

ЧЕРВЯКОВА НАДЕЖДА СЕРГЕЕВНА

ОПТИМИЗАЦИЯ ПОДХОДОВ К УСТАНОВЛЕНИЮ АУТЕНТИЧНОСТИ
И КОНСЕРВАЦИИ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ
ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

кандидат биологических наук

Осин Александр Владимирович

Официальные оппоненты: **Щербаков Анатолий Анисимович** – доктор биологических наук, профессор, профессор кафедры микробиологии, биотехнологии и химии Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный аграрный университет им. Н.И. Вавилова» Министерства сельского хозяйства Российской Федерации

Саяпина Лидия Васильевна - доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, главный эксперт Федерального государственного бюджетного учреждения «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации

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

Защита состоится «21» декабря 2017 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Слудский Александр Аркадьевич

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования и степень разработанности проблемы. Одной из важнейших задач коллекционной деятельности в области использования патогенных микроорганизмов, является формирование панелей тест-штаммов, используемых в качестве контрольных различных научно-практических исследований [Онищенко и др., 2009; Меньшиков и др., 2013; Шепелин и др., 2015]. Их применение определяется нормативно-методическими документами различного уровня и является обязательным при проведении исследований, связанных с использованием микроорганизмов I-IV групп патогенности в производственной, диагностической и образовательной деятельности [СП 1.3.3118-13; СП 1.3.2322-08; МУ 3.3.2.2124-06; МУК 4.2.2316-08]. При этом подавляющее большинство тест-штаммов Государственной коллекции патогенных бактерий (ГКПБ) ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» были выделены и описаны в середине XX века, до периода становления современной микробиологической систематики, и могут не соответствовать ее постоянно совершенствующимся требованиям. Кроме того, методы их идентификации, на момент выделения культуры, обладали меньшей разрешающей способностью и не позволяли, в ряде случаев, с высокой степенью точности определить видовую принадлежность микроорганизма. Также не маловажен тот факт, что до публикации в 1980 г. первого издания «Утвержденные списки названий бактерий» [Skerman et al., 1980], одни и те же микроорганизмы могли иметь различные наименования.

И, наконец, еще одной серьезной проблемой в данном аспекте является несовершенная система хранения микроорганизмов, использовавшаяся в тот период времени. Применение методов долгосрочной консервации (лиофилизации или криоконсервации) могла позволить использовать в практике лишь малая часть коллекций, а наиболее распространенным способом являлось поддержание штаммов на плотных или полужидких питательных средах с интервалом пересева культуры не менее одного раза в год. Постоянные пересевы способствовали накоплению ошибок, вызванных человеческим фактором, к которым в первую очередь относятся загрязнение образцов, а также их непреднамеренная замена, что в случае микроорганизмов, близких по целому ряду признаков, могло привести к утрате первоначальной культуры и распространению в другие коллекции неаутентичного штамма.

Все вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения номенклатурной ревизии коллекционных тест-штаммов с применением современного набора методов установления аутентичности, основанных на использовании автоматизированных систем биохимического и молекулярно-генетического анализа (*VITEK 2 Compact*, *Dupont Qualicon RiboPrinter[®] System*, *MicroFlex[™] LT MALDI-TOF*), определением спектра их видоспецифичных маркеров и уточнением систематического положения на основании обновляющихся, или вновь вводимых признаков, характеризующих видовую принадлежность микроорганизма. Для эффективного использования установленных маркеров аутентичности требуется механизм, позволяющий объединить информацию из различных видов генетических и фенотипических исследований коллекционных штаммов в одну глобальную базу данных и обеспечивающий проведение окончательного анализа их свойств. В этом качестве возможно использование обширного спектра компьютерных программ, одной из которых является BioNumerics [Rodas et al., 2005].

Другой немаловажной деятельностью является совершенствование подходов к поддержанию штаммов в жизнеспособном состоянии с сохранением первоначальных свойств в течение максимально возможного времени [Guidance for the operation of biological research centers, 2004 г.]. Одним из оптимальных методов хранения является лиофилизация, обеспечивающая наибольшую стабильность признаков в течение длительного времени (30 лет и более) и позволяющая не только поддерживать штаммы коллекционного фонда, но и обеспечивать их образцами сторонние учреждения, осуществляя пересылку без сохранения холодной цепи. Используемое ранее для этих целей оборудование к настоящему времени является морально и физически устаревшим и требует замены на современные сублимационные установки. При этом внедрение новых лиофильных аппаратов для высушивания патогенных микроорганизмов влечет за собой необходимость отработки условий этого процесса с учетом их технических характеристик и конструктивных особенностей. Более простым и удобным методом консервации часто востребованных штаммов, прежде всего в рабочих коллекциях, не требующих транспортировки на дальние расстояния, является низкотемпературное замораживание при температуре минус 70 °С. Сложность такого хранения представляет подбор условий, поскольку универсальных способов консервации не существует [Онищенко и др., 2010; Савкина и др., 2015].

В связи с этим, очевидна актуальность исследований, направленных на оптимизацию существующих подходов с подбором условий и адаптации нового оборудования к консервации патогенных микроорганизмов с целью сохранения жизнеспособности и увеличению сроков хранения их коллекционных штаммов, в том числе и контрольных, а также повышения эффективности их консервации и уменьшению времени, затрачиваемого на этот процесс.

Цель исследования: совершенствование методических подходов к установлению аутентичности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и оптимизация способов их долгосрочного хранения.

Задачи исследования:

1. Провести расширенную идентификацию тест-штаммов патогенных бактерий на основе изучения их культурально-морфологических свойств, биохимической активности, протеомного профиля рибосомальных белков, структуры и расположения *rtn*-оперона в геноме патогенов.
2. Определить на основе полученных результатов комплекс маркеров аутентичности тест-штаммов по утилизации субстратов, масс-спектрам и риботипам.
3. Сформировать единую базу данных изученных свойств патогенов и разработать алгоритм установления аутентичности контрольных штаммов.
4. Адаптировать способ низкотемпературного хранения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов в ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.
5. Оптимизировать схему процесса лиофилизации штаммов патогенных микроорганизмов с применением современных сублимационных установок камерного и коллекторного типов с обеспечением режима биологической безопасности.
6. Провести сравнительный анализ лиофилизированных препаратов коллекционных тест-штаммов, полученных на различных сублимационных установках, по их жизнеспособности и длительности хранения.

Научная новизна. Впервые по биохимической активности (от 40 до 60 признаков), по молекулярно-генетическому профилю (структуре и расположению *rnn*-оперона) и спектрам рибосомальных белков проведена расширенная идентификация 130 штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», использующихся в качестве контрольных в диагностической и производственной деятельности.

Получены «молекулярные портреты» контрольных штаммов, позволяющие комплексно проводить их родовую, видовую и подвидовую дифференциацию. Сведение результатов фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных исследований в единой базе данных позволило определить комплекс маркеров аутентичности для каждого из исследуемых коллекционных тест-штаммов, характеризующийся набором: из 5 – 13 биохимических субстратов, ферментируемых клетками микроорганизма; 1 - 9 фрагментов *rnn*-оперона с молекулярными массами в интервале 0,99 – 14,38 т.п.н и 1 - 15 рибосомальных белков с массой 3,06 – 9,78 кДа. Данное исследование позволило впервые комплексно охарактеризовать панель контрольных штаммов, поддерживаемых в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», и способствовало обеспечению их подлинности, на всех этапах воспроизводства.

По материалам проведенных исследований разработан алгоритм определения аутентичности и систематической принадлежности коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов, включающий скрининг культурально-морфологических свойств штаммов, определение их ферментативной активности к расширенному количеству дифференцирующих субстратов, установление профиля рибосомальных белков и получения риботипа, с последующей обработкой этих результатов в биоинформационном программном пакете BioNumerics.

На модели 60 штаммов бактерий, относящихся к 22 родам и 40 видам, научно обоснованы схемы долгосрочной консервации контрольных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации на современных сублимационных установках камерного, коллекторного типов и низкотемпературного замораживания, обеспечивающие длительное поддержание образцов в жизнеспособном состоянии при обеспечении биологической безопасности всего технологического процесса.

Полученные данные о выживаемости и жизнеспособности 45 контрольных штаммов, указывают на высокую эффективность использования лиофильных установок коллекторного типа для поддержания коллекционного фонда штаммов патогенных микроорганизмов, в то время как применение камерной сушки позволяет получать препараты ограниченного срока хранения. Дана оценка использования различных лиопротекторов на качество получаемых препаратов коллекционных штаммов. Показано, что наиболее подходящими для лиофилизации контрольных штаммов являлись сухое молоко с добавлением трегалозы, сахарозо-желатиновая среда (СЖА), лактозо-желатиновая среда (ЛЖ).

Адаптированный метод низкотемпературного замораживания позволяет значительно увеличить сроки хранения контрольных штаммов в рабочих коллекциях в условиях минус 70°C с применением в качестве криопротекторов протеозопептона с 50 % глицерином, сухое молоко с добавлением трегалозы, СЖА.

Эффективность предложенных схем долгосрочной консервации теоретически обоснована путем расчёта прогнозируемых сроков хранения лиофилизированных и замороженных препаратов контрольных штаммов, находящихся в интервале от 2 до 100 лет в зависимости от видовой принадлежности патогена, типа лиофильной установки и состава крио- и лиопротекторов.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в получении знаний, формирующих представления о современных подходах к установлению аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов и их долгосрочной консервации. Экспериментально доказано, что комплекс маркеров аутентичности, включающий биохимическую активность штамма к дифференциально-диагностическим субстратам, структуру и расположение *rnn*-оперона и профиль рибосомальных белков, обеспечивает создание «молекулярных портретов» микроорганизмов, принадлежащих к 23 родам и 57 видам, позволяющих контролировать их подлинность в процессе хранения и воспроизводства. Разработанные схемы долгосрочной консервации коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов методами лиофилизации и низкотемпературной консервации обеспечивают длительное сохранение их образцов в жизнеспособном состоянии, что подтверждается оценкой выживаемости и жизнеспособности бактериальных клеток, а также рассчитанными прогнозируемыми сроками хранения.

Полученные данные в ходе работы вошли в раздел методических рекомендаций: МР 4.2.0089-14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности» и МР 4.2.0090-14 «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности», утвержденных Руководителем Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации А. Ю. Поповой 24 апреля 2014 г. и 13 мая 2014 г., соответственно. Одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 4 от 9 июня 2015 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым «Методические рекомендации по установлению аутентичности и систематического положения коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов».

На основе полученных результатов впервые создан каталог аналитических данных, направленный на установление аутентичности контрольных штаммов, использующихся при проведении диагностических исследований, для контроля качества медицинских диагностических и профилактических препаратов, а также пищевых продуктов. Составлены «Методические рекомендации по созданию структуры и заполнению базы данных коллекционных штаммов микроорганизмов на основе программного пакета Bionumerics», которые одобрены Ученым советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 28.04.2016 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

Для выполнения лиофильного высушивания тест-штаммов патогенных микроорганизмов на современных сублимационных установках камерного и коллекторного типа разработаны методические рекомендации: «Лиофильное высушивание неспорообразующих возбудителей инфекционных заболеваний III-IV групп патогенности на лиофилизаторе Martin Christ»,

одобренны Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 23 декабря 2010 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым; «Лиофильное высушивание коллекционных штаммов бактерий III-IV групп патогенности на коллекторных лиофилизаторах с холодным конденсором» одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 26 декабря 2012 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

С целью стандартизации процедуры низкотемпературной консервации возбудителей I-IV групп патогенности при температуре минус 70 °С, составлены «Методические рекомендации по низкотемпературной консервации возбудителей I-IV групп патогенности при температуре минус 70 °С», которые одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 2 от 20 апреля 2012 г.) и утверждены директором института В. В. Кутыревым.

Подготовлены паспорта коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», включающие полученные данные о фенотипических и молекулярно-генетических свойствах патогенов.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Установленные маркеры аутентичности коллекционных штаммов на основе фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных исследований позволяют комплексно проводить родовую, видовую и подвидовую дифференциацию штаммов и контролировать их подлинность на всех этапах цикла воспроизводства.
2. Разработанный алгоритм и единый каталог аналитических данных расширенного спектра фенотипических (ферментативная активность) и молекулярно-биологических (профиль рибосомальных белков и риботип) маркеров обеспечивают достоверное установление аутентичности контрольных штаммов микроорганизмов I-IV групп патогенности.
3. Предложенные схемы долгосрочной консервации патогенных микроорганизмов методами лиофильного высушивания на сублимационных установках камерного, коллекторного типов и низкотемпературного замораживания, обеспечивают длительное хранение образцов в жизнеспособном состоянии и отвечают всем требованиям биологической безопасности.

Степень достоверности и апробация работы. Достоверность изложенных в диссертационном исследовании положений, выводов и результатов подтверждена значительным объемом экспериментальных данных с применением современных методических приемов, позволяющих повысить информативность идентификации коллекционных штаммов и сохранить их свойства в течение длительного времени. Интерпретация полученных результатов проведена с использованием методов обработки информации и статистического анализа. Работа проведена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании. Материалы диссертации представлены на X Съезде Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации», (Москва, 12-13 апреля, 2012 г.); на XI Межгосударственной научно-практической конференции «Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера» (Саратов, 16-17 октября, 2012 г.); на юбилейной научно-практической конференции Уральской противочумной станции 1914-2014 гг. (Уральск, 2014 г.); на VII ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 30

марта – 1 апреля 2015 г.); на итоговых научных конференциях РосНИПЧИ «Микроб» «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (Саратов, 2-4 мая 2012, 2014 – 2017 г.).

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования. Работа выполнена в отделе «Государственная коллекция патогенных бактерий» ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках плановой научно-исследовательской темы «Новые диагностические технологии в мониторинге особо опасных инфекционных болезней, индикации возбудителей и расширенном изучении свойств штаммов» (шифр темы 53-2-14, регистрационный номер АААА-А16-116112810064-1). Основные разделы диссертационной работы выполнены лично соискателем на базе отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий». Отдельные экспериментальные исследования (п.п 3.3, 3.4 главы 3 диссертационной работы) выполнены на базе отдела диагностики инфекционных болезней ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора совместно с заведующей лабораторией оперативной диагностики, канд. биол. наук С. А. Портенко и науч. сотр. лаборатории молекулярной диагностики, канд. биол. наук А. С. Абдрашитовой.

Публикации результатов исследования. Материалы исследования опубликованы в 10 работах, из них 4 – в периодических изданиях из перечня российских рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертация представлена на 177 страницах текста, состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов), заключения и выводов. Работа иллюстрирована 29 таблицами и 28 рисунками. Библиографический указатель содержит 88 отечественных и 163 зарубежных источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. Для достижения цели диссертационного исследования использовали: микробиологические, биохимические, серологические, молекулярно-генетические методы исследования и методы долгосрочной консервации коллекционных штаммов (лиофилизацию и низкотемпературное замораживание микроорганизмов при температуре минус 70 °С). Работу с патогенными микроорганизмами проводили в соответствии с требованиями действующих санитарно-эпидемиологических правил: СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней».

В работе использовано 130 коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов. Они представлены бактериями I-IV групп патогенности, принадлежащих к 23 различным родам: *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Brucella*, *Citrobacter*, *Corynebacterium*, *Enterobacter*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Francisella*, *Klebsiella*, *Listeria*, *Pasteurella*, *Plesiomonas*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Vibrio*, *Yersinia* и 57 видам.

Для изучения культуральных свойств исследуемых штаммов применяли жидкие и плотные питательные среды, принятые для определенной группы микроорганизмов [Общая и

санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований, 2004; Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2013; Bergey's Manual, 2005]. Подтверждение их видовой принадлежности и установление видовых маркеров проводили с использованием классических методов микробиологического и серологического анализа, а также автоматизированных анализаторов: *VITEK 2 Compact* (Bio-Mérieux, Франция), *RiboPrinter®System* (DuPont Qualicon, США) *MicroFlex™ LT MALDI-TOF* (Bruker Daltonics, Германия в соответствии с инструкцией производителя и MP 4.2.0090-14, MP 4.2.0089-14.

Обработку результатов осуществляли в программе *BioNumerics v. 7.5* с помощью модулей «Character type», «Fingerprint type», «Spectrum type». Коэффициенты подобия рассчитывались на основе корреляции Пирсона. Кластерный анализ проводили по методу невзвешенного попарного среднего - UPGMA.

Лиофилизацию бактериальных клеток исследуемых штаммов проводили на сублимационных установках камерного типа (*Martin Christ Epsilon 2-6D*) и коллекторного типа (аппарат системы К.Е. Долинова, *Martin Christ Alpha 1-4 LDplus* и *Heto Power Dry*) согласно правилам их эксплуатации. Низкотемпературное замораживание тест-штаммов проводили в соответствующей криозащитной среде с применением стерильных криопробирок.

В качестве лио- и криопротекторов использовали: молоко сухое, обезжиренное (*AppliChem, Germany*), трегалозу – D (+) дегидрат (*AppliChem, Germany*), натрия-L-глутамат-моногидрат (*AppliChem, Germany*), сахарозу - D(+) (*USP-NF, BP, Ph. Eur., JP*) pure, pharma grade (*AppliChem, Germany*), желатин (*AppliChem, Germany*), питательный агар (*Himedia, India*), лактозу- D(+) моногидрат (*USP-NF, BP, Ph. Eur.*) pure, pharma grade (*AppliChem, Germany*), глицерин 99 % for synthesis (*AppliChem, Germany*), триптиказо-соевый питательный бульон (*Merck KGaA, Germany*), сыворотку крови крупного рогатого скота для культур клеток, жидкую, стерильную (ООО «БиолоТ», Санкт-Петербург), протеозопептон (*Himedia, India*).

Жизнеспособность микробов определяли путем посева их на питательные среды с последующим подсчетом клеток к первоначальному числу жизнеспособных клеток (до начала хранения), принятому за 100%. Статистическую обработку данных осуществляли с помощью методов вариационной статистики [Плохинский, 1970].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Определение аутентичности и таксономической принадлежности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов

Изначально аутентичность изучаемых штаммов подтверждалась путем выполнения методик, результаты которых были указаны в их паспортах на момент выделения культуры или ее поступления в коллекцию, с применением дифференциально–диагностических питательных сред, традиционно используемых в идентификации микроорганизмов. Набор тестов для каждой группы микроорганизмов своеобразен и строго не регламентируемый, поэтому каждый исследователь имеет право выбирать только те, которые позволяют проводить межвидовую и родовую дифференциации штаммов [Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований, 2004; Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней, 2013]. Установлено, что результаты, полученные нами с помощью этих тестов, в 98 %

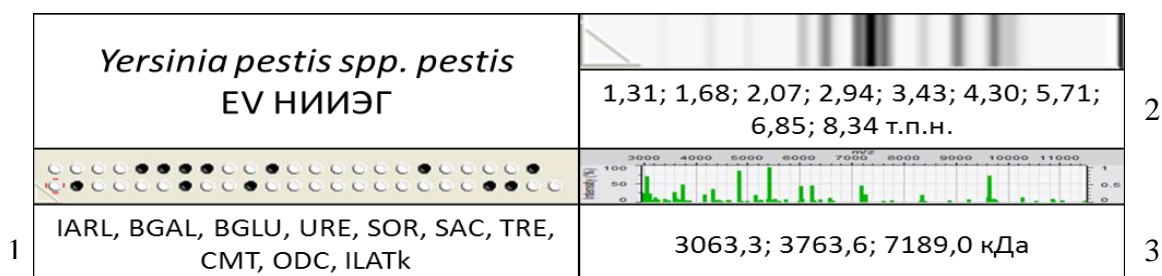
случаях полностью соотносились с паспортными данными, выписанными при их выделении или включении в коллекцию. Отклонения в паспортных данных были обнаружены только у трех штаммов: *Serratia marcescens* 1, *Citrobacter freundii* 101/57, *Proteus vulgaris* 261, а для бактерий рода *Bacillus* применение сред Гисса показало недостаточную разрешающую способность этого набора, не позволив полностью идентифицировать их до вида. Использование в полном объеме традиционных тестов, рекомендованных для идентификации микроорганизмов повышает достоверность результатов, но не всегда доступно для практических лабораторий ввиду трудоемкости их выполнения, что в случае медленно растущих и прихотливых микроорганизмов (*Brucella*, *Francisella*) вызывает сложности и отнимает много времени, кроме того приготовление большинства этих сред *ex tempore* может вызвать отклонения в их составе. Снизить трудоемкость исследования и повысить их информативность позволили микрообъемные технологии, на основе которых разработаны коммерческие тест-системы отечественного и зарубежного производства, СИБ (ФГУП «НПО Микроген», Нижний Новгород) и API® (Bio-Mérieux, Франция), соответственно.

Количество наборов ферментативных признаков, определяемых с помощью СИБ, ограничено и недостаточно для полной биохимической дифференциации многих групп микроорганизмов. В связи с этим, нами были использованы API® системы (Bio-Mérieux, Франция), но следует отметить, что видовая принадлежность микроорганизмов родов *Brucella* и *Francisella* не может быть установлена данными системами. Выявленные несовпадения с паспортными данными у 2 % штаммов классическими пробирочными тестами были подтверждены как СИБами, так и API® системами. Представители *Salmonella* и *Shigella* были идентифицированы только до рода, при этом у одного из них – *Shigella flexneri* 17 его биохимический профиль указывал на принадлежность этой культуры к виду *Escherichia coli*. Окончательную идентификацию этих штаммов проводили с помощью серологических реакций агглютинации (РА) на стекле с применением коммерческих поливалентных и моновалентных агглютинирующих сывороток. В результате анализа видовая принадлежность штаммов рода *Shigella* соответствовала паспортным данным, за исключением штамма *S. flexneri* 17, который ни с одной шигеллезной сывороткой не дал положительной реакции и *S. dysenteriae* 16, определяемый как *S. flexneri* 3b. Кроме того, при сопоставлении номенклатурных единиц отечественной схемы классификации бактерий рода *Shigella* (1962 г.), используемой в нашей стране до 1974 г. и на основании которой были идентифицированы изучаемые штаммы, с международной, применяемой в настоящее время, виды *S. dysenteriae* Shiga и Stutzer-Schmitz – это *S. dysenteriae* серовар 1 и серовар 2, соответственно, а *S. newcastle* - *S. flexneri* VI. Видовая принадлежность изучаемых штаммов рода *Salmonella* соответствовала паспортным данным. Также выявлено, что штаммы *Bacillus mesentericus* 6, *B. subtilis* 3, 35 и *B. subtilis* ATCC6633, не являются таковыми и представляют собой бациллы вида *B. cereus*, а *B. mycoides* 2 и 10 идентифицированы как *B. licheniformis*. Штаммы *B. megaterium* 5, 6, 654 и *B. cereus* 1 - определены как *B. subtilis*. Особый интерес вызвал тот факт, что штаммы *B. pseudoanthracis* 4, 103, 104, *B. antracoides* 9, 1312 были определены как *B. cereus*, а *B. mesentericus* 5, 66, 1227 - *B. subtilis*, что соответствует современному названию этих видов в систематике рода *Bacillus*, представленного в последнем издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.

В настоящее время определение видовой принадлежности базируется на принципе полифазности, комплексном подходе и интеграции культурально-морфологических,

биохимических и молекулярно-генетических методов изучения штаммов [Colwell, 1970; Citarella, 1970; Vandamme et al., 1996; Prakash et al., 2007; Zhi et al., 2012; Donelli et al., 2013; Chun et al., 2014; Ramasamy et al., 2014].

В этой связи была проведена расширенная идентификация контрольных штаммов патогенных микроорганизмов по биохимической активности (от 40 до 60 признаков), по молекулярно-генетическому профилю (структуре *rrn*-оперона) и по спектру рибосомальных белков с использованием автоматизированных систем (*VITEK 2 Compact* (Bio-Mérieux, Франция), RiboPrinter®System (DuPont Qualicon, США), MicroFlex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия). На основании проведенного анализа и включения полученных сведений в базу данных BioNumerics определены маркеры аутентичности контрольных штаммов, совокупность которых формирует их «молекулярные портреты»: на основе 5 – 13 субстратов, масс-спектров, включающим от 1 до 15 белков с молекулярной массой от 3-9 кДа и риботипов, содержащих до 9-и фрагментов *rrn*-оперона с молекулярными массами в интервале от 1 – 14 т.п.н. (Рисунок 1).



¹ результаты ферментативной активности штамма, ² размер видоспецифичных фрагментов *rrn*- оперонов (т.п.н.) штамма, ³ видоспецифичный белковый профиль штамма

Рисунок 1 – Структура «молекулярного портрета» коллекционного штамма на примере *Yersinia pestis* EV НИИЭГ

В результате проведенных исследований для тест-штаммов: *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter braakii* (штамм ATCC 51113), *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. rhinoscleromatis*, *Plesiomonas shigelloides*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris* (штамм 19), *Pseudomonas aeruginosa*, *S. marcescens* (штаммы 9, 10), *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Alcaligenes faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, *L. innocua*, *L. gray*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes*, *S. agalactiae*, *Corynebacterium* подтверждена родовая и видовая принадлежность, указанная в паспорте. При этом результаты, полученные с помощью разных подходов, совпали в 100 % случаях.

В тоже время некоторые культуры имели иное таксономическое положение: штамм *C. freundii* 101/57 идентифицирован как *C. braakii*, *P. vulgaris* 261 - *P. mirabilis*, *S. marcescens* 1 – *S. plymutica*.

В ряде случаев результаты, полученные с помощью разных методов идентификации бактерий, не совпали. Так, штамм *Pasteurella multocida* 556 определен как *P. multocida* (API, MALDI-TOF, рибопринтинг) и как *P. canis* (VITEK); штамм *L. murrayi* M-16 - *L. murrayi* (API) и

L. gray (VITEK, MALDI-TOF, рибопринтинг). В соответствии с современной классификацией [Bergey's Manual, 2005] вид *L. murrayi* отнесен к виду *L. gray*, что возможно, объясняет различную идентификацию данного штамма. В то же время таксономическое положение штамма *P. multocida* 556 требует уточнения.

Для представителей родов *Salmonella* spp. и *Shigella* spp. удалось не только подтвердить их видовую и родовую принадлежность, но и уточнить ее в соответствии с последней классификацией данных родов. Так, штаммы *S. dysenteriae* Shiga 311 и Stutzer-Schmitz 36 были определены как *S. dysenteriae* серовар 1 и серовар 2, соответственно, а *Shigella newcastle* 35, 59752 - *S. flexneri* VI. Только в одном случае таксономическое положение тест-штамма не соответствует указанному в паспорте: *S. flexneri* 17 идентифицирован как *E. coli* всеми использованными методами.

Для исследуемых штаммов рода *Bacillus* в большинстве случаев наблюдали несовпадения паспортных данных и результатов идентификации. Из 29 культур только у 10 эти данные совпадают: *B. anthracis* СТИ-1, *B. subtilis* ATCC 6633 (N), *B. cereus* 8, ИНА, В-384, В-688, 504-Тип, 687, *B. licheniformis* G, *B. megaterium* ATCC 14581.

Штаммы *B. megaterium* 6, 654 идентифицированы всеми методами как *B. subtilis*, *B. mesentericus* 6 - *B. cereus*, *B. subtilis* 3, 35, ATCC 6633 – как *B. cereus*, *B. mycoides* 2 и 10 – как *B. licheniformis*, что указывает на их неаутентичность. Кроме того, представители *B. mesentericus* 5, 66, 1227 определены как *B. subtilis*, а *B. anthracoides* 9, 1312 - *B. cereus*, *B. pseudoanthracis* 4, 103, 104 – как *B. cereus*. В данном случае причиной расхождения результатов является изменение таксономического положения видов бацилл: *B. pseudoanthracis* и *B. anthracoides* в настоящее время отнесены к виду *B. cereus*, а вид *B. mesentericus* - *B. subtilis* [Bergey's Manual, 2005].

Особый интерес вызывают результаты исследования штамма *B. megaterium* 5. На основании анализа биохимической активности этого штамма (API, VITEK) он отнесен к *B. subtilis*, по профилю рибосомальных белков (MALDI-TOF) - к *B. cereus*, по структуре *rrn*-оперона (рибопринтинг) – к *B. licheniformis*. При анализе данной культуры по комплексу изученных свойств с использованием программы BioNumerics v. 7.5 показано, что с высокой степенью вероятности ее можно отнести к *B. licheniformis*. Представляется перспективным продолжить изучение данного штамма с целью выбора маркеров для идентификации микроорганизмов с подобными характеристиками.

Применение методик, реализованных посредством автоматизированных анализаторов, показало высокую степень информативности при идентификации микроорганизмов и позволило установить специфические маркеры аутентичности изученных штаммов. При этом определить таксономическую принадлежность всех изучаемых микроорганизмов, используя только один из приборов не удалось, что указывает на необходимость комплексного анализа результатов, полученных разными методами.

2. Разработка алгоритма установления аутентичности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов и создание базы данных для его выполнения

Для работы с результатами, полученных с использованием принципиально различных методических приемов, нами разработана единая база данных (далее БД) на основе

программного комплекса BioNumerics. Сведение результатов фенотипических, молекулярно-генетических и протеомных исследований в БД позволило определить комплекс маркеров аутентичности для каждого из исследуемых тест-штаммов патогенных микроорганизмов, направленных на обеспечение подлинности, на всех этапах их воспроизводства.

Основываясь на результатах, полученных ранее при идентификации тест штаммов патогенных микроорганизмов с помощью комплекса фенотипических и молекулярно-генетических методов, в совокупности с разработанной БД, предложен алгоритм установления аутентичности контрольных штаммов патогенных микроорганизмов, согласно которому поступление новых, и ревизия ранее описанных таксонов, осуществляется по четырем основным уровням, с последующим обобщением всех данных в программе BioNumerics (Рисунок 2).

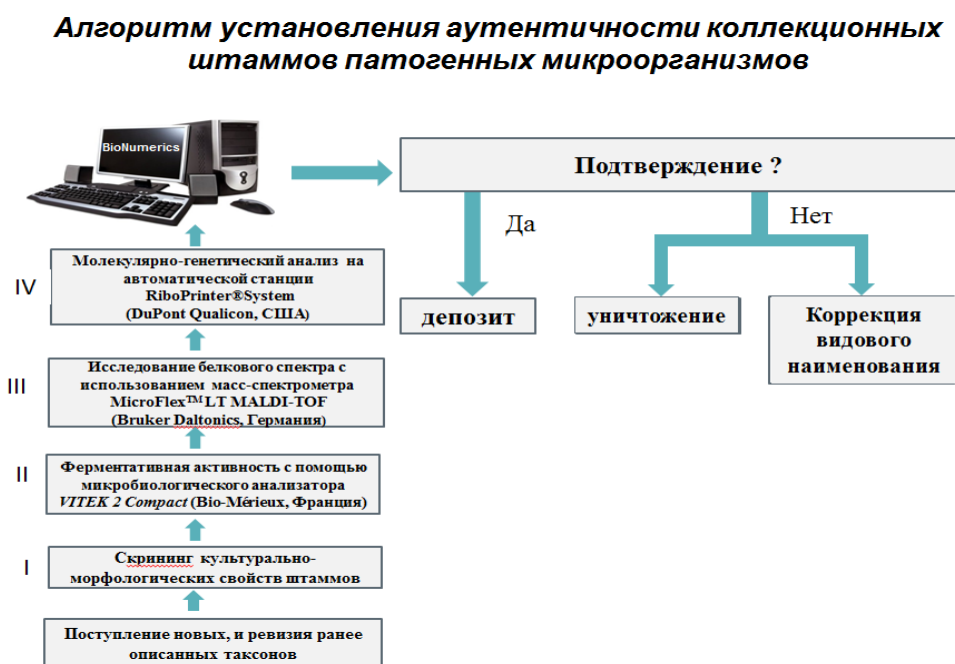


Рисунок 2 - Алгоритм установления аутентичности коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов

Аутентичность штамма подтверждается при полном совпадении результатов исследования с паспортными данными. Такие штаммы подлежат хранению. В остальных случаях штамм признается неаутентичным и дальнейший порядок работы с ним устанавливается исходя из следующих соображений:

1. Если штамм не проходит проверку аутентичности, то в данном случае имеет место факт его утраты и замены на культуру другого микроорганизма. Такие штаммы подлежат уничтожению.

2. При несовпадении наименования видовой принадлежности микроорганизма по паспортным данным с результатами анализа необходимо учитывать возможность изменений, вносимых в таксономию прокариот (в частности коррекцию видовых названий бактерий), и уточнять современное состояние классификации по определителю Bergey's Manual of Systematic

Bacteriology. Паспорта таких штаммов должны корректироваться, с учетом их вновь установленной видовой принадлежности.

Для установления аутентичности штаммов при их воспроизводстве возможно использование одного из методов, выбор которого базируется на родовых и видовых особенностях микроорганизма, с последующим внесением полученных результатов в базу данных. При полном совпадении профиля воспроизводимого образца с таковым, имеющимся в БД, штамм закладывается на хранение, а при его отсутствии – культура уничтожается.

Согласно предложенному алгоритму, у 15 штаммов: *S. dysenteriae* Штуцера-Шмитца 36 (*S. dysenteriae* ser.1), *S. dysenteriae* Григорьева – Шига 311 (*S. dysenteriae* ser.2), *S. dysenteriae* 16 (*S. flexneri*), *S. newcastle* 35, 59752 (*S. flexneri* 6), *L. murrayi* М-16 (*L. gray*), *B. pseudoanthracis* 4, 103, 104 (*B. cereus*), *B. antracoides* 9, 1312 (*B. cereus*), *B. mesentericus* 5, 66, 1227 (*B. subtilis*), *S. marcescens* 1 (*S. plymutica*) была проведена коррекция видового наименования с внесением соответствующих изменений в их паспортные данные.

Штаммы: *C. freundii* 101/57 (*C. braakii*), *P. vulgaris* 261 (*P. mirabilis*), *S. flexneri* 17 (*E. coli*), *B. mesentericus* 6 (*B. cereus*), *B. subtilis* 3, 35, L₂, ATCC 6633 (*B. cereus*), *B. megaterium* 6, 654 (*B. cereus*), *B. megaterium* 5 (*B. licheniformis*), *B. mycoides* 2, 10 (*B. licheniformis*), *B. cereus* 1 – (*B. subtilis*) исключены из коллекционного фонда как не соответствующие своим свойствам в соответствии с требованиями СП 1.2.036-95 «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I-IV групп патогенности».

4. Оптимизация схемы процесса консервации коллекционных штаммов патогенных бактерий

Основной задачей коллекционных центров является поддержание штаммов микроорганизмов в жизнеспособном состоянии с сохранением их первоначальных свойств. Для реализации этой цели использовали группу методов долгосрочной консервации, наиболее распространенными из которых являются лиофилизация и низкотемпературное замораживание.

Одним из направлений на данном этапе работы стала оптимизация схемы долгосрочной консервации тест-штаммов патогенных микроорганизмов методом лиофильного высушивания с использованием современных сублимационных установок камерного (Martin Christ Epsilon 2-6D) и коллекторного типа (Martin Christ Альфа 2-4 LD и НЕТО Power Dry) с целью увеличения сроков хранения коллекционных штаммов, повышения эффективности их консервации и уменьшения времени, затрачиваемого на этот процесс. Для стандартизации полученных результатов параллельно проводили лиофилизацию на регламентированном на федеральном уровне коллекторном аппарате системы К. Е. Долинова в соответствии с инструкцией.

Составляющими этого процесса являются набор физических параметров, выставяемых на лиофильных установках и напрямую влияющих на высушивание образцов, а также состав защитных сред, обеспечивающих сохранность сублимированных препаратов.

Технология лиофилизации штаммов с помощью коллекторного аппарата системы К. Е. Долинова характеризовалась: высокой трудоемкостью; продолжительностью подготовительных этапов сушки и времени лиофилизации (7-8 ч, из них 5-6 ч непосредственного присутствия персонала); использованием углекислоты для замораживания и охлаждения образцов;

применением химического поглотителя влаги (серноокислого кальция) для связывания водяных паров при лиофилизации.

Внедряемые нами в практическое использование ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» современные лиофильные установки Martin Christ Альфа 2-4 LD и НЕТО Power Dry отличались ускоренным процессом подключения ампул к коллектору, более эффективным связыванием водяных паров при сублимировании с помощью холодого конденсора и применением для предварительной заморозки препарата в ампулах 96 % этилового спирта, охлажденного до минус 55 °С. Время лиофилизации составило 6 ч, непосредственного присутствия сотрудника не требовалось.

Отработанный режим лиофилизации на Martin Christ Альфа 2-4 LD осуществлялся в 3 этапа: прогрев вакуумного насоса (20 мин), собственно сушка при 0,040 mbar (3 ч); досушивание при 0,001 mbar (3 ч). Для установки НЕТО Power Dry цикл лиофилизации проходил в 2 этапа: прогрев вакуумного насоса (30 мин) и сушка, при этом глубина вакуума может достигать до 0,0004 mbar (6 ч).

При использовании программируемой камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D препараты загружали в камеру в жидком виде и замораживали на месте. В ходе ряда экспериментов, нами была определена оптимальная программа сублимации на данной установке, включающая пять этапов: охлаждение препарата до температуры минус 45 °С при давлении 1000 mbar в течение 1 ч; начальная лиофилизация при температуре минус 45 °С и давлении 0,18 mbar в течение 1 ч; последующая лиофилизация при давлении 0,18 mbar с постепенным повышением (шаг в 3 °С) температуры до 20 °С в течение 1 ч; заключительный этап досушивания при давлении 0,18 mbar и температуре 20 °С в течение 1 ч; досушивание при температуре 20 °С и давлении 0,001 mbar в течение 1 ч и при температуре 30 °С и давлении 0,001 mbar в течение 2 ч соответственно с полным семичасовым циклом лиофилизации в полностью автоматическом режиме.

Следующим направлением в диссертационной работе была оптимизация схемы долгосрочной консервации контрольных штаммов микроорганизмов методом низкотемпературного замораживания, направленного на повышение эффективности хранения их образцов в рабочих коллекциях. В результате нами была определена оптимальная программа низкотемпературной консервации исследуемых штаммов при температуре минус 70 °С, включающая пять этапов: приготовление клеточной суспензии; внесение защитных сред и осмотическое уравнивание клеток с протекторами при комнатной температуре в течение 15 – 20 минут; замораживание в криопробирках и хранение клеточной суспензии в низкотемпературном холодильнике при минус 70 °С и минус 20 °С (для возбудителей дифтерии); оценка качества замороженного образца после оттаивания.

Далее проведен сравнительный анализ показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, полученных препаратов штаммов патогенных микроорганизмов. По данным исследования концентрация выживших клеток зависела от вида микроорганизма, состава лио- и криопротекторов, марки лиофильного аппарата, температуры хранения и контейнера хранения (ампула/флакон). При лиофилизации и низкотемпературной консервации коллекционных штаммов использованы защитные среды, выбор которых осуществлялся на основании литературных данных [Долинов, 1969; Laboratory procedures for microorganisms: [сайт] URL: <https://www.cabri.org/guidelines/micro-organisms/M300Ap3.html>]:

СЖА (10 % сахара, 1,5 % желатин и 0,1 % питательный агар), ЛЖ (для возбудителей холеры) (15 % лактоза, 3 % желатин), 12 % сухое обезжиренное молоко, среда 2 (12 % сухое обезжиренное молоко, 7 % трегалоза, 5 % натрия глутамат), среда 3 (12 % сухое обезжиренное молоко, 7 % трегалоза), среда 4 (12 % сухое обезжиренное молоко, 5 % натрия глутамат). Кроме того, для низкотемпературного хранения дополнительно использовали 10 % водный раствор глицерина, среду 6 (2 % протеозопептон с 50 % глицерина) и для возбудителей дифтерии – среду 5 (3 % триптиказо-соевый питательный бульон с 10 % сывороткой крови крупного рогатого скота и 10 % глицерина).

Выявлено, что все штаммы проявляли разную устойчивость к стрессовым условиям процедуры сублимации или замораживания и в зависимости от состава защитной среды наблюдалось различное снижение количества жизнеспособных клеток.

Полученные результаты позволили разделить изученные штаммы по степени чувствительности к стрессовым условиям процедуры сублимации и низкотемпературной консервации при минус 70 °С на 3 группы: наиболее устойчивые, среднеустойчивые, занимающие промежуточное положение и наиболее чувствительные.

Установлено, что бактерии рода *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* и *Corynebacterium* оказались наиболее устойчивыми к процессу лиофилизации, уровень их выживаемости составил от (78±0,1) до (90±0,13) %.

Наиболее чувствительными к стрессовым условиям процедуры сублимации были возбудители холеры, аэромоноза, бруцеллеза и туляремии, показавшие низкую выживаемость клеток от (10±0,2) до (50±0,19) %. Вместе с тем, необходимо отметить, что при сушке в лиофильной камере показатель выживаемости клеток холерного вибриона составил (36±0,3) %, что более чем в два раза превышает таковой у препаратов, полученных на коллекторных установках. Выживаемость устойчивых к высушиванию штаммов, занимающих промежуточное положение: *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Plesiomonas* и *Salmonella* после лиофилизации составила от (60±0,2) до (70±0,3) %. Данные, полученные в ходе эксперимента, не позволили отдать предпочтение какой-либо среде высушивания. Дальнейшее исследование концентрации жизнеспособных клеток показало, что их максимальное количество после года хранения достигается в препаратах, сублимированных на лиофильных сушках коллекторного типа, при использовании в качестве лиопротектора сухого молока с добавлением трегалозы (среда 3). Так, после года хранения в этой среде в условиях холодильника, концентрация живых клеток штаммов *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Listeria* и *Corynebacterium* оказалась на уровне (97±0,13) %; *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella* и *Francisella* – (84±0,1); (86±0,13); (92±0,19) и (85±0,4) %, соответственно. Для микроорганизмов *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Alcaligenes*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Plesiomonas* и *Salmonella* этот показатель выживаемости находился в интервале от (89±0,2) до (95±0,3) %. Применяемые в работе другие экспериментальные среды, также обеспечивали удовлетворительную выживаемость клеток изучаемых микроорганизмов (до 80 %) при хранении их сухих препаратов в условиях холодильника. В то же время, после годового хранения при 4 °С жизнеспособность клеток микроорганизмов лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D различалась в зависимости от вида, а показатели их выживаемости были в целом ниже, чем у препаратов лиофилизированных на установках коллекторного типа.

Инкубация препаратов исследуемых штаммов, лиофилизированных в ампулах на установках коллекторного типа, при температуре 25 °С в течение двух недель не привела к существенной гибели их клеток, при этом наибольшей сохранныостью отличались препараты штаммов, лиофилизированные в защитной среде 3, содержащей трегалозу, показавшей в 1,5-2 раза большую эффективность в защите высушенных клеток от воздействия повышенных температур, чем в стандартных, регламентированных средах СЖА, ЛЖ.

Снижение концентрации клеток штаммов, лиофилизированных на Martin Christ Epsilon 2-6D во флаконах, после хранения при температуре 25 °С в СЖА, ЛЖ у *Vibrio*, *Shigella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Listeria*, в сравнении с сублимированными на аппаратах системы Долинова, Martin Christ Альфа 2-4 LD, НЕТО Power Dry, в среднем было в 2 раза ниже, в результате чего процент выживаемости для них был крайне низок, так как использование флаконов, закрываемых резиновыми пробками и защищенных металлическими колпачками, не обеспечивает надежной защиты от проникновения влаги из атмосферы. Тем не менее, способность сохранять жизнеспособность клеток в течение нескольких недель при средней температуре 25 °С указывает на возможность консервации коллекционных тест-штаммов во флаконах и их транспортировки в регионы Российской Федерации без необходимости сохранения холодной цепи, при этом данный формат не подходит для закладки образцов в коллекционный фонд с целью долгосрочного хранения. С увеличением температуры хранения сухих биопрепаратов до 37 °С наблюдается резкое падение выживаемости сублимированных клеток. Обработка экспериментальных данных позволила определить динамику выживаемости лиофилизированных культур от времени хранения при разных температурах, провести оценку времени снижения количества жизнеспособных бактерий в высушенных препаратах и дать прогноз возможных сроков хранения полученных препаратов (Таблица 1).

Таблица 1 – Прогнозируемые сроки хранения изученных групп тест-штаммов патогенных микроорганизмов* (годы)

Защитные среды	Ллиофилизация на аппаратах коллекторного типа			Низкотемпературная консервация при температуре минус 70 °С		
	наиболее чувствительные	среднеустойчивые	наиболее устойчивые	наиболее чувствительные	среднеустойчивые	наиболее устойчивые
СЖА, ЛЖ ¹	28,7	31,7	40,5	2,5	12,0	20,1
среда 2	15,7	25,7	31,1	2,6	10,5	14,3
среда 3	54,8	90,1	140,2	3,4	12,4	18,1
среда 4	16,1	36,0	46,9	2,5	6,6	15,3
12 % сухое молоко	12,7	24,6	28,9	2,2	8,3	12,4
среда 5 ²	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	н.и.	12,6
среда 6	н.и.	н.и.	н.и.	2,5	13,3	66,6
10 % водный раствор глицерина	н.и.	н.и.	н.и.	2,4	11,5	15,2

*- указан максимально рассчитанный срок хранения; н.и.- не использовали; ¹ среда высушивания для бактерий рода *Vibrio*;
² среда для замораживания бактерий рода *Corynebacterium*

В результате прогнозирования сроков хранения тест-штаммов патогенных микроорганизмов, лиофилизированных на установках коллекторного типа при оптимальных температурных условиях 4 °С в разных защитных средах выявлено, что наиболее эффективной средой хранения для всех изученных групп штаммов является среда 3, обеспечивающая срок

хранения клеток в жизнеспособном состоянии более 50 лет (Таблица 1). Следует отметить, что другие экспериментальные среды, применяемые в работе, также обеспечивали удовлетворительное сохранение клеток в жизнеспособном состоянии при хранении их сухих препаратов в условиях холодильника от 12 до 46 лет в зависимости от видовой принадлежности патогена и типа лиофильной установки (Таблица 1).

Исходя из полученных показателей выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, аппараты коллекторного типа показали лучшие результаты по сравнению с камерной сушкой, что объясняется форматом хранения полученных образцов в стеклянных ампулах, отпаиваемых под вакуумом непосредственно с коллектора. При отсутствии микротрещин в стенках ампулы, разрежение в ней будет сохраняться очень долго, в то время как флаконы, используемые в камерной сушке, укупориваются резиновыми пробками, теряющими со временем эластичность, и вследствие этого пропускающими молекулы кислорода, приводящими к окислительным процессам в лиофилизированном препарате штамма, вызывающим гибель его клеток. В связи с этим формат хранения штаммов во флаконах рекомендуется в том случае, если их срок хранения не превышает 3-4 года, тогда как для длительного поддержания культур больше подходит лиофилизация в ампулах.

Ряд проведенных экспериментов по низкотемпературной консервации показал перспективность применения этого метода для хранения рабочих коллекций при условии строгого соблюдения температурного режима хранения.

Эффективными защитными свойствами для группы наиболее чувствительных штаммов при их хранении в течение одного года обладали среды 3, 6 и СЖА, позволяющие сохранить от 19 до 32 % живых клеток. Самые низкие показатели выживаемости данной группы отмечены при низкотемпературном хранении в 10 % водном растворе глицерина (до 7 % живых клеток), в 12 % сухом молоке с глутаматом натрия и без него (до 10 %) и в среде 2 (до 14 % живых клеток) (Рисунок 3). Для среднеустойчивых и наиболее устойчивых групп микроорганизмов значительной разницы в выживаемости клеток не обнаружено, в том числе и для среды 5, используемой при замораживании клеток возбудителей дифтерии.

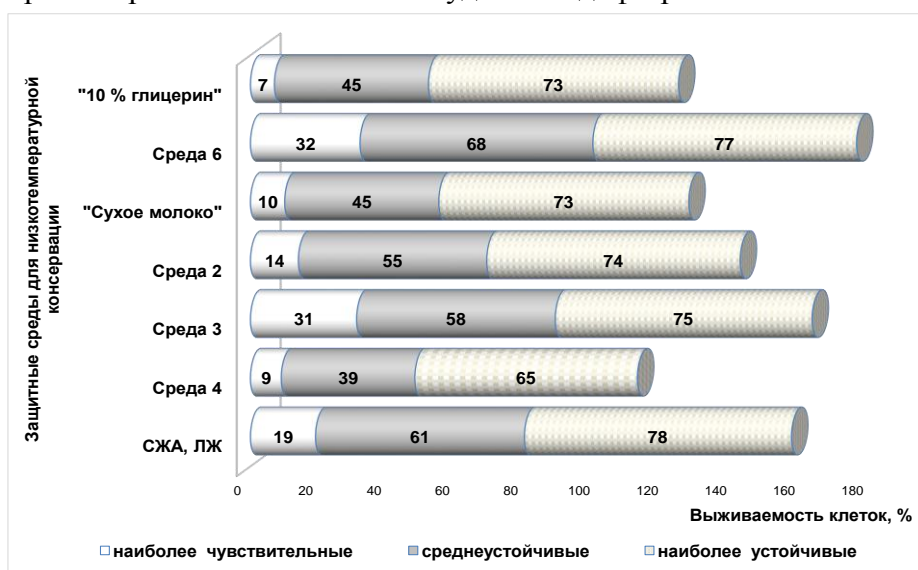


Рисунок 3 - Выживаемость клеток тест-штаммов после 12 месяцев хранения при минус 70 °C в процентном исчислении

Наблюдения за выживаемостью клеток различных видов микроорганизмов в изучаемых образцах в разных средах, в условиях низкотемпературного хранения в течение года показало, что отмирание клеток происходит с постоянной удельной скоростью, достоверно снижая их выживаемость. Вследствие чего, мы посчитали возможным рассчитать теоретический прогнозируемый срок хранения штаммов при температуре минус 70 °С, продолжительность которого зависит от вида микроорганизма и выбора криопротектора (Таблица 1).

Таким образом, апробация разработанных условий на широком спектре тест-штаммов показала высокое качество получаемых лиофильно высушенных препаратов, подтверждаемое расчетами показателей жизнеспособности, выживаемости и прогнозируемых сроков хранения, а эксперименты по применению низкотемпературной консервации контрольных штаммов позволили сделать вывод о возможности внедрения этой технологии в практику при хранении рабочих коллекций.

В целом, результаты, полученные в ходе настоящей диссертационной работы, представляют собой законченное исследование, на основании которых был разработан эффективный алгоритм установления аутентичности коллекционных штаммов, проведена номенклатурная ревизия микроорганизмов, использующихся в качестве контрольных в различных видах научно-практической деятельности, скорректированы и дополнены их паспортные данные, а также созданы схемы долгосрочной консервации этих штаммов методами лиофильного высушивания и низкотемпературного замораживания с применением нового оборудования. Все эти приемы внедрены в практику и активно используются в деятельности Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», что позволило повысить эффективность ее деятельности в области обеспечения научно-практических учреждений высококачественными образцами коллекционных тест-штаммов патогенных микроорганизмов, расположенных в более чем 70 субъектах Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Проведена номенклатурная ревизия 130 штаммов патогенных бактерий, принадлежащих к 23 различным родам и 57 видам, регламентированных к использованию в качестве контрольных в диагностической и производственной деятельности. Их расширенная идентификация на основе изучения культурально-морфологических свойств, биохимической активности, протеомного профиля рибосомальных белков, структуры и расположения *rnn*-оперона, позволила подтвердить видовую принадлежность 80 % штаммов, у 10 % - уточнить их таксономическое положение в соответствии с требованиями международной классификации, а также установить, что оставшиеся 10 % исследуемых микроорганизмов не являются аутентичными.
2. Определены маркеры аутентичности контрольных штаммов, совокупность которых формирует их «молекулярные портреты» на основе утилизации 5 - 13 биохимических субстратов, масс-спектров, включающих от 1 до 15 белков с молекулярной массой 3,06 – 9,78 кДа и риботипов, содержащих до 9 фрагментов ДНК с массами в интервале 0,99 – 14,38 т.п.н.

3. Разработанный алгоритм установления аутентичности контрольных штаммов, включающий этапы скрининга культурально-морфологических свойств, определения ферментативной активности более чем на 40 субстратах, рибопринтинга, масс-спектрометрического анализа по технологии Maldi-Toff и сформированная на основе этих результатов единая база данных, позволяют осуществлять контроль их подлинности на всех этапах воспроизводства.
4. Адаптирован способ низкотемпературного хранения контрольных штаммов патогенных микроорганизмов в ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», позволяющий на основании рассчитанных прогнозируемых сроков, сохранять клетки в интервале от 3 до 60 лет в зависимости от вида патогена и выбранного криопротектора. Показано, что наиболее оптимальным криопротектором для штаммов родов *Vibrio*, *Aeromonas*, *Brucella* и *Francisella* является среда, содержащая 12 % обезжиренного сухого молока и 7 % трегалозы, тогда как для остальных микроорганизмов – 2 % протеозопептон с 50 % раствором глицерина.
5. Оптимизирована схема процесса лиофилизации штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационной установке камерного типа. Показана возможность использования ее для получения препаратов коллекционных штаммов III-IV групп патогенности, имеющих ограниченные сроки хранения, составляющие в прогнозируемых расчетах от 2 до 40 лет в зависимости от видовой принадлежности микроорганизма и при использовании в качестве лиопротектора среду, содержащую 10 % сахарозы, 1,5 % желатина и 0,1 % питательного агара.
6. Разработанная схема лиофилизации контрольных штаммов I-IV групп патогенности на новых сублимационных аппаратах коллекторного типа, включающая программу сублимации и оптимальную среду высушивания на основе 12% обезжиренного сухого молока и 7% трегалозы, позволяет эффективно сохранять их сухие препараты в жизнеспособном состоянии более 50 лет.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение разработанного алгоритма установления аутентичности штаммов патогенных микроорганизмов обеспечивает подтверждение систематического положения вновь поступающих штаммов при формировании коллекционного фонда и позволяет контролировать их подлинность на этапах воспроизводства.
2. Предложенные схемы долгосрочной консервации штаммов патогенных микроорганизмов, закладываемых в коллекционный фонд, с применением метода лиофилизации на новых сублимационных установках позволяют поддерживать их клетки в жизнеспособном состоянии более 50 лет.
3. Используемый протокол низкотемпературной консервации при минус 70 °С способствует эффективному поддержанию штаммов в рабочих коллекциях.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Необходимо продолжить номенклатурную ревизию коллекционных штаммов возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, выделяемых на территории Российской Федерации и сопредельных государств, для получения их «молекулярных портретов».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Червякова, Н. С. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов [Текст] / Н. С. Червякова, Т. В. Валова, А. В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – Вып. 3. – С. 65 – 68 (журнал из перечня ВАК).
2. Осин, А. В. Применение автоматизированных систем идентификации микроорганизмов для верификации таксономической принадлежности коллекционных штаммов патогенных бактерий [Текст] / А. В. Осин, Н. С. Червякова, С. А. Портенко, А. С. Абдрашитова, В. Е. Куклев // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 1. – С. 79 – 83 (журнал из перечня ВАК).
3. Осин, А. В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов [Текст] / А. В. Осин, Н. С. Червякова, Т. В. Валова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 66 – 70 (журнал из перечня ВАК).
4. Червякова, Н. С. Установление аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов с применением автоматического микробиологического анализатора ВИТЕК 2 [Текст] / Н. С. Червякова, А. В. Осин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – Вып. 1. – С. 100 – 104 (журнал из перечня ВАК).
5. Червякова, Н. С. Совершенствование лиофилизации коллекционных штаммов патогенных бактерий [Текст] / Н. С. Червякова, Т. В. Валова, А. В. Осин // Инфекция и иммунитет: матер. X съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов «Итоги и перспективы обеспечения эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации» (12-13 апр., 2012 г. Москва). - 2012. - № 1-2. – С. 341
6. Осин, А. В. Сравнительный анализ лиофилизированных препаратов коллекционных штаммов патогенных бактерий, полученных на различных сублимационных установках [Текст] / А. В. Осин, Н. С. Червякова, Т. В. Валова // Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения сан.-эпид. Характера: матер. XI Межгосуд. научн.-практ. конф. (16-17 окт. 2012., Саратов) / Фед. Служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; под ред. Г. Г. Онищенко, В. В. Кутырева. – Саратов: ООО «Приволж. Изд-во». – С. 182 - 183.
7. Червякова, Н. С. Номенклатурная ревизия штаммов рода *Bacillus*, хранящихся в государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» [Текст] / Н. С. Червякова, С. А. Портенко, А. В. Осин // Матер. юбил. Междунар. науч.-практ. конф. Уральской противочумной станции 1914-2014 гг. – Уральск, 2014. – С. 197 – 199.
8. Червякова, Н. С. Эффективность использования автоматических систем идентификации микроорганизмов для установления аутентичности коллекционных штаммов рода *Bacillus* [Текст] / Н. С. Червякова, А. В. Осин // Материалы VII ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 30 марта-1 апр. 2015 г.). – М., 2015. – С. 364. – Электронный вариант.

9. Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности [Текст]: методические рекомендации МР 4.2.0089-14 / Ю. В. Демина, Н. В. Шеенков, В. Е. Куклев, Н. А. Осина, А. В. Осин, И. Н. Шарова, С. А. Портенко, А. Н. Спицин, Д. В. Уткин, **Н. С. Червякова**, А. С., Абдрашитова, С. А. Щербакова, С. В. Титова, О. С. Чемисова, В. В. Агафонова, С. О. Чайка, О. А. Рыковская, И. А. Молдаван, Н. В. Павлович, М. В. Цимбалистова, С. В. Балахонов, М. В. Чеснокова, М. В. Афанасьев, Л. В. Миронова, С. А. Татарников, Е. Г. Токмакова, Г. В. Вдовиченко, А. С. Остяк, М. Б. Ярыгина, Е. А. Басов, И. А. Дятлов, Е. А. Тюрин, Л. В. Чекан, К. В. Детушев, А. Е. Хомяков, В. А. Антонов, Г. А. Ткаченко, С. С. Савченко, В. В. Алексеева, О. В. Зинченко, И. М. Шпак, М. А. Гришина, Н. В. Вьючнова, О. С. Ульянова, Д. В. Викторov // Бюл. норм. и метод. Документов Госсанэпиднадзора. – 2015. – № 2. – С. 55 – 70.
10. Использование методов полиморфизма длин рестриционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I-II групп патогенности [Текст]: методические рекомендации МР 4.2.0090-14 / Ю. В. Демина, Н. В. Шеенков, В. Е. Куклев, Н. А. Осина, А. В. Осин, И. Н. Шарова, А. С. Абдрашитова, **Н. С. Червякова**, С. А. Щербакова, С. В. Балахонов, М. В. Чеснокова, М. В. Афанасьев, Л. В. Миронова, С. А. Татарников, Е. Г. Токмакова, Г. В. Вдовиченко, А. С. Остяк, М. Б. Ярыгина, Е. А. Басов, В. А. Антонов, Г. А. Ткаченко, С. С. Савченко, В. В. Алексеева, О. В. Зинченко, И. М. Шпак, М. А. Гришина, Н. В. Вьючнова, О. С. Ульянова, Д. В. Викторov // Бюл. норм. и метод. Документов Госсанэпиднадзора. – 2015. – № 2. – С. 71 – 92.