

7. Hyndman R. Forecast: Forecasting Functions for Time Series and Linear Models. R Package Version 8.2. 2017, <http://pkg.robjhyndman.com/forecast>.
8. Hyndman R.J., Khandakar Y. Automatic Time Series Forecasting: The Forecast Package for R. *Journal of Statistical Software*. 2008, 27(3). <https://www.jstatsoft.org/article/view/v027i03>. doi: 10.18637/jss.v027.i03.
9. Hyndman R.J., Koehler A.B. Another Look at Measures of Forecast Accuracy. *International Journal of Forecasting*. 2006, 22(4): 679-688. doi: 10.1016/j.ijforecast. 2006.03.001.
10. Li Q., Na-Na G., Zhan-Ying H. et al. Application of an Autoregressive Integrated Moving Average Model for Predicting the Incidence of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012, 87(2):364-370. doi: 10.4269/ajtmh. 2012.11-0472.
11. Rios M., Garcia J.M., Sánchez J.A., Pérez D. A Statistical Analysis of the Seasonality in Pulmonary Tuberculosis. *European Journal of Epidemiology*. 2000, 16(5):483-488.
12. Ture M., Kurt I. Comparison of Four Different Time Series Methods to Forecast Hepatitis A Virus Infection. *Expert Systems with Applications*. 2006, 31(1):41-46. doi: 10.1016/j.eswa.2005.09.002.
13. Wongkoon S., Jaroensutasinee M., Jaroensutasinee K. Development of Temporal Modeling for Prediction of Dengue Infection in Northeastern Thailand. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2012, 5(3):249-252. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60034-0.
14. Zhang G.P. Time Series Forecasting Using a Hybrid ARIMA and Neural Network Model — *ScienceDirect. Neurocomputing*. 2003, 50:159-175. doi: [https://doi.org/10.1016/S0925-2312\(01\)00702-0](https://doi.org/10.1016/S0925-2312(01)00702-0).
15. Zhang X., Zhang T., Young A.A., Li X. Applications and Comparisons of Four Time Series Models in Epidemiological Surveillance Data. *PLoS ONE*. 2014, 9(2):e91629. doi: 10.1371/journal.pone.0088075.

*Поступила 22.01.19*

Контактная информация: Филатова Елена Николаевна, к.б.н.,  
603950, Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71, р.т. (831)469-79-46

## ОБЗОРЫ

© Ю.Д.ПАХОМОВ, Л.П.БЛИНКОВА, 2019

*Ю.Д.Пахомов, Л.П.Блинкова*

### **БИООПАСНОСТЬ ЖИЗНЕСПОСОБНЫХ НЕКУЛЬТИВИРУЕМЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ**

НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва

В обзоре изложены современные представления о жизнеспособных некультивируемых микроорганизмах — новом направлении исследований в общей и медицинской микробиологии. Анализируется информация о факторах и условиях перехода в некультивируемое состояние и выхода из него. Особый интерес представляют сведения о биоопасности жизнеспособных некультивируемых патогенов, трудно выделяемых рутинными методами в организме, окружающей среде, продуктах питания и т.д. Знания об этом явлении ценны для детекции живых микробов при изучении клинических образцов, уровня жизнеспособных некультивируемых клеток в препаратах вакцин, пробиотиков, музейных культур и др.

Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 83—91

Ключевые слова: жизнеспособные некультивируемые микробы, условия перехода — выхода, биоопасность

## BIOHAZARD CAUSED BY VIABLE BUT NONCULTURABLE MICRO-ORGANISMS

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

In this review we discuss current notions about viable but nonculturable microorganisms — new subject of microbiological research. Information about factors and conditions of formation of nonculturable cells and their resuscitation is analyzed. Of particular interest is information of biohazard of nonculturable cells that are hard to isolate by traditional means from organisms, the environment, foodstuffs etc. Knowledge about this is valuable for detection live microbes from clinical samples, levels of viable but nonculturable cells in vaccine and probiotic preparations, culture collections.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 3, P. 83—91

Key words: viable but nonculturable microbes, conditions of entry and resuscitation, biohazard

*Образование и свойства некультивируемых клеток микроорганизмов.* Жизнеспособными, но некультивируемыми клетками микроорганизмов (viable but nonculturable VBNC, ЖНК) называются обратимо потерявшие способность расти на традиционных питательных средах вследствие стрессовых воздействий [1, 2, 17]. Пока не ясно, является ли это некультивируемое состояние (НС) адаптацией к переживанию неблагоприятных условий в течение определенного времени или этапом отмирания культуры. Известны три наиболее рациональных предположения: 1) клетки спонтанно теряют способность давать колонии и подвергаются разрушению [33]; 2) существует программируемая смерть клеток [19]; 3) формирование ЖНК является механизмом переживания неблагоприятных условий, сравнимым со спорообразованием [17]. Вегетативные клетки микроорганизмов способны переходить в НС под действием большого числа факторов, в том числе считавшихся ранее бактерицидными. К таким факторам относятся неоптимальная температура [29] и давление [17], окислительный потенциал среды, [34], соли и ионы тяжелых металлов [15], кислотность среды [45], высушивание [6], облучение светом различных длин волн [25], хлорирование водопроводной воды [11], применение антибиотиков [38], ультразвук [12], воздействие CO<sub>2</sub> [50], лиофилизация [7] и дезинфектанты [17], биологические факторы (экзометаболиты зеленых водорослей, клеток простейших) [1]. ЖНК *Escherichia coli* образуются под действием CO<sub>2</sub> при высоком давлении, причем больше образуется их при 37°C, чем при более низкой температуре, при которой выше отмирание бактерий [48]. Выявлено, что для нормального образования ЖНК микроорганизмов важен весь комплекс стрессовых воздействий, которым они подвергаются в окружающей среде [27]. В некоторых случаях показана зависимость формирования ЖНК от источника выделения [3]. Так, выделенные из пищевых продуктов штаммы *E. coli*, пропущенные и не пропущенные через пищеварительную систему мыши, имели разную степень образования ЖНК при повышенном осмотическом давлении (13% NaCl) и окислительном (0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) стрессе [3]. Штамм, прошедший через пищеварительную систему мыши, был более чувствителен к стрессу, чем родительский, выделенный из пищевого продукта, и полностью переходил в НС под действием повышенной концентрации NaCl и перекиси водорода [3]. Для *Vibrio vulnificus* и *V. parahaemolyticus* показано, что ЖНК обладают повышенной устойчивостью к широкому спектру неблагоприятных воздействий, таких как антибиотики, токсичные соли тяжелых металлов, окислительный стресс, повышенная температура, высокое и низкое содержание NaCl, кислотность, кон-

центрация этанола [49]. Помимо водной среды для *Serratia marcescens* образованию ЖНК может способствовать и нахождение микроба в аэрозоле [21]. Присутствие некультивируемых микроорганизмов обнаружено на частицах пыли [20], где факторами для образования ЖНК могли быть высушивание и ультрафиолетовое излучение. Кроме патогенных микроорганизмов наличие НС с сохранением некоторого уровня метаболизма показано, например, для пробиотического микроорганизма *Lactococcus lactis* [18, 36]. Авторы показали, что при лимитировании по углеводам исследуемые штаммы переходят в НС. При этом наблюдается штаммовое разнообразие по времени перехода к некультивируемости (от одной недели до 3 месяцев) в зависимости от особенностей углеводного метаболизма.

Клетки микроорганизмов в НС уменьшаются в размерах, периплазматическое пространство более выражено, в нуклеоиде исчезают темные гранулы, уменьшается количество рибосом [48]. Внешняя мембрана ЖНК *V. cholerae* становится волнистой, утолщается слой пептидогликана, снаружи появляется слой, похожий на капсулу [24]. В клетках *Vibrio parahaemolyticus* цитоплазма разделяется на электронноплотный периферический слой и прозрачный центр [8]. Клеточная стенка становится неплотной, гибкой, после чего следует синтез новой тонкой стенки [43]. Обнаружено, что изменение состава липидов мембраны в условиях стресса играет роль в поддержании мембранного потенциала [35]. Также могут возникать серьезные перестройки в пептидном составе клеточной стенки: у *E. coli* обнаружено, что количество связей между молекулами диаминопимелиновой кислоты увеличилось более чем в три раза, а также повысилось количество мурамилпептидов [49]. Происходило укорочение гликановых цепей по сравнению с клетками экспоненциальной фазы, что обуславливает большую устойчивость микроорганизма к механическим воздействиям. Kusumoto A. et al. [26] установили, что в процессе потери культивируемости *Salmonella enterica* снижается количество стрессового фактора  $\sigma^S$  (RpoS) в клетках, а мутанты с делецией в соответствующем гене переходят в НС быстрее, чем родительские штаммы. Активируется продукция гистонподобного белка H-NS, который ингибирует продукцию RpoS. Метаболизм в ЖНК не прекращается. У ЖНК происходит синтез *de novo* белков холодового шока и голодания [35]. Trevors et al. (2012) показали меньшее содержание РНК в цитоплазме голодающих бактерий, чем у нормальных микроорганизмов. Синтез белка также претерпевает изменения. Так, у *V. parahaemolyticus* снижение синтеза одних белков и усиление синтеза других подавляет переход клеток в стационарную фазу и способствует переходу в НС [27]. Уровень АТФ остается на высоком уровне, что подтверждает факт жизнеспособности таких клеток [19]. Количество 16S рибосомной РНК меняется незначительно, сохраняются редуктазная и эстеразная активность [28]. На нескольких штаммах *Vibrio vulnificus* *in vitro* и *in situ* показано, что при нахождении клеток в НС сохраняется экспрессия некоторых генов, таких как, например, *groS* и *katG*, хотя транскрипция последнего идет на крайне низком уровне. Выявлено, что *groS* мутанты, не имеющие регуляторного пептида *ppGpp*, быстрее, чем дикий тип, переходят в НС. ЖНК продолжают экспрессию RpoS. Показано, что мутанты без *groS* теряли культуранальность быстрее и отмирали раньше, чем родительские клетки. Поэтому сделан вывод, что экспрессия гена *groS* способствовала персистенции ЖНК [49]. Таким образом, хотя экспрессия и регуляция гена *groS* осложняет переход в НС, долговременное выживание популяции без его экспрессии невозможно. Имеется также другая точка зрения: *ppGpp*, регулируемый белком RelA, может быть индуктором НС и клетки, не имеющие *ppGpp*, становятся ЖНК с меньшей вероятностью [5]. Для ЖНК *E. coli* показано заметное усиление продукции белка внешней мембраны

OmpW, который активирует альтернативный сигма-фактор  $\sigma^E$  (RpoE) [3]. Клетки *E. coli* в НС устойчивы к ультразвуку [48]. Белковый состав клеток также меняется, отмечено торможение синтеза одних белков и увеличение синтеза других. Lai C. J. et al. [27] сравнили белковые профили клеток *Vibrio vulnificus* и *V. parahaemolyticus* в НС, в процессе перехода в НС и с блоком НС. В результате выявлен ряд генов, для которых при переходе в НС наблюдали усиление транскрипции по сравнению с клетками, у которых переход в НС заблокирован (например, факторы элонгации EF-Tu и EF-G, рибосомальный белок S1 и др.). Показано, что при переходе в НС *groS* транскрибируется активнее, чем в экспоненциальной фазе, а затем транскрипция затухает, но остается на детектируемом уровне [27]. Yaron and Matthews [46] показали экспрессию генов в *E. coli*, включая *mobA*, *rfbE*, *stx1*, *stx2* и некоторых генов, относящихся к синтезу 16s rRNA. Продолжающаяся экспрессия генов, контролируемых у ЖНК *E. coli* токсин Шига, гемолизин и адгезин, может приводить к диарее, геморрагическому колиту и гемолитико-уремическому синдрому.

Использование различных методов измерения метаболической активности, а также целостности мембраны позволяет установить жизнеспособность ЖНК [35]. *Legionella pneumophila* при обработке хлорноватистой кислотой переходит в НС. Причем из двух субпопуляций, различающихся по уровню метаболизма, которые выявляются в ранней стационарной фазе роста культуры, устойчивее оказалась более активная субпопуляция. Она, переходя в НС, сохраняет свою активность при небольших дозах кислоты. При формировании НС появляется субпопуляция с очень низкой активностью метаболизма. С повышением концентрации кислоты возрастает доля таких клеток, вплоть до 100% [16].

*Выход микроорганизмов из некультивируемого состояния.* Первыми термин «реанимация некультивируемых клеток» использовали Roszak et al. [40] для описания реактивации ЖНК *Salmonella enteritidis*. Возможность их возврата к активному росту и размножению является одним из свойств, полученных в периодической культуре ЖНК или покоящихся клеток бактерий (ПК)[1]. Морфология клеток при реверсии также восстанавливается [17]. Основной проблемой при реанимации покоящихся клеток или ЖНК является доказательство того, что происходит реанимация, а не рост недетектируемой активной части популяции [35]. Во многих случаях для успешного выхода микроорганизмов из НС достаточно снятия неблагоприятного воздействия. Например, для *Vibrio parahaemolyticus* и *Vibrio vulnificus*, переходящих в НС при низкой температуре, достаточно инкубации ЖНК при комнатной температуре с последующим посевом культуры на богатую среду [43]. Кроме того, например, для *Vibrio vulnificus* показано, что динамика увеличения числа КОЕ в условиях инкубации при комнатной температуре и отсутствии питательных веществ отражает именно возврат к росту некультивируемых клеток, поскольку увеличение численности с недетектируемого уровня до  $5 \times 10^4$  за 1 час в данном режиме невозможно за счет деления остаточных активных клеток [44]. Реактивация ЖНК может происходить с помощью видонеспецифичного аутоиндуктора по механизму quorum sensing: добавление культуральной жидкости от *Vibrio vulnificus* и синтетического аутоиндуктора ускоряет выход вибрионов из НС, а ингибирование системы quorum sensing замедляет рекультивацию [1, 4]. Однако *groS* мутанты не способны к реанимации с помощью аутоиндуктора даже при добавлении экзогенного стимулирующего вещества. Значит, этот  $\sigma$ -фактор играет важную роль не только в персистенции ЖНК, но и в их рекультивации. Аугаретян et al. [4] показали, что сигнальная молекула в системе quorum sensing AI-2 может выводить ЖНК *V. vulnificus* из НС. Установлено что клетки *E. coli* могут быть реанимированы на богатой среде при наличии в ней

антиоксидантов (каталаза или пируват натрия) [38]. Хотя существуют различные точки зрения на использование антиоксидантов, Morishige Y. et al. [32] показали, что клетки *Salmonella enteritidis*, введенные в НС с помощью  $H_2O_2$ , восстанавливают культурабельность после добавления пирувата натрия или его аналогов, доказывая, что пируват — одно из ключевых веществ, запускающих синтез макромолекул. *Staphylococcus aureus* не реактивируется при добавлении в среду антиоксидантов, но может быть реактивирован при повышении температуры. Для стафилококковых биопленок реактивирующим фактором служила культуральная жидкость (добавка 50% жидкости к триптическому соевому бульону) от клеток экспоненциальной фазы того же штамма [38]. Эффективными индукторами для выхода из НС оказались фетальная сыворотка, ауксин, витамин К, почвенные вытяжки из живых и убитых инфузорий [1]. Переход в активное состояние, возможно, связан с взаимодействием микроорганизмов с цитокинами организма хозяина [1, 2]. Для *Legionella pneumophila* выявлено, что реанимация возможна при совместном культивировании с *Acanthamoeba castellani* [16]. *L. monocytogenes* serovar Thompson предположительно рекультивируется в кишечнике нематоды [22]. Для ЖНК некоторых энтеропатогенных микроорганизмов (*V. cholerae*, *E. coli*, *S. flexneri*, *S. enterica*) недавно показана реверсия в вегетативное состояние при совместном культивировании с культурами клеток эукариот, установлено, что такой реактивации способствует выделяемая живыми эукариотическими клетками каталаза [41]. Известны работы по реверсии к пролиферативной активности с использованием мышей [47]. Обнаружено, что у многих бактерий присутствует белок Rpf (Reasucitation Promoting Factor). Выявлено, что ЖНК *S. enterica* serovar Oranienburg могут быть стимулированы определенными концентрациями Rpf белка [49]. Пептидогликангидролазная активность белков семейства Rpf предполагает, что восстановление ПК требует гидролиза клеточной стенки, способствуя выходу из нее факторов, влияющих на пробуждение [23]. К настоящему моменту известно, что вирулентность реанимированных клеток сохраняется или восстанавливается. ЖНК различных микроорганизмов имеют ограниченный срок жизни и ограниченный во времени потенциал возврата к росту и размножению. Так, для *Vibrio cholerae* показано отсутствие возврата ЖНК в вегетативное состояние после 91 дня наблюдений [41].

*Опасность жизнеспособных некультивируемых микроорганизмов.* Вопрос, являются ли ЖНК опасными, если они не обнаружены рутинными методами, изучен недостаточно. Поскольку многие микроорганизмы способны сохранять активность факторов вирулентности и инфекционность, существует риск для здоровья человека, животных, растений [39]. Показано, что 80% вспышек заболеваний вызваны неидентифицированными агентами, возможно ЖНК [49]. При этом, такие вспышки часто относят к вирусным инфекциям, т.к. бактерии не выделяются [17]. Так, *Vibrio cholerae* в НС вызывал диарею у волонтеров [9]. Этот микроорганизм продолжал секрецию холерного токсина в течение 28 дней после перехода в НС [10]. *L. pneumophila* в НС сохраняла способность проникать в клетки амебы-хозяина, впоследствии представляя опасность для теплокровных [49]. *S. dysenteriae*, сохраняя сниженную токсичность и адгезивность для клеток HeLa, продуцировала токсин Шига, находясь в НС. Существуют исследования, в которых инфицированные *Shigella dysenteriae* рыбы, не имевшие явного контакта с патогеном, не способным существовать в среде [39]. Highmore et al. [22] показали, что обработка хлором *Listeria monocytogenes* и *Salmonella enterica* serovar Thompson как в жидкой среде, так и на листьях салата приводит к быстрому, в течение нескольких минут, образованию ЖНК, которые сохраняют свою патогенность. Для перевода исследованных



авторами микробов в НС на листьях требуется значительно больше хлора. Это, возможно, связано с расположением клеток в устьицах и вокруг них и образованием биопленок совместно с автохтонной микробиотой листа. Патогенность ЖНК *L. monocytogenes* зависит от примененного стрессового воздействия [22]. Для *E. coli* показано формирование ЖНК при замораживании. Следовательно, микроб становится более опасным при наличии циклов замораживания — оттаивания пищевых продуктов, т.к., ЖНК при этом продолжают синтезировать токсин [29]. Штаммы *Legionella* в НС сохраняют инфекционность в отношении *Acanthamoeba* и макрофагов человека даже после года нахождения в голодной среде. На моделях макрофагов показано, что легионеллы восстанавливали способность к размножению внутриклеточно [13]. При использовании медных водопроводных труб образуются ЖНК *P. aeruginosa*, т.к. там присутствуют ионы меди в определенных концентрациях. Клетки могут выходить из НС при снятии стресса, обусловленного медью, например, хелатирующим агентом, восстанавливать цитотоксичность и генотоксичность в отношении клеток человека в течение 14 дней [15]. *S. typhi* также переходит в опасное НС под воздействием ионов меди в течение 12 — 14 дней [47]. Это указывает на то, что при многих вспышках заболеваний не уделяется достаточного внимания существованию некультивируемых патогенов, особенно в виде биопленок [2]. Логично предположить, что неудачи в выделении данного штамма *E. coli* O104:H4 связаны с присутствием клеток возбудителя в НС. *S. aureus* может находиться в НС в биопленках в присутствии ванкомицина хинопристин/дальфопристин и персистировать в составе биопленок, что предположительно сопряжено с рецидивирующими инфекциями [38]. Следовательно, при выборе дезинфицирующего агента необходимо подбирать биоциды, работающие по нескольким направлениям, поскольку окислительные биоциды неэффективны в отношении биопленок. Одними из наиболее действенных средств считаются соединения хлора, например  $\text{HOCl}$ , для которого показано, что инактивирующие дозы намного меньше, чем, например, для  $\text{H}_2\text{O}_2$  [17].

Для пивоваренной промышленности важны микроорганизмы *Lactobacillus lindneri* и *Lactobacillus harbinensis* и другие представители рода *Lactobacillus*, наличие которых приводит к порче пива. Они могут переходить в НС при адаптации к пиву, при его ферментации и хранении при низкой температуре или при тепловой обработке. При этом сохраняется способность производить вещества, приводящие к порче пива. Важную роль играет окислительный потенциал пива, в том числе бактерицидные вещества хмеля [30, 31]. Существование ЖНК обнаружено также у эукариотных микроорганизмов. Serpaggi et al. [42] показали, что эукариотные микроорганизмы — дрожжи *Brettanomyces bruxellensis*, вызывающие порчу вина, также могут переходить в НС под действием метабисульфита натрия и сохранять свои свойства по порче вина. *Saccharomyces cerevisiae* и *Candida stellata* способны переживать обработку сульфитами, переходя в НС [14].

По мнению Blinkova L.P. et al. [7] и Pakhomov et al. [37] ЖНК важны для определения истинной жизнеспособности вакцинных, пробиотических, музейных культур как основных, так и их опасных контаминирующих микроорганизмов.

Таким образом, имеется возможность возникновения ситуации, когда заболевание вызывается жизнеспособными некультивируемыми микроорганизмами. В этом случае затруднен поиск резервуара и возбудителя инфекции, поскольку традиционный культуральный метод выделения микроорганизмов из природных и антропогенных источников (почва, вода, продукты питания, клинические образцы и др.) дает ложноотрицательный результат.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Гинцбург Г.А., Романова Ю.М., Эль-Регистан Г.И. Механизмы выживания бактерий. М., Медицина, 2005.
2. Романова Ю.М., Горячев С.Н. Современный взгляд на экологию бактерий: некультивируемые формы, персистеры, биопленки. М., АР-Консалт, 2017.
3. Asakura H., Kawamoto K., Haishima Y. Differential expression of the outer membrane protein W (OmpW) stress response in enterohemorrhagic O157:H7 corresponds to the viable but non-culturable state. *Research in Microbiology*. 2008, 159(9-10):709-717.
4. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Interspecific Quorum Sensing Mediates the Resuscitation of Viable but Nonculturable Vibrios. *Applied and Environmental Microbiology*. 2014, 80(8):2478-2483.
5. Ayrapetyan M., Williams T.C., Oliver J.D. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. Bridging the gap between viable but non-culturable and antibiotic persistent bacteria. *Trends in microbiology*. 2015, 23(1):7-13.
6. Barron J.C., Forsythe S.J. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* 2007, 70:2111-2117. doi: 10.4315/0362-028X-70.9.2111.
7. Blinkova L.P., Martirosyan D., Pakhomov Yu. et al. Nonculturable forms of bacteria in lyophilized probiotic preparations. *Functional Foods in Health and Disease*. 2014, 4(2):66-76.
8. Chen S.Y., Jane W.N., Chen Y.S. et al. Morphological changes of *Vibrio parahaemolyticus* under cold and starvation stresses. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, 129(12):157-165.
9. Colwell R.R., Brayton P.R., Grimes D.J. et al. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* and related pathogens in the environment: implications for release of genetically engineered microorganisms. *BioTechnology*. 1985, 3:817-820.
10. Colwell R.R., Brayton P., Tamplin M. et al. Pathogenic potential including production of cholera toxin in viable but nonrecoverable *Vibrio cholerae* O1 in environmental microcosm. *In*: S. Kuwahara and, N.F. Pierce (ed.), *Advances in research on cholera and related diarrheas*. KTK Publishers, Tokyo, 1988, p. 29-39.
11. De Velasquez O., Noguez M.T.Y. et al. Effects of ozone and chlorine disinfection on VBNC *Helicobacter pylori* by molecular techniques and FESEM images. *Environmental Technology*. 2017, 40(6):744-753.
12. Declerck P., Vansacker L., Hulsmans A. et al. Evaluation of power ultrasound for disinfection of both *Legionella pneumophila* and its environmental host *Acanthamoeba castellanii*. *Water Research*. 2010, 44:703-710. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2009.09.062>.
13. Dietersdorfer E., Kirschner A., Schrammel B. et al. Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Research*. 2018, 141:428-440.
14. Divol B., Lonvaud-Funel A. Evidence for viable but nonculturable yeasts in botrytis — affected wine. *Journal of Applied Microbiology*. 2004, 99(1):85-93.
15. Dopp E., Richard J., Dwidjosiswojo Z. et al. Influence of the copper-induced viable but non-culturable state on the toxicity of *Pseudomonas aeruginosa* towards human bronchial epithelial cells in vitro. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 2017, 220:1363-1369.
16. Ducret A., Chabaliere M., Dukan S. Characterization and resuscitation of 'non-culturable' cells of *Legionella pneumophila*. *BMC Microbiology*. 2014, 14 (3) doi:10.1186/1471-2180-14-3.
17. Ferro S., Amorico T., Deo P. Role of food sanitizing treatments in inducing the viable but nonculturable state of microorganisms. *Food control*. 2018, 91:321-329.
18. Ganesan B., Stuart M.R., Weimer B.C. Carbohydrate Starvation Causes a Metabolically Active but Nonculturable State in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007, 73(8):2498-2512.
19. Gerdes K., Jacobsen J.S., Franch T. Plasmid stabilization by post-segregational killing. *Genet. Eng.* 1997, 19:49-61.
20. Hara K., Zhang D. Bacterial abundance and viability in long-range transported dust. *Atmospheric Environment*. 2012, 47:20-25.
21. Heidelberg J. F., Shahamat M., Levin M. et al. Effect of aerosolization on culturability and viability of gram-negative bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(9):3585-3588.
22. Highmore C.J., Warner J.C., Rothwell S.D. et al. Viable-but-Nonculturable *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica* Serovar Thompson Induced by Chlorine Stress Remain Infectious. *mBio*. 2018, 9(2), e00540-18.

23. Keep N.H., Ward J.M., Cohen-Gonsaud M. et al. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth state. *Trends Microbiol.* 2006, 14(6):271-276.
24. Kondo K., Takade A., Amako K. Morphology of the viable but nonculturable *Vibrio cholerae* as determined by the freeze fixation technique. *FEMS Microbiology Letters.* 1994, 123:179-184.
25. Kramer B., Muranyi P. Effect of pulsed light on structural and physiological properties of *Listeria innocua* and *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology.* 2013, 116, 596e611.
26. Kusumoto A., Asakura H., Kawamoto K. General stress sigma factor RpoS influences time required to enter the viable but non-culturable state in *Salmonella enterica*. *Microbiol Immunol.* 2012, 56:228-237.
27. Lai C.J., Chen S.Y., Lin I.H. et al. Change of protein profiles in the induction of the viable but nonculturable state of *Vibrio parahaemolyticus*. *International Journal of Food Microbiology.* 2009, 135(2):118-124.
28. Lahtinen S.J., Ahokoski H., Reinikainen J.P. et al. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable bacteria. *Letters in Applied Microbiology.* 2008, 46(6):693-698.
29. Liu J., Zhou R., Li L. et al. Viable but non-culturable state and toxin gene expression of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 under cryopreservation. *Research in Microbiology.* 2017, 168:88-193.
30. Liu J., Li L., Li B. et al. First study on the formation and resuscitation of viable but nonculturable state and beer spoilage capability of *Lactobacillus lindneri*. *Microbial Pathogenesis.* 2017, 107:219-224.
31. Liu J., Deng Y., Li L. et al. Discovery and control of culturable and viable but non-culturable cells of a distinctive *Lactobacillus harbinensis* strain from spoiled beer. *Scientific Reports.* 2018, 8, Article number: 11446.
32. Morishige Y., Fujimori K., Amano F. Differential resuscitative effect of pyruvate and its analogues on VBNC (Viable But Non-Culturable) *Salmonella*. *Microbes Environ.* 2013, 28:180-186. doi: 10.1264/j sme2.ME12174.
33. Nyström T. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol. Microbiol.* 2003, 48(1): 17-23.
34. Oh E., McMullen L., Jeon B. Impact of oxidative stress defense on bacterial survival and morphological change in *Campylobacter jejuni* under aerobic conditions. *Front. Microbiol.* 2015, 6 (295). doi: 10.3409/fmicb.2015.00295.
35. Oliver J.D. Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 2010, 34(4):415-425.
36. Pakhomov Yu.D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V. et al. Non-culturability and Nisin Production of *Lactococcus lactis*. *J. Bacteriol. Parasitol.* 2013, 5(1) article 178. doi: 10.4172/2155-9597.1000178.
37. Pakhomov Yu. D., Blinkova L.P., Dmitrieva O.V. et al. Factors for conversion of nonculturable probiotic bacteria into active state. *Journal of Nature Science and Sustainable Technology.* 2016, 10 (1):147-153.
38. Pasquaroli S., Zandri G., Vignaroli C. et al. Antibiotic pressure can induce the viable but non-culturable state in *Staphylococcus aureus* growing in biofilms. *J. Antimicrob. Chemother.* 2013, 68(8):1812-1817.
39. Rahman I., Shahamat M., Choudhury M.A. et al. Potential virulence of viable but nonculturable *Shigella dysenteriae* Type I. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62(1):115-120.
40. Roszak D. B., Grimesa J., Colwell R. R. Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. *Can. J. Microbiol.* 1984, 30:334-340.
41. Senoh M., Hamabata T., Takeda Y. A factor converting viable but nonculturable *Vibrio cholerae* to a culturable state in eukaryotic cells is a human catalase. *Microbiology Open.* 2015, doi: 10.1002/mbo3.264.
42. Serpaggi V., Remize F., Recorbet G. Characterization of the «viable but nonculturable» (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology.* 2012, 30(2): 440-447.
43. Su C.P., Jane W.N., Wong H.C. Changes of ultrastructure and stress tolerance of *Vibrio parahaemolyticus* upon entering viable but nonculturable state. *International Journal of Food Microbiology.* 2013, 160(3):360-366.
44. Whitesides M.D., Oliver J.D. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63(3):1002-1005.
45. Wong H.C., Wang P. Induction of viable but nonculturable state in *Vibrio parahaemolyticus* and its susceptibility to environmental stresses. *Journal of Applied Microbiology.* 2004, 96:359-366.



46. Yaron S., Matthews K. A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes. *J. Appl. Microbiol.* 2002, 92:633-640. doi: 10.1046/j.1365-2672.2002.01563.x.
47. Zeng B., Zhao G., Cao X. et al. Formation and Resuscitation of Viable but Nonculturable *Salmonella typhi* *BioMed Research International.* 2013, 2013 article ID 907170.
48. Zhao F., Bi X., Hao Y. Induction of Viable but Nonculturable *Escherichia coli* O157:H7 by High Pressure CO<sub>2</sub> and Its Characteristics. *PLoS One.* 2013, 8(4) e2408.
49. Zhao X., Wang J., Forghani F. et al. Rapid detection of viable *Escherichia coli* O157 by coupling propidium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 23:1708-1716. doi:10.4014/jmb.1306.06003.
50. Zhao X., Zhong J., Wei C. et al. Current Perspectives on Viable but Non-culturable State in Foodborne Pathogens. *Frontiers in Microbiology.* 2017, 8 Article 580.

*Поступила 30.11.18*

Контактная информация: Пахомов Юрий Дмитриевич, к.б.н.,  
105064, Москва, М.Казенный пер., 5а, р.т. (495)916-11-52

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

*Ф.И.Ершов<sup>1</sup>, Т.П.Оспельникова<sup>2,1</sup>, А.Н.Наровлянский<sup>1</sup>*

## **ИНТЕРФЕРОНОВЫЙ СТАТУС КАК МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ БИОМАРКЕРОВ ИММУНОПАТОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА**

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им.Н.Ф.Гамалеи,  
<sup>2</sup>НИИ вакцин и сывороток им.И.И.Мечникова

На протяжении более 60 лет продолжается изучение системы интерферонов (ИФН) как сложной сетевой системы. Открыты ИФН 3 типов: I ( $\alpha/\beta$ ), II ( $\gamma$ ), III ( $\lambda$ ), исследуются их взаимосвязи, механизмы действия, функциональное разнообразие. Практическим выходом изучения функциональной способности лейкоцитов периферической крови человека продуцировать ИФН явился метод определения интерферонового статуса, который позволяет судить об иммунореактивности организма, выявлять чувствительность клеток крови к иммуноактивным препаратам и дает возможность определить тактику лечения при разных формах патологии и прогнозировать исход заболевания. Предложен и научно обоснован усовершенствованный метод ИФН статуса, показатели которого в настоящее время могут считаться характеристиками неспецифических биомаркеров иммунопатологии человека.

*Журн. микробиол., 2019, № 3, С. 91—99*

Ключевые слова: интерфероны I ( $\alpha/\beta$ ), II ( $\gamma$ ), III ( $\lambda$ ) типов, интерфероновый статус, усовершенствованная методика, неспецифические биомаркеры, иммунопатологии человека

*F.I.Ershov<sup>1</sup>, T.P.Ospelnikova<sup>2,1</sup>, A. N.Narovlyansky<sup>1</sup>*

## **INTERFERON STATUS AS A METHOD OF DETERMINATION OF NONSPECIFIC BIOMARKERS OF HUMAN IMMUNOPATHOLOGY**

<sup>1</sup>Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

For more than 60 years, the study of interferons (IFN) system has continued, as a complex network system. IFNs of 3 types are discovered: I ( $\alpha/\beta$ ), II ( $\gamma$ ), III ( $\lambda$ ), their interrelations, mechanisms of action, functional diversity are investigated. The practical way out of the study of the functional capacity of human peripheral blood leukocytes to produce IFN was the method of determining the interferon status, which