериурии у беременных женщин Семечкин Н.В., Романов В.А., Данилик О.Н., Новосадова И.Г., Ершова М.Г., Акентьева С.А.	117	Делеция в гене <i>csgA</i> курли-отрицательных штаммов уропатогенных <i>Escherichia coli</i> Слукин П.В., Подгорная Н.Н., Фурсова Н.К.	124
Характеристика штаммов <i>Brucella melitensis</i>, выделенных на территории Республики Дагестан Сердюк Н.С., Жаринова Н.В., Кузнецова И.В., Жилченко Е.Б., Белозерова О.Н., Ковалев Д.А., Хачатурова А.А., Карапетян М.Г.	118	Вариабельность первичной структуры гена <i>chuA</i>, кодирующего рецептор гемофора, в штаммах разных клональных групп уропатогенных <i>Escherichia coli</i> Слукин П.В., Фурсова Н.К.	125
Определение жизнеспособности коллекционных штаммов <i>Francisella tularensis</i> в лиофильном состоянии и при низкотемпературном замораживании в криопробирках Сердюк Н.С., Жилченко Е.Б., Жаринова Н.В., Карапетян М.Г., Белозерова О.Н.	118	Опыт использования полногеномного секвенатора Genolab M Соломенцев В.И., Шишкина Л.А., Соломенцева А.Е., Лебедева А.Ю., Богун А.Г.	125
Оптимизация метода MLVA25-типирования для дифференциации штаммов <i>Yersinia pestis</i> основного подвида средневекового биовара Сидорин А.С., Карапетян Л.А., Коврижников А.В., Ерошенко Г.А.	119	Выявление нетипичных эритромицинчувствительных геновариантов возбудителя туляремии в Ростовской области Сорокин В.М., Павлович Н.В., Цимбалистова М.В., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Махмудов Р.С., Носков А.К.	126
Ретроспективное исследование сывороток крови от лихорадящих больных в Ставропольском крае (2007–2013 гг.) на наличие ДНК возбудителя лихорадки Ку Сирица Ю.В., Гнусарева О.А., Васильева О.В., Волынкина А.С., Ульшина Д.В., Зайцева О.А.	119	Биологические свойства штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ со сниженной экспрессией гена <i>sodB</i>, кодирующего железозависимую супероксиддисмутазу Сотникова М.А., Кравченко Т.Б., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Комбарова Т.И., Борзилов А.И., Мокриевич А.Н., Павлов В.М.	127
Оценка инфекционных рисков последствий чрезвычайной ситуации на левом берегу реки Днепр Ситникова А.Л., Пеньковская Н.А., Листопад С.А., Зинич Л.С., Тихонов С.Н.	120	Влияние состава питательной среды на молекулярно-биологические свойства вакцинного штамма <i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ Сотникова М.А., Хлопова К.В., Вахрамеева Г.М., Кравченко Т.Б., Мокриевич А.Н., Павлов В.М.	127

Перестройки резистома микробных сообществ тела человека в ходе терапии COVID-19

Старикова Е.В., Галева Ю.С., Федоров Д.Е., Корнеев Е.В., Селезнева О.В., Зорук П.Ю., Климина К.М., Веселовский В.А., Олехнович Е.И., Морозов М.Д., Болдырева Д.И., Сперанская А.С., Янушевич О.О., Маев И.В., Крихели Н.И., Левченко О.В., Андреев Д.Н., Соколов Ф.С., Фоменко А.К., Девкота М.К., Андреев Н.Г., Заборовский А.В., Царегородцев С.В., Евдокимов В.В., Говорун В.М., Ильина Е.Н. 128

Молекулярно-генетическая характеристика гена *LMP-1* вируса Эпштейна–Барр у ВИЧ-инфицированных пациентов

Суслов Н.А., Сахарнов Н.А., Минаева С.В., Филатова Е.Н., Попкова М.И., Уткин О.В. 128

Анализ бактериоциногенных штаммов *Enterococcus* spp.

Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Тазина О.И., Кисличкина А.А., Сизова А.А. 129

Молекулярная характеристика штаммов *Escherichia albertii*, выделенных при кишечной инфекции от перепелок

Теймуразов М.Г., Карцев Н.Н., Абаимова А.А., Тазина О.И. 130

Оценка эффективности и безопасности мундтицина Р436 в качестве пищевого биоконсерванта

Теймуразов М.Г., Абаимова А.А., Тазина О.И., Кисличкина А.А., Светоч Э.А., Карцева А.С. 131

Использование биологической модели золотистых хомячков для оценки эффективности субъединичных противосибиреязвенных вакцин

Тимофеев В.С., Бахтеева И.В., Хлопова К.В. 132

Этиология пневмоний

Тимофеева Н.Ю., Сармосова М.Г., Гаврилова Э.С. 133

Образование биопленки *Klebsiella pneumoniae* на абиотическом субстрате

Титова С.В., Анисимова А.С., Аронова Н.В. 133

Использование модели бубонной чумы при тестировании кандидатных вакцинных препаратов в УББ-2 лаборатории

Трунякова А.С., Вагайская А.С., Мазурина Е.М., Дентовская С.В., Анисимов А.П. 134

Оценка иммуногенной и протективной активности штамма *Yersinia pseudotuberculosis* 85pCad+ с делецией гена *surA*

Трунякова А.С., Красильникова Е.А., Гапельченкова Т.В., Светоч Т.Э., Дентовская С.В. 135

Изучение влияния экзометаболитов микробиоты кишечника человека с разной степенью дисбиоза на ростовые свойства штаммов *Vibrio cholerae*

Федотова И.С., Миронова Л.В., Григорова Е.В., Белькова Н.Л. 135

Активность эндолизина *LysSA18* в отношении клинических метициллинрезистентных штаммов *Staphylococcus aureus*

Фурсова А.Д., Скрыбин Ю.П., Шишкова Н.А., Абаев И.В. 136

Молекулярная эпидемиология ведущих возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в хирургических и реанимационных отделениях стационаров Республики Северная Осетия – Алания

Хабалова Н.Р., Кафтырева Л.А., Макарова М.А., Лялина Л.В., Полев Д.Е., Сайтова А.Т., Бутаев А.К., Бутаева Л.М., Хапсаева М.Э. 136

Состав аэробной микробиоты при инфекциях верхних дыхательных путей у амбулаторных пациентов г. Челябинска

Хайдаршина Н.Э., Катаева Е.И., Бахарева Л.И., Бурмистрова А.Л. 137

Антибиотикорезистентность возбудителей инфекций мочевыводящих путей в современной медицинской практике

Хацкая С.В., Собинова Л.Д. 137

Разработка безопасного протокола лиофилизации микроорганизмов в аппарате камерного типа Alpha 2-4 LSCplus

Хвойнова И.Г., Архипенко С.С., Юденич С.В., Токмакова Е.Г. 138

Оптимизация процесса спорообразования непатогенных бациллярных штаммов-продуцентов сибиреязвенного протективного антигена

Хлопова Г.М., Гончарова Ю.О., Бахтеева И.В., Миронова Р.И., Тимофеев В.С. 139

Потенциальная роль полиморфизма факторов патогенности сибиреязвенного микроба в дифференциальной вирулентности его штаммов для лабораторных животных

Хлопова К.В., Бахтеева И.В., Титарева Г.М., Евсеева В.В., Гончарова Ю.О., Тимофеев В.С. 139

Разработка магнимоносорбентов для селективного концентрирования токсинов бактериальной природы на основе магнитных частиц с иммобилизованными моноклональными антителами

Хлынцева А.Е., Шкуратова М.А., Жарникова И.В., Геогджаян А.С., Русанова Д.В., Калмантаева О.В., Зенинская Н.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. 140

Диски индикаторные картонные с противомикробными лекарственными средствами

Холодков С.В., Котляр М.А. 140

Резистом основных возбудителей гнойно-воспалительных осложнений у больных г. Красноярска

Хохлова О.Е., Камшилова В.В., Акушева Д.Н., Ларионова И.А., Федюкович Н.В., Авдеева В.А., Евсеева М.А., Кисличкина А.А., Богун А.Г., Фурсова Н.К. 141

Биологическая роль микробных биоценозов в полости рта. Их значение в этиологии кариеса

Цветков Ю.А., Цветков А.В., Бессонов С.Н. 142

Бактериофаги бактерий рода *Francisella*

Цимбалистова М.В., Мелоян М.Г., Павлович Н.В. 142

Оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus* на модели культуры клеток

Цырулина О.А., Темякова С.Ю., Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Чемисова О.С. 143

Характеристика микробиоты кожи в условиях применения местных глюкокортикостероидов в составе однокомпонентных и комбинированных мазей

Червинец Ю.В., Червинец В.М., Леонтьева А.В., Беляев В.С., Терехов В.М., Тимановский А.С., Чубарова Е.А. 143

Получение рекомбинантного белка экзоспориума *Bacillus anthracis* для разработки диагностических тест-систем

Шевяков А.Г., Панферцев Е.А. 144

Плазмидная криотрансформация вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ

Шишкова Н.А., Вахрамеева Г.М., Сотникова М.А., Мокриевич А.Н., Павлов В.М., Дятлов И.А. 144

Конструирование продуцента А-субъединицы шигатоксина второго типа *Escherichia coli* разными продуцентами

Шкуратова М.А., Марьин М.А., Рогозин М.А., Шемякин И.Г., Фирстова В.В. 145

Исследование биоматериала на иерсиниозы из природных очагов Алтайского края за период 2013–2023 гг. Щукина М.А.	146	Новые подходы к эпидемиологической оценке риска заражения кишечными инфекциями в зонах водопользования морских прибрежных акваторий Яковлев А.А., Матосова Е.В., Бынина М.П., Еськова А.И., Дробот Е.И., Щелканов М.Ю.	149
Модификация генов структурных деполимераз и изменение капсульной специфичности <i>Acinetobacter baumannii</i>-бактериофагов рода <i>Friunavirus</i> путем CRISPR/Cas9-редактирования Щурова А.С., Зверева С.Д., Полова А.В.	146	Микробиологические характеристики проб биоматериала пациентов с обширными ожогами при поступлении в специализированный ожоговой центр Ярец Ю.И.	150
Современные данные о микробиоме пищевых производств – что нового? Юшина Ю.К., Грудистова М.А., Зайко Е.В., Махова А.А.	147	Микробиота острых и хронических ран на различных стадиях инфекционного процесса Ярец Ю.И.	150
Комплексный подход к определению пищевых вирусов: возможности и перспективы Юшина Ю.К., Сатабаева Д.М., Зайко Е.В.	148	Иммунофенотип лейкоцитов крови у пациентов с ранами на различных стадиях инфекционного процесса Ярец Ю.И.	151
Анализ субвидового типирования сальмонелл из очагов групповой заболеваемости кишечными инфекциями по Республике Саха (Якутия) Ядрихинская В.К.	148	Изучение нового химиотерапевтического средства для лечения инфекционных заболеваний Буковская Ю.А., Гостев В. А., Черных Т.Ф., Генералов И.И.	151

Научное издание

Материалы VIII Национального конгресса бактериологов
Москва, 27–28 сентября 2023 г.

Подписано в печать 11.09.2023

Формат 60x90/8

Усл. печ. л. 20,25

Тираж: 600 экз.

Заказ № 20611

ООО «Издательство «Династия»

117149, Москва, ул. Азовская д. 6, к. 3, Блок 8,8/2

Мастерская печати Old School

603105, Нижний Новгород, ул. Чачиной, 39а, оф. 5

ISBN 978-5-98125-127-6



9 785981 251276