

Е.В.Молчанова, Н.П.Агеева

НАУЧНО-МЕТОДИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОЛГОГРАДСКОГО НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОГО ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

В обзоре отражено современное состояние коллекционной деятельности и представлены направления ее совершенствования в рамках проведенной паспортизации коллекции патогенных *Burkholderia* spp. Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Рассмотрены пути модернизации существующих методов консервации, оптимизации современных методов фенотипической и молекулярно-генетической характеристики штаммов патогенных микроорганизмов, а также предложена информационная система каталогизации с формированием универсальной базы данных.

Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 117—126

Ключевые слова: паспортизация, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, коллекционные штаммы, VITEK 2, MALDI ToF MS, DFR, MLVA, MLST

E.V.Molchanova, N.P.Ageeva

SCIENTIFIC AND METHODOLOGICAL SUPPORT FOR DEVELOPMENT OF PATHOGENIC MICROORGANISM COLLECTION OF VOLGOGRAD RESEARCH INSTITUTE FOR PLAGUE CONTROL

Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia

The review reflects the current state of the working in collection and presents the directions of its improvement within the framework of the carried out certification of the collection of pathogenic *Burkholderia* spp. of Volgograd Research Institute for Plague Control. The ways of modernization of existing methods of conservation, optimization of modern methods of phenotypic and molecular-genetic characteristics of strains of pathogenic microorganisms are considered, and an information cataloging system with the formation of a universal database is proposed.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 117—126

Key words: certification, *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, collection strains, VITEK 2, MALDI ToF MS, DFR, MLVA, MLST

Коллекции патогенных микроорганизмов играют важную роль в целом ряде мероприятий, направленных на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Изучение свойств возбудителей инфекционных заболеваний необходимо при мониторинге территорий в случае природно-очаговых инфекций и расследовании путей завоза и распространения на неэндемичных для них регионах.

К направлениям совершенствования деятельности учреждений коллекций патогенных микроорганизмов относятся: оптимизация существующих методов и разработка новых технологий консервации, использование современных методов фенотипической и молекулярно-генетической паспортизации, внедрение новых информационных технологий каталогизации, паспортизации и учета движения патогенных штаммов, а также формирование универсальной единой базы данных.

Возбудители мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) и сапа (*Burkholderia mallei*)

относятся к микроорганизмам II группы патогенности (опасности) и являются потенциальными агентами биотерроризма группы В [9, 25, 33].

Роль *V. pseudomallei* и *V. mallei* в инфекционной заболеваемости человека и некоторых животных рассматривается, главным образом, в связи с существованием эндемичных регионов и появлением завозных случаев инфекций. Сап — зоонозная антропургическая инфекция, регистрируемая в Монголии, Турции, Иране, Ираке, странах Аравийского полуострова, Китае, Индии, Индонезии, Филиппинах [33]. Случаи заражения человека связаны с профессиональной деятельностью: ветеринары, работники мясоперерабатывающих предприятий, сотрудники лабораторий, дрессировщики лошадей. *V. pseudomallei* входит в состав микробиоты почвы и воды стоячих водоемов. К странам, где распространен возбудитель мелиоидоза, относятся Индия, Шри-Ланка, Филиппины, Индонезия, Таиланд, Сингапур, Вьетнам, Малайзия, Бирма, Бразилия, Пуэрто-Рико, страны Тихоокеанского региона, Иран и Австралия. В исследовании Sarovich D.S. et al., показано распространение *V. pseudomallei* в мире с указанием эндемичности мелиоидоза также и для Африки [30]. В США, странах Европы встречаются спорадические случаи этого заболевания у людей, прибывших с эндемичных территорий [18]. Так, в 2016 г. был зарегистрирован случай заражения мелиоидозом во Франции у туриста, прибывшего из Вьетнама [23].

Потенциальная возможность завоза мелиоидоза и сапа на территорию Российской Федерации, а также опасность преднамеренного использования *V. pseudomallei* и *V. mallei* в качестве средства биологического терроризма диктует необходимость наличия представительной коллекции охарактеризованных штаммов этих микроорганизмов как базы для проведения исследований (изучения свойств возбудителей, разработки и испытания средств диагностики, внедрения современных методов и новых технологий и др.).

Коллекция микроорганизмов Волгоградского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора входит в перечень биологических и генетических коллекций РФ (<http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>) и включает 14 штаммов *V. mallei*, выделенных в различных географических регионах (Монголия, Югославия, Венгрия, Польша, Индия, Индонезия), и 59 штаммов *V. pseudomallei* (Вьетнам, Австралия, Таиланд), полученных в 1970 — 1980 гг. прошлого столетия из научно-исследовательских учреждений Советского Союза. Штаммы возбудителя мелиоидоза и сапа содержатся и в коллекциях микроорганизмов США, Великобритании, Бразилии, Венесуэлы, Таиланда и Малайзии, а также в государственных коллекциях патогенных бактерий РФ (Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», ГКПМ, Оболенск). Основная роль в изучении данных видов микроорганизмов в РФ отводится Волгоградскому научно-исследовательскому противочумному институту Роспотребнадзора, на базе которого функционирует «Референс-центр по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза» — координирующий, консультативно-методический, учебный, диагностический и экспертный орган по вопросам индикации, экспресс-диагностики, идентификации и типирования *V. pseudomallei* и *V. mallei* на территории Российской Федерации.

Технологии консервации. Первостепенной задачей коллекции микроорганизмов является сохранение штаммов в неизменном состоянии в течение длительного периода времени. Это осуществляется чаще всего с помощью методов сублимационного высушивания или криоконсервации при низких температурах (-20—85°C), каждый из которых имеет преимущества и недостатки [12].

Лиофилизация (сублимационное высушивание, замораживание-высушивание) — широко распространенный способ высушивания биоматериалов из замороженного состояния, при котором вода испаряется в условиях вакуума без оттаивания льда, что позволяет полностью сохранять первичную структуру объекта. В зависимости от способа размещения биопрепаратов при высушивании различают сублимационные установки коллекторного и камерного типа [12].

Процесс лиофилизации представляет собой стрессовый фактор, вызывающий у

микробных клеток ряд различных изменений [2]. Отмечено, что после 24 лет хранения в ампулах в лиофилизированном состоянии штаммы возбудителя сапа при высеве на питательные среды оставались жизнеспособными. Однако с увеличением сублимационных циклов высушивания наблюдалось снижение окислительной активности штаммов *V.mallei* по отношению к желатине, зависящей от сроков хранения штамма [4]. Аналогично, вакцинный штамм *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ после 60 лет хранения в лиофилизированном состоянии при высеве на питательные среды всё еще сохранял жизнеспособность, однако характеризовался снижением иммуногенных свойств и незначительными изменениями в геноме [13]. Такой длительный срок хранения коллекционных штаммов с сохранением в целом основных свойств является преимуществом рассматриваемого метода. Однако используемая для этого установка К.Е.Долинова морально и физически устарела, но до сих пор является единственной, на которую имеется регламентирующий документ федерального уровня «Инструкция по лиофильному высушиванию возбудителей инфекционных заболеваний I — IV групп на коллекторном аппарате системы К.Е.Долинова». Современные аппараты для лиофильного высушивания предназначены для консервирования биологического и фармацевтического материала и не имеют регламентирующих документов, разрешающих их использование в работе с микроорганизмами I — IV группы патогенности. Кроме того, современные установки не могут полностью обрабатываться дезинфектантами и не подлежат автоклавированию.

В исследовании по оценке возможности применения различных сублимационных систем для лиофилизации патогенных микроорганизмов бактериальной природы было установлено, что препараты, полученные на трех лиофильных сушках коллекторного типа (аппарат системы К.Е.Долинова, Martin Christ Alpha 1-4 LDplus и Heto Power Dry), сохраняют максимальное количество жизнеспособных клеток в процессе хранения. Показатели выживаемости у штаммов, высушенных на этих аппаратах, находились в интервале от 97,3 до 98,7%. При этом биопрепараты, полученные с помощью современной установки Heto Power Dry, обладали максимальным прогнозируемым сроком хранения до 105 лет [11]. В работе Червяковой Н.С. и др. получены данные по лиофилизации во флаконах при помощи современной сушки камерного типа Martin Christ Epsilon 2-6D штаммов III — IV группы патогенности. Авторы указывают на недостатки камерной системы из-за наличия жизнеспособных клеток микроорганизмов на рабочих поверхностях лиофильной камеры, что обуславливает высокий риск создания аварийной ситуации с ПБА. Для обеспечения биологической безопасности необходимо модернизировать данное инженерно-техническое оборудование с возможностью проводить дезинфекцию камеры в автоматическом режиме до момента ее разгерметизации. В то же время, показатели жизнеспособности клеток, лиофилизированных с помощью камерной сушки Martin Christ Epsilon 2-6D, зависели от вида микроорганизмов и были в целом ниже, чем у препаратов, лиофилизированных на системах коллекторного типа [15].

В Волгоградском НИПЧИ для сублимационного высушивания микроорганизмов IV группы патогенности используется лиофильная сушка коллекторного типа нового поколения CoolSafe 110 Freeze Dryer. К преимуществам данной системы следует отнести короткий временной цикл лиофилизации (2,5 ч) и возможность обработки дезинфектантами ее составляющих частей; к недостаткам — ограниченное количество ампул, получаемых за один цикл работы (16) и риск возможной аварии с ПБА на этапе их запаивания в ручном режиме. Для использования этого метода консервации патогенных микроорганизмов необходима инженерно-техническая модернизация системы CoolSafe 110 Freeze Dryer, обеспечивающая биологическую безопасность на всех этапах работы. Кроме того, также необходимо создание регламентирующих документов, разрешающих использование данной системы для работы с микроорганизмами I — IV группы патогенности с утверждением их на федеральном уровне.

Известно, что лиофилизированные культуры и в ампулах, и во флаконах необходимо хранить в темноте при 1 — 4°C. При комнатной температуре и тем более при

30°C наблюдается быстрое отмирание клеток [5]. Поэтому для данного способа хранения микроорганизмов необходимо наличие системы основного и резервного холодильного оборудования в лаборатории коллекции.

Низкотемпературная консервация по сравнению с лиофилизацией для хранения микроорганизмов более универсальна в связи с наличием и доступностью оборудования — низкотемпературных холодильников. Однако данный способ предполагает наличие системы постоянного температурного контроля, аварийной сигнализации с уведомлением об изменении температурного состояния, системы охлаждения помещения хранилища, дублированное энергоснабжение, а также резервные морозильные камеры. Кроме того, время хранения биоматериала при этих температурах также ограничено. Длительность хранения бактерий при этом зависит от биологических особенностей штамма и от условий замораживания и хранения (скорость охлаждения-оттаивания, температура и среда культивирования). По данным Gibson L.F. и Khoury J.T., в холодильнике при температуре -70°C время хранения разных видов бактерий колебалось в пределах 12 — 40 месяцев [24]. По данным De Paoli P. метод криоконсервации при низких температурах позволял сохранять бактериальные клетки без пересевов до 10 лет [20]. Результаты исследований по хранению штаммов патогенных микроорганизмов в государственной коллекции Роспотребнадзора показывают, что штаммы *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus* устойчивы к замораживанию и хранению при -70°C с использованием оптимальной среды и в присутствии криопротекторов [3, 7]. Для холерных вибрионов наиболее высокая выживаемость с сохранением основных диагностических признаков наблюдалась при применении лактозо-желатиновой среды, для штаммов возбудителя туляремии и бруцеллеза — сахарозо-желатиновой среды и бульона Альбими с 10% глицерином. При этом установлено некоторое снижение количества жизнеспособных клеток как на этапе замораживания, так и в процессе хранения.

В целом, оба описанных метода сохранения референтных штаммов патогенных микроорганизмов необходимы для одновременного использования в коллекциях. Культуры в лиофилизированном состоянии в виде ампул/флаконов удобны для транспортировки при передаче из учреждения в учреждение, а также в качестве резервного многолетнего источника штаммов в замороженном состоянии — для оперативной повседневной деятельности (выдача в структурные подразделения, изучение свойств и т.д.).

Современные методы фенотипической и молекулярно-генетической паспортизации. Важным направлением деятельности коллекций микроорганизмов является установление таксономической принадлежности штаммов и подтверждение их аутентичности в процессе воспроизводства. Систематика бактерий постоянно обновляется и совершенствуется, в связи с чем существует необходимость в периодическом проведении номенклатурной ревизии штаммов коллекций. Нередки случаи, когда штамм, идентифицированный по фенотипическим свойствам классическими методами как определенный вид, при более детальном изучении оказывался иной видовой принадлежности [10, 14]. Внедрение в лабораторную практику новых методов и технологий обуславливает применение их как для верификации видовой принадлежности коллекционных штаммов, так и для изучения их свойств [10]. Поэтому в крупных международных коллекциях и государственных коллекциях патогенных микроорганизмов РФ для подтверждения аутентичности референтных штаммов сегодня используется ряд современных автоматических технологий, в частности биохимическое профилирование с применением микробиологических анализаторов, масс-спектрометрия по технологии MALDI-ToF, рибопринтинг, фрагментарное, мультилокусное и полногеномное секвенирование [10].

В 2012 г. 20 лабораторий, представляющих государственные, промышленные и частные испытательные центры США, провели масштабные совместные испытания по оценке идентификационной возможности тест-карты Gram-negative (GN) микробиологической системы VITEK 2 «bioMerieux» (Франция) по идентификации 720 культур микроорганизмов, включая *Brucella melitensis*, *F.tularensis*, *B. mallei*, *B. pseudo-*

mallei и *Yersinia pestis*. В результате видовая принадлежность 707 штаммов была определена верно, что позволило сделать вывод о приемлемости анализатора VITEK 2 GN для быстрой идентификации [17].

В РосНИПЧИ «Микроб» с помощью микробиологического анализатора VITEK 2 проводилось подтверждение аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов, при этом было установлено, что некоторые из них не соответствовали видовой принадлежности, указанной в паспортных данных [10, 14].

Однако диагностические возможности любой современной системы идентификации ограничены полнотой сведений, заложенных в базу данных (БД) прибора. Идентификационные ключи для отдельных видов микроорганизмов II группы патогенности либо отсутствуют в БД анализатора VITEK 2, либо представлены в ограниченном количестве. В связи с этим, штаммы *Brucella suis* 1330 и *B. abortus* 19VA были определены только до рода [14]. Кроме того, штаммы, имеющие особенности в своем профиле биохимической активности, не совпадающим с заложенным стандартом, могут быть неверно идентифицированы. Так, авторы ряда работ указывали, что клинические изоляты возбудителя мелиоидоза бактериологический анализатор VITEK 2 в некоторых случаях идентифицировал как виды комплекса *Burkholderia ceracia*, а бактерий возбудителя сапа как виды *Pseudomonas fluorescens* и *Pseudomonas putida*, что было связано со спецификой биохимического профиля отдельных штаммов [27, 29, 36]. В исследовании Van den Beld M.J. et al. при идентификации бактерий *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas gessardii* или *Pseudomonas proteolytica*, выделенных из промышленных вод в Нидерландах, автоматический анализатор VITEK 2 определил как вид *F. tularensis* [32]. Проведенная расширенная характеристика по биохимической активности коллекционных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза Волгоградским НИПЧИ с помощью данного анализатора показала, что 31 из 40 штаммов возбудителя мелиоидоза и 8 из 12 штаммов возбудителя сапа обладали типичным биохимическим профилем и были идентифицированы верно с вероятностью 90 — 99%. Остальные штаммы имели определенные особенности в биохимическом профиле, что обуславливало их идентификацию как виды комплекса *B. ceracia* или *Sphingomonas paucimobilis*. Для правильной идентификации системой VITEK 2 культур возбудителя мелиоидоза решающее значение имело наличие β -N-ацетилглюкозаминидазной и β -N-ацетилгалактозаминидазной активности и отсутствие активности фермента целлюлазы, для культур возбудителя сапа — неспособность к утилизации сахарозы и D-трегалозы, наличие активности L-пролинариламидазы и тирозинариламидазы, отсутствие глицинариламидазной активности [8].

В целом, использование системы VITEK 2 позволяет проводить паспортизацию по биохимическим свойствам микроорганизмов. Вместе с тем, для применения данного анализатора в коллекциях очевидна необходимость расширения его БД идентификационными ключами по отдельным видам микроорганизмов II группы патогенности.

Еще одним современным методом идентификации и биотипирования микроорганизмов является времяпролетная масс-спектрометрия с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией. На данный момент для идентификации патогенных микроорганизмов во многих лабораториях применяют аппаратно-программные комплексы MALDI Biotyper «Bruker» (США) и S.A.R.A.M.I.S.[™] «Anagnostec GmbH» (Германия), основанные на использовании MALDI-ToF масс-спектрометров линейки Microflex[™] «Bruker» (США) и Axima[™] «Shimadzu» (Япония) соответственно. Идентификационные БД содержат масс-спектры порядка 5 тыс. видов микроорганизмов, но референсные масс-спектры возбудителей особо опасных инфекций в коммерческих сборках БД представлены в ограниченном количестве. В связи с этим, на практике встречались случаи неправильной идентификации штаммов возбудителя сапа и мелиоидоза [26]. Wang H. et al. (2016) в своем исследовании указали на отсутствие масс-спектров *B. pseudomallei* в текущей версии базы данных системы Bruker Biotyper (DB 5627), что затрудняло идентификацию клинических изолятов возбудителя мелиоидоза. Внесение только что полученных в работе масс-спектров изучаемых

штаммов в базу данных MALDI-ToF MS (включая масс-спектры трех штаммов, неправильно определенных анализатором как виды *V. putida* и комплекса *V. serasia*) обусловило их верную 100% идентификацию как вид *V. pseudomallei* со значением Score >2,000.

В работе Лопастейской Я.А. и др. приведены результаты исследования по дополнению БД S.A.R.A.M.I.S.TM, «Anagnostec GmbH» (Германия) масс-спектрами клеточных белков 10 референтных штаммов возбудителей сапа и мелиоидоза коллекции Волгоградского НИПЧИ для повышения эффективности дальнейшей идентификации. В результате проведенной работы все коллекционные штаммы *V. pseudomallei* и *V. mallei* были корректно идентифицированы до вида, а в их паспорта были внесены масс-спектрометрические белковые профили с их детальным анализом пиков с определенными молекулярными массами (3780, 4815, 5202, 6560, 7090, 7560, 9624 и 10460 Da), характерными для этих видов [6].

В 2014 году были утверждены методические рекомендации «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I — II групп патогенности». В этом документе отражены такие разделы, как культивирование исследуемых штаммов, получение из них белковых препаратов, снятие спектров, дополнение базы данных спектрами референтных штаммов, проведение идентификации, интерпретация полученных результатов. Представленный унифицированный алгоритм позволяет проводить экспресс-идентификацию и хемотипирование микроорганизмов — возбудителей опасных инфекционных заболеваний и стандартизует результаты, полученные методом масс-спектрометрии.

Для паспортизации коллекционных штаммов микроорганизмов необходима полная характеристика не только фенотипических свойств, но и их генотипов. Универсального алгоритма молекулярно-генетической паспортизации не существует. Полиморфность геномов таких видов как *Vibrio cholerae*, *V. pseudomallei* и *Y. pestis* позволяет использовать большинство известных методов для их типирования. Выбор методов исследования определяется возможностями каждой отдельной лабораторией. Генотипы одних и тех же референтных штаммов, хранящихся в различных коллекциях, зачастую охарактеризованы с помощью разных методов и поэтому не поддаются сопоставлению.

Из всего многообразия методов генотипирования микроорганизмов, в отношении изолятов патогенных буркхольдерий наиболее эффективными оказались VAT, DFR, MLVA, MLST и полногеномное секвенирование. Метод амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК используют для генетической паспортизации, внутривидового дифференцирования и анализа филогенетических взаимоотношений штаммов *V. pseudomallei* с определением наличия 14 локусов и *V. mallei* с определением наличия 9 локусов [1, 21]. При использовании метода MLVA для типирования штаммов возбудителя мелиоидоза определяют число тандемных повторов в 23 переменных локусах [31] или в четырех, по упрощенной системе [19], для типирования штаммов возбудителя сапа — в 6 локусах [31]. Метод мультилокусного сиквенса-типирования (MLST) применяется для выяснения географической принадлежности коллекционных штаммов [30]. Для некоторых микроорганизмов, в том числе для возбудителя сапа, метод MLST малоэффективен, так как у штаммов *V. mallei* было зарегистрировано всего лишь два сиквенса-типа (www.mlst.net).

Для стандартизации получаемых результатов в рамках государственного санитарно-эпидемиологического нормирования РФ учреждениями Роспотребнадзора совместно разработаны методические указания «Порядок молекулярного типирования возбудителей особо опасных инфекционных болезней на базе Референс-центров и Национальных центров верификации диагностической деятельности». Данный документ определяет объем молекулярно-генетических исследований и методические основы получения характеристик для каждого вида патогенных микроорганизмов I-II группы, а также требования к организации и оснащению лабораторий. Таким образом, согласно методическим указаниям для генетической паспортизации штаммов воз-

будителя мелиоидоза показано использовать методы VAT, MLVA и MLST/полногеномное секвенирование, для штаммов возбудителя сапа — DFR, MLVA и полногеномное секвенирование.

Формирование универсальной единой базы данных. В 1960-х годах Всемирная федерация коллекций культур (WFCC, <http://www.wfcc.info>) инициировала разработку международной базы данных о мировых биоресурсах. Был создан Всемирный центр данных микроорганизмов (WDCM, www.wdcm.org), содержащий информацию о коллекциях в мире (CCINFO, <http://www.wfcc.info/ccinfo/home/>), представленную в виде глобального (GCM) и справочного каталогов микроорганизмов (ПКК) и программы по сбору и анализу информации о штаммах из внешних источников (ABC) [28]. GCM на данный момент содержит информацию о более, чем 368 000 штаммах из 708 коллекций из 72 стран и регионов всего мира [34, 35]. В этих каталогах на текущий момент отображены 25 коллекций РФ.

В 1985 году была создана Микробная информационная сеть Европы (MINE), инициированная структурными подразделениями коллекций микроорганизмов Германии, Нидерландов, Великобритании, Бельгии и Португалии [Gams W. et al., 1990]. В результате была создана первая крупная многонациональная модель общего каталога, который охватывал все микроорганизмы включая вирусы. Ключевой особенностью этой информационной системы было определение общих минимальных универсальных наборов данных, включающих приблизительно 60 характеристик, таких как таксономию, физиологические и биохимические свойства, географическое происхождение, среды культивирования и т.д. [22], [Stalpers J.A. et al., 1990]. К сожалению, краткосрочный характер финансирования не дал этому направлению дальнейшего развития. С 2000 г. с целью объединения и обеспечения всеобщего доступа к фрагментированным ресурсам, информации и экспертным знаниям, имеющимся в европейских общественных коллекциях микроорганизмов, была создана общеевропейская научно-исследовательская инфраструктура (MIRRI), включающая более 40 коллекций общественных фондов и исследовательских институтов из 19 европейских стран. Ключевым компонентом данной структуры является разработка динамичной информационной системы. На сегодня отдельные каталоги различных коллекций стран Европы доступны в режиме онлайн и взаимодействуют друг с другом, продвигаясь к созданию совместимых баз данных. Этого во многом способствует создание инфраструктуры исследований микробиологических ресурсов (MIRRI, <http://www.mirri.org/>) [16].

В России коллекции, обеспечивающие хранение генетических и биологических ресурсов, представлены самостоятельными специализированными организациями — ботаническими садами РАН, структурными подразделениями научно-исследовательских организаций (коллекции микроорганизмов и клеточных культур, рабочими коллекциями лабораторий, ведущих исследования в области генетики и селекции, а также рядом организаций, для которых хранение генетического материала не является основной функцией (питомники, зверофермы, зоопарки и т.п.). Эти организации принадлежат различным ведомствам (в т.ч. РАН, Минсельхоз, Минобрования и науки, Минздрав, Минобороны, Роспотребнадзор и др.). В 2004 г. была создана информационная система, состоящая из каталога-перечня коллекций РФ (92 коллекции биологических и генетических ресурсов различных организаций) и единый каталог микроорганизмов Российских коллекций немедицинского профиля, <http://www.sevin.ru/collections/microorganisms.html>. Открытый каталожный фонд ВКМ (www.vkm.ru) представлен микроорганизмами более 750 родов и 3300 видов и превосходит по таксономическому разнообразию каталогизированные фонды других микробных коллекций РФ. Сведения по культурам открытого фонда ВКМ включены в электронный сводный каталог российских коллекций и WFCC Global Catalogue of Microorganisms (GCM — gcm.wfcc.info/).

Во всех учреждениях Роспотребнадзора, на базе которых имеются структурные подразделения коллекций патогенных микроорганизмов, разработано информационное сопровождение оперативной коллекционной деятельности. Информация в

базах данных достаточно разнородна и зависит, в частности, от исходных данных по единицам хранения, предназначения коллекции, наличия инструментов информационных технологий и персонала. Такая гетерогенность каждой конкретной коллекции как по содержанию, так и по формату затрудняет информационный взаимообмен.

В настоящий момент в рамках унификации коллекционной деятельности в учреждениях Роспотребнадзора разрабатывается «Положение об обеспечении коллекционной деятельности в области патогенных микроорганизмов». Целью данного документа является создание единой формы учетной документации, единого алгоритма выборки изолятов, подлежащих хранению, единой процедуры паспортизации коллекционного штамма и общего электронного каталога патогенных микроорганизмов для обеспечения информационного взаимодействия между структурами этого ведомства.

В Волгоградском НИПЧИ создан электронный каталог (Microsoft Excel) коллекционных штаммов патогенных микроорганизмов и база данных (Microsoft Access) «Коллекционные штаммы патогенных буркхольдерий ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора» (государственная регистрация № 2017620285).

Главной задачей при создании БД являлось проектирование такой системы, которая была бы достаточно гибкой и позволяла в дальнейшем включать в нее новые разделы. При разработке структуры базы данных учитывалась необходимость отражения всего многообразия свойств и связей рассматриваемых объектов, обеспечения быстрого и удобного способа получения информации. Созданная БД является реляционной и представляет собой систему связанных таблиц, каждая из которых описывает определенную информационную категорию, определяемую рядом характерных признаков. Наиболее значимыми являются категории «штамм», «фенотипические свойства» и «генотипические свойства», каждая из которых несет определенную функциональную информацию. Большое значение имеют подразделы, выполненные в форме справочников и описывающие биохимические свойства и особенности генетических характеристик. В них характеризуются свойства, важные для определения таксономического положения штамма и его практического использования.

Разработанная структура БД позволяет хранить и отображать разнообразную информацию о содержащихся объектах, формализованную, текстовую и графическую информацию, а также документы, созданные другими приложениями. Структурированная таким образом информация по коллекционным штаммам *V. pseudomallei* и *V. mallei* представляет единую систему, обеспечивающую быстрый переход между логически связанными объектами, целенаправленный отбор объектов и их групп по определенным признакам и упрощает повседневную оперативную деятельность коллекции. Вместе с тем, очевидна необходимость создания ежегодно обновляемого единого каталога коллекционных штаммов организаций держателей государственных и учрежденческих коллекций Роспотребнадзора.

В обзоре рассмотрены основные направления совершенствования коллекционной деятельности. Для сохранения коллекционных штаммов в виде лиофилизированных культур необходима разработка регламентирующих документов, определяющих порядок использования современных аппаратов для сублимационного высушивания микроорганизмов I — IV группы патогенности, а также мер по соблюдению требований биологической безопасности и снижения риска возникновения аварии с ПБА. В случае применения метода низкотемпературной консервации необходимо наличие системы постоянного температурного контроля низкотемпературных холодильников, аварийной сигнализации с уведомлением об изменении температурного состояния, системы охлаждения помещения хранилища, дублированное основное энергоснабжение и аварийное от дизельного генератора, а также резервные морозильные камеры. Проведение ревизии с подтверждением таксономической принадлежности штаммов и паспортизации коллекций патогенных буркхольдерий необходимо осуществлять с использованием современных автоматических бактериологических

анализаторов, например VITEK 2, метода MALDI ToF масс-спектрометрии, а также методов исследования генома: VAT, MLVA и MLST/полногеномное секвенирование — для *B. pseudomallei*, DFR, MLVA и полногеномное секвенирование — для *B. mallei*. Создание единого электронного каталога реализовано в программе Microsoft Excel, а базы данных — Microsoft Access, как универсального и доступного информационно-обеспечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бондарева О. С., Савченко С.С., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Антонов В.А. Генотипирование штаммов *Burkholderia mallei* на основе метода амплификации дифференцирующих фрагментов ДНК. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2016, 1: 33-37.
2. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 5-12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.
3. Грачева И.В., Осин А.В. Низкотемпературная консервация коллекционных штаммов холерных вибрионов. Пробл. особо опасных инф. 2014, 4: 39-42.
4. Гришкина Т.А., Тимофеева Е.В., Спиридонов В.А. Оценка результатов хранения музейных штаммов возбудителя сапа в течение длительного периода. Пробл. особо опасных инф. 2004, 87: 40-42.
5. Куплетская М.Б., Нетрусов А.И. Жизнеспособность лиофилизированных микроорганизмов после 50 лет хранения. Микробиология. 2011, 80 (6): 842-846.
6. Лопастейская Я.А., Молчанова Е.В., Шаров Т.Н., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Применение времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF) для идентификации возбудителей сапа и мелиоидоза. Клини.лаб.диагн. 2016, 61 (8): 502-507.
7. Малахаева А.Н., Ляшова О.Ю., Плотников О.П., Осин А.В. Хранение штаммов *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ и *Brucella abortus* 19 ВА в жизнеспособном состоянии путем их глубокого замораживания. Пробл. особо опасных инф. 2015, 1: 63-66.
8. Молчанова Е.В., Лопастейская Я.А., Незнамова А.В., Кузютина Ю.А., Агеева Н.П., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Топорков А.В. Особенности идентификации *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 compact 30. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 57-61.
9. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. Вестник РАН. 2003, 73 (3): 195-204.
10. Осин А.В., Червякова Н.С., Портенко С.А., Абдрашитова А.С., Куклев В.Е. Применение автоматизированных систем идентификации микроорганизмов для верификации таксономической принадлежности коллекционных штаммов патогенных бактерий. Пробл. особо опасных инф. 2016, 1: 79-83. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-1-79-83.
11. Осин А.В., Червякова Н.С., Валова Т.В. Лиофилизация штаммов патогенных микроорганизмов на сублимационных установках разного типа и оценка качества полученных препаратов. Пробл. особо опасных инф. 2016, 3: 66-70.
12. Похиленко В.Д., Баранов А.М., Детушев К.В. Методы длительного хранения коллекционных культур микроорганизмов и тенденция развития. Известия вузов. 2009, 4: 99-121.
13. Соловьев Е. А., Саяпина Л. В., Осина Н. А., Давыдов Д. С., Бондарев В. П. Характеристика фенотипических и генетических свойств вакцинного штамма *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ с длительными сроками хранения. Пробл. особо опасных инф. 2015, 4: 91-95. DOI: <http://dx.doi.org/10.21055/0370-1069-2015-4-91-95>.
14. Червякова Н.С., Осин А.В. Установление аутентичности референтных штаммов патогенных микроорганизмов с применением автоматического микробиологического анализатора Vitek 2. Пробл. особо опасных инф. 2017, 1: 100-104. DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-100-104.
15. Червякова Н.С., Валова Т.В., Осин А.В. Использование лиофильных аппаратов камерного типа в коллекциях патогенных микроорганизмов. Пробл. особо опасных инф. 2014, 3: 65-68.
16. Casaregola S., Vasilenko A., Romano P. et al. An Information System for European culture collections: the way forward. 2016, 5: 772-783.
17. Crowley E., Bird P., Fisher K. et al. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. J. AOAC Int. 2012 May-Jun; 95 (3): 778-85. PMID:22816270.
18. Currie B.J., Dance D.A., Cheng A.C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and

- melioidosis: an update. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2008 Dec; 102 Suppl. 1: S1-4. PMID: 19121666.
19. Currie B.J., Haslem A., Pearson T. et al. Identification of melioidosis outbreak by multilocus variable number tandem repeat analysis. *Emerg. Infect. Dis.* 2009 Feb; 15 (2): 169-174.
 20. De Paoli P. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29 (5): 897-910.
 21. Duangsonk K., Gal D., Mayo M. et al. Use of a variable ampli-con typing scheme reveals considerable variation in the accessory genomes of isolates of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2006, 44 (4): 1323-1334.
 22. Gams W., Hennebert G., Stalpers J. et al. Structuring strain data for storage and retrieval of information on fungi and yeasts in MINE, the Microbial Information Network Europe. *J. Gen. Microbiol.* 1988, 134: 1667-1689.
 23. Gauthier J., G r me P., Defez M. et al. Melioidosis in travelers returning from Vietnam to France. *Emerg. Infect. Dis.* 2016 Sep; 22 (9): 1671-1673. Doi: 10.3201/eid2209.160169. PMID: PMC4994359.
 24. Gibson L.F., Khoury J.T. Storage and survival of bacteria by ultra-freeze. *Lett. Appl. Microbiol.* 1986, 3 (6): 127-129.
 25. Gilad J., Harary I., Dushnitsky T. et al. *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* as bioterrorism agents: national aspects of emergency preparedness. *IMAJ.* 2007, 9: 499-503.
 26. Karger A., R. Stock, Ziller M. et al. Rapid identification of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* by intact cell Matrix-assisted Laser Desorption/Ionisation mass spectrometric typing. *BMC Microbiology.* 2012, 12: 229.
 27. Kiratisin P., Santanirand P., Chantratita N. et al. Accuracy of commercial systems for identification of *Burkholderia pseudomallei* versus *Burkholderia cepacia*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2007, 59: 277-281.
 28. Ma J., Miyazaki S., Sugawara H. A handy database for culture collections worldwide: CCINFO-PC. *Comput. Appl. Biosci.* 1995 Apr; 11 (2): 209-212.
 29. Podin Y., Kaestli M., McMahon N. et al. Reliability of automated biochemical identification of *Burkholderia pseudomallei* is regionally dependent. *J. Clin. Microbiol.* 2013, 51 (9): 3076.
 30. Sarovich D.S., Garin B., De Smet B., et al. Phylogenomic analysis reveals an Asian origin for African *Burkholderia pseudomallei* and Further Supports Melioidosis Endemicity in Africa. *Mosphere.* 2016 Mar 9; 1 (2). Pii: e00089-15. Doi: 10.1128/msphere.00089-15.
 31. U'Ren J.M., Schupp J.M., Pearson T. et al. Tandem repeat regions within the *Burkholderia pseudomallei* genome and their application for high resolution genotyping. *BMC Microbiol.* 2007, 7: 23.
 32. Van den Beld M.J., Reinders E., Notermans D.W. et al. Possible misidentification of species in the *Pseudomonas fluorescens* lineage as *Burkholderia pseudomallei* and *Francisella tularensis*, and emended descriptions of *Pseudomonas brenneri*, *Pseudomonas gessardii* and *Pseudomonas proteolytica*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2016 Sep; 66 (9): 3420-3425. DOI: 10.1099/ijsem.0.001206. Epub. 2016 Jun 3.
 33. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013 Sep 3; 8: 131. DOI: 10.1186/1750-1172-8-131.
 34. Wu L., Sun Q., Sugawara H. et al. Global catalogue of microorganisms (gcm): a comprehensive database and information retrieval, analysis, and visualization system for microbial resources. *BMC Genomics.* 2013 Dec 30; 14: 933. DOI: 10.1186/1471-2164-14-933.
 35. Wu L., Sun Q., Desmeth P. et al. World data centre for microorganisms: an information infrastructure to explore and utilize preserved microbial strains worldwide. *Nucleic Acids Res.* 2017 Jan 4; 45 (D1): D611-D618. DOI: 10.1093/nar/gkw903. Epub 2016 Oct 7.
 36. Zong Z., Wang X., Deng Y. et al. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system. *JMM.* 2012, 61: 1483-1484.

Поступила 10.11.17

Контактная информация: Елена Владимировна Молчанова, к.б.н.,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442)37-37-74