

Н.С.Червякова, А.В.Осин

## УСТАНОВЛЕНИЕ АУТЕНТИЧНОСТИ РЕФЕРЕНТНЫХ ШТАММОВ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ С ПРИМЕНЕНИЕМ АВТОМАТИЧЕСКОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО АНАЛИЗАТОРА VITEK 2

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

**Целью** работы являлось проведение идентификации референтных штаммов патогенных микроорганизмов из фонда Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» с применением микробиологического анализатора Vitek 2 с последующим установлением их биохимических маркеров аутентичности. **Материалы и методы.** В основу методического подхода заложено применение автоматизированной системы Vitek 2 Bio-Mérieux с последующим проведением анализа полученных результатов в программе BioNumerics 7.5. **Результаты и выводы.** Проведено подтверждение аутентичности 103 референтных штаммов патогенных микроорганизмов из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Установлено, что семь из них (6,8 %) не соответствовали своим паспортным данным и не могут использоваться в научно-практической деятельности, вследствие чего были заменены на подтвержденные аналоги. Анализ результатов взаимодействия изучаемых штаммов с дифференцирующими субстратами, позволил определить для каждого из них маркеры аутентичности, необходимые для контроля подлинности коллекционной культуры при ее воспроизводстве и хранении. На основе полученных данных были обновлены паспорта изученных референтных штаммов.

**Ключевые слова:** аутентичность референтных штаммов, бактериологический анализатор Vitek 2, видовые маркеры, BioNumerics.

Корреспондирующий автор: Червякова Надежда Сергеевна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

N.S.Chervyakova, A.V.Osin

## Authentication of Reference Strains of Pathogenic Microorganisms Applying Automated Microbiological Analyzer “Vitek 2”

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

**Objective** of the study was to carry out identification of reference strains of pathogenic microorganisms from stores of the State Collection of Pathogenic Bacteria (SCPB) at RusRAPI “Microbe”, using microbiological analyzer Vitek 2, followed by determination of their biochemical authenticity markers. **Materials and methods.** Methodological approach was based on application of automated system Vitek 2 Bio-Mérieux with the subsequent assessment of the results obtained, using BioNumerics 7.5 software package. **Results and conclusions.** Verified was authenticity of 103 reference strains of pathogenic microorganisms stored in SCPB, RusRAPI “Microbe”. It was established that 7 out of 103 strains (6.8 %) did not conform to the claimed feature profiles and cannot be used in scientific-practical activities, in consequence of which they were replaced with reliable authentic analogues. Evaluation of the data on interaction between the tested strains and differentiating substrates allowed for determination of authenticity markers for each of them, necessary for control of collection culture identity under reproduction and storage. On the basis of the data gathered, the profiles of the studied reference strains were regenerated.

**Key words:** authenticity of reference strains, bacteriologic analyzer Vitek 2, species markers, BioNumerics.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nadezhda S. Chervyakova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Chervyakova N.S., Osin A.V. Appliance of Automated Microbiological Analyzer “Vitek 2” for Authentication of Reference Strains of Pathogenic Microorganisms. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*, 2017; 1:100–104. (In Russ.). DOI: 10.21055/0370-1069-2017-1-100-104

Определение видовой принадлежности штаммов, а также подтверждение их аутентичности (установление подлинности по свойствам, заявленным в паспорте на момент поступления) в процессе воспроизводства с учетом требований современной систематики бактерий является одним из важных направлений деятельности коллекций микроорганизмов [8, 9].

Традиционно установление таксономической принадлежности микроорганизмов основывается на изучении их морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и генетических свойств. Ключевым тестом при определении аутентичности является изучение биохимической активности патогена с использованием

комбинированных (комплексных) сред Клиглера, Олькеницкого, Ресселя, Кларка, Гисса и коммерческих тест-систем: системы индикаторные бумажные – СИБ (Нижний Новгород), АПИ стрипы – API® (Bio-Mérieux, Франция) и др. [2, 3, 4, 10]. Это не всегда позволяет окончательно идентифицировать некоторые бактерии до вида, что является необходимым при включении их штаммов в коллекционный фонд. Нередки случаи, когда бактерия, идентифицированная по фенотипическим свойствам определенным видом, оказывается при более детальном изучении иной видовой принадлежности [5].

Контроль соответствия паспортным данным особенно необходим при консервации и воспроиз-

водстве референтных штаммов, использующихся в производственной, диагностической и образовательной деятельности, свойства которых недостаточно изучены, т.к. выделение и описание их осуществлялось в различное время, большей частью в середине XX века, когда сведения о фенотипических свойствах носили фрагментарный характер [1].

В ряде случаев для правильной видовой идентификации требуется расширить перечень используемых субстратов с помощью микробиологического анализатора Vitek 2 (Bio-Mérieux, Франция), позволяющего одновременно изучать более 60 различных биохимических свойств бактерий.

В настоящее время в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (ГКПБ) поддерживается большое число бактериальных штаммов, применение которых в качестве референтных регламентировано нормативно-методическими документами различного уровня и является обязательным при проведении диагностических исследований, связанных с использованием микроорганизмов I–IV групп патогенности, для контроля качества медицинских диагностических и профилактических препаратов, а также пищевых продуктов. Изначально аутентичность этих штаммов подтверждалась путем выполнения методик, результаты которых указаны в их паспортах на момент выделения культуры или ее поступления в коллекцию, и полностью согласовывались с паспортными данными. Однако эти данные могут не соответствовать современным требованиям систематики микроорганизмов.

В этой связи целью нашего исследования являлось проведение идентификации референтных штаммов патогенных микроорганизмов из фонда ГКПБ с применением микробиологического анализатора Vitek 2 и последующим установлением их биохимических маркеров аутентичности.

### Материалы и методы

В работе использованы 103 штамма, наиболее востребованных в настоящее время в качестве референтных. Они представлены бактериями I–IV групп патогенности, принадлежащими к 22 различным родам: *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Plesiomonas*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Francisella*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Corynebacterium*, *Brucella*, *Pasteurella*.

Для изучения культуральных свойств исследуемых штаммов использовали жидкие и плотные питательные среды, принятые для определенной группы микроорганизмов. Подтверждение их видовой принадлежности и выделение видовых маркеров проводили с помощью автоматизированной системы Vitek 2 Bio-Mérieux в соответствии с инструкцией производителя и применением карт VITEK® 2: Gram-Negative identification card (GN) для идентификации грамотрицательных палочек, Gram-Positive

identification card (GP) – грамположительных микроорганизмов, Anaerobic and *Corynebacteria* identification card (ANC) – для идентификации большинства клинически значимых анаэробных микроорганизмов и видов рода *Corynebacterium*.

Обработку результатов осуществляли в программе BioNumerics v. 7.5 с помощью модуля «Character type». Коэффициенты подобия рассчитывались на основе корреляции Пирсона. Кластерный анализ проводили по методу невзвешенного попарного среднего – UPGMA.

### Результаты и обсуждение

На первом этапе нашей работы проведена расширенная идентификация взятых в исследование штаммов с применением автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Bio-Mérieux. Установлено, что из 103 изученных штаммов семь (6,8 %) не соответствовали видовой принадлежности, указанной в паспортных данных. Из них штамм *Serratia marcescens* 1 (в ГКПБ с 1951 г.) идентифицирован как *S. plymuthica*, *Proteus vulgaris* 261 (1977 г.) – *P. mirabilis*, *Citrobacter freundii* 101/57 (1999 г.) – *C. braakii*, *Listeria monocytogenes* 766 (2010 г.) – *L. innocua*, *Pasteurella multocida* 556 (1965 г.) – *P. canis*, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525 (2005 г.) – *A. salmonicida*, *Vibrio alginolyticus* 143 (1997 г.) – *A. salmonicida*. Полученные данные указывают на невозможность использования этих штаммов в научно-практической деятельности.

Анализ данных, полученных на Vitek 2, показал, что штаммы *Brucella suis* 1330 и *B. abortus* 19VA определены только до рода, в связи с отсутствием представителей данных видов в базе данных анализатора. Также выявлено, что некоторые изучаемые культуры могут принадлежать к составному таксону (включающему несколько микроорганизмов), т.к. его виды имеют одинаковый биохимический профиль на картах GN, GP, ANC, и для окончательной их идентификации необходимо использовать дополнительные тесты вне прибора (рис. 1). Так, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. *enteritidis*, *paratyphi*, *dublin*, *typhimurium* принадлежат к составному таксону *Salmonella group*; *Shigella dysenteriae* ser. 1 (панее *S. dysenteriae shiga*), *S. dysenteriae* ser. 2 (*S. dysenteriae stutzer-schmitz*), *S. dysenteriae* (*S. dysenteriae hissar*), *S. flexneri* ser. 6 (*S. dysenteriae ser. newcastle*) принадлежат к составному таксону *Shigella group* и для окончательной их идентификации необходимо провести серологические тесты. Кроме того, было скорректировано таксономическое положение штамма *Listeria murrayi* M-16 (рис. 2), который определен бактериологическим анализатором как *L. grayi*, что согласуется с систематикой рода *Listeria*, представленной в последнем издании Bergey's Manual of Systematic Bacteriology [6].

Следующим этапом нашего исследования было определение биохимических маркеров аутентичности у использованных в работе референтных штаммов. Для этого полученные на Vitek 2 результаты по

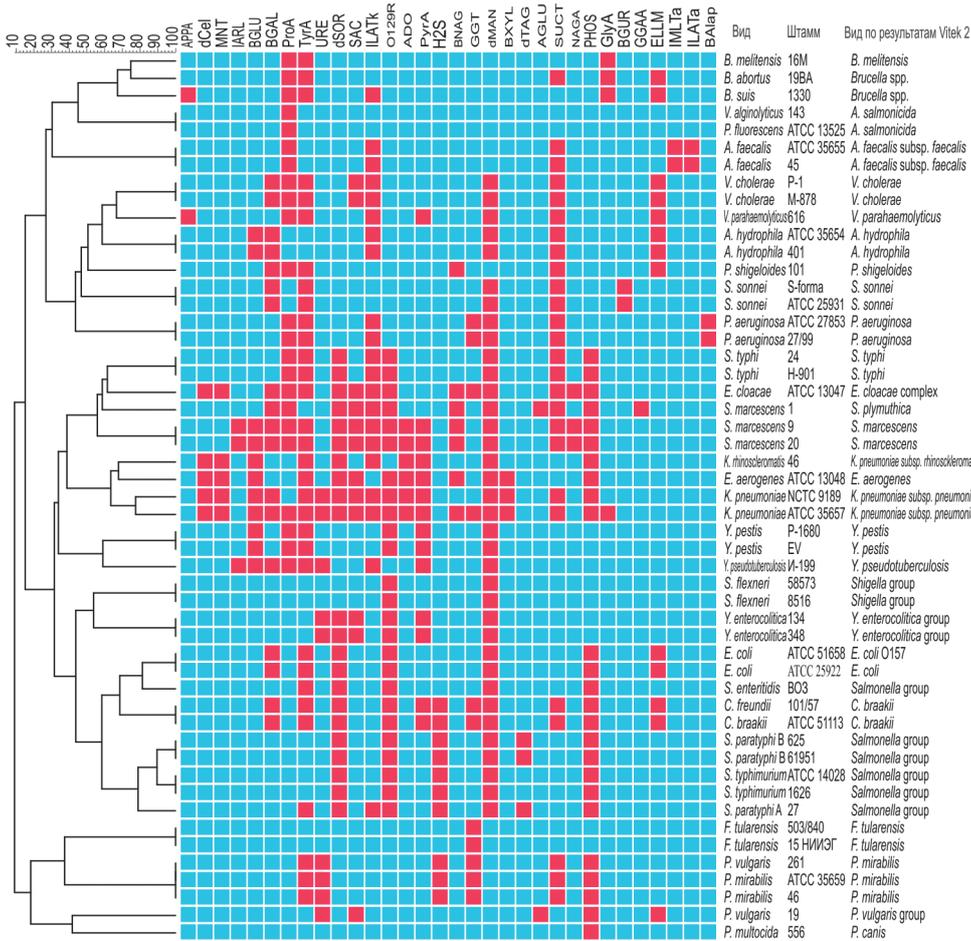


Рис. 1. Фрагмент филогенетического анализа результатов идентификации грамотрицательных микроорганизмов на анализаторе Vitek 2, проведенный в программе BioNumerics v. 7.5:

*Вид* – видовая принадлежность микроорганизма по паспортным данным; *Штамм* – номер штамма по паспортным данным; *Вид по результатам Vitek 2* – видовая принадлежность микроорганизма при автоматической идентификации его системой Vitek 2

способности изучаемых изолятов к ферментации различных дифференцирующих субстратов загрузили и проанализировали в программном пакете Bionumerics 7.5 с модулем Character Type.

На основании использования идентификационных карт GN, GP и ANC все тестируемые штаммы разделены на три группы. В первую, наибольшую из них, вошли бактерии семейства *Enterobacteriaceae*, принадлежащие к родам *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Plesiomonas*, *Escherichia*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, а также родов *Francisella*, *Alcaligenes*, *Aeromonas*, *Pseudomonas*,

*Vibrio* и *Brucella*, относящиеся к различным семействам грамотрицательных микроорганизмов.

Проведенный анализ показал, что видовая дифференциация референтных штаммов иерсиний, принадлежащих к видам *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, осуществляется по способности к ферментации арабита, β-галактозидазы, β-глюкозидазы, уреазы, сорбита, сахарозы, трегалозы, кумарата, а также тестами на орнитиндекарбок-силазу и лактат.

Биохимические свойства бактерий рода *Shigella*, анализируемые с помощью программного пакета Bionumerics v. 7.5, свидетельствуют о малой активности этих микроорганизмов. Ряд признаков характерен для представителей всего рода. Установлено, что все штаммы шигелл ферментировали трегалозу, глюкозу, маннозу, не образовывали сероводород, не гидролизировали уреазу, не утилизировали малонат и цитрат натрия, не обладали лизиндекарбоксилазной активностью. К видовым признакам *Shigella* относились: отсутствие ферментации маннита для представителей *S. dysenteriae* 16, 36, 311; штаммы *S. flexneri* 2407, 58573, 8516 обладали способностью расти в присутствии вибриостатического агента O/129R. Наиболее активными по ферментативным свойствам оказались изоляты *S. sonnei* 37, 714, S-forma, ATCC 25931. Они взаимодействовали с α-и β-галактозидазой, β-глюкуронидазой, 5-кето-d-глюконатом.

Все тестируемые штаммы *Salmonella* фер-

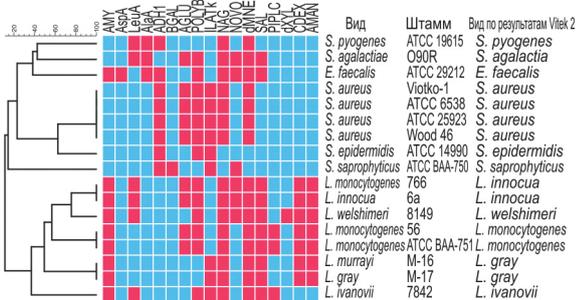


Рис. 2. Филогенетический анализ результатов идентификации грамположительных бактерий на анализаторе Vitek 2, проведенный в программе BioNumerics v. 7.5:

*Вид* – видовая принадлежность микроорганизма по паспортным данным; *Штамм* – номер штамма по паспортным данным; *Вид по результатам Vitek 2* – видовая принадлежность микроорганизма при автоматической идентификации его системой Vitek 2

ментировали глюкозу, мальтозу, сорбит, трегалозу,  $\alpha$ -галактозидазу, фосфотазу, кумарат, гидролизировали лизиндекарбоксилазу, утилизировали цитрат натрия (за исключением *S. typhi* 4a, 24, H-901) и обладали способностью роста в присутствии вибриостатического агента O/129R. Установлено, что ферментация пролинариламидазы, способность подщелачивать лактат, сукцинат являются маркерами аутентичности *S. typhi*, тогда как ферментация тагатызы – *S. paratyphi* A 27, *S. paratyphi* B 625, 61951, *S. dublin* 6.

Для референтного штамма *Plesiomonas shigelloides* 101 в качестве видоспецифических маркеров установлены его способность к ферментации  $\beta$ -галактозидазы, пролинариламидазы,  $\beta$ -ацетил-глюкозаминидазы и эллмана.

Группу изучаемых бактерий, включенных в род *Escherichia*, представляли штаммы (*E. coli* ATCC 51658, ATCC 10798, ATCC 25922, 3912/41, 675, 18, M-17) по ферментативным свойствам не отличающиеся друг от друга. В качестве маркеров их аутентичности выбраны способности к ферментации глюкозы,  $\alpha$ - и  $\beta$ -галактозидазы, фосфотазы, мальтозы, маннита, маннозы, сорбита, трегалозы и эллмана.

Используемые в качестве референтных микроорганизмы рода *Citrobacter* включают два вида *C. freundii* 101/57 и *C. braakii* ATCC 51113, к общим маркерам аутентичности которых отнесены способности к утилизации цитрата натрия, ферментации маннита, маннозы, сорбита, мальтозы, трегалозы,  $\beta$ -галактозидазы, образованию сероводорода. В то же время дифференциацию этих двух штаммов проводили по их отношению к субстратам, содержащим пирролидонариламидазу, гамма-глутамин-трансферазу, 5 кето-d-глюконат и эллман.

К используемым в научно-практической деятельности бактериям рода *Serratia* относятся штаммы *S. marcescens* 9, 20 в качестве дифференцирующих маркеров которых определены положительная реакция с арабитом,  $\beta$ -глюкозидазой, орнитин- и лизиндекарбоксилазой, адонитом,  $\beta$ -N-ацетилгалактозаминидазой, а также способность к продукции при комнатной температуре на свету красного пигмента (продигиозин).

Микроорганизмы рода *Enterobacter* представлены в исследовании двумя штаммами разных видов *E. cloacae* ATCC 13047 и *E. aerogenes* ATCC 13048. Проведенный анализ выявил, что *E. cloacae* ATCC 13047 можно дифференцировать от *E. aerogenes* ATCC 13048 по отсутствию у первого лизиндекарбоксилазной активности, а также ферментации  $\beta$ -глюкозидазы, пролинариламидазы, кумарата, адонита,  $\beta$ -ксилозидазы.

Изученные штаммы рода *Klebsiella* (*K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* ATCC 35657, 8172, NCTC 9189,1017, *rhinoscleromatis* 46) по ферментативным свойствам соответствовали общей характеристике семейства *Enterobacteriaceae*. Они ферментировали целлобиозу, малонат натрия, мальтозу, глюкозу, сорбит, маннит, маннозу, фосфотазу, адонит. Все исследуемые штаммы *K. pneumoniae* (за исключением *K. rhino-*

*scleromatis* 46) ферментировали  $\beta$ -галактозидазу,  $\beta$ -ксилозидазу, палатинозу, сахарозу, трегалозу, гидролизировали уреазу, утилизировали цитрат натрия. Особенностью *K. pneumoniae* ATCC 35657, 8172 является образование на плотных питательных средах больших слизистых колоний. В качестве дифференцирующих маркеров таких слизистых форм *K. pneumoniae* spp. *pneumoniae* относится ферментация пролинариламидазы,  $\beta$ -ацетил-глюкозаминидазы, глицин-ариламидазы, гамма-глутамин-трансферазы, в то время как не слизистые формы не обладают этими признаками (*K. pneumoniae* NCTC 9189,1017).

Дифференциация штаммов *P. vulgaris* 19 и *P. mirabilis* ATCC 35659, 46, входящих в состав рода *Proteus*, осуществлялась на основе ферментации субстратов, содержащих сахарозу,  $\alpha$ -глюкозидазу, эллман, тирозинариламидазу, трегалозу, гамма-глутамин-трансферазу.

Для микроорганизмов, не входящих в состав семейства *Enterobacteriaceae*, установлены следующие маркеры аутентичности: штаммы туляремийного микроба (*Francisella tularensis* 503/840 и 15 НИИЭГ) определялись с помощью анализатора до вида по ферментации гамма-глутамин-трансферазы; бактерии рода *Aeromonas* (*A. hydrophila* ATCC 35654, 401) – по ферментации эллмана,  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, мальтозы, маннита и способности подщелачивать лактат и сукцинат; видовая принадлежность штаммов *Alcaligenes faecalis* spp. ATCC 35655, 45 – по наличию пролинариламидазы, способности к ассимиляции и подщелачиванию лактата, сукцината и ассимиляции малата. Характерным идентификационным маркером для штаммов *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, 27/99 установлена их способность взаимодействовать с субстратами, содержащими гамма-глутамин-трансферазу,  $\beta$ -аланинариламидазу и малонат натрия.

Использованные в работе штаммы рода *Vibrio* относились к двум видам *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* (P-1, M-878, MO 45, P 16064, P 9741), не смотря на разную биоварную и серологическую принадлежность, образовывали единую группу, характеризующуюся утилизацией  $\beta$ -глюкозидазы,  $\beta$ -галактозидазы, глюкозы, сахарозы, мальтозы, маннита, пролин- и тирозинариламидазы, цитрат натрия и способностью подщелачивать лактат, сукцинат. Отличительными признаками *V. parahaemolyticus* 616 являются ферментация Ala-Phe-Pro-ариламидазы, пирролидонариламидазы и способность к ассимиляции лактата и малата. Анализ результатов Vitek 2 по взаимодействию различных дифференцирующих субстратов с бактериями рода *Brucella* выявил, что штаммы *B. melitensis* 16M, *B. abortus* 19BA, *B. suis* 1330 отличаются друг от друга на основе ферментации Ala-Phe-Pro-ариламидазы, пролинариламидазы, тирозин-ариламидазы, лактата, сукцината, глицин-ариламидазы и эллмана.

Вторую группу исследуемых штаммов составили грамположительные бактерии родов *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus* (рис. 2).

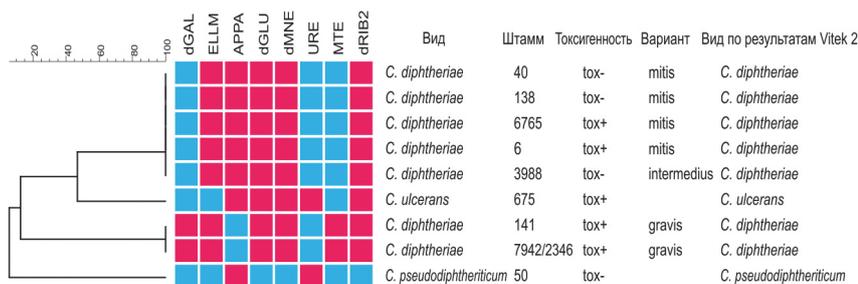


Рис. 3. Филогенетический анализ результатов идентификации штаммов рода *Corynebacterium*, проведенный в программе BioNumerics v. 7.5:

*Вид* – видовая принадлежность микроорганизма по паспортным данным; *Штамм* – номер штамма по паспортным данным; *Токсигенность* – наличие специфических линий преципитации на среде для определения токсигенности; *Вариант* – вариант штамма по паспортным данным; *Вид по результатам Vitek 2* – видовая принадлежность микроорганизма при автоматической идентификации его системой Vitek 2

Для внутривидовой дифференциации бактерий рода *Listeria* к установленным маркерам аутентичности относились: ферментация α-маннозидазы, α-глюкозидазы, циклодекстрина, ксилозы, лейцинариламидазы, фосфатидилинозит фосфолипазы С, способность к подщелачиванию лактата и устойчивость к новобиоцину; для представителей рода *Staphylococcus* – утилизация β-галактозидазы, α-глюкозидазы, устойчивость к полимиксину В и новобиоцину, способность к подщелачиванию лактата, N-ацетил-d-глюкозамина; для *Streptococcus* – ферментация лейцинариламидазы, аланинариламидазы, α-глюкозидазы, салицина, N-ацетил-d-глюкозамина, устойчивость к полимиксину В и новобиоцину; *Enterococcus* – ферментация аспаргатамидазы и лейцинариламидазы.

В последнюю группу изучаемых штаммов вошли представители рода *Corynebacterium*, идентификация которых вследствие ряда морфологических и биохимических особенностей нередко затруднительна [7]. Для получения достоверных сведений о характеристике вида необходимо использование наиболее информативных биохимических тестов с применением карт Vitek 2 ANC (рис. 3). В ходе анализа установлено пять маркеров (d-галактоза, ala-phe-pro-ариламидаза, уреазы, мальтотриоза, d-рибоза 2), по ферментации которых можно с 99 % точностью определить вид. Таксономически близкими виду *C. diphtheriae* является *C. ulcerans* и *C. pseudodiphthericum*, дифференциация которых проводится на основе применения тестов с Ala-Phe-Pro-ариламидазой, уреазой, d-рибозой 2. При этом штамм *C. diphtheria* ser. *intermedius* по биохимическим свойствам не отличается от *C. diphtheria* ser. *mitis*, что соответствует классификации и требует дополнительных серологических методов анализа.

Таким образом, с помощью автоматического микробиологического анализатора Vitek 2 Bio-Mérieux проведено подтверждение аутентичности 103 референтных штаммов патогенных микроорганизмов из ГКПБ ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Установлено, что семь из них (6,8 %) не соответствовали своим паспортным данным и не могут использоваться в научно-практической деятельности, вследствие чего их заменили на подтвержденные аналоги. Анализ результатов по взаимодействию изучаемых штаммов с дифференцирующими субстратами позволил определить для каждого из них маркеры аутентичности, необходимые для контроля подлинности коллекционной культуры при ее воспроизводстве и хранении. На основе полученных данных обновлены паспорта изученных референтных штаммов.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белова Л.Н., Мошенцева В.Н. Биологические коллекции Российской Федерации. В кн.: Микробные биотехнологии: фундаментальные и прикладные аспекты. 2013. Т. 5. С. 10–8.
2. Биргер М.О. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования. М.: Медицина; 1982. 464 с.
3. Голубева И.В., Килессо В.А., Киселёва Б.С. Энтеробактерии. М.: Медицина; 1985. 321 с.
4. Лабинская А.С., Блинкова Л.П., Ещина А.С. Общая и санитарная микробиология с техникой микробиологических исследований. М.: Медицина; 2004. 576 с.
5. Леванова Г.Ф., Ефимов Е.И. Фенотаксономия и геносистематика локтобацилл. Н.Новгород: Изд. Ю.А.Николаев; 2009. 248 с.
6. Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Volume Three. The Firmicutes. 2009. P. 244–57. DOI: 10.1007/978-0-387-68489-5.
7. Efstratiou A., Glorge R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Commun. Dis. Public Health*. 1999; 2(4):250–7.
8. Guidance for the operation of biological research Centers (BRC.) OECD. 2004. Part 1. P. 1–16.
9. Smith D. Culture Collections. *Microbiology*. 2012; 79:73–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
10. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G., Grimont P., Mouden M., Rossello-Mora R., Swings J., Ward A., Whitman B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52(Pt 3):1043–7. DOI: 10.1099/00207713-52-3-1043.

#### References

1. Belova L.N., Moshentseva V.N. [Biological collections of the Russian Federation]. In: [Microbial Biotechnologies: Fundamental and Applied Aspects]. 2013. Vol. 5. P. 10–8.
2. Birger M.O. [Reference Book on Microbiological and Virological Methods of Investigation]. M.: "Meditsina"; 1982. 464 p.
3. Golubeva I.V., Kileso V.A., Kiseleva B.S. [Enterobacteria]. M.: "Meditsina"; 1985, 321 p.
4. Labinskaya A.S., Blinkova L.P., Eshchina A.S. [General and Sanitary Microbiology with Microbiological Study Technique]. M.: "Meditsina"; 2004, 576 p.
5. Levanova G.F., Efimov E.I. [Pheno-Taxonomy and Genosystematics of Lactobacillus]. N. Novgorod: Yu.A.Nikolaev Publishing House; 2009. 248 p.
7. Efstratiou A., Glorge R.C. Laboratory guidelines for the diagnosis of infections caused by *Corynebacterium diphtheriae* and *C. ulcerans*. *Commun. Dis. Public Health*. 1999; 2(4):250–7.
8. Guidance for the operation of biological research Centers (BRC.) OECD. 2004. Part 1. P. 1–16.
9. Smith David. Culture Collections. *Microbiology*. 2012; 79:73–118. DOI: 10.1016/B978-0-12-394318-7.00004-8.
10. Stackebrandt E., Frederiksen W., Garrity G., Grimont P., Mouden M., Rossello-Mora R., Swings J., Ward A., Whitman B. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52(Pt 3):1043–7. DOI: 10.1099/00207713-52-3-1043.

#### Authors:

Chervyakova N.S., Osin A.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

#### Об авторах:

Червякова Н.С., Осин А.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Поступила 04.04.16.