

МИРОВЫЕ ТЕНДЕНЦИИ В ИЗОЛЯЦИИ, ИДЕНТИФИКАЦИИ И ХАРАКТЕРИСТИКЕ *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* ТИП В – ВОЗБУДИТЕЛЯ ГЕМОФИЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ

Е. Л. Салимова*, А. Д. Конон, В. П. Трухин, И. В. Красильников

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток и предприятие по производству
бактерийных препаратов» ФМБА России

Поступила в редакцию 28.07.2017 г.

Аннотация. Гемофильная инфекция или Нib-инфекция, вызываемая *Haemophilus influenzae* тип b, является актуальной медицинской проблемой из-за значительной распространенности, частой генерализации и тяжелого течения с высокой смертностью. *H. influenzae* тип b является причиной тяжелой пневмонии, менингита и других инвазивных заболеваний у детей до 5 лет.

За рубежом проблема Нib-инфекции успешно решена с помощью специфической вакцинопрофилактики. После повсеместного введения заболеваемость гемофильной инфекцией снизилась более чем на 90 %. Однако в Российской Федерации до настоящего времени технологии получения вакцин для профилактики инфекций, вызываемых *H. influenzae* тип b, находятся на стадии разработки.

Главной составляющей технологий получения вакцин является штамм-продуцент, синтезирующий целевой продукт (действующее вещество лекарственного препарата), поэтому целью данной работы было обобщить данные литературы о штаммах *H. influenzae* тип b.

В обзоре приводятся данные по характеристике, способам выделения и идентификации бактерий *H. influenzae* тип b. Приводится информация по истории открытия и изучения *H. influenzae* тип b, а также структуры синтезируемого полисахарида, его иммуногенности. Подробно рассматриваются такие особенности *H. influenzae* тип b, как потребность в факторах роста X (гемин) и V (никотинамидадениндинуклеотид, НАД), их биохимическая роль для культуры, а также другие физиолого-биохимические, серологические признаки, позволяющие идентифицировать серотип b среди представителей рода *Haemophilus*.

Обобщена информация об описанных в современной литературе штаммах *H. influenzae* тип b, используемых в производстве полисахаридных вакцин. Всего рассмотрено 25 штаммов *H. influenzae* тип b, для которых приводятся данные по месту выделения штаммов, их получению (источнику), способу хранения, условиям пассирования, продуктивности.

Совокупность литературных данных, представленных в настоящем обзоре, дает основание заключить, что выделенный сотрудниками ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России штамм *Haemophilus influenzae* SPB тип b В-7884 не уступает по свойствам штаммам, описанным в изученной литературе.

Ключевые слова: *Haemophilus influenzae* тип b, штамм, полирибозилрибитолфосфат, X и V фактор, шоколадный агар

В настоящее время многие развитые страны мира включили в Национальные программы иммунизации вакцину против гемофильной инфекции, вызванной бактерией *Haemophilus influenzae* тип b. Основными признаками Нib-инфекции являются тяжелая пневмония, менингит и другие инвазивные

заболевания у детей до 5 лет. До введения вакцинации серьезные заболевания были зафиксированы у 8.13 млн. детей в возрасте 1–59 месяцев, смертность составила – 371 000 человек [1]. Начиная с 90-х годов XX ст., после начала иммунизации Нib-вакциной, заболеваемость гемофильной инфекцией значительно снизилась (более чем на 90 %) [1]. В Российской Федерации вакцинация против Нib-инфекции осуществляется только детям из группы

© Салимова Е. Л., Конон А. Д., Трухин В. П., Красильников И. В., 2019

риска. В первую очередь это связано с отсутствием полного цикла производства вакцины против *H. influenzae* тип b на территории нашей страны.

Важной составляющей любого биотехнологического процесса является высокоактивный штамм-продуцент. Работа по изолированию, идентификации и изучению штаммов *H. influenzae* тип b ведется уже более 70 лет, а постоянное усовершенствование технологий, использование современного оборудования позволяют значительно повышать синтез целевых метаболитов продуцентов.

Цель настоящего обзора – обобщить данные литературы о свойствах, особенностях и местах выделения, идентификации, продуктивности описанных штаммов *H. influenzae* тип b, а также сравнить эти сведения с собственными результатами, полученными на базе ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов» ФМБА России (ФГУП СПбНИИВС ФМБА России).

Общая характеристика *H. influenzae* тип b. Бактерии *H. influenzae* тип b относятся к грамотрицательным палочкам овоидной формы и вызывают ряд заболеваний у человека. Согласно книге Prokaryotes [2] типы вида *H. influenzae* впервые были выделены в 1889 г. во время эпидемии гриппа и описаны Пфайфером. Долгое время именно они считались возбудителями гриппа. В 1920 г. Winslow с соавтор. предложили название *Haemophilus*, а в 1933 г. Smith с соавтор. установили вирусную природу гриппа, а также то, что инфекция, вызванная *H. influenzae* была иного происхождения [3]. Однако наименование вида («*influenzae*»), что в переводе означает «грипп») за данными микроорганизмами закрепилась.

На протяжении долгого времени данный вид менял свой таксономический статус, пока в 1984 г. не был окончательно включен в семейство *Pasteurellaceae*.

H. influenzae тип b синтезирует капсульный полисахарид, состоящий из повторяющихся единиц 5-D-рибитол-(1→1)-β-D-рибоза-3-фосфата (рисунок) и названный полирибозилрибитолфосфатом (ПРФ) [4, 5].

Впервые структура капсульного полимера была описана в 1953 г. Zamenhof с соавтор. [6], однако в его составе выделяли только полирибозилфосфат. Наличие рибитола в структуре полисахарида было установлено в 1975 г. Crisel с соавтор. при помощи бумажной хроматографии и ядерно-магнитного резонанса [7].

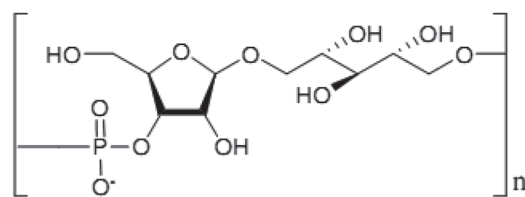


Рис. 1. Структура ПРФ *Haemophilus influenzae* тип b [5]

Основываясь на структуре капсульного полисахарида *H. influenzae* тип b, микроорганизмы данного серотипа также разделяются на две группы – тип I и тип II – причем большинство клинических изолятов относится к первому типу [8]. При помощи сиквенса генов *hcsA* и *hcsB* исследователи определяли принадлежность изолятов, выделенных от больных гемофильной инфекцией в Иране, к определенному генотипу. Установлено, что среди 50 исследованных культур *H. influenzae* четыре относились к серотипу b, половина из которых принадлежала ко II типу. Полученные результаты подчеркивают необходимость проведения таких исследований с целью усовершенствования вакцинопрофилактики [8].

По способности вызывать иммунный ответ капсульный полисахарид относится к T-независимым антигенам 2-го типа, которые стимулируют образование антител без помощи главного комплекса гистосовместимости II класса. ПРФ запускает активацию комплементарного фактора C3d по комплимент альтернативному пути, в следствии чего примированные В клетки маргинальной зоны перемещаются в зародышевый центр и контактируют с комплексом полисахарид-C3d через CD21 рецептор комплимента [9].

Виды, относящиеся к роду *Haemophilus*, являются факультативными анаэробами. Клетки неподвижны и не образуют спор, оксидазоположительны и являются мезофилами – оптимальная для роста температура 35–37 °С. Для культивирования представителей рода *Haemophilus* используют натуральные (например, сердечно-мозговой бульон), синтетические и полусинтетические питательные среды, содержащие неорганические соли, глюкозу, пептон [10–14].

Выделение и идентификация *H. influenzae* тип b. В основном источниками выделения *H. influenzae* (в том числе и серотипа b) являются цереброспинальная жидкость, кровь, мокрота, ушная жидкость и верхние дыхательные пути детей, имеющих гемофильную инфекцию [4]. После изолирования определяют принадлежность пред-

ставителей рода *Haemophilus* к определенному виду и серотипу. Идентификацию микроорганизмов, как правило, проводят общепринятыми методами по морфолого-культуральным, физиолого-биохимическим, генетическим и серологическим признакам [11, 15–17].

Известно, что *H. influenzae* тип b обладает рядом уникальных отличительных особенностей и свойств, благодаря которым данный микроорганизм можно идентифицировать.

Традиционно считается, что представители рода *Haemophilus* для своей жизнедеятельности требуют X (гемин) и V (никотинамидадениндинуклеотид, НАД) факторы и это является их отличительной особенностью, однако на данный момент установлено, что некоторые виды *Actinobacillus* и *Pasteurella* также нуждаются в V факторе [15]. Относительно *H. influenzae* тип b, данный вид способен расти только в присутствии данных двух факторов. В зависимости от вида и штамма большинство других представителей рода *Haemophilus* требуют для роста только один из них [15].

При использовании этого метода для идентификации *H. influenzae* тип b возникает трудность, связанная с тем, что потребность в X и V факторах для данного вида одинакова с *H. haemolyticus*. В таком случае для их различия необходимо использовать дополнительные исследования, например, проверка типа гемолитической реакции. Известно, что *H. haemolyticus* способен к β-гемолитизису, что подтверждается по результатам дополнительного теста на кровяном агаре [15, 17].

Потребность штаммов *H. influenzae* в порфиринах различной структуры, а также влияние функциональных групп в их составе начали изучать еще в середине прошлого века [18]. Потребность в факторе X у *H. influenzae* обусловлена тем, что клетки данного микроорганизма не способны синтезировать фермент, превращающий δ-аминолевулиновую кислоту (АЛК) в протопорфирин IX (интермедиаты пути биосинтеза гема) [4]. Поэтому для роста представителей *H. influenzae* тип b в питательную среду обязательно вносить источник протопорфирина IX, например, в виде гемина. Установлено, что у *H. influenzae* присутствует активная феррохелатаза, которая катализирует введение двухвалентного железа в ядро протопорфирина с образованием гема. Предполагается, что оптимальная концентрация гема для роста *H. influenzae* – 0.1–10 мкг/мл.

НАД участвует в окислительно-восстановительных реакциях в клетке *H. influenzae* [4]. У *H. influenzae*

полностью отсутствует биосинтетический путь получения НАД *de novo*. Накоплено достаточно информации о влиянии НАД на рост *H. influenzae* тип b при внесении фактора роста в питательную среду, однако мало информации о поглощении и преобразовании фактора V *in vivo*. Авторы [19] установили, что генетическая последовательность *pad N* у *H. influenzae* тип b Eagan отвечает за катаболизм НАД и его преобразование в никотинамидрибозид. Потребность в факторе V удовлетворяется путем внесения НАД или его производных в количестве 0.2–1.0 мкг/мл.

Кроме того, виды рода *Haemophilus* отличаются по способности лизировать лошадиные эритроциты, присутствию каталазы и ферментативной активности в отношении сахаров [15–17].

На основе биохимических реакций, наличия уреазы, орнитиндекарбоксилазы и по продукции индола штаммы *H. influenzae* разделяют на биотипы. Всего различают восемь биотипов *H. influenzae* (I–VIII). Большинство изолятов типа b относятся к биотипу I, тогда как основная часть нетипируемых штаммов – к биотипу II–VI [16].

Учитывая метаболические особенности, представителей рода *Haemophilus* традиционно выращивают на шоколадном агаре, который получают путем добавления 5–10 % дефибринированной крови к основе кровяного агара. Смесь выдерживают при 80 °С в течение 15–20 мин до приобретения средой темно-коричневого цвета, напоминающего шоколад. Такое нагревание способствует высвобождению НАД из красных кровяных телец, а также приводит к инактивации НАД-разрушающих ферментов. В некоторых случаях в качестве источников НАД используют добавки, например, Isovitale X, а гемина – раствор гемоглобина [4, 16, 17]. Возможно приготовление шоколадного агара в лабораторных условиях из основы шоколадного агара с добавлением раствора гемоглобина и добавки, содержащей необходимые факторы роста. Также используют коммерческие готовые чашки со средой, в состав которых к основе – гонокковому агару – добавлен гемин и смесь различных добавок. При росте на шоколадном агаре *H. influenzae* тип b образует большие, круглые, гладкие, выпуклые, сероватые непрозрачные колонии [17]. Недостатком использования шоколадного агара для идентификации является невозможность наблюдения гемолитических свойств выделенной культуры, что не позволяет разделить различные виды рода *Haemophilus* [4].

Все признаки, характерные для *H. influenzae*, и позволяющие дифференцировать данный вид среди других представителей рода, представлены в определителе бактерий Берджи [15].

Необходимо отметить, что основной и наиболее простой способ определения серотипа b гемофильной палочки – реакция агглютинации со специфической сывороткой [16, 17].

Обобщенная схема по идентификации представителей рода *Haemophilus* предложена в работе [16]. Предварительно образцы материала высевают на кровяной или шоколадный агар, изучают морфолого-культуральные свойства полученной культуры и проводят ряд биохимических тестов (на оксидазу, каталазу, уреазу, рост в присутствии X и V факторов).

Центром по контролю и профилактике заболеваний США для идентификации именно серотипа b *H. influenzae* предложена схема, включающая высеивание материала на шоколадный агар, изучение культуральных свойств полученных колоний, тест на оксидазу, рост в присутствии X и V факторов, агглютинацию с сывороткой, специфичной к серотипу b. В случае положительных результатов делают предварительный вывод, что изолированная культура – *H. influenzae* тип b и при необходимости проводят дополнительные исследования (например, генетические) [17].

В настоящее время учеными предлагается использовать инструментальные методы для идентификации серотипа b. Так, в статье [20] описаны результаты применения времяпролетной масс-спектрометрии с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF MS), которая позволила идентифицировать штаммы, относящиеся к *H. influenzae* тип b, с высокой чувствительностью (100 %), специфичностью (99 %) и воспроизводимостью (98 %).

Ранее сотрудниками ФГУП СПбНИИВС ФМБА России был получен клинический изолят путем смыва свабом со слизистой из носоглотки больного ребенка. Из клинического изолята при помощи последовательного пассирования на твердой (шоколадный агар) и жидкой питательной среде выделили чистую культуру *H. influenzae* тип b. После изучения морфолого-культуральных, фи-

зиолого-биохимических, серологических и генетических (анализ последовательности генов 16 S rRNA) свойств было доказано, что изолированная культура относится к виду *Haemophilus influenzae* и обладает серотипом b [21].

Данный штамм был депонирован в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ – Оболенск» Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» (ФБУН ГНЦ ПМБ) для целей национальной патентной процедуры под регистрационным номером В-7884. Область применения штамма обозначена как: высокоактивный продуцент капсульного полисахарида (полирибозилрибитолфосфата), используемый для промышленного производства. Максимальная продуктивность *H. influenzae* тип b В-7884 по полисахариду при оптимальных условиях составила 290–300 мкг/мл.

Получены и охарактеризованы по всем соответствующим показателям Главный и Рабочий банки клеток *H. influenzae* тип b В-7884, а также проведена отработка процесса культивирования штамма.

В таблице обобщена информация по некоторым описанным в литературе штаммам *H. influenzae* тип b, с приведением данных по их продуктивности и условиям пассирования.

На основании данных, приведенных в таблице, можно сделать вывод, что выделенный нами штамм по количеству синтезированного ПРФ не уступает, а иногда и превышает данные, указанные для других штаммов, в том числе и российских.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения // Еженедельный эпидемиологический бюллетень. 2013. Т. 88. С. 413-428.
2. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. The Prokaryotes. Springer. New York, 2006, vol. 6, 1194 p.

Таблица 1

Некоторые штаммы *H. influenzae* тип b – продуценты капсульного полисахарида ПРФ

Штамм	Место выделения	Место получения/ источник	Способ хранения	Условия пассирования	Продуктивность*, мкг/мл	Ссылка
GB 3291	Атланта	Центры по контролю и профилактике заболеваний	Лиофильно высушенная культура	Шоколадный агар. При приготовлении Рабочего банка клеток (РБК) использовали среду Greaves, содержащую 10 % глицерина в качестве криопротектора. Хранение РБК при -70°C	155.0	[22]

Таблица 1 (Продолжение)

Некоторые штаммы *H. influenzae* тип b – продуценты капсульного полисахарида ПРФ

Штамм	Место выделения	Место получения/ источник	Способ хранения	Условия пассирования	Продуктивность*, мкг/мл	Ссылка			
Hib (1)	Тегеран, 2002	Детская больница Мофид, образец спинномозговой жидкости детей с подозрением на менингит	Данные отсутствуют	Модифицированные сердечно-мозговой бульон, триптон-соевый бульон, бульон Мюллера-Хилтона, гонококковый бульон с добавками 1 % гемоглобина и 1 % Isovitalex. Инкубирование 24 ч при 37 °С в присутствии 5–10 % CO ₂ .	102.7	[12]			
Hib (2)					108.0				
Hib (3)					93.4				
Hib (4b)	Тегеран, 2009-2010	Детская больница Бахрами, образец спинномозговой жидкости детей с подозрением на менингит			286.7				
Hib(5s) (ATCC 35540)	Данные отсутствуют	Американская коллекция типовых культур			321.0				
Hib(6s) (ATCC 10210)					276.4				
Hib(7b)	Тегеран, 2009-2010	Детская больница Бахрами, образец спинномозговой жидкости детей с подозрением на менингит			267.2				
H.inf.1	Тегеран	Детская больница Мофид, изолят от грудных детей в возрасте до двух лет			Лиофильно высушенная культура в виде порошка, или в криопробирках, содержащих стеклянные шарики при -70 °С, или в глицерине в соотношении 3:1 к культуральной жидкости при -20 °С		В колбах, содержащих модифицированный гонококковый бульон с добавлением гемина (10 мг/мл) и IsovitaleX. Культивирование при 37 °С в присутствии 5-10% CO ₂ на протяжении 18 ч при энергичном перемешивании.	16.0	[23]
H.inf.2		Больница Имама Хомейни, детское отделение, изолят от грудных детей в возрасте до двух лет						116.0	
H.inf.3		Детская больница Мофид, изолят от грудных детей в возрасте до двух лет						108.0	
ATF1 (ATCC 35540)		Данные отсутствуют	Американская коллекция типовых культур	100.0					
ATF2 (ATCC 10210)			Американская коллекция типовых культур	192.0					
A760705	Амстердам	Данные отсутствуют	В условиях глубокой заморозки при -70 °С	Полусинтетическая жидкая питательная среда, содержащая неорганические соли, дрожжевой экстракт, декстрозу, аминокислоты, гемин и НАД	480.0	[13]			

Таблица 1 (Продолжение)

Некоторые штаммы *H. influenzae* тип *b* – продуценты капсульного полисахарида ПРФ

Штамм	Место выделения	Место получения/ источник	Способ хранения	Условия пассирования	Продуктивность*, мкг/мл	Ссылка
Гетерогенная популяция (отбирала продуктивные белые колонии)	Данные отсутствуют	Данные отсутствуют	Лиофильно высушенная культура или в условиях глубокой заморозки в присутствии глицерина	Твердая питательная среда, содержащая неорганические соли, растительный пептон и дрожжевой экстракт, источник углерода и факторы роста НАД и протопорфирин IX	719.0–904.0	[24]
ATCC 10211	ATCC АМС Медицинский армейский центр Уолтера Рида М Питтман 572	Американская коллекция типовых культур	Лиофильно высушенная культура (2–8) °С	Сердечно-мозговой бульон с добавками 1 % гемина и 0.01 % НАД. Культивирование при 37 °С	1050.0–1160.0	[25, 26]
CS 68	Индия	Госпиталь Христианского медицинского колледжа, Веллур	Данные отсутствуют	Культивирование на жидкой питательной среде, содержащей неорганические соли, аминокислоты, дрожжевой экстракт, растительный пептон, глюкозу, НАД и гемин.	100.0	[14]
326 (№ 289)	Россия, 2006	Выделен от больного ребенка в ходе клинико-лабораторного обследования (история болезни № 62159), депонирован в коллекции ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России	Лиофильно высушенная культура	1.5% сердечно-мозговой агар с добавлением 10 мг/л гемина и 4 мг/л среды НАД. Инкубация на протяжении 18 ч при 37°С и 5-10% CO ₂ .	80.0–150.0	[27]
267 (Mech №1)	Россия	Клинический изолят, полученный от больного менингитом ребенка, депонирован в коллекции ФГБУ «ГИСК им. Л.А. Тарасевича» Минздравсоцразвития России	Данные отсутствуют	Сердечно-мозговой бульон с добавлением 4 мг/л НАД и 10 мг/л гемина.	50.0–100.0	[15]
Santos (San)	Нью-Йорк, перед 1945	Колумбийская пресвитерианская больница	В стерильном обезжиренном молоке при -70 °С	Сердечно-мозговой бульон и триптон-соевая основа, среда Левинтала и шоколадный агар (с добавлением лошадиной крови), среда, содержащая казеиновый гидролизат и дрожжевой экстракт с добавлением лошадиной крови и НАД	130.0**	[16]
Rabinowitz (Rab)					116.0**	
62B	Бостон, 1936	Государственная лаборатория биопрепаратов			119.0**	

Таблица 1 (Продолжение)

Некоторые штаммы *H. influenzae* тип b – продуценты капсульного полисахарида ПРФ

Штамм	Место выделения	Место получения/ источник	Способ хранения	Условия пассирования	Продуктивность*, мкг/мл	Ссылка
305	Алабама, 1970	В. Хови Хансвелл	В стерильном обезжиренном молоке при -70 °С	Сердечно-мозговой бульон и триптон-соевая основа, среда Левинтала и шоколадный агар (с добавлением лошадиной крови), среда, содержащая казеиновый гидролизат и дрожжевой экстракт с добавлением лошадиной крови и НАД	114.0**	[16]
Eag	Бостон, 1968	Бактериологическая лаборатория детского госпиталя медицинского центра			122.0**	
Mad	Бостон, 1970	Бактериологическая лаборатория детского госпиталя медицинского центра			133.0**	
B-7884	Санкт-Петербург, 2015	ФГУП СПбНИ-ИВС ФМБА России	В стерильном глицерине при -70 °С	Культивирование на жидкой питательной среде, содержащей неорганические соли, аминокислоты, дрожжевой экстракт, растительный пептон, глюкозу, НАД и гемин.	290.0–300.0	[21]

«*» – данные приведены для оптимальных условий культивирования.

«**» – по пентозе ПРФ/мг биомассы

3. Centers for disease control and prevention. Epidemiology and prevention of vaccine-preventable Diseases. *Haemophilus influenzae* type b. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html#vaccines> (дата обращения: 13.03.2017).

4. Богданович Т.М., Стецюк О.У., Кречикова О.И., Боронина Л.Г., Катосова Л.К., Фаустова М.Е., под редакцией Страчунского Л.С. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2000. Т. 2. № 2. С. 93-109.

5. Riza A., Nurainy N. // Proceed. Intern. Semin. Chemist. 2008, pp. 294-296.

6. Zamenhof S., Leidy G., Fitzgerald P. L., Alexander H.E., Chargaff E. // J. Biol. Chem. 1953. Vol. 203. N 2, pp. 695-704.

7. Crisel R.M., Baker R.S., Dorman D.E. // J. Biol. Chem. 1975. Vol. 250. N 13, pp. 4926-4930.

8. Bagherzadeh Khodashahri S., Siadat S.D., Rahbar M., Abdollahpour-Alitappeh M., Vaziri F., Rahnamaye-Farzami M., Mohammadzadeh M., Davari M., Fateh A., Masoumi M. // Iran J. Microbiol. 2015. Vol. 7. N 3, pp. 136-143.

9. Zarei A.E., Almehdar H.A., Redwan E.M. Hib Vaccines: Past, present, and future perspectives. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html#vaccines> (дата обращения: 13.03.2017).

10. Afshar M., Esmaily F., Aminian M., Asli E., Haadi A., Torabi M., Hatami A. // Arch. Razi Inst. 2012. Vol. 67. N 1, pp. 7-12.

11. Hamidi A., Beurret M.F. Patent United States, N 7,582,459 B2, 2004.

12. Ella K. M., Ramasamy V., Naidu M. G., Sarma A. D. Patent WO, N 2014009971, 2014.

13. Елкина С.И., Сергеев В.В., Ванеева Н.П. Апарин П.Г., Львов В.Л., Ястребова Н.Е., Орлова О.Е. Патент РФ, № 2257412, 2005.

14. Anderson P., Pitt J., Smith D.H. // Infect. Immun. 1976. Vol. 13. N 2, pp. 581-589.

15. Заварзин Г.А. Определитель бактерий Берджи. Москва, Мир, 1997, Т. 1, 2, 800 с.

16. UK Standards for microbiology investigations bacteriology. Identification of *Haemophilus* species and the HACEK group of organisms, 2015, N 3, 35 p.

17. Centers for Disease Control and Prevention. Identification and characterization of *Haemophilus influenzae*. Режим доступа: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html> (дата обращения: 13.03.2017).

18. Granick S., Gilder H. // J. Gen. Physiol. 1946. Vol. 30, pp. 1-13.

19. Schmidt-Brauns J., Herbert M., Kemmer G., Kraiss A., Schlör S., Reidl J. // Int. J. Med. Microbiol. 2001. Vol. 291. N 3, pp. 219-225.

20. Månsson V., Resman F., Kostrzewa M., Nilson B., Riesbeck K. // J. Clin. Microbiol. 2015. Vol. 53. N 7, pp. 2215-2224.

21. Салимова Е.Л., Конон А.Д., Трухин В.П., Петровский С.В., Красильников И.В. // Актуальная биотехнология. 2016. № 3 (18). С. 77-81.

22. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Baruque-Ramos J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. // Appl. Biochem. Biotechnol. 2003. Vol. 110. N 2, pp. 91-100.

23. Esmaily F., Aminian M., Tavangar A.R., Hadi A. // Arch. Razi Instit. 2011. Vol. 66. N 1, pp. 43-49.

24. Maitre-Wilmotte G., Speck D., Rokbi B. Patent United States, N 8,673,617, 2014.

25. Arsang A., Tabatabaie A., Vaziri F., Nejati M., Zolfaghari M. R., Fateh A., Rahimi Jamnani F., Bahrmand A. R., Siadat S. D. // *Minerv. Biotechnolog.* 2017. Vol. 29. N 1, pp. 17-23.

26. American type culture collection. *Haemophilus influenzae* (Lehmann and Neumann)

ФГУП «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов»

*Салимова Е. Л., кандидат фармацевтических наук, начальник цеха «Комбинированные вакцины»
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Конон А. Д., кандидат технических наук, ведущий инженер-технолог цеха «Комбинированные вакцины»

E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Трухин В. П., директор

Красильников И. В., доктор биологических наук, профессор, заместитель директора по международным отношениям

Winslow et al. (ATCC® 10211™). Режим доступа: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/10211.aspx#generalinformation> (дата обращения: 13.03.2017).

27. Ванеева Н.П., Елкина С.И., Апарин П.Г. Патент РФ, № 2465316, 2012.

The federal state unitary enterprise "The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations"

*Salimova E. L., PhD., head of the department "Combined Vaccines"
E-mail: e.l.salimova@spbniivs.ru

Konon A. D., PhD., leading process engineer of the department "Combined Vaccines"

E-mail: a.d.konon@spbniivs.ru

Truhin V. P., director

Krasilnikov I. V., doctor of biological sciences, professor, deputy director for international relations

WORLD TRENDS IN ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERISTICS OF *HAEMOPHILUS INFLUENZAE* TYPE B – THE AGENT OF HAEMOPHILIC INFECTION

E. L. Salimova*, A. D. Konon, V. P. Truhin, I. V. Krasilnikov

FSUE "The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations" FMBA

ABSTRACT. Hib infection caused by *Haemophilus influenzae* type b is a topical medical issue due to its high prevalence, frequent generalization and severe course with high mortality. *H. influenzae* type b causes severe pneumonia, meningitis and other invasive diseases in children under 5 years of age.

Abroad, the problem of Hib infection has been successfully solved using specific vaccine prevention. After widespread administration, the incidence of Hib infection has decreased by more than 90%. However, in the Russian Federation, vaccine technology for the prevention of *H. influenzae* type b infections is still under development.

The main component of vaccine technologies is a producer strain synthesizing the desired product (active drug substance), therefore the purpose of this work was to summarize the literature data about *H. influenzae* strains type b.

Data on characteristics, methods of isolation and identification of bacteria of *Haemophilus influenzae* type b are provided in review. Information on the history of the discovery and study of *H. influenzae* type b, as well as the structure of the synthesized polysaccharide and its immunogenicity is given. The features of *H. influenzae* type b, such as the requirement of growth factors X (hemin) and V (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD), their biochemical role for culture, as well as other physiological, biochemical, serological characters that identify the serotype b among the genus *Haemophilus* are considered in detail.

The information about strains of Hib used in the manufacture of polysaccharide vaccines and described in the current literature is reviewed. A total of 25 strains of *H. influenzae* type b were examined, for which data on the place of strains isolation, their preparation (source), storage method, passaging conditions, and productivity are given.

The totality of the literature data presented in this review gives grounds for concluding that the strain of *H. influenzae* SPB type b B-7884 isolated by the officers of FSUE «The Saint-Petersburg scientific research institute of vaccines and serums and the enterprise for the production of bacterial preparations» FMBA of Russia is not inferior in properties to strains described in the studied literature.

Keywords: *Haemophilus influenzae* type b, strain, polyribosylribitol phosphate, X and V factor, chocolate agar

REFERENCES

1. Vsemirnaya organizatsiya zdravookhraneniya // *Ezhenedel'nyi ehpidemiologicheskii byulleten'*, 2013, Vol. 88, pp. 413-428.
2. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. *The Prokaryotes*. Springer, New York, 2006, vol. 6, 1194 p.
3. Centers for disease control and prevention. *Epidemiology and prevention of vaccine-preventable Diseases. Haemophilus influenzae type b*. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html#vaccines> (accessed 13 March 2017).
4. Bogdanovich T.M., Stetsyuk O.U., Krechikova O.I., Boronina L.G., Katosova L.K., Faustova M.E., pod redaktsiei Strachunskogo L.S. // *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*, 2000, Vol. 2, No. 2, pp. 93-109.
5. Riza A., Nurainy N. // *Proceed. Intern. Semin. Chemist*, 2008, pp. 294-296.
6. Zamenhof S., Leidy G., Fitzgerald P. L., Alexander H.E., Chargaff E. // *J. Biol. Chem*, 1953, Vol. 203, No. 2, pp. 695-704.
7. Crisel R.M., Baker R.S., Dorman D.E. // *J. Biol. Chem*, 1975, Vol. 250, No. 13, pp. 4926-4930.
8. Bagherzadeh Khodashahri S., Siadat S.D., Rahbar M., Abdollahpour-Alitappeh M., Vaziri F., Rahnamaye-Farzami M., Mohammadzadeh M., Davari M., Fateh A., Masoumi M. // *Iran J. Microbiol*, 2015, Vol. 7, No. 3, pp. 136-143.
9. Zarei A.E., Almeshdar H.A., Redwan E.M. *Hib Vaccines: Past, present, and future perspectives*. Available at: <https://www.cdc.gov/vaccines/pubs/pinkbook/hib.html#vaccines> (accessed 13 March 2017).
10. Afshar M., Esmaily F., Aminian M., Asli E., Haadi A., Torabi M., Hatami A. // *Arch. Razi Inst*, 2012, Vol. 67, No. 1, pp. 7-12.
11. Hamidi A., Beurret M.F. Patent United States, no. 7,582,459 B2, 2004.
12. Ella K.M., Ramasamy V., Naidu M.G., Sarma A.D. Patent WO, no. 2014009971, 2014.
13. Elkina S.I., Sergeev V.V., Vaneeva N.P., Aparin P.G., L'vov V.L., Yastrebova N.E., Orlova O.E. Patent RF, no. 2257412, 2005.
14. Anderson P., Pitt J., Smith D.H. // *Infect. Immun*, 1976, Vol. 13, No. 2, pp. 581-589.
15. Zavarzin G.A. *Opredelitel' bakterii Berdzhii*. Moscow, Mir, 1997, vol. 1, 2, 800 p.
16. UK Standards for microbiology investigations bacteriology. *Identification of Haemophilus species and the HACEK group of organisms*, 2015, No. 3, 35 p.
17. Centers for Disease Control and Prevention. *Identification and characterization of Haemophilus influenzae*. Available at: <https://www.cdc.gov/meningitis/lab-manual/chpt09-id-characterization-hi.html> (accessed 13 March 2017).
18. Granick S., Gilder H. // *J. Gen. Physiol*, 1946, Vol. 30, pp. 1-13.
19. Schmidt-Brauns J., Herbert M., Kemmer G., Kraiss A., Schlör S., Reidl J. // *Int. J. Med. Microbiol*, 2001, Vol. 291, No. 3, pp. 219-225.
20. Månsson V., Resman F., Kostrzewa M., Nilson B., Riesbeck K. // *J. Clin. Microbiol*, 2015, Vol. 53, No. 7, pp. 2215-2224.
21. Salimova E.L., Konon A.D., Trukhin V.P., Petrovskii S.V., Krasil'nikov I.V. // *Aktual'naya biotekhnologiya*, 2016, No. 3 (18), pp. 77-81.
22. Takagi M., Cabrera-Crespo J., Baruque-Ramos J., Zangirolami T.C., Raw I., Tanizaki M.M. // *Appl. Biochem. Biotechnol*, 2003, Vol. 110, No. 2, pp. 91-100.
23. Esmaily F., Aminian M., Tavangar A.R., Hadi A. // *Arch. Razi Instit*, 2011, Vol. 66, No. 1, pp. 43-49.
24. Maitre-Wilmotte G., Speck D., Rokbi B. Patent United States, no. 8,673,617, 2014.
25. Arsang A., Tabatabaie A., Vaziri F., Nejati M., Zolfaghari M. R., Fateh A., Rahimi Jamnani F., Bahrmand A. R., Siadat S. D. // *Minerv. Biotechnolog*, 2017, Vol. 29, No. 1, pp. 17-23.
26. American type culture collection. *Haemophilus influenzae* (Lehmann and Neumann) Winslow et al. (ATCC® 10211™). Available at: <https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/10211.aspx#generalinformation> (accessed 13 March 2017).
27. Vaneeva N.P., Elkina S.I., Aparin P.G. Patent RF, no. 2465316, 2012.