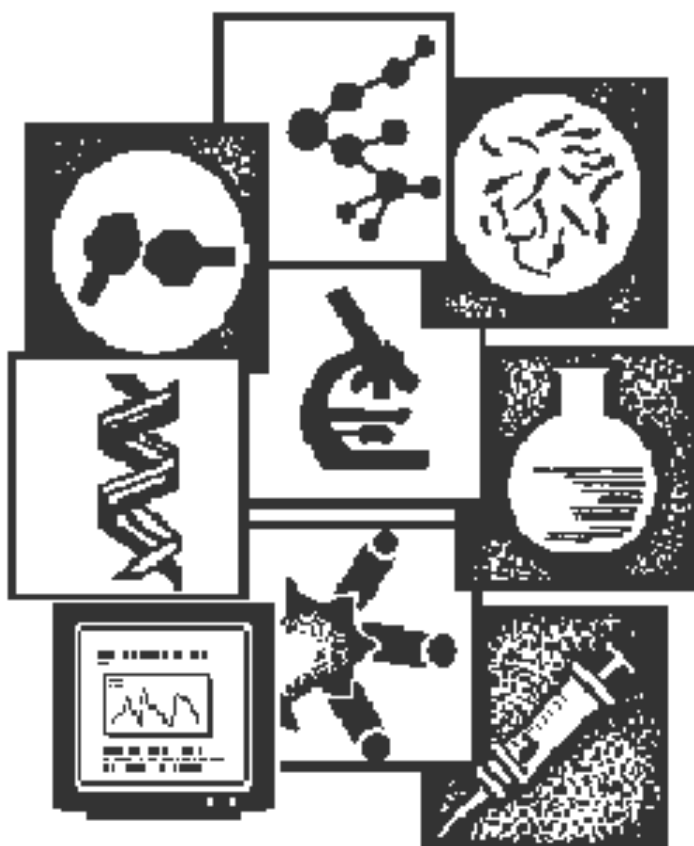




**ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА**

**ХОЛЕРА И
ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ
ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ**

**МАТЕРИАЛЫ
ПРОБЛЕМНОЙ
КОМИССИИ
(48.04)**



ВЫПУСК № 28

**РОСТОВ-НА-ДОНУ
2015 г.**

Редакционная коллегия: Титова С.В. (ответственный редактор), Кругликов В.Д., Марковская Е.И. (ответственный секретарь), Щипелева И.А., Алексеева Л.П., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Монахова Е.В., Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Черепихина И.Я., Веркина Л.М., Селянская Н.А., Смоликова Л.М., Гаевская Н.Е., Часовских С.В., Сухостат Е.В., Талалаева З.С., Емцова Л.И.

X71 Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2015, Вып. 28. с. 220.

ISBN 978-5-98615-143-4

Сборник посвящён актуальным вопросам изучения холеры: эпидемиология, микробиология, молекулярная биология, генетика, лабораторная диагностика.

Представленные в сборнике результаты научных исследований имеют несомненный научный интерес и окажут помощь в работе специалистов практических учреждений Роспотребнадзора и Росздравнадзора.

Опубликованные в сборнике материалы могут отражать позицию авторов, не всегда совпадающую с точкой зрения специалистов ведущего по проблеме «Холера» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

ISBN 978-5-98615-143-4

© ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ХОЛЕРЫ И ПРОГНОЗ ПО РЕГИОНАМ.....	10
СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ.....	10
С.В. Титова, Э.А. Москвитина, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов	
О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ	17
С.В. Титова ¹ , В.Д. Кругликов ¹ , Э.А. Москвитина ¹ , А.Б. Мазрухо ¹ , А.С. Водопьянов ¹ , С.О. Водопьянов ¹ , Л.П. Алексеева ¹ , В.Е. Безсмертный ² , С.М. Иванова ² , Е.И. Марковская ¹ , Н.Л. Пичурина ¹ , С.Ю. Водяницкая ¹ , А.Л. Трухачев ¹	
ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА КАК РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....	22
С.В. Титова, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина, И.В. Архангельская, М.И. Ежова, Д.А. Зубкова, А.Б. Мазрухо, Н.Л. Пичурина	
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ РАССЛЕДОВАНИЕ ПРИ КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ O1 И O139 СЕРОГРУПП СТХАВ⁺ТСРА⁺	26
Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов	
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2014 Г.....	31
М.И. Ежова, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, Д.А. Зубкова, Р.В. Писанов	
ИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУР ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ИЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 1989 ПО 2014 ГГ.....	34
Д.А. Зубкова, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, М.И. Ежова, Н.Б. Непомнящая, С.В. Титова	
АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОНИТОРИНГА ВИБРИОФЛОРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ.....	37
С.В. Балахонов ¹ , Л.В. Миронова ¹ , Ж.Ю. Хунхеева ¹ , Л.Я. Урбанович ¹ , Е.А. Басов ¹ , Э.Г. Гольдапель ¹ , Е.С. Куликалова ¹ , А.С. Пономарева ¹ , С.К. Миткеева ¹ , В.С. Ганин ¹ , Г.И. Кобанова ²	
ОБ УСИЛЕНИИ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ОТ ЗАНОСА И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ ХОЛЕРЫ, И ОСНОВНЫХ ЗАДАЧАХ НА 2015 ГОД	45
М.Ю. Соловьев, Е.В. Ковалев, С.А. Ненадская, С.С. Слись, Н.В. Леоненко, Г.А. Мирошниченко, Л.В. Лемешева	
ОБ ЭПИДМОНИТОРИНГЕ ХОЛЕРЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОМ ФБУЗ «ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ» И ЕГО ФИЛИАЛАМИ.....	50
Г.Т. Айдинов, М.М. Швагер, А.В. Полонский, Н.В. Половинка, А.Ю. Гончаров	

ПРОБЛЕМА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИБРИОФЛОРЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЮДЕЙ И В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ.....	53
Г.В. Гальцева, Л.В. Пономарёва, О.А. Христенко, О.П. Малай	
К ВОПРОСУ О ПОЛОЖЕНИИ ХОЛЕРЫ В СИСТЕМАТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ	56
Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, Л.В. Миронова, С.В. Балахонов	
МНОГОСТУПЕНЧАТАЯ ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ПОДГОТОВКА ЧЛЕНОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ БРИГАД К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ	60
А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков, Д.И. Каминский, Н.Л. Пичурина, И.Я. Черепахина, С.А. Иванов	
К ВОПРОСУ ОБ ОПТИМИЗАЦИИ СБОРА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА ПРИ ХОЛЕРЕ	64
Н.Л. Пичурина, Е.И. Марковская, Т.В. Кирина	
МИКРОБИОЛОГИЯ	67
ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ОТ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2014 ГОДУ	67
С.М. Иванова ¹ , Г.В. Титов ¹ , В.Е. Безсмертный ¹ , С.В. Титова ² , В.Д. Кругликов ² , Э.А. Москвитина ² , И.В. Архангельская ² , М.И. Ежова ² , Т.А. Кудрякова ² , Д.А. Зубкова ² , С.О. Водопьянов ² , А.С. Водопьянов ²	
О СВОЙСТВАХ КУЛЬТУР ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМОВ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ В ПЕРИОД С 2012-2014ГГ.....	71
К.Б. Яшкулов, Т.Б. Каляева, Н.Ф. Оброткина, В.Д. Тюнникова, Б.В. Дандаева	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЁНОК, ОБРАЗОВАННЫХ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ ЭЛЬ ТОР	75
Н.А. Селянская, С.В. Титова, Л.М. Веркина, Л.К. Лысова, А.В. Тришина	
ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	78
Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина, О.П. Фецайлова	
ДИНАМИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ О1/ НЕ О139 СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	81
Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, И.В. Архангельская, Е.А. Березняк, Н.Г. Железняк	
ПРИОБРЕТЕНИЕ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМИ ВИБРИОНАМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ УМЕРЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ.....	84
Т.А. Кудрякова, Н.Е. Гаевская, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина, Л.В. Романова, С.Ю. Лупилина	
РЕКЛАССИФИКАЦИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АЭРОМОНАД И ФОСФОРЕСЦИРУЮЩИХ ВИБРИОНОВ.....	88
О.С. Чемисова, Л.М. Смоликова, О.А. Рыковская, Е.М. Санамянц, М.М. Сагакянц, Р.Р. Даликова, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая	
МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ.....	92

А.В. Тришина, Е.А. Березняк, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева	
ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К ФАЗОВЫМ ПЕРЕХОДАМ S-ВАРИАНТОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>	96
О.В. Маркина, А.И. Шелохович, Е.Ю. Люкшина, А.Н.Терентьев, А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К ФАГОЦИТОЗУ РУГОЗНЫХ И ГЛАДКИХ ВАРИАНТОВ ШТАММА <i>VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR P-18895</i>	99
О.В. Маркина, А.И. Шелохович, Е.Ю. Люкшина, А.Н. Терентьев	
ОБ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛ-В-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА	102
О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин	
СТАБИЛЬНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ	104
М.В. Овчинникова, М.Н. Исляева, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова	
ЗИМОГРАФИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗ И ХИТИНАЗ У <i>VIBRIO CHOLERAЕ O1</i> И <i>O139</i> СЕРОГРУПП	107
С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев, Л.Я. Урбанович, Т.А. Иванова, О.И. Витязева	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА	110
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2013-2014 ГОДАХ	110
А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова	
ПОТЕНЦИАЛЬНО ЭПИДЕМИЧЕСКИ ОПАСНЫЕ ШТАММЫ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА: МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И СТРУКТУРА ГЕНОМА	113
Т.А. Кульшань, Е.Ю. Баранихина, Д.А. Агафонов, Я.М. Краснов, Н.И. Смирнова	
РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ВНУТРИВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	116
С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Л.К. Лысова, С.В. Титова	
К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТИ АНТИЛАКТОФЕРРИНОВОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	120
В.А. Коршенко, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Е.В. Монахова, И.Я. Черепахина	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ <i>O1</i>/НЕ <i>O139</i> СЕРОГРУПП РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	124
И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая	
ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПРОФАГА СТХ, ИНТЕГРИРОВАННОГО В ГЕНОМ ШТАММА <i>VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/NON O139</i>	129
Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.В. Титова	
МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/ NON O139</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ И АКВАТОРИИ ПОРТОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	134
С.Ю. Водяницкая ¹ , И. Б. Захарова ² , М.В. Подшивалова ² , В.Д. Кругликов ¹ , И.В. Архангельская ¹ , Д.В. Викторов ²	134

СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ И БЕЛКОВ CEF (CHO CELL ELONGATION FACTOR) ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	139
Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, И.В. Архангельская	
КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НА МОДЕЛИ АТОКСИГЕННОГО ГЕНОВАРИАНТА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>	144
Е.Ю. Щелканова, Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова	
ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР У АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В 1942-1943 ГГ.....	147
Н.Б. Челдышова, А.А. Крицкий, И.В. Тучков	
ИЗУЧЕНИЕ МЕЖГЕННОЙ ОБЛАСТИ ZOT– СТХАВ (P_{СТХАВ}) У ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР.....	150
Е.И. Подопригора, И.В. Савельева, А.Д. Ковалев, В.Н. Савельев, А.Н. Куличенко	
МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (MOONLIGHTING PROTEINS) ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ: АЛЬФА- ЕНОЛАЗА	154
Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова. А.С. Водопьянов, Л.В. Романова	
ИММУНОЛОГИЯ	159
ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА.....	159
А.Л. Галичева, Н.Д. Омельченко, А.В. Филиппенко, Н.И. Пасюкова, И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова, Л.В. Романова, Е.С. Шипко, И.А. Беспалова, Е.П. Дорошенко	
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО ФОРМАЛЬДЕГИДА В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ	162
О.В. Громова, А.В. Гаева, В.И. Павлова, М.Н. Киреев, О.Д. Клокова, О.А. Волох, О.А. Лобовикова.....	
ДИАГНОСТИКА	164
МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ИММУНОРЕАКТИВНЫМ АНТИГЕНАМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ EL TOR И O139.....	164
В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, О.С. Бурша, И.В. Архангельская, М.Э. Яговкин	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОЙ СЕЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СРЕДЫ СЭДХ-М ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ИЗ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД	168
О.С. Чемисова, Г.Д. Харабаджахан, О.А. Рыковская, А.Б. Мазрухо, И.К. Савельева, М.М. Сагакянц	
ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ	171
РАБОТА ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2014 – 2015 ГГ.	171
С.В. Титова, В.Д. Кругликов, И.А. Щипелева, Е.И. Марковская	
АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР ЗАВЕРШАЕМЫХ В 2015 ГОДУ НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА	178
И.А. Щипелева, С.В. Титова, Л.П. Алексеева, В.Д. Кругликов, Е.И. Марковская, Р.Н. Иванова	

ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ КООРДИНАЦИОННОГО НАУЧНОГО СОВЕТА ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2015 ГОДУ	184
Е.И. Марковская, И.А. Щипелева, С.В. Титова, В.Д. Кругликов, Л.П. Алексеева	
ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»	187
Э.А. Москвитина, Т.В. Ковалева, Г.Б. Анисимова, И.А. Андрусенко, Ю.И. Арутюнов, Л.Г. Худобец-Шереминская	
РЕФЕРАТЫ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ОТЧЕТОВ ПО НИР	192
СОЗДАНИЕ ГИС «РАСПРОСТРАНЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 1989- 2014 ГГ.».....	192
В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова, И.В. Архангельская, О.А. Подойнищина, Н.Б. Непомнящая, О.С. Чемисова, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина, Л.Д. Македонова, Н.Е. Гаевская, С.В. Часовских, И.Т. Аверьянова, Н.В. Дроботковская, М.О. Коломыйченко	
МОНИТОРИНГ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД МЕЖДУНАРОДНОГО МОРСКОГО ТРАНСПОРТА В БАССЕЙНЕ АЗОВСКОГО МОРЯ.....	193
С.Ю. Водяницкая, О.В. Лях, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.С. Чемисова	
ВЛИЯНИЕ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА СВОЙСТВА, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ПЕРСИСТЕНЦИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	194
И.Я. Черепихина, Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, В.В. Евдокимова, В.А. Коршенко, О.П. Фецайлова, О.И. Помухина, В.В. Балахнова, Е.В. Кушнарева	
ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ	195
О.С. Чемисова, Л.М. Смоликова, О.А. Рыковская, Е.В. Монахова, Е.М. Санамянц, О.А. Подойнищина, Н.Б. Непомнящая, Р.Р. Даликова, М.М. Сагакянц.....	
ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ СВОЙСТВ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ ПРИ ТРАНСДУКЦИИ	196
Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Н.Е. Гаевская, Г.В. Качкина, Л.В. Романова	
ПРИРОДНАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ О1/НЕ О139 СЕРОГРУПП, ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ.....	197
Л.М. Веркина, Н.А. Селянская	
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ.....	198
Л.В. Ларионова ¹ , Д.И. Симакова ¹ , Е.Ю. Люкшина ¹ , А.Н. Наркевич ¹ , А.П. Кочеткова ¹ , И.В. Навицкая ² , В.Г. Пушкарь ² , М.Я. Кулаков ²	
АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И УЧЕБНЫХ ПОСОБИЙ.....	200
УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ.....	200
А.Ю. Попова, И.В. Брагина, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков, С.В. Балахонов, Л.Я. Урбанович, В.С. Ганин, Л.В. Миронова, Т.Ю. Загоскина, О.А. Носкова, Е.С. Куликалова, Е.А. Басов, М.В. Афанасьев, Л.Е. Токарева, Т.С. Тайкова, Т.М. Долгова	

КАТАЛОГ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ (ВЫПУСК 6).....	201
О. С. Чемисова, Л. М. Смоликова, О. А. Рыковская, Е. М. Санамянц, Р. Р. Даликова, М. М. Сагакянц, Л. И. Денисенко, Е. В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, А. В. Картамышева	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОТБОР И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБ БАЛЛАСТНЫХ ВОД МОРСКИХ (РЕЧНЫХ) СУДОВ, ВЫПОЛНЯЮЩИХ МЕЖДУНАРОДНЫЕ РЕЙСЫ»	202
С.Ю. Водяницкая, О.В. Лях, Ю.В. Рыжков, В.Д. Кругликов, И.С. Шестиалтынова, И.В. Архангельская, М.И. Ежова	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ ДЛЯ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ОБЪЕКТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ».....	203
С. В. Титова, Л. М. Веркина, Е.А. Березняк, А.В. Тришина, И.Р. Симонова, Н. В. Павлович, М. В. Цимбалистова, Н. К. Тынкевич, Н. С. Ерёменко, С. Н. Головин	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ ХОЛЕРЫ И ДРУГИХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ».....	204
Н.А. Селянская, Л.М. Веркина	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «МЕТОДИКИ СОЗДАНИЯ УСЛОВИЙ СТРЕССА ДЛЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПЕРСИСТЕНТНОГО ПОТЕНЦИАЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ».....	205
Ю.В. Сизова, В.А. Коршенко, О.С. Бурлакова, В.В. Балахнова, О.П. Фецайлова, О.И. Помухина, И.Я. Черепахина, А.В. Гавринева	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «АЛГОРИТМ СОЗДАНИЯ ГЕОИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ (НА ПРИМЕРЕ Г. ИРКУТСКА)»	206
Е.С. Куликалова, Л.В.Миронова, Л.Я. Урбанович, Н.В. Яковчиц	
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА»	206
С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев, Л.Я. Урбанович, Т.Ю. Загоскина	
АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ В 2014 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА».....	208
РАЗРАБОТАННЫЕ ПРОГРАММЫ И БАЗЫ ДАННЫХ	209
БАЗА ДАННЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА «<i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O1 И O139. ИРКУТСК».....	209
Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, Л.В.Миронова, С.В. Балахонов, Н.В. Яковчиц	
БАЗА ДАННЫХ «ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO ALGINOLYTICUS</i>».....	210
О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, Л.М. Смоликова, Е.В. Монахова	
SEQANALYZER — ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>.....	210
А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов, И.П. Олейников, К.В. Кулешов, А.В. Керманов, К.В. Олейникова	

ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ	
ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ (БД)	212
ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ НУКЛЕОТИДНЫХ	
ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В МЕЖДУНАРОДНОЙ БАЗЕ ДАННЫХ GENBANK	214
СОСТАВ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ	218

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ХОЛЕРЫ И ПРОГНОЗ ПО РЕГИОНАМ

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ

С.В. Титова, Э.А. Москвитина, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов,
А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Холера продолжает оставаться приоритетной проблемой мирового здравоохранения в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде интенсивных и масштабных эпидемий и вспышек на различных континентах мира. Это определяет необходимость постоянного мониторинга холеры как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора на глобальном и территориальных уровнях. В Международных медико-санитарных правилах (2005 г.) подчеркивается важность обмена информацией, который способствует эффективному предотвращению и сдерживанию эпидемий. Не менее важным является использование при этом информационных технологий, основой которых являются базы данных и ГИС (геоинформационные системы), создаваемые с целью адекватного отражения и визуализации событий, анализа, оценки масштабов, характера распространения инфекции во времени и пространстве, прогноза.

С использованием сведений проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире» с 2001 по 2014 год, по официальным данным ВОЗ, зарегистрировано 2 915 454 больных холерой.

В структуре мировой заболеваемости за указанный период наибольший удельный вес больных холерой приходится на Африканский континент – 69,03 % , на Американском континенте он составил 25,9 % , в странах Азии – 4,66 % , Европы – 0,01 % . Максимальные показатели летальности в мире – 3,2 % (2008 г.), в странах Америки (страны Карибского бассейна) – 2,2 % (2010 г.), Африки – 3,2 % (2008 г.), Азии – 0,95 % (2009 г.). В динамике заболеваемости сохранилась тенденция роста в 2014 г. по линейной и степенной линиям трендов относительно 2001 г. с прогнозируемым ростом. Исходя из понятия «глобализация распространения инфекционных болезней» [5], мы можем констатировать глобальное распространение холеры при наличии различных по характеру чрезвычайных ситуаций,

способствующих активизации эпидемических проявлений.

К числу основных из них относятся:

1) Продолжающееся пандемическое, поступательное распространение инфекции по континентам и странам за счет импорта инфекции. Число заносов за указанный период составило 1970 с преобладанием их в странах Азии – 1310 (66,5 %) за счет межрегиональной и межгосударственной миграции населения.

2) Чрезвычайные ситуации различного происхождения: природного и социального характера, терроризм, в том числе биологический; военные ЧС и, как следствие, миграция населения, проживание в лагерях беженцев, переселенцев, в основном с неудовлетворительными санитарно-гигиеническими условиями (Африка).

3) Природные условия. По мнению исследователей, занимающихся проблемой холеры, глобальное потепление может создать благоприятную среду для возбудителя в водных объектах и повышение уровня заболеваемости холерой в эндемичных местностях.

4) Социальные условия: наличие постоянных рисков – неудовлетворительное состояние водоснабжения, канализования, урбанизация, высокая плотность населения и временных рисков – миграция (хадж, туризм и др.). Факторами, способствующими активизации эпидпроявлений холеры, являются традиции и обычаи населения.

5) Наличие стойких эндемичных очагов холеры в Азии, Африке и странах Карибского бассейна – одна из основных прогностически неблагоприятных тенденций в развитии седьмой пандемии.

По мнению экспертов ВОЗ, «Динамика заболеваемости холерой, начиная с 2005 года, в сочетании с появлением новых штаммов, приводящих к заболеванию с более тяжелым клиническим течением и обладающих повышенным уровнем антибиотикорезистентности, и с изменением климата выводят холеру на центральное место в повестке дня проблем глобального здравоохранения». К этому следует добавить: особенностью, определяющей тенденцию в динамике заболеваемости холерой в мире в последнее десятилетие, является вовлечение впервые в эпидемический процесс стран Карибского бассейна: Гаити, Доминиканской Республики, Кубы и других.

Следует отметить, что эпидемии и вспышки холеры на различных континентах мира в период седьмой пандемии обусловлены *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139. Появление в современный период новых геновариантов *V. cholerae* O1 El Tor, содержащих в составе профага СТХφ аллелей гена субъединицы В холерного токсина классического типа (ctxВ1 или ctxВ7), рассматривается как довольно быстрая эволюция генома возбудителя холеры Эль-Тор относительно начала седьмой пандемии. Отмечено распространение таких штаммов по континентам мира [2,3,6-8]. К настоящему времени зарубежными и отечественными исследователями установлено, что вспышки или заносы холеры, обусловленные измененными

геновариантами *V.cholerae* Эль Тор, имели место с 1991 г. в странах Азии, Африки, Америки и Европы [3,9]. Широкомасштабная эпидемия холеры в регионе Карибского бассейна, в Гаити, возникшая на фоне чрезвычайных ситуаций природного и социального характера и обусловленная *V. cholerae* Эль Тор с геном *ctxB* классического типа [5,7], свидетельствует, на наш взгляд, о начале нового периода в развитии седьмой пандемии холеры.

С использованием информационного фонда проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ. Россия» за анализируемый период выявлена (2001-2014 гг.) тенденция к снижению заболеваемости (темп –32,1561%). За указанный период холера завозного происхождения в виде вспышек или спорадических случаев отмечена в Казахстане в 2001, 2005 и 2008 гг., а также на Украине в 2007 и 2011 г. При вспышке холеры на Украине, в Донецкой области в 2011 г., по данным государственной санитарно-эпидемиологической службы Украины, с 29.05 по 09.09.2011 г. было зарегистрировано 33 больных и 24 вибрионосителя с выделением из клинического материала *V. cholerae* Эль Тор серовара Огава, содержащих гены *ctxAB* и структурной единицы токсин-корегулируемых пилей адгезии – основного фактора колонизации (*tcrA*). Завозы холеры на фоне изоляции в указанных и других странах СНГ атоксигенных гемолизположительных холерных вибрионов O1 из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды позволяют в целом оценить эпидобстановку как неустойчивую. Прогноз остается неблагоприятным в плане возможного импорта инфекции и заносов холерных вибрионов с водой рек из сопредельных, неблагополучных по холере стран (Таджикистан).

В России сохраняется тенденция снижения заболеваемости в 2014 г. (относительно 2001 г.) с темпом –27,956. Наличие более 300 международных пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации, различные виды и объемы миграции населения определяют существование реальной угрозы заноса холеры всеми видами международного транспорта на любую административную территорию независимо от типа по эпидемическим проявлениям холеры. Подтверждением этому является вспышка холеры в Республике Татарстан в 2001 г., завозы холеры с выделением от больных холерных вибрионов O1 биовара Эль Тор серовара Огава с генами *ctxA* и *tcrA* в Башкортостан (2004 г.), в Мурманскую область (2006 г.) и в Москву (2010, 2012, 2014 гг.) из Индии; в Тверскую область и в Москву (2005 г.) из Таджикистана. Особенностью этого периода является завоз холеры, обусловленной атоксигенными холерными вибрионами O1 биовара Эль Тор, серовара Огава в Ростовскую область (2005 г.) из Таджикистана с локальной вспышкой (два больных холерой и 30 вибрионосителей) и реализацией водного пути передачи возбудителя инфекции. Установлено, что холерные вибрионы, обусловившие вспышку, содержат детерминанты ряда

дополнительных факторов патогенности. В частности, в их геноме обнаружен остров патогенности VPI с геном *tcpA*, кластеры генов контакт-зависимых систем секреции – третьего типа (T3SS) [1], играющей существенную роль в патогенезе [10], и шестого типа (T6SS); способность к экспрессии последней показана нами на модели *Dictyostelium discoideum* [1].

В результате мониторинга контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды в 32 субъектах Российской Федерации с 2001 по 2014 г. было выделено 909 штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^-$, $ctxA^-tcpA^+$ и *V. cholerae* O139 $ctxAB^-tcpA^-$, а также 12 штаммов Эль Тор $ctxA^+tcpA^+$ (Татарстан, 2001 г.; Санкт-Петербург, 2005 г.; Ростовская область, 2000, 2001, 2003, 2011, 2014 гг.). Штаммы *V. cholerae* O139 $ctxAB^-tcpA^-$ были изолированы в Хабаровском крае (2003 г.), Москве (2001-2002, 2005-2006, 2008 гг.), Иркутской (2006 г.), Челябинской (2010, 2012 гг.) областях. Сезон обнаружения – с мая (Москва, 2005 г.; Ростовская область, 2006 г.) по сентябрь.

Анализ данных о выделенных штаммах с учетом типов административных территорий (на уровне субъектов) по эпидемическим проявлениям холеры показал, что наибольший удельный вес холерных вибрионов O1 приходится на территории II типа – 50,6 %, на территориях I типа он составил 14,2 %, III типа подтип А – 23,7 % и III типа подтип Б – 11,5 % (рис.1).

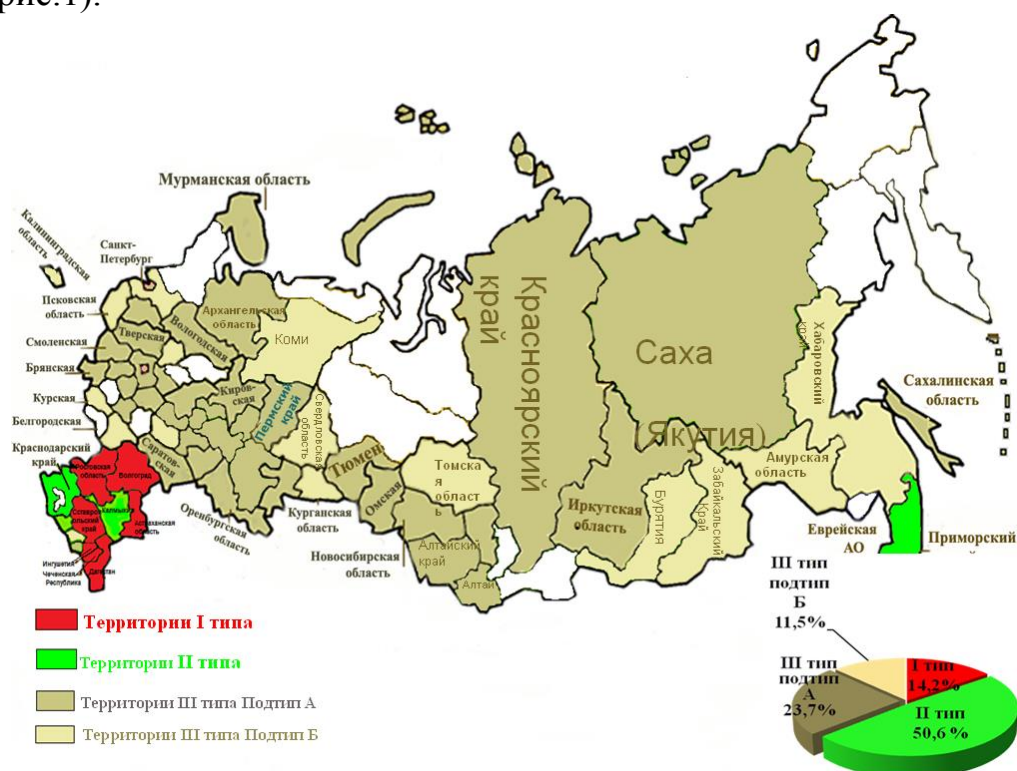


Рисунок 1. Удельный вес холерных вибрионов O1, выделенных в субъектах Российской Федерации, различных по типам эпидемических проявлений холеры (2001-2014 гг.).

В настоящее время в практику углубленного анализа штаммов *V.cholerae* внедряется полногеномное секвенирование, которое проводится в Ростовском, Иркутском и Российском противочумных институтах, а также в ЦНИИ эпидемиологии, имеется и опыт сотрудничества между ними. Специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института создана база данных «Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование» (Свидетельство о государственной регистрации № 2014620308) и разработан алгоритм для сравнения данных по генам. На рисунке 2 показана построенная с его помощью дендрограмма, отражающая родство $ctxAB^+tcpA^+$ штаммов, выделенных в России с 2001 по 2014 гг. (обозначены синим цветом), с выделенными в других регионах мира (их сиквенсы найдены в базах GenBank). На ней можно проследить генетическую неоднородность холерных вибрионов, занесенных в Россию. Большинство их имеют сходство с вибрионами из Южной Азии – Индии, Бангладеш, Непала, причем российские штаммы группируются с разными азиатскими. Особый интерес представляет тот факт, что три из пяти клинических штаммов, выделенных в Москве, попадают в один кластер с возбудителем, вызвавшим эпидемию на Гаити. Большинство штаммов являются геновариантами, содержащими «гибридные» профаги СТХ с геном *rstR* типа Эль Тор и *ctxB* классического типа (В1 либо В7) и имеющими еще целый ряд особенностей структуры генома [3,6]; принято считать, что они обладают повышенным эпидемическим потенциалом [3,9]. Приведенные данные указывают на занос на территорию России токсигенных эпидемически опасных штаммов из активных очагов, находящихся в разных странах. Используемый нами алгоритм позволяет определять их происхождение с достаточно высокой степенью вероятности. Применение молекулярно-биологических и информационных технологий при проведении мониторинга холеры открывает новые перспективы в определении источников заноса возбудителей и путей его распространения.

Вместе с тем, существует проблема оперативного анализа большого объема данных полногеномного секвенирования. Для решения этой проблемы в Ростовском-на-Дону противочумном институте разработана программа SeqAnalyzer, позволяющая проводить быстрый анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae*, что позволяет определять вид, серогруппу, биовар анализируемого штамма, а также ряд мобильных генетических элементов и островков. Важной особенностью является возможность определения кратности вариабельных тандемных повторов, что имеет существенное значение для эпидемиологического анализа. Программа и методические рекомендации по ее использованию находятся на официальном интернет-сайте института (<http://antiplague.ru/seqanalyzer/>).

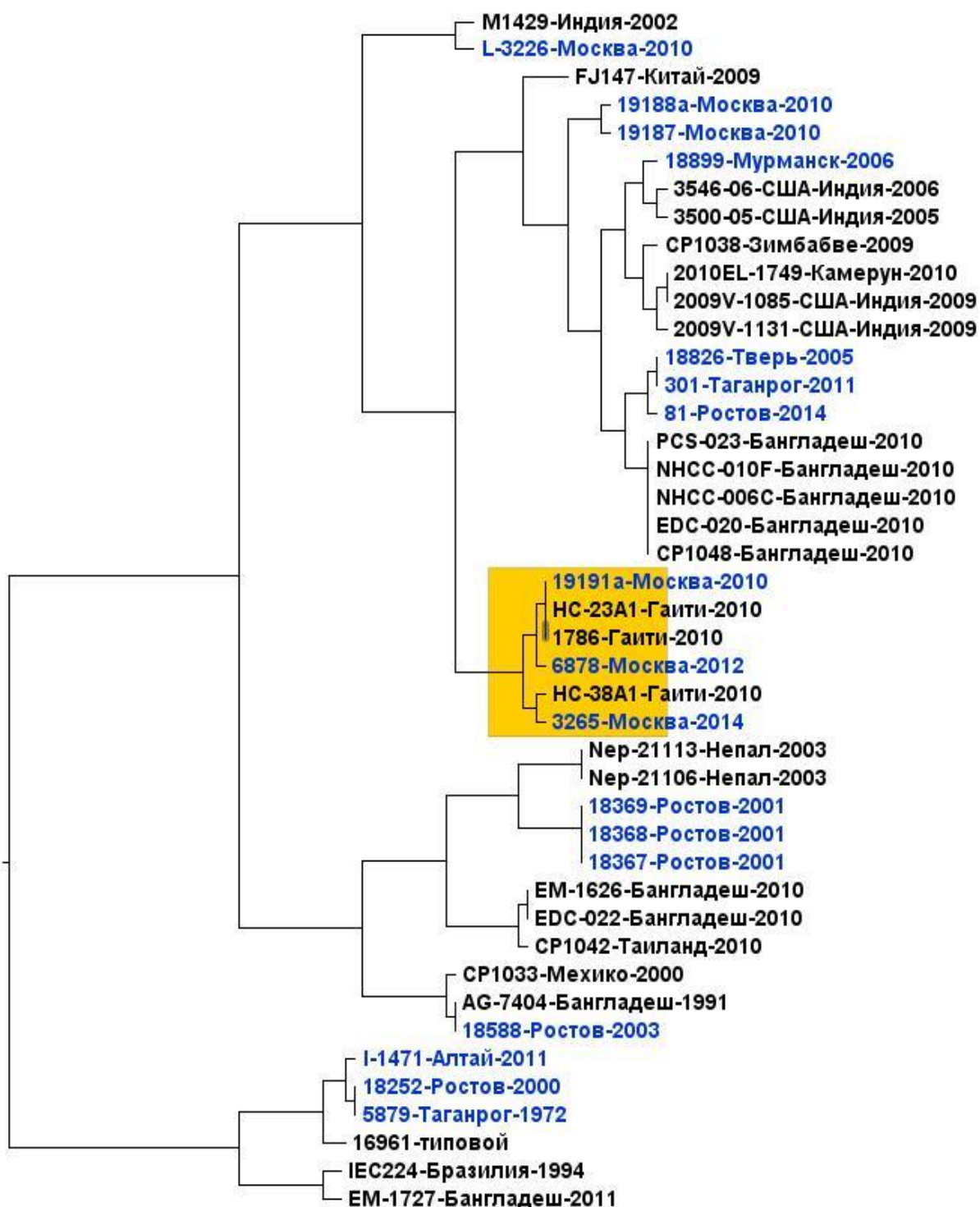


Рисунок 2. Дендрограмма распределения CTX⁺ штаммов *V.cholerae* 2001-2014 годов выделения по анализу результатов полногеномных сиквенгов на основе единичных нуклеотидных замен в 985 генах.

Прогноз по холере в мире на 2015 г. с учетом изложенного остается неблагоприятным, что, в свою очередь, обуславливает возможность заноса инфекции в Россию [2]. В связи с этим особую актуальность приобретает дальнейшее совершенствование мониторинговых исследований, проводимых в плане эпидемиологического надзора за холерой.

Литература

1. Монахова Е.В., Божко Н.В. Изучение экспрессии контакт-зависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2010. – № 4. – С.89-92.
2. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. и др. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005–2014 гг., прогноз на 2015 г. // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – Вып.1. – С. 18-25.
3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2011. – №3. – С.11-18.
4. Черкасский Б.Л. Глобальная эпидемиология. М.: Практическая медицина; 2008. 446 с.
5. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol.364. – P.33-42.
6. Dolores J., Satchell K.J.F. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates // mBio. – 2013; Vol.4, No.2. – e00624-12.
7. Katz L.S., Petkau A., Beaulaurier J. et al. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single-source introduction to Haiti // mBio. – 2013. – Vol.4, No.4. – e00398-13.
8. Kim E.J., Lee D., Moon S.H. et al. CTX prophages in *Vibrio cholerae* O1 strains // J. Microbiol. Biotechnol. – 2014. – Vol. 24, No.6. – P. 725–731.
9. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // Trends Microbiol. – 2010. – Vol.18. – P. 46-54.
10. Shin O.K., Tam V.C., Suzuki M. et al. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* // mBio. – 2011. – Vol. 2, No.3. – e00106-11.

О МЕРАХ ПО СОВЕРШЕНСТВОВАНИЮ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

С.В. Титова¹, В.Д. Кругликов¹, Э.А. Москвитина¹, А.Б. Мазрухо¹,
А.С. Водопьянов¹, С.О. Водопьянов¹, Л.П. Алексеева¹, В.Е. Безсмертный²,
С.М. Иванова², Е.И. Марковская¹, Н.Л. Пичурина¹, С.Ю. Водяницкая¹,
А.Л. Трухачев¹

¹*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону*

²*ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, г. Москва*

Векторы направлений работы Референс-центра по мониторингу холеры на территории Российской Федерации в аспекте совершенствования эпидемиологического надзора за этой инфекцией находятся в формате соответствия современным условиям новых вызовов и угроз и представляют собой: а) научно - методическое обеспечение; б) рекомендации по внедрению разработанных и апробированных новых форм и методов работы по результатам консолидированного взаимодействия с органами и учреждениями Роспотребнадзора по организации и проведению мероприятий, направленных на минимизацию эпидемиологических рисков, в) поиск, обозначение объективных проблем и разработку конкретных мер и путей их решения, охватывая все субъекты.

Постоянное слежение за распространением холеры в странах мира, определенное ММСП (2005 г.), Правилами по санитарной охране территории РФ, СП «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой в Российской Федерации», осуществляется с использованием информационных технологий на глобальном, континентальных и региональных уровнях. В 2014 году сохранилась тенденция роста динамики заболеваемости холерой, что обусловлено вовлечением в эпидемический процесс в последнее десятилетие ежегодно от 40 до 62 стран, наряду с регистрацией холеры в различных регионах Азии, Африки, Америки, с продолжающимися эпидемиями в Гаити, в Доминиканской Республике, на Кубе, с завозами в Австралию, Океанию, а также в Европу, в том числе, в Россию.

Референс-центр, а также ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора участвовали в составлении информации Федеральной службы по субъектам «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире и прогнозе на 2015 год» (01/820-15-27 от 29.01.2015). На 2015 год дан

неблагоприятный прогноз.

Основные принципы дальнейшего совершенствования научно - методического обеспечения эпиднадзора заложены в НИР «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации» (период выполнения - 2014-2017 гг.). Для реализации поставленных задач заключены договора о научно-практическом сотрудничестве с противочумными учреждениями, Управлениями Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» 15 административных образований. Существование реальной угрозы импорта возбудителя холеры в Россию из стран, неблагополучных по данной инфекции, определяет актуальность изучения структуры миграции населения в формировании социальных групп риска; наиболее вероятных направлений завоза холеры из стран ближнего и дальнего зарубежья в различные по типам эпидемических проявлений холеры субъекты, их муниципальные образования с учетом наличия международных портов на различных видах транспорта.

Кроме того, совершенствование эпиднадзора за холерой в России направлено на гармонизацию с ММСП (2005 г.). В частности, обследование иностранных граждан на территории страны в действующих СП предусмотрено как рекомендательная мера, а при переработке СП (2013 г.) эта мера предложена как обязательная. Совершенствования районирования субъектов Российской Федерации по типам территорий по эпидемическим проявлениям холеры - одна из основных задач «реконструкции-развития» этого блока в системе профилактических противохолерных мероприятий. В новой редакции СП увеличено число субъектов, в которых мониторинговые исследования следует проводить только по эпидпоказаниям. Актуальными продолжают оставаться исследования по контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп поверхностных водоемов I и II категорий с вводом дополнительных стационарных и других точек отбора проб в субъектах, различных по типам эпидемических проявлений, и их муниципальных образованиях во взаимосвязи с данными социально-гигиенического мониторинга, а также с учетом эпидемической значимости и генетических характеристик циркулирующих штаммов холерных вибрионов. Так, в перечень стационарных точек отбора проб воды из водоемов I категории (переработанные СП 2013 г.) добавлены точки в местах сброса поверхностно-ливневых сточных вод.

В итоге разработаны (в соавторстве) проекты 4 нормативных документов федерального уровня внедрения: СП «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», МУК «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на

случай возникновения очага холеры», МУК «Лабораторная диагностика холеры», МУК «Организация, обеспечение и оценка готовности органов и организаций, обеспечивающих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, медицинских организаций к проведению мероприятий в условиях чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера». Для совершенствования ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа и последующей интеграцией в общую по стране геоинформационную систему зарегистрирована ГИС штаммов - возбудителей холеры, выделенных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации (с 2009 по 2014 гг.) с динамической привязкой к географическим картам страны. Оказана консультативно-методическая помощь, в том числе при проведении эпидрасследований выделенных атоксигенных штаммов *V. cholerae*, и даны рекомендации по проведению лабораторных исследований и мониторинга холеры органам и учреждениям Роспотребнадзора и учреждениям здравоохранения в субъектах Российской Федерации (Московская, Волгоградская, Калининградская области, г. Санкт-Петербург, Республика Хакасия и др.).

На основе комплексной оценки показателей, характеризующих многофакторность эпидемического процесса при холере, а именно: 1. данные об эпидемических проявлениях холеры в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе (1970 - 2013 гг.); 2. данные обследования на холеру различных контингентов населения; 3. данные по выделению холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоёмов и других объектов окружающей среды в Республике Крым и городе федерального значения Севастополе; 4. данные по эпидемиологической оценке транспортных связей в возможности завоза холеры; 5. данные по гигиене водных объектов и водоснабжения: по микробиологическим показателям, характеризующие состояние водоемов, используемых для питьевого водоснабжения и рекреационного водопользования (2003-2014гг.), Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и Межрегионального управления Роспотребнадзора по Республике Крым и городу Федерального значения Севастополю определен эпидемический потенциал Республики Крым, территория которой отнесена к I типу по эпидпроявлениям холеры и города федерального значения Севастополя - к III типу, подтипу А.

На совещании специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпиднадзора за холерой и на заседании Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (2013 г.) отмечено, что одним из основных направлений работы является совершенствование схем взаимодействия организаций Роспотребнадзора

Российской Федерации с заинтересованными службами и ведомствами по обеспечению эпидемиологического благополучия населения по холере, что касается реализации и в условиях ЧС.

Выполняя задачи Референс-центра по мониторингу холеры на территории Российской Федерации, в 2014 году было принято участие в проведении мероприятий в условиях введения режима Чрезвычайной ситуации в связи со сложной обстановкой в юго-восточных областях Украины и значительным увеличением прибытия граждан на территорию Ростовской области. Для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в сложившихся условиях ЧС органы и учреждения Роспотребнадзора, дислоцированные в Ростовской области, осуществили активное консолидированное взаимодействие во исполнение решений санитарно-противоэпидемиологических комиссий при Правительстве Ростовской области с участием Главного государственного санитарного врача Российской Федерации Поповой А.Ю. (СПЭК от 21.06.2014, протокол № 6), Постановления Главного Государственного врача по Ростовской области № 5 от 11 июня 2014 г. а также в реализации разработанного межведомственного плана. На основе указания Федеральной службы «Об обеспечении готовности СПЭБ в связи с неблагоприятной ситуацией на Украине» СПЭБы ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора были приведены в режим повышенной готовности.

Организован и проведен комплекс мероприятий, направленных на предотвращение заноса инфекции с территории Украины водой поверхностных водоемов, в том числе реками, впадающими в Азовское море. Введены 8 дополнительных точек отбора проб воды поверхностных водоемов на вибриофлору. Лабораторное обеспечение эпидемиологического надзора осуществлялось с применением современных методов диагностики, молекулярно-генетических методов при идентификации выделенных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в лабораториях соответствующих территориальных уровней.

В аспекте совершенствования лабораторной диагностики холеры нами в 2014-2015 гг. зарегистрированы в Росздравнадзоре 2 набора реагентов на основе моноклональных иммуноглобулинов для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методами РИФ и РА. На стадии решения находится вопрос организации производства зарегистрированных препаратов.

В 2014 г. Референс-центром проведена идентификация и углублённое изучение (в том числе, молекулярно-биологическое типирование) 37 штаммов холерных вибрионов O1, изолированных на территориях субъектов Российской Федерации, в том числе – одного штамма, выделенного от человека (завоз из Индии). Проведено с отрицательным результатом серологическое исследование сыворотки

крови больной с подозрением на холеру.

В результате мониторинговых исследований воды поверхностных водоёмов и стоков на наличие холерного вибриона по стационарным и дополнительным точкам, был выделен токсигенный штамм *V.cholerae* O1 El Tor Inaba № 81 (10.08.14), генетическая организация которого была изучена в тесном взаимодействии с ФКУЗ Российский научно-исследовательский институт «Микроб» Роспотребнадзора. В связи с осложнением эпидемиологической ситуации, связанной с выделением токсигенного штамма холерного вибриона был проведен весь комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий. Использовались разработанные в нашем институте современные коммуникационные средства: ГИС «Холера-штаммы-VNTR» в формате коммуникатора на базе Android с модулем GPS-навигации.

В ходе проведенного эпидемиологического расследования установлены возможные риски контаминации воды реки Темерник холерными вибрионами и приняты адекватные меры по их устранению. Специалисты института приняли участие в проведении эпидемиологического расследования, в рамках которого был осуществлен сбор данных по заболеваемости ОКИ в 5 инфекционных отделениях Ростовской области. Разработан универсальный алгоритм и таблица сбора эпиданамнеза.

Кроме того, обращает на себя внимание факт выделения от больных гастроэнтеритами в Ростовской области и Республике Калмыкия 13 штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, идентифицированных в референс-центре.

Референс-центром подготовлен и направлен в Федеральную службу проект информационного письма «О подготовке и проведению эпидсезона по холере в субъектах Российской Федерации».

В этой связи, на текущий момент в плане обеспечения совершенствования эпиднадзора за холерой в субъектах Российской Федерации мы считаем приоритетным реализацию решений конкретных первоочередных задач, как в период подготовки, так и при проведении эпидсезона, а именно:

- 1) актуализация и паспортизация стационарных точек отбора проб до начала эпидсезона (по обоснованному сокращению их количества) в сроки, в зависимости от типов территорий по эпидемическим проявлениям холеры;
- 2) обеспечение своевременного проведения в установленном порядке контроля питательных сред, ингибиторов роста посторонней микрофлоры, используемых для лабораторной диагностики холеры;
- 3) проведение Управлениями Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации, совместно со специалистами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии», ФКУЗ противочумных учреждений и МЗ по субъектам проверок готовности лабораторий, ведущих исследования на холеру, а

также организация и проведение семинаров по лабораторной диагностике этой инфекции; 4) проведение проверок госпитальных баз, предусмотренных для развертывания на случай эпидсложнения по холере; 5) использование всех современных средств коммуникации для дистанционного получения консультативно-методической помощи в Референс-центре, включая он-лайн консультации; 6) в период эпидсезона обеспечение направления в Референс-центр по мониторингу холеры по эл. почте еженедельной информации по субъектам Российской Федерации о выделении штаммов *V. cholerae* O1, O139 (вода, люди) и *V. cholerae* non O1/non O139 (люди). Практика проведения таких мероприятий в Ростовской области (с 2011 по 2014 гг.) показала свою эффективность в плане настороженности в отношении холеры и результативности исследований.

В свою очередь, в первостепенные обязанности Референс-центра входит: 1) информирование Федеральной службы о выявлении возбудителей и об особенностях их генетической организации; 2) обобщение получаемых данных по стране в целом и подготовка информационно-аналитических материалов по эпидемиологической ситуации по России в 2015 году (в срок 01.12.15 г.); 3) составление прогноза эпидемиологической ситуации по холере на 2016 г. 4) оказание консультативно-методической и практической помощи в каждом конкретном случае специалистами (эпидемиологами и бактериологами) Референс-центра, включая выезды на места, в проведении эпидемиологических расследований в случае выделения штаммов *V. cholerae* O1 и O139 (токсигенных и атоксигенных) как от людей, так и из водных объектов; 5) в проведении мониторинговых исследований на холеру в рамках мероприятий, планируемых Федеральной службой в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА КАК РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

С.В. Титова, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина, И.В. Архангельская,
М.И. Ежова, Д.А. Зубкова, А.Б. Мазрухо, Н.Л. Пичурина

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Деятельность референс-центра по мониторингу холеры ведется в рамках 11 научных тем и двух Федеральных целевых программ.

В ходе работы в качестве референс-центра по мониторингу холеры были идентифицированы 35 атоксигенных и одна токсигенная культуры O1 серогруппы, выделенные из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в течение 2014г. Из них: 3 культуры изолированы из водоемов на территории Ростовской области (1 - в Ростовском-на-Дону противочумном институте, 2 - в Северо-Кавказской ПЧС), 19 - в Республике Калмыкия, 3 - в Республике Крым, 3 - в Приморском крае, 1 - в Забайкальском крае, по 2 - в Иркутской, Московской и Калининградской областях, 1 - в Псковской области. Данные о расширенной характеристике выделенных штаммов по генам, ассоциированным с вирулентностью, пандемичностью, персистенцией, внесены в базу данных Геоинформационная система «Холера 1989-2014 гг.», с помощью которой возможен биоинформационный анализ свойств культур, изолированных на территории России в разные годы.

В 2014 г. изучена одна токсигенная культура *Vibrio cholerae* O1 серогруппы от больной холерой (занос в г. Москву), при исследовании сыворотки крови которой выявлены противохолерные антитела (агглютинины и вибриоцидные антитела).

На территории России от людей изолировано 13 культур *V. cholerae* non O1/non O139 серогруппы (2 - Республика Калмыкия и 11 –Ростовская область). Установлена серологическая принадлежность штаммов холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп.

В ходе мониторинга холеры, проведенного в Референс-центре по холере с 05.05.14г. по 29.09.14г. было исследовано 287 проб из объектов окружающей среды г. Ростова-на-Дону и Ростовской области, включая пробы: из стационарных точек г. Ростова-на-Дону, исследуемые по эпидпоказаниям - из Таганрогского залива Азовского моря и в плане научно-практической работы - балластные воды судов. Всего было выделено 160 культур, в том числе 1 штамм *V. cholerae* O1 серогруппы и 159 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139. При исследовании 175 проб воды из восьми стационарных точек (из поверхностных водоемов и сточных вод), закрепленных за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, выделены 1 токсигенная культура *V. cholerae* O1 серогруппы и 100 культур *V. cholerae* non O1/non O139 серогрупп. При исследовании 56 проб морской воды Таганрогского залива Азовского моря, доставленных филиалом ФБУЗ «ЦГиЭ в РО» в г. Таганроге, культур холерного вибриона O1 серогруппы выделено не было, изолировано 40 культур *V. cholerae* non O1/non O139. При исследовании 56 проб балластных вод судов обнаружено 19 культур *Vibrio cholerae* non O1/non O139.

В 2014 году 37 штаммов *V. cholerae* O1, поступившие на

идентификацию, были изучены с использованием мультилокусному VNTR-типирования по пяти локусам VcA, VcB, VcC, VcD и VcG, а результаты типирования добавлены в геоинформационную систему «Холера. Штаммы -VNTR», что дает возможность сравнивать вновь выделенные холерные вибрионы со штаммами, выделенными ранее на территории Российской Федерации, а также с генетически измененными, в том числе, изолированными в Гаити.

Сотрудники института совместно с эпидемиологами и специалистами по коммунальной гигиене Управления Роспотребнадзора по Ростовской области приняли участие в проведении эпидемиологического расследования в связи с выделением токсигенного штамма *V. cholerae* O1 из реки. В ходе проведения эпидемиологического расследования выявлены потенциальные риски контаминации водоёма патогенными микроорганизмами, исследованы 14 проб воды из дополнительных точек с отрицательным результатом. Для оценки эффективности эпидемиологического надзора за холерой в плане своевременного выявления больных среди госпитализированных с диагнозами ОКИ взрослых и детей осуществлены выезды в МБУЗ Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону (5-е инфекционное и детское инфекционное отделения), МБУЗ Центральная городская больница г. Батайска, МБУЗ Центральная районная больница г. Азова, МБУЗ Центральная районная больница Аксайского района.

В 2014 году подписаны 26 договоров о научно-практическом сотрудничестве по направлению исследований «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации».

При оказании практической помощи учреждениям здравоохранения проведено бактериологическое обследование на холеру с отрицательным результатом 11 больных с диагнозом ОКИ из лагеря переселенцев из Украины (34 анализа).

Для учреждений, выполняющих исследования на холеру, проведен контроль питательных сред и реактивов для лабораторной диагностики холеры. Проконтролировано 74 серии жидких, плотных питательных сред и ингибиторов роста, из которых одна серия щелочного агара, шесть серий основного раствора пептона признаны непригодными для использования.

По плану межведомственного взаимодействия в приграничных с Украиной районах Ростовской области и в связи с обострением внутривнутриполитической ситуации на Юго-Востоке сопредельного государства и существующими рисками для санитарно-эпидемиологического благополучия населения приграничных территорий была проведена оценка противоэпидемической готовности госпиталей специального назначения (14 лечебно-профилактических учреждений) и бактериологических лабораторий (4 лаборатории). По результатам оценки

противоэпидемической готовности к проведению мероприятий в случае заноса и распространения опасных инфекционных болезней (холерой) составлены аналитические справки, в которых даны рекомендации по расчету мощности лаборатории, организации трехсменной работы, а для лечебных учреждений - по возможным вариантам перепланирования санитарных пропускников для поступления и выписки больных, соблюдению режима биологической безопасности при выявлении больного с подозрением на холеру и другим.

Проанализирована эпидемиологическая ситуация по холере в мире, СНГ, России; дан прогноз с использованием сведений проблемно-ориентированной базы данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире». Пополнены базы данных «Холерные вибрионы. Россия» с учетом типов территорий по эпидемическим проявлениям холеры, климато-географических областей и федеральных округов России, ГИС «Холера штаммы VNTR».

Еженедельно составляются сводки о состоянии заболеваемости холерой в мире, выделении холерных вибрионов на территории Российской Федерации с передачей соответствующей информации в Роспотребнадзор.

Для повышения чувствительности, специфичности и экспрессности методов лабораторной диагностики ведется разработка и внедрение препаратов на основе моноклональных иммуноглобулинов в тестах слайд-агглютинации («Имуноглобулины – *V.cholerae* O1/O139 – РА»), прямой иммунофлуоресценции (набор реагентов «Имуноглобулины - *V. cholerae* O1/O139 – РИФ») и иммунохроматографии. Прошел апробацию на базе института набор видоспецифических диагностических моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции холерных вибрионов O1 и O139 в дот-иммуноанализе. Для выявления специфических антител в сыворотках крови людей сконструирован полимерный антигенный диагностикум на основе липополисахарида O1 серогруппы, ведется разработка диагностикума на основе липополисахарида O139. Осуществляется поиск новых селективных и элективных сред, в которых произведена модернизация за счет введения ранее не использовавшихся селективных агентов (патентованные среды СЭДХ и СЭДХ-М).

В 2014 году при подготовке кадров по проблеме «Холера» проведены семинары-совещания «О состоянии и тенденциях заболеваемости холерой в мире и России, проведении первичных противохолерных мероприятий в случае выявления больного с подозрением на холеру» для специалистов учреждений Роспотребнадзора и Минздрава в г. Ростове-на-Дону ГБУ «Центр восстановления медицины и реабилитации №1», г. Сальск МБУЗ ЦРБ Сальского района, г. Б. Калитва МБУЗ ЦРБ. 10 врачей бактериологов подготовлены по программе повышения квалификации по лабораторной диагностике и эпидемиологическому надзору за холерой.

За отчетный период ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт принимал участие в разработке следующих нормативно-методических документов федерального уровня:

МУК «Лабораторная диагностика холеры».

СП ««Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры»».

СП «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой в Российской Федерации»

В соответствии с письмом Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека «О резолюции совещания специалистов Роспотребнадзора по совершенствованию эпиднадзора за холерой» от 23.06.2014г. №01/7042-14-32 сотрудниками ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора совместно со специалистами Управления Роспотребнадзора по Республике Крым проведено определение эпидемического потенциала Республики Крым и города федерального значения Севастополя с учетом показателей, характеризующих многофакторность эпидемического процесса при холере. Республика Крым отнесена к территориям I типа по эпидемическим проявлениям холеры, город федерального значения Севастополь – к территориям III типа подтипа А по эпидемическим проявлениям холеры с соответствующей тактикой эпидемиологического надзора

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ РАССЛЕДОВАНИЕ ПРИ
КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ
ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ O1 И O139
СЕРОГРУПП $ctxAB^+tcpA^+$**

Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Противохолерные мероприятия, в части, касающейся проведения профилактических мероприятий при выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, содержащих ген холерного токсина ($ctxAB^+$), из водных

объектов и хозяйственно-бытовых сточных вод, а также до установления эпидемической значимости (токсигенности) выделенных культур, предусматривают определенный комплекс мероприятий, одним из основных среди которых является эпидемиологическое расследование с целью установления источников контаминации водных объектов и сточных вод [1]. С учетом теоретических основ общей эпидемиологии и практики проведения санитарно-противоэпидемических (профилактических) мер, комплекс мероприятий при проведении эпидрасследования должен быть направлен на выявление источника возбудителя инфекции в популяции населения и источника контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп объектов окружающей среды.

При выявлении источника возбудителя холеры среди людей основной акцент уделяется проводимым мероприятиям при эпиднадзоре. Необходимо отметить, что регламентированная тактика эпидемиологического надзора за холерой на национальном уровне определена с учетом системного подхода. На соцэкоцистемном уровне – возможного функционирования соцэкоцистемы – она направлена на своевременное выявление больных с диареей и рвотой при тяжелом течении болезни и выраженном обезвоживании; больных холерой среди граждан Российской Федерации и иностранных граждан, заболевших острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в течение пяти дней после прибытия из неблагополучных по холере стран; лиц без гражданства или иностранных граждан при медицинском освидетельствовании (группы риска) на территории Российской Федерации (территория риска) в течение года (время риска). Предупреждение потенциального функционирования региональных соцэкоцистем реализуется за счет бактериологического обследования на холеру больных ОКИ в инфекционных стационарах и оставленных на дому, лиц с дисфункцией кишечника при поступлении в специализированные учреждения, умерших, причиной смерти, которых явились кишечные инфекции неустановленной этиологии (группы риска) на территориях субъектов, отнесенных к I, II и III типам по эпидемическим проявлениям холеры (территории риска), в определенные сроки (с мая и июня по сентябрь – время риска) и по эпидемиологическим показаниям соответственно с определенной тактикой.

Учитывая, что проведение бактериологического обследования на холеру указанных контингентов проводится бактериологическими лабораториями, в основном, территориального уровня – лечебно-профилактических организаций (ЛПО), ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в субъекте» Роспотребнадзора и его филиалов, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в субъекте на железнодорожном транспорте» и его филиалов, противочумными и учреждениями различных ведомств, необходимо предусмотреть ежемесячную систематизацию

данных с сопоставлением их с числом зарегистрированных больных ОКИ установленной и не установленной этиологии.

Среди мероприятий, направленных на выявление источника инфекции, проводится: анализ заболеваемости ОКИ установленной и не установленной этиологии с целью выявления тенденций в динамике заболеваемости и сравнительного анализа за предшествующие годы (три-пять лет) и аналогичный период с начала текущего года; заболеваемости ОКИ с реализацией водного пути распространения возбудителей инфекций; контроль соблюдения регламентированной тактики бактериологического обследования определенных контингентов населения; анализ прибытия российских и иностранных граждан на предприятиях субъекта (муниципального образования), где имеется практика сотрудничества, служебных командировок за рубеж и в Россию соответственно. В ЛПО используются статистические данные о гражданах СНГ, находящихся и находившихся на лечении в детских и взрослых инфекционных стационарах в соответствии с приказами по организации «О порядке уведомления территориальных органов ФМС о прибытии и убытии иностранных граждан». Основание: Федеральный закон от 18 июля 2006 г. № 109-ФЗ «О миграционном учете иностранных граждан и лиц без гражданства в Российской Федерации» и постановление Правительства Российской Федерации от 15 января 2007 г. № 9 «О порядке осуществления миграционного учета иностранных граждан и лиц без гражданства в Российской Федерации».

Учитывая кратковременность выделения холерных вибрионов у больных холерой из клинического материала (испражнений) при своевременно начатой антибактериальной терапии, необходимо предусмотреть проведение серологического исследования сыворотки (ок) крови в сроки, достаточные для выявления сероконверсии титров антител в комплексе предусмотренных реакций [3], у больного (ых) ОКИ, предполагаемого в качестве источника инфекции, в том числе ответственного за контаминацию объектов окружающей среды.

Одновременно осуществляются мероприятия, направленные на выявление источника контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп объектов окружающей среды. Первоочередными из них являются предусмотренные действующими СП при выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, содержащих ген холерного токсина (ctxAB⁺), из водных объектов и хозяйственно-бытовых сточных вод, а также до установления эпидемической значимости (токсигенности) выделенных культур.

Для предотвращения реализации водного пути распространения возбудителя холеры управлением Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации, его отделами совместно с противочумными учреждениями готовятся материалы к Решению СПЭК (областной,

муниципальных образований), в том числе о введении ограничительных мероприятий на водопользование водными объектами в местах сброса производственных и хозяйственно-бытовых сточных вод и ниже по течению на 500 м от места их сброса на водотоках, независимо от степени их очистки, а также в местах сброса поверхностно-ливневых сточных вод; об увеличении количества точек отбора проб воды из поверхностных водоемов, в том числе ниже сброса сточных вод на водотоках и в акватории непроточных водоемов и водохранилищ; в местах впадения малых рек в поверхностные водоемы, используемые для рекреационного водопользования в черте населенного пункта; в местах расположения лодочных станций, суда которых могут осуществлять сброс фоновых вод в акваторию поверхностных водоемов; ежедневном отборе проб и исследовании на наличие холерного вибриона до трех отрицательных результатов.

Осуществляется анализ и оценка качества воды источников, используемых для хозяйственно-питьевого водоснабжения, и в местах рекреационного водопользования на соответствие действующим СанПиН «Гигиенические требования к охране поверхностных вод»; при выделении холерных вибрионов в зонах санитарной охраны водных объектов для хозяйственно-питьевого водоснабжения – на соответствие действующим СанПиН «Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды централизованных систем питьевого водоснабжения. Контроль качества», «Гигиенические требования к качеству воды нецентрализованного водоснабжения. Санитарная охрана источников».

С целью выявления потенциальных рисков – предвестников осложнения эпидемиологической ситуации – учитываются гидрологические данные водного объекта, погодные условия; систематизируются данные о наличии сбросов производственных и хозяйственно-бытовых сточных вод независимо от степени их очистки, имеющих на учете органов и учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор, а также выявленных при эпидрасследовании; о наличии сбросов поверхностно-ливневых сточных вод с возможным попаданием (при врезке) содержимого канализационных сетей, а также присутствие дренажных систем с возможной подпиткой из выгребных туалетов при соответствующем стоянии грунтовых вод. Придается значение аварийным ситуациям на КНС и канализационных коллекторах с особым вниманием возможной их разгрузки в поверхностные водоемы и зоны санитарной охраны подземных вод, используемых в качестве источников хозяйственно-питьевого водоснабжения.

Особое внимание уделяется ЛПО с инфекционными стационарами, имеющими сбросы сточных вод в систему водоотведения в общегородские канализационные сети (при наличии), с предусмотренным

обеззараживанием стоков и последующим сбросом их в поверхностные водоемы, используемые в качестве источников водоснабжения или водопользования. Одновременно осуществляется контроль соблюдения режима безопасности в инфекционных стационарах при работе с микроорганизмами I-II групп патогенности [2].

Нельзя не отметить, что при эпидрасследовании необходимо учитывать обычаи и традиции населения (омовение), которые могут привести к контаминации водного объекта с последующим сохранением и размножением холерных вибрионов и реализацией водного пути распространения возбудителя инфекции.

Перечень мероприятий при контаминации атоксигенными холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп определяется Руководителем Управления Роспотребнадзора по субъекту Российской Федерации с учетом эпидемиологических и санитарно-гигиенических показаний.

В заключении следует акцентировать внимание на том, что при проведении эпидемиологического расследования в связи с контаминацией холерными вибрионами O1/O139 серогрупп объектов окружающей среды, не всегда удается обнаружить источник инфекции или контаминации, но всегда выявляются потенциальные и реальные риски осложнения эпидемиологической ситуации по острым кишечным инфекциям, в том числе холере. Минимизация и устранение рисков – стратегия в профилактике и борьбе с инфекционными болезнями, направленная на обеспечение биологической безопасности в возникновении чрезвычайных ситуаций санитарно-эпидемиологического характера.

Литература

1. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521–09. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации.
2. Санитарно-эпидемиологическими правилами СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».
3. Серологические методы в диагностике холеры. Дополнение к МУК 4.2.2218-07 "Лабораторная диагностика холеры". Методические указания. МУК 4.2.2315-08.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2014 Г.

М.И. Ежова, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, С.В. Титова,
Д.А. Зубкова, Р.В. Писанов

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Анализ результатов мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов и сточных вод Ростовской области на наличие холерных вибрионов является актуальной задачей в условиях возможного заноса холеры на территорию России, в том числе с сопредельных территорий [2].

В 2014 г. в ходе мониторинга холеры в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт по восьми стационарным точкам г. Ростова-на-Дону и четырем дополнительным точкам г. Таганрога в период с мая по сентябрь была исследована 231 проба воды, из них - 210 проб поверхностных водоёмов, и 21 - из стоков. В результате были выделены: 1 токсигенная культура *V.cholerae* O1 El Tor (ctxAB⁺, tcpA⁺) и 141 культура *V.cholerae* non O1/non O139. Холерные вибрионы O139 серогруппы обнаружены не были (табл.).

Таблица. Результаты исследований на холеру стационарных точек Ростовской области в 2014г.

№	Название водоема / Точка отбора проб воды	Кол-во проб	Выделено <i>V. cholerae</i>	
			O1	non O1/ O139
1	Р. Дон / Правый берег у Державинского спуска	22	-	16
2	Р. Темерник / Устье впадения в р.Дон	22	-	14
3	Сточные воды / Городские очистные сооружения, приемная камера КНС № 4	21	-	-
4	Р. Дон / У железнодорожного моста (правый берег) в Западном жилом массиве	22	-	14
5	Пр.М.Донец /1 км ниже автодорожного моста (Кумжинская роща)	22	-	14
6	Р. Темерник / Ботанический сад, у моста	22	1	13
7	Р. Дон / 500 м ниже железнодорожного моста	22	-	14
8	Р. Дон / Правый берег, Кировский спуск напротив здания экипажа № 2 РМК им. Седова	22	-	15

9	Азовское море/ с. Петрушино, Неклиновского района	14	-	7
10	Азовское море / пляж Елисеевский, г. Таганрог	14	-	11
11	Азовское море / место впуска ливневых стоков (р-он МБУЗ «Детская гор. Бол.» г.Таганрог)	14	-	12
12	Азовское море /в месте сброса из балки М.Черепаша, г.Таганрог	14	-	11
Итого		231	1	141

Культура *V. cholerae* O1, изолированная из р. Темерник, была типична по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам, относилась к серовару Инаба, была устойчива к бактериофагам (С и El Tor), росла на среде с полимиксином, образовывала ацетилметилкарбинол, не лизировала эритроциты барана, в ПЦР содержала гены *ctxA* и *tcrA*. При полногеномном секвенировании было выявлено наличие в геноме этого штамма гибридного профага СТХ, содержащего ген *ctxB* классического типа (аллель *ctxB1*), ген *rstR* типа Эль Тор, ген *tcrA* с мутациями в кодирующей и промоторной областях (аллель *tcrETCIRS*), а также наличие null-мутации в гене *rtxA* (аллель *rtxA4*) и протяженной делеции в пределах острова пандемичности. При сравнительном анализе по данным генотипирования штамм является близкородственным штамму, выделенному из воды Таганрогского залива в 2011 году во время эпидемических осложнений по холере на территории Украины (г. Мариуполь) [3].

При эпидемиологическом расследовании было исследовано 14 проб воды (трехкратный забор из стационарной точки №6, из двух дополнительных, а также ил и сточные воды) с отрицательным результатом. Хотя источник токсигенного штамма выявить не удалось, сам факт обнаружения культуры *V. cholerae* O1 в воде р. Темерник свидетельствует о реальной опасности данного водоема как резервуара и фактора передачи инфекции. Отсутствие повторного выделения *V. cholerae* O1 говорит об эффективности проведенных профилактических мероприятий, а также о невозможности длительной циркуляции токсигенных клонов в условиях данной водной экосистемы.

Что касается холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, то культуры были изолированы из всех стационарных точек, кроме сточных вод, но наибольшее количество было обнаружено в пробах воды из стационарных точек №№ 1 и 8. При характеристике биологических свойств изолированных культур была установлена типичность культурально-морфологических и биохимических свойств, отсутствие изменчивости по агглютинабельности.

Необходимо подчеркнуть, что нацеленность исследований на

обнаружение холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп должна быть дополнена более пристальным вниманием и к *V.cholerae non O1/non O139*. Так, в 2014 году от людей, поступивших в стационары г. Таганрога с ОКИ, было выделено 11 культур *V.cholerae non O1/non O139*. В отсутствие генов *ctxA* и *tcrA* эти штаммы, возможно, за счет наличия других генетических детерминант факторов вирулентности вызвали клинические проявления заболевания [1]. Регистрация гастроэнтеритов, вызванных холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп в июле-августе, то есть во время циркуляции этих микроорганизмов в водных объектах на этой же территории, а также заболевания, в основном, детей до 14 лет, свидетельствует о наиболее вероятной реализации водного пути передачи этой инфекции.

Таким образом, ежегодные мониторинговые исследования на наличие холерных вибрионов проб из водных экосистем с анализом полученных данных о фено- и генетических свойствах изолированных культур продолжают оставаться одной из важнейших частью эпидемиологического надзора за холерой на территории Ростовской области и позволяет своевременно и адресно проводить профилактические мероприятия.

Литература

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae nonO1/nonO139*, выделенной в Ростовской области. // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С. 25-27.
2. Мазрухо А.Б., Москвитина Э.А., Кругликов и др. Мероприятия по предотвращению заноса холеры на территорию Ростовской области и другие субъекты Российской Федерации в связи с осложнением эпидемиологической обстановки на Украине в 2011 году // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2012. – Вып. 25. – С. 31-39.
3. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И. и др. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V.cholerae O1 El Tor*, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области с 2003-2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 2(263). – С.39-42.

ИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ВЫДЕЛЕНИЯ КУЛЬТУР ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ИЗ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 1989 ПО 2014 ГГ.

Д.А. Зубкова, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, М.И. Ежова,
Н.Б. Непомнящая, С.В. Титова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Для совершенствования эпидемиологического надзора за холерой особое значение имеет оценка эпидемиологической ситуации, важное место в которой занимает накопление и систематизация многолетних данных мониторинговых исследований на территории Российской Федерации с анализом биологических свойств изолированных культур холерных вибрионов [1, 3].

Целью настоящего исследования явилось изучение динамики выделения штаммов холерных вибрионов в России с разным фено- и генотипом, с 1989 по 2014 г. с применением геоинформационной системы «Холера 1989-2014».

В период с 1989 г. по 2014 г. при мониторинговых исследованиях водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации было выделено 962 штамма *V. cholerae* O1, 133 штамма *V. cholerae* PO – вариант, 9 штаммов *V. cholerae* O139.

При анализе распределения штаммов по субъектам Российской Федерации установлено, что наибольшее количество культур выделено на территории Республики Калмыкии – 306 (31,8%), Ростовской области – 137 (14,2%) и Приморского края – 93 (9,6%). Единичные случаи выделения штаммов холерных вибрионов регистрировались на территориях Республики Бурятия, Краснодарского края, Астраханской, Курганской, Нижегородской, Пензенской, Псковской, Тульской, Челябинской, Ярославской областей (рис.).

Стоит отметить количественное снижение динамики выделения холерных вибрионов в 2013-2014 гг., которое может быть обусловлено климато-географическими факторами. В тоже время среди 36 штаммов холерных вибрионов, выделенных в 2014 году, был обнаружен один токсигенный, что свидетельствует о возможном заносе холеры на территорию Российской Федерации и сохранении неблагоприятной эпидемиологической ситуации по холере [4].

Все изолированные штаммы *V. cholerae* O1 были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим

свойствам и относились к биовару Эль Тор. Большинство выделенных культур принадлежали к серовару Огава - 556 штаммов (57,7%), 256 (26,6%) - к серовару Инаба, 8 (0,8%) - к серовару Гикошима, 133 (13,8%) - к РО - варианту и 9 (0,9%) – к О139. Была отмечена изменчивость штаммов холерных вибрионов по признаку фаголизабельности: устойчивость по отношению к холерному диагностическому фагу эльтор.

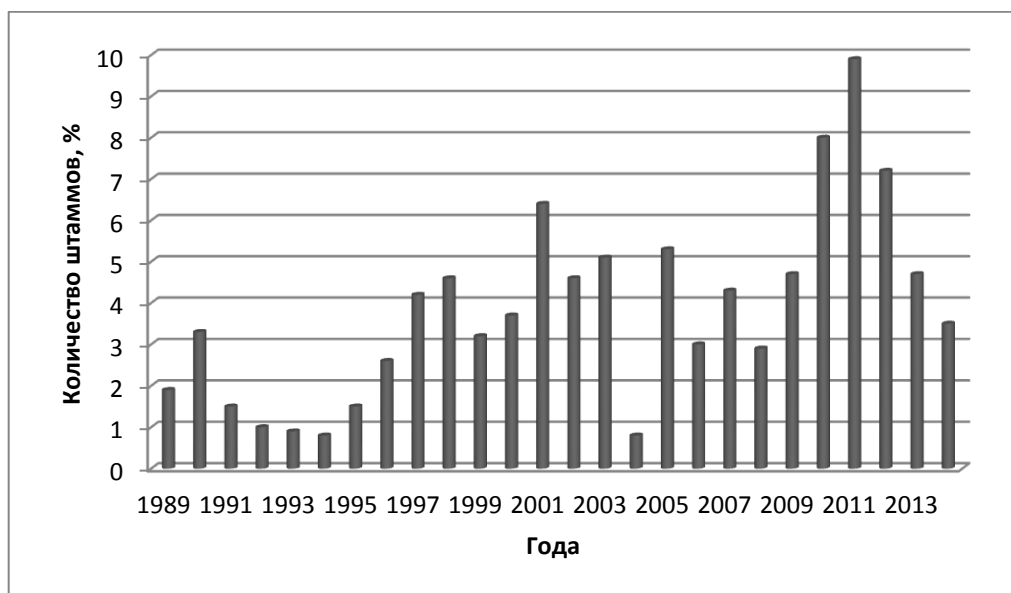


Рисунок. Динамика выделения холерных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации по годам.

Следует подчеркнуть, что в водных экосистемах России происходит непродолжительная циркуляция атоксигенных культур холерных вибрионов О1 серогруппы. Спорадическое выделение токсигенных (ctx^+tcp^+) и потенциально опасных, имеющих неполный остров VPI ($ctx^-tcp^+toxT^+$), штаммов холерных вибрионов имеет предположительно завозной характер, хотя и не всегда сопровождается выявлением больных (таб.). В 1999 г. в Приморском крае и Сахалинской области токсигенные штаммы холерных вибрионов были выделены в период эпидемических осложнений, а в остальные годы в Ростовской, Московской, Ленинградской областях и Чувашской Республике при отсутствии клинических случаев. Одновременно с выделением из воды культур *V. cholerae* O1($ctx^-tcp^+toxT^+$) такие же культуры были изолированы от 2 больных и 30 носителей в Ростовской области (2005г.) и одного больного в Республике Калмыкия (2011г.) [2].

Таблица. Выделение культур холерных вибрионов на территории Российской Федерации.

Административная территория	Генетическая характеристика	
	ctx ⁺ tcp ⁺	ctx ⁻ tcp ⁺
Московская обл.	2 (1995 г.)	-
Ростовская обл.	8 (1999, 2000, 2001, 2003, 2011, 2014 гг.)	16 (2002, 2005, 2007 гг.)
Чувашская Респ.	1 (1999 г.)	-
Сахалинская обл.	3 (1999 г.)	-
Приморский край	1 (1999 г.)	-
Ленинградская обл.	1 (2005 г.)	-
Респ. Калмыкия	-	34 (2003, 2011, 2012, 2013 гг.)
Хабаровский край	-	2 (2013 г.)

Таким образом, на современном этапе на фоне неблагоприятного прогноза по холере необходимо повышение качества мониторинговых исследований. Учитывая возможность заноса токсигенных и потенциально опасных (ctx⁻tcp⁺) штаммов холерных вибрионов на любую территорию России, необходимо своевременное изучение биологических свойств изолированных при мониторинге культур, в том числе генетической характеристики для выяснения происхождения на базе Референс-центра по мониторингу холеры. Для повышения эффективности работы лабораторий территориального уровня рекомендуется проведение семинаров для медицинских работников, проводящих исследование клинического материала на холеру, своевременная (до начала мониторинговых исследований) проверка качества питательных сред используемых для диагностики холеры.

Литература

1. Зубкова Д.А., Водопьянов А.С., Архангельская И.В. и др. Использование новой ГИС для ретроспективного и оперативного анализа свойств холерных вибрионов O1, выделены из объектов окружающей среды на территории России. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2014 г. – Вып.27. – С. 47-50.
2. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы ctxA⁻tcpA⁺, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. // Здоровье населения и среда обитания. 2014. – №9 (258). – С.32-34.
3. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. и др. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014гг., прогноз на

2015г. // Пробл. особо опас. Инф. – 2015. – № 1.– С.18-25.

4. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И. и др. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V.cholerae* O1 El Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области с 2003-2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 2(263). – С.39-42.

АКТУАЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ МОНИТОРИНГА ВИБРИОФЛОРЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ В СИСТЕМЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

С.В. Балахонов¹, Л.В. Миронова¹, Ж.Ю. Хунхеева¹, Л.Я. Урбанович¹,
Е.А. Басов¹, Э.Г. Гольдапель¹, Е.С. Куликалова¹, А.С. Пономарева¹,
С.К. Миткеева¹, В.С. Ганин¹, Г.И. Кобанова²

¹*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

²*Научно-исследовательский институт биологии при Иркутском
государственном университете, г. Иркутск*

На текущем этапе седьмой пандемии эпидемиологическая обстановка по холере в мире остается крайне нестабильной. Глобальному распространению инфекции с развитием в ряде стран эпидемических осложнений способствуют не только интенсивные трансграничные и трансконтинентальные миграционные процессы, но и формирование атипичных генетически измененных клонов *V. cholerae El Tor* с повышенным патогенным и пандемическим потенциалом на фоне растущей резистентности возбудителя к антимикробным препаратам. Ситуация по холере в 2014 г. характеризовалась регистрацией 126 626 случаев заболевания холерой в 31 стране мира [2]. Продолжает оставаться напряженной обстановка на о. Гаити, где с начала эпидемии число заболевших превысило 700 тыс. человек, 8741 из которых – с летальным исходом [6]. Увеличение количества случаев заболевания холерой, зарегистрированных здесь за первые два месяца текущего года, по сравнению с аналогичным периодом 2014 г. и возможный дальнейший подъем заболеваемости в период сезона дождей на фоне неудовлетворительного состояния системы водоснабжения в стране,

вызывают обеспокоенность со стороны международного сообщества [7]. В Доминиканской Республике в 2014 г., выявлено 597 больных холерой, включая 10 умерших, в Мексике – 14 больных, на Кубе – 43 [4, 6]. Неблагополучной эпидемиологическая ситуация по холере оставалась и в ряде стран Африки (Гана – свыше 10 тыс. случаев заболевания; Демократическая Республика Конго – около 10 тысяч; Южный Судан – 6421; Нигерия – свыше 34 тысяч с начала вспышки в мае 2013 г.; Нигер – более 1350; Камерун – свыше 2000) и Азии (Индия – 533 случая, Непал – 1230; Китай – 5, Пакистан – свыше 900; Мьянма – 234; Филиппины – свыше 500) [8].

Несмотря на наметившуюся тенденцию к снижению количества зарегистрированных случаев заболевания холерой в мире (в 2014 г. – 126 626 случаев, в 2010 г. – 317 534, 2011 г. – 589 854, 2012 г. – 245 393, 2013 г. – 129 064) [11-14], сохраняется угроза завоза инфекции на территорию РФ, в т.ч. больными легкими и стертыми формами холеры, больными в инкубационном периоде болезни или вибрионосителями, что определяет риск попадания возбудителя в поверхностные водоемы и накопления его в благоприятных экологических нишах. С учетом этого в системе надзора за холерой, наряду с мероприятиями по своевременному выявлению больных и вибрионосителей, важнейшая роль отводится мониторинговым исследованиям вибриофлоры водных объектов.

В 2014 г. в Сибирском и Дальневосточных регионах в рамках мониторинговых исследований из поверхностных водоемов отобрано 17350 проб, в т.ч. проб воды – 16120, ила – 1225, гидробионтов – четыре и водорослей – одна. Из общего числа исследованных проб 2748 (15,8 %) приходится на поверхностные водоемы Приморского края, относящегося ко II типу территорий по эпидемическим проявлениям холеры. Удельный вес проб, отобранных в субъектах III типа А и Б подтипов, составляет 56,5 % (9804 проб) и 24,3 % (4216 проб), соответственно. В регионах подтипа В исследовано 3,4 % (582 пробы) от общего количества. Большая часть исследований приходится на зоны рекреационного водопользования (62,3 %) и места сброса хозяйственно-бытовых сточных вод (15,5 %). Дополнительно исследованию подверглись 213 проб воды из систем водоснабжения: централизованного – 205 и нецентрализованного – 8, а также хозяйственно-бытовые сточные воды в количестве 116 проб.

По результатам микробиологического мониторинга водных объектов региона в 2014 г. изолировано шесть штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы и 939 *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп. Три штамма *V. cholerae* *El Tor* выделено в Приморском крае из рр. Раздольная, Седанка в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод и после канализационно-очистных сооружений и по одному – на территории Иркутской области (р. Ангара, залив о. Юность, зона рекреации), Алтайского (р. Пивоварка, место сброса сточных вод и неорганизованной рекреации) и Забайкальского краев (оз.

Кенон, зона рекреации). Водные объекты в местах сброса сточных вод и водоемы, используемые населением в целях рекреации, показали сходную картину и в отношении контаминированности *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп. Так, в зонах организованной рекреации выделено 53,5 % от всех вибрионов не O1/O139 серогрупп, в местах сброса сточных вод – 21,9 %.

Повышение информативности и ценности мониторинговых исследований вибриофлоры водных объектов определяется системным подходом к их организации и проведению, предусматривающим, наряду с выполнением стандартного бактериологического анализа, комплексную оценку экологических факторов водной окружающей среды, санитарно-химических и санитарно-микробиологических показателей качества воды в стационарных точках отбора проб, а также использование в схеме исследования экспресс- и ускоренных методов, направленных на индикацию и идентификацию микроорганизмов рода *Vibrio*, и методов молекулярного типирования в случае выделения культуры. Данный подход применяется нами в рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов г. Иркутска, осуществляемого в двадцати эпидемиологически обоснованных, согласованных в установленном порядке стационарных точках поверхностных водоемов города в течение ряда лет. В 2014 г. проведено исследование 721 пробы из поверхностных водоемов г. Иркутска, в том числе воды – 482, иловых отложений – 234, гидробионтов – четыре, водорослей – одна. Ускоренная индикация детерминант холерного вибриона (гены *wbeT*, *wbfR* и *hlyA*, *toxR*) на этапе бактериологического исследования показала наличие детектируемых фрагментов (*toxR*, *hlyA* и/или *wbeT*, *wbfR*) в 73 из 139 объединенных проб с бактериологическим подтверждением результатов лишь в 40 случаях (54,8 %). Интерес представляет одновременное обнаружение в пробах из Шишиловской протоки фрагментов генов *wbfR* (ген, детерминирующий биосинтез O139 антигена) и *toxR* (видоспецифический ген) при отсутствии выделения культур *V. cholerae* O139 в указанной точке. Проведенный с использованием инструментов программы BLAST анализ нуклеотидных последовательностей амплифицированных фрагментов *wbO139* показал их максимальное сходство (на 94-96 %) с депонированными в GenBank нуклеотидными последовательностями гена, отвечающего за синтез O-антигена, штаммов холерного вибриона O139 серогруппы – *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 (№AB012956) и *V. cholerae* O139 AI-1837 (№Y07786). Последовательностей с более высоким уровнем гомологии в международных базах данных не обнаружено. Эти результаты позволяют предполагать присутствие в водоеме холерного вибриона O139 серогруппы в некультивируемом состоянии или в концентрациях, ниже предела чувствительности бактериологического метода. Не исключено также, что исследуемые пробы могли содержать вибрионы других

серогрупп, обладающих высоким сходством структуры гена биосинтеза О-антигена с таковым O139 серогруппы. Однако данное предположение требует дальнейшего углубленного изучения.

Как отмечалось выше, в результате бактериологического исследования проб из поверхностных водоемов изолировано 40 культур холерного вибриона, в т.ч. одна идентифицирована как *V. cholerae* El Tor O1 серогруппы, остальные – *V. cholerae non* O1/O139. Вместе с тем, при включении в схему бактериологического исследования на этапе идентификации морфологически сходных с холерным вибрионом колоний MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа, основанного на определении протеомного профиля микроорганизмов [9], к *V. cholerae* отнесено 53 культуры. При этом выборочная молекулярно-генетическая идентификация культур по структуре таксономически информативных генов (*16S rRNA*, *rpoB*) в 100 % случаев соответствовала данным определения таксономической принадлежности по профилю константных белков микробной клетки, что указывает на вероятность гиподиагностики на основании фенотипических культуральных тестов в ходе мониторинговых исследований вибриофлоры поверхностных водоемов и подтверждает высокую диагностическую ценность масс-спектрометрического анализа.

Следует отметить, что в 2014 г. культуры холерного вибриона не O1/O139 изолированы в 16 из 20 стационарных точек поверхностных водоемов г. Иркутска, с максимальным их количеством в трех точках (Шишиловская протока – 10 культур, озеро у храма Михаила Архангела – 8 культур, р. Ангара, залив о. Юность – 4 культуры). Большинство штаммов *V. cholerae non* O1/O139 серогрупп в указанных точках изолировано в августе при температуре воды от 13 до 23 °С и рН в диапазоне от 8,0 до 9,6. Холерный вибрион O1 серогруппы выделен также в августе в одной из этих точек – р. Ангара, залив о. Юность. При этом анализ санитарно-гигиенического состояния указанного участка водоема выявил нестандартные показатели в 25 % исследуемых проб с превышением предельно допустимых концентраций ОКБ и ТКБ в 1,3 и 5,3 соответственно, что может свидетельствовать об антропогенном воздействии на данный участок водоема.

С другой стороны состояние водной экосистемы и интенсивность биогенной нагрузки на водоём можно охарактеризовать по обилию и видовому составу развивающихся в нем водорослей (Баринава, 1998; Рысин 1995 и др.). Исследование методом Пантле-Бука в модификации Сладечека [5], основанным на разной чувствительности водорослей к присутствию в водной среде растворенной органики, показало, что качество воды в стационарной точке, где был обнаружен холерный вибрион O1 серогруппы и в одной из точек с максимальным количеством изолированных штаммов холерного вибриона не O1/O139 (Шишиловская

протока), соответствует III классу чистоты (в р. Ангара залив о. Юность – степень сапробности соответствует олиго-альфамезосапробной зоне самоочищения, индексы сапробности до 1,78 – 1,9; Шишиловская протока – степень сапробности соответствует бета-мезосапробной зоне самоочищения, индексы сапробности 1,99 – 2,02). Следует отметить, что в одной из анализируемых точек – р. Сарафановке – установлена наибольшая антропогенная нагрузка (альфа-бета-мезосапробная зона, IV класс чистоты воды), поскольку водоросли здесь не обнаружены, что характерно для вод, в которых находятся токсические вещества. Интересен тот факт, что в 2014 г. в р. Сарафановке на протяжении всего периода исследования микроорганизмы рода *Vibrio* не обнаруживались, тогда как ранее в указанной стационарной точке практически ежегодно изолировались штаммы холерного вибриона не O1/O139, а в отдельные годы – *V. cholerae El Tor* O1 серогруппы.

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует об антропогенном воздействии на отдельные участки водных объектов г. Иркутска, их органическом загрязнении и формировании экологических предпосылок для накопления и сохранения в них микроорганизмов рода *Vibrio*.

Подтверждением этому служат данные проведенного по факту выделения штамма *V. cholerae El Tor* O1 эпидемиологического расследования, по результатам которого выявлены случаи нарушения санитарно-гигиенических норм на предприятиях, осуществляющих хозяйственную деятельность в береговой зоне водоемов залива о. Юность и Шишиловской протоки. В дополнение к этому, установленная при комплексном молекулярном типировании уникальность MLVA- и PFGE-профилей изолированного штамма в сравнении с генотипами выделенных в предыдущие годы из водоёмов г. Иркутска культур свидетельствует о заносе вибриона в водный объект.

Молекулярно-генетическая характеристика этого штамма показала отсутствие у него фрагментов генов холерного токсина *ctxAB*, токсинорегулируемых пилей адгезии *tcpA* и краевых фрагментов генов «островов пандемичности» *tnp0183* и *pro0490*, что говорит об его эпидемической безопасности. Вместе с тем, следует учитывать вероятность обмена генетической информацией между микроорганизмами в условиях водной окружающей среды, что определяет целесообразность исследования генетической структуры микробных популяций водной экосистемы. Исследование группы изолированных из поверхностных водоемов в 2014 г. вибрионов не O1/O139 серогрупп выявило их дифференциацию на генотипы в зависимости от наличия/отсутствия детерминант персистенции, дополнительных генов вирулентности и видоспецифических генов. У всех штаммов отсутствуют детерминанты патогенности, фрагменты «островов пандемичности» и гены отвечающие

за принадлежность к O1 и O139 серогруппам. В геноме всех изолятов присутствуют гены *rtxA*, *rtxC*, *vpsR*. По остальным генам популяция вибрионов оказалась неоднородна: ген *toxR* содержат 87,5 % штаммов, *hlyA* – 83 %, *hapA* – 75 %, ген порина наружной мембраны – 54 % и *mshQ* детектирован у половины изолятов. При этом наличие генов, отвечающих за адаптацию вибрионов к среде обитания (*mshA*, *mshQ*, *hapA*), оказалось характерно преимущественно для персистирующих в течение сезона в определенных стационарных точках штаммов. Кроме того, среди вибрионов не O1/O139 обнаружены изоляты, содержащие в своем геноме SXT, который рассматривается в качестве элемента, обеспечивающего возможность приобретения бактерией-хозяином детерминант резистентности к антибактериальным препаратам [10]. Фенотип резистентности этих штаммов к антибактериальным препаратам полностью соответствует данным генетического анализа. Сопоставление результатов детекции SXT с молекулярным типированием показало, что все SXT⁺ штаммы относятся к одному MLVA-генотипу. Полученные данные позволяют рассматривать такие варианты вибрионов в качестве потенциальных доноров SXT элемента, а собственно наличие указанного генетического блока может расцениваться как эпидемиологическая метка определенной группы штаммов.

Высоковариабельны изоляты *V. cholerae non O1/O139* оказались и по структуре локусов тандемных повторов при MLVA типировании. Тем не менее, в отдельных водных объектах г. Иркутска на протяжении ряда лет обнаружены вибрионы не O1/O139 серогрупп со схожими или идентичными аллельными профилями. Данный факт служит доказательством формирования в определенных участках водоемов благоприятных для существования, накопления и сохранения холерного вибриона условий, т.н. «участков риска». По данным ретроспективного анализа такие участки водоемов с практически ежегодным выделением из проб воды вибрионов не O1/O139 серогрупп сформировались в поверхностных водоемах и на других территориях, в частности в Хабаровском и Приморском крае [1, 3]. Учитывая изложенное, такие «участки риска» водоемов должны подвергаться комплексному мониторингу (санитарно-гигиеническому, микробиологическому, эпидемиологическому, экологическому) с применением современных молекулярных технологий при бактериологическом исследовании и идентификации культур в рамках эпидемиологического надзора за холерой.

Проведенный в рамках деятельности Регионального центра по мониторингу возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности анализ биологических свойств изолированных в 2014 г. на территории Сибири и Дальнего Востока штаммов *V. cholerae El Tor* выявил типичность их по культурально-морфологическим и биохимическим

свойствам. Все изоляты относятся к серогруппе O1, сероварианту Инаба. Гетерогенность свойств вибрионов прослеживается по чувствительности к фагам: два изолированных в Приморском крае штамма оказались резистентны к холерным диагностическим фагам С, эльтор и типизирующим фагам Дрожевкиной-Арутюнова. Остальные штаммы лизируются фагом эльтор, фагом С в начальном разведении и отнесены к 15 фаготипу. Все изолированные в 2014 г. штаммы *V. cholerae El Tor* чувствительны к широкому спектру антибиотиков. Вместе с этим, штаммы из Иркутской области и Забайкальского края проявляют резистентность к ампициллину, тетрациклину, канамицину и цефотаксиму, штаммы из Приморского и Алтайского краев – к одному или двум вышеперечисленным препаратам. При исследовании в ПЦР генетических детерминант резистентности к сульфаметоксазолу (*sulII*), триметоприму (*dfrA1/dfr18*), стрептомицину (*strB*) не выявлено, что соответствует фенотипу выделенных штаммов.

Молекулярно-генетическая паспортизация изолированных в регионе в 2014 г. штаммов *V. cholerae* O1 показала отсутствие в их геноме ключевых детерминант патогенности (*ctxA*, *tcpA*), «островов пандемичности» *tcpO183*, *proO490* (VSP-I и VSP-II, соответственно) на фоне наличия детерминант кластера цитотоксина RTX (*rtxA*, *rtxC*), «острова персистенции» EPI (*mshQ*), генов гемагглютининпротеазы – *hapA* и регулятора синтеза экзополисахарида – *vpsR*. Ген порина наружной мембраны *ompU* выявлен в геноме лишь одного штамма. По результатам молекулярного типирования установлены определенные территориальные особенности распределения генотипов изолированных из объектов окружающей среды штаммов холерного вибриона эльтор. Так, кластерный анализ MLVA-профилей выявил идентичность генотипа двух штаммов из р. Седанка Приморского края и уникальность аллельных профилей остальных изолятов. Все штаммы не содержат локус VcB, ассоциированный с токсин-корректируемыми пиллями адгезии. Аналогичные данные получены и при макрорестрикционном анализе хромосомной ДНК: два штамма из р. Седанка демонстрируют идентичные PFGE паттерны, тогда как остальные характеризуются уникальными пульс-электротипами.

Таким образом, комплексный системный подход к проведению мониторинговых исследований вибриофлоры с физико-химической, санитарно-гигиенической, экологической оценкой состояния водных объектов, внедрением современных молекулярных технологий в диагностический процесс дает возможность своевременно выявить экологические и эпидемиологические риски осложнения ситуации и оперативно определить приоритетные направления профилактических и противоэпидемических мероприятий, осуществляемых в рамках эпидемиологического надзора за холерой.

Литература

1. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В. и др. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Хабаровского края в 2013 г. // Пробл. особо опас. инф. - 2014. – Вып. 1. – С. 121-125.
2. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. и др. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005 – 2014 гг., прогноз на 2015 г. // Пробл. особо опас. инф.- 2015 – Вып.1. – С. 18-25.
3. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012 / под ред. акад. РАМН Г.Г. Онищенко. – Новосибирск: Наука-Центр, 2013. – 419 с.
4. Опасные инфекционные болезни за рубежом. – 2015. – Вып. 1/2.
5. Сладечек В.. Общая биологическая схема качества воды // Санитарная и техническая гидробиология. М.: Наука, 1967. – С. 26–31.
6. Cholera, diarrhea & dysentery update 2015 (10): Americas, 2015 [Internet]. 05 Mar 2015 [cited 05 Mar 2015]. Archive number: 20150305.3208679. Available from: <http://www.promedmail.org>.
7. Cholera, diarrhea & dysentery update 2015 (13): Africa, Americas, 2015 [Internet]. 31 Mar 2015 [cited 31 Mar 2015]. Archive number: 20150331.3268472. Available from: <http://www.promedmail.org>.
8. <http://www.promedmail.com>.
9. Patel R. MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases. // Clin Chem. 2015; 61(1):1 00-11. doi: 10.1373/clinchem.2014.221770.
10. Ramachandran D., Bhanumathi R., Singh D. V. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae* // J. Med. Microbiol. – 2007. – Vol. 56. – P. 346–351.
11. Weekly epidemiological record - 2011. - Vol.86, No. 31- P. 325-340.
12. Weekly epidemiological record - 2012. - Vol.87, No. 31-32 - P. 289 – 304.
13. Weekly epidemiological record - 2013. - Vol.88, No. 31- 32 - P. 321-336.
14. Weekly epidemiological record - 2014. - Vol.89, No. 31- P. 345-356.

ОБ УСИЛЕНИИ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ОТ ЗАНОСА И РАСПРОСТРАНЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ БОЛЕЗНЕЙ, В ТОМ ЧИСЛЕ ХОЛЕРЫ, И ОСНОВНЫХ ЗАДАЧАХ НА 2015 ГОД

М.Ю. Соловьев, Е.В. Ковалев, С.А. Ненадская, С.С. Слись, Н.В. Леоненко,
Г.А. Мирошниченко, Л.В. Лемешева

*Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека по Ростовской области*

В настоящее время в мире продолжает оставаться неустойчивая эпидемиологическая обстановка по ряду инфекционных болезней, способствующая возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения на территории Ростовской области.

Ростовская область относится к первому типу территорий по эпидемическим проявлениям холеры, поэтому мероприятия по эпидемиологическому надзору за холерой проводятся комплексно всеми службами и ФКУЗ «Ростовский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

Откорректирован комплексный план противохолерных мероприятий на территории Ростовской области на период 2013 – 2017 годы (утвержден 22.02.2013 Руководителем Управления Роспотребнадзора по Ростовской области – М.Ю. Соловьевым). Переутверждены составы, структура и функции городских и районных медицинских штабов на случай выявления особо - опасных инфекционных заболеваний, оперативные планы проведения противоэпидемических мероприятий при выделении из объектов окружающей среды токсигенных холерных вибрионов O1 или O139 групп и проведения первичных противоэпидемических мероприятий при выявлении больного (трупа) с подозрением на холеру на территории области.

Вопросы готовности заинтересованных служб и ведомств к проведению комплекса мероприятий ежегодно заслушиваются, на заседании комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при Правительстве Ростовской области, в том числе в 2014 году «О мероприятиях по санитарной охране территорий от заноса и распространения инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, в том числе холеры» (протокол № 2 от 12.02.2014), аналогичные комиссии проведены во всех территориальных округах.

Специалистами Управления Роспотребнадзора по Ростовской области (далее – Управление) проводится оценка готовности лабораторной и госпитальной базы ЛПО, совместно со специалистами ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»; в 2015 году проверено 22 отделения ЛПО с оценкой их готовности к развёртыванию в случае возникновения осложнений эпидемической ситуации по опасным инфекционным болезням, в том числе холере: г. Ростове-на-Дону (МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко города Ростова-на-Дону», МБУЗ «Городской больницы № 20 города Ростова-на-Дону»), МБУЗ «Городская больница № 1 города Новошахтинска», МБУЗ ЦРБ Матвеево-Курганского района, МБУЗ ЦРБ Куйбышевского района, МБУЗ ЦРБ Белокалитвенского района, МБУЗ ЦРБ Неклиновского района, МБУЗ ЦГБ г. Гуково, МБУЗ ЦГБ г. Донецка, бактериологические лаборатории МБУЗ ЦРБ Миллеровского района и МБУЗ ЦРБ Красносулинского района и др., в т.ч. по вопросам соблюдения биологической безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности. Руководителям Управлений здравоохранением данных муниципальных образований и главным врачам ЛПО даны рекомендации по доукомплектованию штата врачами-инфекционистами. Определены мероприятия и сроки доукомплектования в требуемом количестве средствами этиотропной и патогенетической терапии, дезинфекционными средствами и средствами индивидуальной защиты медицинского персонала (противочумными костюмами I типа).

Управлением совместно с Министерством здравоохранения Ростовской области, ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» и ГБОУ ВПО Ростовским государственным медицинским университетом проведены областные и кустовые семинары-совещания (08.04.2014, 10.04.2014, 16.04.2014) со специалистами территориальных отделов Управления, филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» и медицинскими работниками ЛПО (в том числе ССП) по вопросам: «Профилактика инфекционных заболеваний и «сигнальные признаки» особо опасных болезней и других актуальных инфекции, требующих проведение мероприятий по санитарной охране территории».

За период 1996 - 2014 гг. случаев заболевания холерой или вибрионосительства на территории Ростовской области не зарегистрировано. Последний случай заболевания холерой, вызванный токсигенным штаммом холерного вибриона, был зарегистрирован в 1995 году в г. Ростове-на-Дону.

Ежегодно Управлением корректируется и утверждается Перечень стационарных точек отбора проб воды открытых водоемов, сточных вод, который согласовывается с референс-центром по мониторингу возбудителя холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт

Роспотребнадзора (от 24.03.2014).

В рамках Государственного заказа 05.05.2014 был организован забор проб воды для бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов из стационарных точек открытых водоемов. Под особым контролем находятся водоемы, берущие начало из сопредельных территорий. Дополнительно были определены 4 точки для отбора проб воды из Азовского моря, акватории, граничащей с Украиной, а также из реки Калитва, где базируются 3 детских оздоровительных лагеря.

ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» при проведении лабораторных исследований проб воды на вибриофлору, отобранных из поверхностных водоемов с 05.05.2014 по 29.09.2014 отобрано 3613 проб (7226 исследований), из которых в 673 выявлены *Vibrio cholerae* non O1/ non O139, или 18,6 % (2013 – 20,2 %).

В связи с выделением из стационарной точки № 6 (г. Ростов-на-Дону, река Темерник, Ботанический сад у моста) токсигенной культуры *Vibrio cholerae* El Tor Inaba № 81 (дата забора – 07.07.2014), Управлением:

- разработан межведомственный план оперативных мероприятий (далее – План), утвержденный 10.07.2014 заместителем Губернатора Ростовской области

В соответствии с Планом организовано 3-х кратное исследование воды на вибриофлору из реки Темерник филиалом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в г. Ростове-на-Дону и ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 10.07.2014, 11.07.2014, 12.07.2014. Проведен 11.07.2014 отбор воды для исследования на вибриофлору в двух дополнительных точек (Северное море, Ростовское море).

Проведены рабочие совещания при Главном государственном санитарном враче по Ростовской области (14.07.2014, 18.07.2014) по вопросам:

- О выполнении Плана и др. директивных документов в связи с выделением 10.07.2014 ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора;

- О выполнении мероприятий Плана и др. директивных документов, а также о мерах по случаю выделения ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора 17.07.2014 из стационарной точки № 3 (г. Ростов-на-Дону, река Темерник, у моста Текучева) атоксигенной культуры *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa № 54 (дата забора – 14.07.2014).

- Принято Постановление Главного государственного санитарного врача по Ростовской области № 6 от 10.07.2014 «Об ограничении использования водных объектов в границах г. Ростова-на-Дону и проведению противоэпидемических мероприятий».

Информация о случае выделения токсигенного холерного вибриона из р. Темерник направлена в адрес заместителя Губернатора Ростовской

области (исх. № 08-98/9260 от 10.07.2014), МЗРО (исх. 08-98/9393 от 10.07.2014), Управление ФМС по Ростовской области (исх. № 08-98/9394 от 10.07.2014), Управление здравоохранением г. Ростова-на-Дону (исх. № 08-98/9396 от 10.07.2014) и другие заинтересованные организации.

Проведено заседание городской комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Администрации г. Ростова-на-Дону «О мероприятиях в связи с осложнением эпидемической ситуации и выделением токсигенной культуры холерного вибриона из реки Темерник» (протокол от 11.07.2014 № 4).

Из объектов окружающей среды лабораторией ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» из проб воды поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону выделено 2 штамма холерных вибрионов, которые подтверждены ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, идентифицированы как атоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa № 16 (из стационарной точки № 4, г. Ростов-на-Дону, река Дон, у железнодорожного моста), дата забора – 02.06.2014 и *Vibrio cholerae* O1 El Tor Ogawa № 54 (из стационарной точки № 3, г. Ростов-на-Дону, река Темерник, у моста Текучева), дата забора – 14.07.2014.

Управлением совместно с ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора принимались меры оперативного реагирования по поиску источника контаминации водоемов согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». Из 10 проб воды, отобранных по эпидемическим показаниям, в 2 пробах выявлены *Vibrio cholerae* non O1/non O139 серогруппы.

Бактериологическое обследование на холеру подлежащих контингентов осуществляется на базе бактериологических лабораторий ЛПО. Так, в 2014 году с мая по сентябрь обследован 9921 больной ОКИ, в 11 случаях выделен *Vibrio cholerae* non O1/ non O139. Среди граждан, вынужденно покинувших территорию Украины и размещенных в ППВР в Ростовской области 143 обследованы на холеру. Все культуры подтверждены в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» и ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Кроме того, в Красносулинском районе, хутор Черниково, палаточный пункт временного размещения (ППВР) граждан, вынуждено покинувших территорию Украины, с 22.07.2014 по 23.07.2014 зарегистрировано 10 случаев заболевания сальмонеллезной инфекцией гастроэнтеритическая форма средней степени тяжести, в том числе детей до 17 лет – 8. При проведении ПЦР - исследования, проведенного ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», в нативном материале у 10 заболевших определена ДНК *Salmonella* spp., все

пострадавшие были обследованы на холеру, результаты отрицательные.

Управление регулярно направляет информацию в Департамент инвестиций и предпринимательства Ростовской области, а также доводит информацию до фирм и агентств, занимающих туроператорской или турагентской деятельностью, о ситуации в мире по особо опасным и природно-очаговым болезням, а также мерам личной профилактики, используя средства массовой информации, в т.ч. сайт Управления.

В 2014 году проводилась работа по выявлению случаев инфекционных заболеваний у иностранных граждан и лиц, въезжающих на территорию страны с целью осуществления трудовой деятельности.

В Управлении в соответствии с Приказом от 29.12.2012 № 669, работает Межведомственная комиссия для подготовки и представления в Роспотребнадзор материалов для принятия решения о нежелательности пребывания (проживания) иностранного гражданина или лица без гражданства, выявленного на территории Ростовской области.

В 2014 году по итогам медицинского освидетельствования 32 563 иностранных граждан подготовлено и направлено в Федеральную службу 52 проекта решений о нежелательности пребывания иностранных граждан или лиц без гражданства на территории РФ. Роспотребнадзором принято 20 решений о нежелательности пребывания (проживания) иностранного гражданина или лица без гражданства на территории РФ.

С июля месяца 2014 года введена статистическая форма учета заболеваемости среди граждан, прибывших в Российскую Федерацию в связи с гуманитарной ситуацией на Украине. По официальным статистическим данным за период с июля по декабрь 2014 года зарегистрировано 48 случаев инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих, в том числе ВИЧ-инфекцией – 26, туберкулезом – 22. Медицинское освидетельствование прошли 11908 граждан Украины.

По данным УФМС в 2014 году покинули территорию Российской Федерации 10 иностранных граждан, у которых выявлены инфекционные заболевания (ВИЧ-инфекция, туберкулез и сифилис).

Таким образом, в Ростовской области выполнение всех составляющих эпиднадзора за холерой, активное межведомственное взаимодействие по вопросам санитарной охраны территории области от заноса и распространения опасных инфекционных болезней позволяет своевременно выявлять предпосылки (риски) осложнения эпидситуации и своевременно проводить адекватные противоэпидемические мероприятия.

ОБ ЭПИДМОНИТОРИНГЕ ХОЛЕРЫ, ОСУЩЕСТВЛЯЕМОМ ФБУЗ «ЦЕНТР ГИГИЕНЫ И ЭПИДЕМИОЛОГИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ» И ЕГО ФИЛИАЛАМИ

Г.Т. Айдинов, М.М. Швагер, А.В. Полонский, Н.В. Половинка,
А.Ю. Гончаров

*ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»
г. Ростов-на-Дону*

Седьмая пандемия холеры, объявленная более полувека назад (1961г.), не имеет тенденции к резервационному становлению возбудителя инфекции, т.к. она характеризуется интенсивным и широкомасштабным распространением в странах Африки, Азии, Америки с межгосударственным и межконтинентальным завозом инфекции в страны Европы, другие государства, где разлитой эпидемический процесс во времени и пространстве связан с чрезвычайными ситуациями природного и техногенного характера и в определенной мере обусловлен генетически измененными вариантами *V.cholerae El Tor* [1,4].

Не драматизируя исторические события по холере в стране (СССР - 1970г., г. Батуми, в других городах - Астрахань, Одесса, включая и территорию Ростовской области, а с начала 90-х годов в населенных пунктах Российской Федерации), следует отметить, что при отсутствии больных в 2014г. из воды поверхностных водоемов в 9 субъектах РФ изолировано 36 штаммов *V.cholerae El Tor* сероваров Огава-25, Инаба-11 и РО вариант- 1, в том числе атоксигенных- 35 и один токсигенный, который выделен из стационарной точки ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и не является идентичным штамму, выделенному из воды Таганрогского залива в 2011 году в период эпидемического осложнения по холере в г. Мариуполе (Украина)[3,8].

Наша работа по профилактике холеры направлена на мониторинг объектов окружающей среды на вибриофлору, обеспечивая санитарную охрану территории, включая полный комплекс неотложных мер по профилактике инфекции, в том числе лабораторные исследования материала от лиц, подвергшихся риску заражения, больных с подозрением на заболевание холерой, идентификация выделенных культур *V.cholerae* non O1/ non O139 из водных объектов и от больных с ОКИ, независимо от условий лечения – стационарного или поликлинического [1,2,3].

В эпидемический сезон по холере 2014 года (май-сентябрь) в лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (далее Центр), было подтверждено 11 культур *V.cholerae* non O1/non O139 , выделенных от 11 больных с

первичным диагнозом: острый гастроэнтероколит.

Для сравнения в эпидсезон по холере 2013 года в Российской Федерации таких культур от людей выделено не было, а в 2012 году зарегистрировано 2 случая заболевания, вызванного холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп в Ростовской области [5,6].

В ходе эпидмониторинга холеры 2014 года нами проведено исследование 3613 проб воды из открытых водоемов, против 3586 – в сезон 2013 года, а отбор проб воды проводился в 166 стационарных точках Управления и его территориальных отделов (ТО) [5].

Увеличение на 3 стационарные точки произошло за счет ТО в г. Миллерово, где добавились 2 точки по городу и одна в Тарасовском районе [6, 8].

В 2014 г. на территориях 6 ТО – Управления и филиалов Центра (г.г. Волгодонск, Шахты, Миллерово и Орловском, Цимлянском, Шолоховском районах), где проводились исследования проб воды открытых водоемов, не было зафиксировано положительных результатов на холеру.

В 2013 году таких территорий было 4 (г.г. Волгодонск, Шахты, Цимлянский и Миллеровский районы).

В 2013 году была выделена 651 культура холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, а в 2014 г. 673 культуры, что составило соответственно 20,2% и 18,6% положительных результатов от числа исследованных проб, но говорить о стабильности эпидпроцесса, очевидно, преждевременно.

По типу проявления эпидпроцесса по холере Ростовская область относится к I типу. По внутриобластному распределению по 2012 год включительно 14 территорий (23,7%) с 92 стационарными точками (55,4%) относились к I типу, 22 территории (37,3%) ко II типу и 23 территории (39,0%) к III типу [1,2,3].

С 2013 года все 59 административных территорий области (16 городов и 43 района) переведены в I группу проявления эпидпроцесса по холере, что должно было обоснованно вызвать увеличение количества проб воды на территориях, ранее относящихся ко II и III типу.

Но этого не произошло, причем в ряде ТО - в г. Азове, зерноградский и Кагальницкий районы; Боковский и Кашарский районы ТО в Шолоховском районе; Заветинский и Ремонтненский районы ТО в г. Волгодонске; Милютинский, Обливский, Тацинский, Советский районы ТО г. Белая Калитва; Зимовниковский, Мартыновский, Орловский районы ТО в Орловском районе, количество проб из стационарных точек не только не увеличено, но даже отсутствует.

С другой стороны мы обращаем внимание, что по стационарным точкам ТО в г. Новочеркасске количество положительных находок увеличилось на 27 (2013г. – 23 культуры холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, 2014г. - 50), ТО г. Белая Калитва на 51 случай (18 и 69

соответственно) и все по г. Белая Калитва и Белокалитвенскому району. Увеличение положительных результатов ТО в г. Таганроге произошло за счет роста на 16 случаев в Куйбышевском и на 42 в Матвеево - Курганском районах. [4]

Наряду с этим отмечаем снижение высеваемости культур *V.cholerae* по O1/поп O139 на 32 случая в г. Азове и в г. Сальске на 42 случая [4,5].

Отнесение всех муниципальных образований области к I типу территорий по эпидпроявлениям холеры должно было привести к увеличению кратности бактериологического обследования больных с ОКИ, что не произошло в течение последних двух лет, больные с ОКИ на этих территориях продолжали обследоваться однократно или вообще не обследовались при амбулаторно-поликлиническом лечении.

По многолетнему анализу вибриофлоры открытых водоемов можно констатировать, что первые две недели отбора материала из стационарных точек (май) в равной мере, как и последние 2-3 недели окончания эпидсезона (сентябрь), как правило, не имеют положительных результатов.

На наш взгляд, нецелесообразно проведение трехкратных бактериологических исследований проб воды поверхностных водоёмов, зон рекреации и водозаборов при обнаружении атоксигенных *V. cholerae* O1 El Tor до получения трех отрицательных результатов, так как такая работа на протяжении десятка лет, неся существенные финансовые затраты, не имела эпидемиологической эффективности.[5]

Таким образом, эпидемическая ситуация по холере в Ростовской области, несмотря на сезонные колебания острых кишечных инфекций, остается стабильной, что подтверждают результаты мониторинга вибриофлоры.

Литература

1. Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Гайбарян К.С. и др., Об итогах деятельности ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» по мониторингу вибриофлоры после реорганизации Госсанэпидслужбы // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2010. – Вып. 23 – С. 18-20.

2. Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Гайбарян К.С. и др. О роли ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в обеспечении мониторинга холеры и эпиднадзора за ОКИ // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. – С. 37-42.

3. Айдинов Г.Т., Швагер М.М., Гайбарян К.С., Богунов И.И. О мониторинге холеры в рамках деятельности службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в Ростовской области// Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27. – С. 22-27.

4. Безсмертный В.Е. и др. Информация и биологических свойства холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2013 году. – М., 2014. – С.1-5.

5. Киреев Ю.Г., Мазрухо А.Б., Водопьянов С.О. и др. Данные о выделении холерных вибрионов при эпидемиологическом надзоре, изолированных их поверхностных вод рек. Дон и Темерник в 2013 году // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27. – С. 51-53.

6. Соловьёв М.Ю., Ковалёв Е.В., Ненадская С.А. и др. О деятельности Управления Роспотребнадзора по Ростовской области по санитарной охране территории Ростовской области от заноса и распространения холеры в 2013 году // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27. – С. 19-22.

7. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила; СП 3.1.1.2521-09. – М., 2009.

8. Эпидемия холеры в СССР в 1970г. / В.Ф. Попов // МИБП ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздравсоцразвития. – М., 2011.

ПРОБЛЕМА ВЫЯВЛЕНИЯ ВИБРИОФЛОРЫ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЛЮДЕЙ И В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Г.В. Гальцева, Л.В. Пономарёва, О.А. Христенко, О.П. Малай
*ФКУЗ Причерноморская противочумная станция Роспотребнадзора,
г. Новороссийск*

По современной классификации бактерий к семейству *Vibrionaceae* относится основной таксон-род *Vibrio Pacini* 1854, включает 44 вида. Характеристика видов бактерий состоит из типовых штаммов в соответствии с основным положением «Международного Кодекса номенклатуры бактерий» от 1978 года. В вид *Vibrio cholerae* (А.00-МКБ 10) включены биотипы: *V. cholerae cholerae Classical* (А.00.0), *V. cholerae El Tor* (А.00.1), *V. cholerae non O1*(А.009), *V. cholerae biovar albensis* [4]. Возбудителями холеры являются *V.cholerae* O1/O139, а холероподобных

заболеваний - *V. cholerae* non O1/O139 и *V. albensis*. Светящиеся вибрионы практически отсутствуют в отечественных публикациях и НД.

Биолюминесценция - особый вид хемилюминесценции, выявленный в клетках вибрионов (эмиссия квантов света). Функция свечения осуществляется при образовании ферментсубстратного комплекса (люциферин-люцифераза). Биолюминесценцию вибрионов выявляют на питательных средах при просмотре посевов в темноте 3-5 минут. Функция свечения варьирует в зависимости от свойств среды или утрачивается и они неотличимы от *V. cholerae* non O1/O139. Необходимо учитывать и факт серологического родства неагглютинирующихся и светящихся вибрионов [1]. Штаммы из коллекции R.Sakazaki серотипов 2,8,9,18,19,38,39 агглютинировались кроличьими сыворотками к *V. albensis*, на которые получены авторские свидетельства. В 1924г. З.В. Ермольева выделяла светящиеся вибрионы от больных ОКИ по клинической картине сходными с холерой. В РостНИПЧИ в 1970-1972гг. выделили 167 штаммов *V. albensis* от людей. Заболевания протекали как гастроэнтерит, диспепсия, ПТИ различной степени тяжести. Светящиеся вибрионы выделяли на территориях Сибири и Дальнего Востока, Узбекистана, Украины, Молдовы, Дагестана, Краснодарского края, Астраханской области. Мы изучили 463 штамма из Гурьевской ПЧС. Штаммы вибрионов из СтавНИПЧИ отличались по антигенным свойствам, 5 из них нами депонированы в ГКПБ Саратовского института «Микроб» и получены приоритетные справки. Всего изучено 2,5 тысячи штаммов *V. albensis*. Холерные вибрионы не О1 от больных выделяли на всей территории страны, теперь редко. Серологические свойства вибрионов не являются таксономическими признаками. Это дополнительная характеристика штаммов вибрионов в пределах вида *V. cholerae*. При мониторинге проб поверхностных водоёмов идентифицируют только *V. cholerae* и никто не выделяет вибрионы других видов.

С 80-х годов прошлого столетия выявили причину диарейных заболеваний - *V. fluvialis*. В Бангладеш при вспышке диарей выделено 500 штаммов *V. fluvialis*. Вспышки описаны в США, Азии, новорожденных в Бразилии, во Флориде, в Гавайи. В 1986г. на 14 Международном конгрессе микробиологов в Манчестере проведено совещание по этим инфекциям. Холероподобный гастроэнтерит, вызванный *V. fluvialis* (тяжёлое течение), был у работницы водоканала Анапского района в Краснодарском крае в 90-е годы. *V. fluvialis*-природные обитатели пресной, морской, сточных вод и вызывают диарейные заболевания [2]. Патогенны эти вибрионы и для рыб, их с постоянством выделяли из устриц, креветок, мидий. Инфицирование людей патогенными вибрионами происходит при купании, профессиональном контакте с водной средой, употреблении в пищу инфицированных продуктов. В коллекции R.Sakazaki выявили, что O12, O23, O26 серотипы вибрионов типичные по таксономическим тестам

V. fluvialis. Эти вибрионы постоянно выделяли из морской воды на территории Краснодарского края на побережье Новороссийска, Сочи, Туапсе, а также из рек, озёр, прудов и т.д.

По результатам многолетних исследований установлено, что санитарное состояние некоторых поверхностных водоёмов на территории края остаётся напряжённым и свидетельствует о неудовлетворительных санитарно-гигиенических условиях водопользования населения. При этом никогда не учитываются показатели по вибриофлоре, которая является компонентом экосистем морских, речных, озёрных и других природных бассейнов на земле[3]. Из водоёмов выделяли фаги не только холерных вибрионов O1 и из не O1 серогруппы, светящихся, но и галофильных вибрионов, что также является индикаторным признаком их распространения в тех же точках отбора проб.

Галофильные вибрионы - естественный компонент биоценоза морских вод и вызывают вспышки ПТИ при употреблении морепродуктов, контаминированных *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. Они вызывают и заболевания рыб. Болезни рыб, вызванные *V. anguillarum*, известны как вибриозы - проблема для МинРыбХоза, так как приходится решать вопросы проведения и строгого соблюдения противоэпизоотических мероприятий при формировании хозяйств марикультуры. В стране галофильные вибрионы впервые от больных выделены в 1973г. в Новороссийске, а далее на Дальнем Востоке, Одессе, Крыму, Бердянске, Ростове и др. Но в отечественную классификацию болезней ПТИ не входят, а в международной классификации они фигурируют с 1965 года.

В 1981г. ВОЗ обратилась к учёным мира с призывом принять участие в глобальной программе по изучению диарейных заболеваний и галофильные вибрионы, после холеры, стоят на втором месте.

V. mimicus - негалофильные вибрионы генетически близкие к возбудителям холеры, вызывают диарейные заболевания, особенно у детей младшего возраста, ранее выявляли в Краснодарском крае.

V. mimicus в стране выделяли из сточных вод, морской воды, гидробионтов и клинического материала. *V. vulnificus* (7серотипов) наиболее инвазивные и патогенные для человека возбудители тяжелых раневых инфекций (некрозы кожных и мягких тканей), пневмоний, септицемий, менингитов, эндометритов, перитонитов, миозитов, заболевания глаз и диарей. В Новороссийске *V. vulnificus* выделяли от больных при ранении стопы в морской воде, при нарушении кожных покровов голени с развитием некрозов, высокой температурой и др.

В 2013г. впервые за 30 лет выделили *V. cholerae El Tor*, Ogawa эпидемически неопасные из лиманчика у перешейка выхода в море в г. Новороссийске. Ежегодно выделяются из проб воды *V. cholerae non O1/O139*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. anguillarum*, *V. mimicus*, *V. vulnificus*, *V. harveyi*, *V. pelagius*, *V. hollisae*, *V. mimicus*, *V.*

*natrie*gens, *V.cincinnatiensis* и др. Перспективно иметь типовые штаммы *V.spp.* ATCC, NCTC для сравнительного изучения выделяемых штаммов с целью профилактики заболеваний, вызываемых *V.spp.* Поэтому, следует в планах и программах по санитарному контролю предусматривать и исследования по условно патогенным вибрионам. Пополнение коллекции вибрионами различных видов *V. spp.* рода *Vibrio* позволит выявить индикаторные культуры, разработать показатели по предельно допустимым нормам, внести эти показатели в ГОСТы, ориентировать медицинские образования (МО) на исследования материала от больных и на условно патогенные вибрионы. Необходимо научное обоснование эколого-гигиенических критериев для оценки качества водных бассейнов и разработка предупредительных мер, связанных с защитой антропогенного загрязнения окружающей среды. Ведь среди микробных показателей доминируют бактерии *Proteus*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Staphilococcus*, *Salmonella* и др., а где *Vibrio*?

Литература

1. Г.В.Гальцева А.Б.Хайтович, Г.М.Голковский и др. Светящиеся вибрионы и их этиологическая роль при острых кишечных инфекциях //Тез. докл. Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. -Москва.-1985.-С.185-187.
2. Г.В.Гальцева, А.М.Зайдёнов, Э.Л.Черноусова и др. Холероподобный гастроэнтерит, обусловленный *Vibrio fluvialis* //Сборник научных трудов - Новороссийск. - 1994. – С.129-132.
3. Г.В.Гальцева, А.М.Зайдёнов, Р.А.Брудный и др. Энтеропатогенная вибриофлора как компонент водных экосистем в зонах рекреации Черноморского побережья.// Всесоюз. конф. Тез. докл. «Экологическое состояние рекреационной зоны Юга Европейской части СССР». - Тбилиси.-1990.-С.89-90.
4. DonJ.Brenner, Noel R, Krieg James et al., // Bergey's Manual of Systematic Bacteriology second edition Volume Two the Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria. -2004.-P.493-546

К ВОПРОСУ О ПОЛОЖЕНИИ ХОЛЕРЫ В СИСТЕМАТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, Л.В. Миронова, С.В. Балахонов
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск

Актуальность проблемы холера обусловлена существованием истинных и вторичных эндемичных очагов в Азии и Африке, укоренением инфекции на Американском континенте, распространением гибридных вариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с эпидемическим и пандемическим потенциалом, а также постоянной угрозой трансконтинентальных и международных завозов холеры на территорию нашей страны.

С начала седьмой пандемии холеры Комитет экспертов ВОЗ (1968) признал поверхностные водоемы самостоятельной заражающей средой. Однако по отечественной классификации инфекционных болезней с учетом специфики резервуара и особенности передачи патогена [3, 4, 10] холера относится к антропонозам с фекально-оральным механизмом передачи и единственным источником инфекции. Анализ результатов исследований отечественных авторов [2] позволил отметить существование инфекционных болезней, занимающих промежуточное положение среди трех классов, и целесообразность отнесения холеры к сапрозооантропонозам. Экосистемный подход к пусковому механизму эпидемий на примере холеры подвел других авторов [5, 12] к заключению о необходимости пересмотра её в систематике инфекционных болезней по экологическому признаку и включения в класс сапронозов.

Резервуаром для холерного вибриона могут быть такие водные цветковые растения, как водный гиацинт *Eichornia crassipes*, обеспечивающий сохранение токсигенного вибриона в межэпидемический период в Бангладеш [27], Индии [14], и ряска *Lemna minor* [20]. Установлена роль в резервации холерного вибриона содержащих хитин поверхностей таких ракообразных, как креветки, крабы, а также остатков их экзоскелетов, продуктов их линьки и погадок [13, 17, 19, 22, 23, 25, 26]. Показана способность холерного вибриона к росту и размножению в клетках амёб *Acanthamoeba polyphaga* и *Naegleria gruberi* [28], инфузорий *Tetrahymena pyriformis* [9] с сохранением возбудителя при образовании цист простейших, защищающих его подобно хитину ракообразных от дезинфицирующих веществ или микробного антагонизма [21]. Личинки хирономид (*Chironomidae*, Diptera), составляющие основу зообентоса континентальных водоемов и литоральной зоны морей, также являются резервуаром *V. cholerae* [15, 16]. При этом передача летающими хирономусами холерного вибриона играет роль в его распространении. Кроме того, попавший в кишечник водоплавающих птиц *V. cholerae* может переноситься на большие расстояния [7, 11, 24], чем возможно объяснить обнаружение холерного вибриона в водоемах, редко посещаемых человеком и удаленных от мест постоянной циркуляции патогена. Обнаружение холерного вибриона в кишечнике рыб [1, 18] и у водоплавающих птиц подтверждает роль зоонозного компонента в фазе резервации и распространения этого заболевания, а многообразные связи холерного вибриона в составе пищевых цепей водных экосистем

раскрывают эти механизмы и обуславливает сапронозность возбудителя.

Водный характер вспышек холеры в Сибири и на Дальнем Востоке России, связанный с попаданием токсигенного холерного вибриона в водоемы посредством заноса, сохранения и накопления возбудителя до инфицирующих доз обосновывает роль организма человека как источника инфекции и подтверждает антропонозную природу болезни [6, 8].

Представленные материалы, касающиеся среды обитания холерного вибриона и её значения в эпидемиологии холеры, свидетельствуют о целесообразности введения дополнительных классов (подклассов) в классификацию инфекционных болезней по экологическому признаку [2]. При этом резервуаром возбудителя (а при заражении человека и источником инфекции) могут являться больной или вибриононоситель, позвоночные и беспозвоночные животные, водные растения, прокариоты. Уточнение места холеры в классификации инфекционных болезней и возможных ее резервуаров будет способствовать совершенствованию комплекса профилактических мероприятий при эпидемиологическом надзоре за этой инфекцией.

Литература

1. Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С. Эколого-микробиологические аспекты эпиднадзора за холерой (по материалам Сибири и Дальнего Востока). – Saarbrücken: LAP LAMBERT Academic Publishing GmbH & Co; 2013.
2. Белов А.Б. Вероятные перспективы развития экологической классификации инфекционных болезней человека по резервуарам возбудителей. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2013. – № 1. – С. 6 – 14.
3. Беляков В. Д., Яфаев Р. Х. Эпидемиология: Учебник. – М.: Медицина, 1989.
4. Зуева Л., Яфаев Р. Эпидемиология. – СПб: Фолиант, 2006.
5. Литвин В.Ю. Экосистемный пусковой механизм эпидемического проявления сапронозов (на примере холеры Эль-Тор). // Журн. микробиол. 1996. – № 3. – С. 11 – 15.
6. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С. и др. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры. // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2009. – № 2. – С. 21-25.
7. Мухамедов С.М., Ривкус Ю.З., Митропольский О.В. Выделение неагглютинирующихся вибрионов от птиц в долине реки Сырдарьи. // Мат. VII науч. конф. – Алма-Ата, 1971. – С. 472 – 473.
8. Онищенко Г. Г., Марамович А. С., Голубинский Е.П. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1: Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Владивостоке. // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С. 26–31.

9. Погорелов В.И. Оценка экологических факторов, влияющих на циркуляцию вибрионов эльтор в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока: Дис. ... канд. мед. наук. – Иркутск, 1997. – 171 с.
10. Покровский В.И., Пак С.Г., Брико Н.И., Данилкин Б.К. Инфекционные болезни и эпидемиология: Учебник для ВУЗов. – М.: ГЭОТАР-Медиа; 2007.
11. Ривкус Ю.З., Митропольский О.В., Семиотрочев В.Л. Циркуляция вибрионов эльтор как природное явление. // Актуальные вопросы патогенеза, диагностики, клиники и профилактики бактериальных инфекций. – Ташкент, 1985. – С. 59 – 62.
12. Сергевнин В.И. Эколого-эпидемиологическая классификация инфекционных и паразитарных болезней человека: проблемы и пути решения. // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2002. – № 2. – С. 54 – 57.
13. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. // FEMS Microbiol. Ecol. – 2007. – Vol. 60(1). – P. 33 – 39.
14. Bhanumathi R., Sabeena F., Isac S.R. et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* O139 Bengal isolated from water and the aquatic plant *Eichhornia crassipes* in the River Ganga, Varanasi, India. // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69 (4). – P. 2389 – 2394.
15. Broza M., Gancz H., Halpern M., Kashi Y. Adult non-biting midges: possible windborne carriers of *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139. // Environ. Microbiol. – 2005. – Vol. 7 (4). – P. 576 – 585.
16. Broza M., Halpern M. Pathogen reservoirs: Chironomid egg masses and *Vibrio cholerae*. // Nature. – 2001. – Vol. 412(6842). – P.40.
17. Elhadi N., Radu S., Chen C.H., Nishibuchi M. Prevalence of potentially pathogenic *Vibrio* species in the seafood marketed in Malaysia. // J. Food Prot. – 2004. – Vol. 67 (7). – P. 1469 – 1475.
18. <http://www.oblises.donetsk.ua>. (Reference date 10.04.2015 г.).
19. Huq A., Small E.B., West P.A. et al. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. // Appl. Environ. Microbiol. – 1983. – Vol. 45 (1). – P. 275 – 283.
20. Islam M.S., Drasar B.S., Bradley D.J. Survival of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 with a common duckweed, *Lemna minor*, in artificial aquatic ecosystems. // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. – 1990. – Vol. 84 (3). – P. 422 – 424.
21. King C.H., Shotts E.B., Wooley R.E., Porter K.G. Survival of coliforms and bacterial pathogens within protozoa during chlorination. // Appl. Environ. Microbiol. – 1988. – Vol. 54 (12). – P. 3023 – 3033.
22. Martinelli Filho J.E., Lopes R.M., Rivera I.N.G., Colwell R.R. *Vibrio cholerae* O1 detection in estuarine and coastal zooplankton. // J. Plankton Res. – 2011. – Vol. 33 (1). – P. 51 – 62.

23. Nahar S., Sultana M., Naser M.N. et al. Role of shrimp chitin in the ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* and cholera transmission. // Front. Microbiol. – 2012. – Vol. 2. – P. 1 – 8.

24. Ogg J.E., Ryder R.R., Smith H.L. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. // Appl. Environ. Microbiol. – 1989. – Vol. 55. – P. 95-99.

25. Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73 (24) . – P. 7926-7933.

26. Shukla B.N., Singh D.V., Sanyal S.C. Attachment of non-culturable toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and non-O1 and *Aeromonas* spp. to the aquatic arthropod *Gerris spinolae* and plants in the River Ganga, Varanasi. // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 1995. – Vol. 12 (2) . – P. 113 – 120.

27. Spira W.M., Huq A., Ahmed Q.S. et al. Uptake of *Vibrio cholerae* biotype *eltor* from contaminated water by water hyacinth (*Eichornia crassipes*). // Appl. Environ. Microbiol. – 1981, 42(3) . – P. 550 – 553.

28. Thom S., Warhurst D., Drasar B.S. Association of *Vibrio cholerae* with fresh water amoebae. // J. Med. Microbiol. – 1992. – Vol. 36(5) . – P. 303 – 306.

МНОГОСТУПЕНЧАТАЯ ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ПОДГОТОВКА ЧЛЕНОВ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫХ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ БРИГАД К ПРОВЕДЕНИЮ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ МЕРОПРИЯТИЙ

А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков, Д.И. Каминский, Н.Л. Пичурина,
И.Я. Черепихина, С.А. Иванов

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

За 51 год существования специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ) привлекались для работы более чем в 100 очагах различных инфекционных болезней. Из них 64% - очаги холеры. Бригады зарекомендовали себя как наиболее эффективные и действенные формирования при локализации и ликвидации вспышек холеры на территории СССР, России и стран СНГ: в Кара-Калпакии (1965

г.); Астрахани (1970 г.); Одессе (1970 г.); Керчи (1970 г.); Донецке (1971 г.); Вилково (1991 г.); Республике Дагестан (1971 и 1994 г.г.). В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, являющимся головным учреждением по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» сначала в СССР, затем – в Российской Федерации, и референс-центром по мониторингу холеры, накоплен большой практический опыт по организации комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на недопущение заноса и распространения холеры, а также – на локализацию и ликвидацию уже возникших очагов данной опасной инфекционной болезни. Этот опыт реализуется, с одной стороны, в соответствующих нормативно-методических документах, научных разработках, направленных на совершенствование эпидемиологического надзора и лабораторной диагностики холеры, с другой – в многоступенчатой системе теоретической и практической подготовки членов СПЭБ к выполнению противохолерных мероприятий.

Первой ступенью являются курсы подготовки личного состава СПЭБ для работы в чрезвычайных ситуациях, проводимые на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» и ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Программа данных курсов предусматривает изучение вопросов эпидемиологии, микробиологии, лабораторной диагностики холеры, санитарной охраны территории, организации комплекса противоэпидемических мероприятий в чрезвычайных ситуациях (ЧС).

Вторая ступень подготовки – проводимые на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт курсы повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций по лабораторной диагностике и эпидемиологическому надзору за холерой в объеме 72 часа, на которых специалисты СПЭБ закрепляют теоретические знания и получают практические навыки. В связи с тем, что на данных курсах рассматриваются как вопросы эпидемиологии и эпидемиологического надзора за холерой, так и вопросы лабораторной диагностики этой опасной инфекционной болезни, имеет место реализация одного из базовых принципов функционирования СПЭБ – универсальности подготовки специалистов.

Третьей ступенью подготовки эпидемиологов и бактериологов СПЭБ является их участие в выполнении научной тематики, посвященной совершенствованию эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики, специфической и неспецифической профилактики, этиотропной и патогенетической терапии холеры, разработке и внедрению в практику новых и модернизации существующих диагностических препаратов, тест-систем, питательных сред, созданию проблемно-

ориентированных баз данных и геоинформационных систем, углубленному и всестороннему изучению штаммов холерных и других патогенных для человека вибрионов.

Четвертая ступень подготовки членов СПЭБ – это их участие в организации и проведении научно-практических семинаров, конференций, лекций, учебно-тренировочных занятий (в том числе, с вводом условного больного) для специалистов-практиков, представляющих организации Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения, разработка инструкций-памяток по профилактике холеры для медицинских работников и населения.

Пятой ступенью является участие специалистов СПЭБ в ежегодно проводимом мониторинге объектов окружающей среды (прежде всего, воды поверхностных водоемов и стоков из сети стационарных пунктов отбора проб воды, а также, балластных вод судов, прибывающих из неблагополучных по холере стран). Эта систематическая практика дает возможность членам СПЭБ реализовать свои теоретические знания, освоить методы лабораторной диагностики холеры, идентификации и углубленного изучения выделенных штаммов.

Шестая ступень подготовки специалистов СПЭБ – их участие в проведении эпидемиологических расследований по фактам выявления токсигенных, эпидемически опасных (а в ряде случаев, и атоксигенных - для оценки рисков контаминации водоемов) штаммов холерного вибриона у людей, в объектах окружающей среды и определении объема необходимых в этой связи санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. Данная ступень подготовки, наряду с отработкой навыков и умений найти источник инфекции, дает возможность врачам СПЭБ работать во взаимодействии со специалистами органов и организаций Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения, администраций территорий, других заинтересованных ведомств. Тесное межведомственное взаимодействие и активное привлечение местного административного ресурса является основой эффективного управления кризисной ситуацией в зоне ЧС, в том числе, очаге холеры.

Седьмой ступенью подготовки врачей-эпидемиологов, инфекционистов и бактериологов СПЭБ является их участие в проведении комплексной оценки противоэпидемической готовности госпитальной и лабораторной баз лечебно-профилактических организаций, лабораторий филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» к проведению мероприятий в случае выявления больного (трупа) с подозрением на холеру. Оказание консультативно-методической и практической помощи специалистам этих организаций есть необходимый элемент данной ступени подготовки. Участие членов СПЭБ в указанных мероприятиях позволяет сформировать у них, с одной стороны, представления о реальных проблемах, которые могут возникнуть при развертывании

госпиталей и лабораторий специального назначения (включая проблемы соответствия фактической и расчетной мощности госпиталя или лаборатории, соблюдения требований биологической безопасности, материально-технического и кадрового обеспечения, подготовки персонала), с другой стороны – подходы к оперативному и стратегическому решению конкретных практических задач.

Восьмая ступень подготовки – проведение тематических тактико-специальных учений СПЭБ является обобщением полученных ранее теоретических знаний и практических навыков в условиях, максимально приближенных к реальной ЧС – работе в очаге холеры – или в случае природной, техногенной, социально-политической катастрофы с угрозой возникновения эпидемических осложнений. Тематические тактико-специальные учения позволяют отработать:

- алгоритмы развертывания, материально-технического и энергетического обеспечения и работы функциональных подразделений и модулей СПЭБ в различных режимах (включая полный автономный режим);

- стандартные операционные процедуры в каждом из модулей СПЭБ, используемых для проведения лабораторной диагностики холеры;

- навыки обеспечения биологической безопасности работы в мобильном комплексе СПЭБ при проведении исследований на холеру;

- практическое взаимодействие с органами и организациями Роспотребнадзора, Министерства здравоохранения и других ведомств;

- в соответствии с задачами учения – комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, направленных на локализацию (ликвидацию) уже возникшего очага холеры или недопущению его возникновения.

Кроме того, в ходе тактико-специальных учений проводят апробацию новых методов, препаратов и оборудования для лабораторной диагностики холеры с целью оценки возможности их внедрения в практику работы СПЭБ.

Таким образом, используемая нами многоступенчатая система теоретической и практической подготовки в режиме повседневной деятельности, позволяет комплектовать СПЭБ универсальными специалистами, обладающими не только углубленными теоретическими знаниями в области эпидемиологии, микробиологии и лабораторной диагностики холеры, но и владеющими большим арсеналом практических навыков, полученных при осуществлении мероприятий по реальному обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения в зоне деятельности института – формировавателя СПЭБ.

К ВОПРОСУ ОБ ОПТИМИЗАЦИИ СБОРА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО АНАМНЕЗА ПРИ ХОЛЕРЕ

Н.Л. Пичурина, Е.И. Марковская, Т.В. Кирина

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Научная деятельность ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора определена Государственным заданием и осуществляется в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации.

Все научно-исследовательские разработки нацелены на внедрение результатов в практику здравоохранения, направлены на совершенствование эпидемиологического надзора на территории Российской Федерации, в том числе за холерой, и на совершенствование диагностики холеры.

Вопросы оптимизации эпидемиологического надзора и диагностики холеры реализуются во взаимодействии с учреждениями практического здравоохранения при оказании консультативно-методической помощи, что входит в ежегодные планы работы ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт. В течение последних пяти лет деятельность в этом направлении значительно активизировалась.

Несмотря на пристальное внимание научной и медицинской общественности к проблеме холеры, риск возникновения различных по интенсивности эпидемических проявлений этой инфекции существует, в том числе и на территории Ростовской области. Это обусловлено комплексом причин биологического, природного и социального характера, включающих миграционные процессы населения из стран с неблагоприятной эпидемиологической обстановкой по холере.

Определенную озабоченность вызывали потенциальные эпидемиологические риски заноса холеры с сопредельной территории, граничащей с Ростовской областью, где в 2011 году регистрировали заболеваемость этой опасной инфекцией.

В связи с событиями в юго-восточных областях Украины и значительным увеличением потока вынужденных переселенцев на территорию Ростовской области, Распоряжением Губернатора № 150 от 04.06.2014 г. был введен режим чрезвычайной ситуации. С момента начала его действия, в регион и через него прошли тысячи жителей Украины. Следует учитывать и то обстоятельство, что вынужденные переселенцы могли пересекать границу, находясь в инкубационном периоде, когда ещё

нет четких патогномоничных признаков болезни, что потребовала особого внимания служб Роспотребнадзора к эпидемиологическому надзору в плане его оптимизации и оперативного принятия неординарных управленческих решений.

Стратегия управления эпидемическим процессом при холере базируется на мощном фундаменте системы информационного обеспечения профилактических мероприятий, регламентированных нормативными документами федерального уровня, обращающих особое внимание на аналитические данные микробиологического мониторинга и выяснение генеза вспышек. В этой связи интересным является эпизод исполнения мероприятий по сбору данных к эпидемиологическому расследованию, проведенного специалистами Ростовского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, в связи с выделением токсигенной культуры *Vibrio cholerae* O1 *El Tor* *Inaba* (07.07.2014 г.) из стационарной точки отбора проб воды для исследования на холеру.

Помимо подробного эпидемиологического расследования возможных рисков контаминации воды в радиусе точки её отбора, были обработаны истории болезни больных с острыми кишечными инфекциями, находившихся в этот период на стационарном лечении в специализированных медицинских учреждениях городов: Ростов-на-Дону, Батайск, Азов и районных больницах Аксайского и Азовского районов. Общий массив обработанных документов составил 1005, и показал отсутствие, как больных холерой и с подозрением на нее, так и умерших от острых кишечных инфекций. Эпидемиологический анамнез, собираемый врачами-инфекционистами, в историях болезни присутствует. Однако, в большинстве случаев он носит формальный характер, а объем сведений не позволяет эпидемиологу составить объективную картину возможных условий инфицирования. Кроме того, используется несоответствующая современным стандартам терминология, как то: «эпидокружение чистое или спокойное», «эпиданамнез без особенностей или благополучный».

В этой связи нами, для оптимизации работы и повышения информативности проводимых мероприятий была разработана «Универсальная схема сбора эпидемиологического анамнеза».

Схема, оформленная в виде таблицы для заполнения врачом при приёме больного в стационар, учитывает эпидемиологически значимую информацию: о выезде (куда) за пределы Ростова, Ростовской области в период, предшествующий болезни; о прибытии в Россию российских и иностранных граждан из зарубежных стран неблагополучных по холере, в том числе вынужденных переселенцев из Украины; об использовании водоемов для рекреационного водопользования, купание в водоемах (с указанием названия места); об употреблении в пищу рыбы, раков, морепродуктов и др.; об употреблении продуктов питания, с которыми

заболевший связывает дисфункцию кишечника; о контактах с инфекционными больными; об условиях проживания госпитализируемого.

На наш взгляд, заполнение подобной таблицы нацелит врача-инфекциониста на правильную постановку клинического диагноза и создаст настороженность в отношении особо опасных инфекций, а эпидемиологу поможет в короткие сроки провести эпидемиологическое расследование и принять правильное управленческое решение в осуществлении противоэпидемических мероприятий.

МИКРОБИОЛОГИЯ

ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ И ОТ ЛЮДЕЙ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2014 ГОДУ

С.М. Иванова¹, Г.В. Титов¹, В.Е. Безсмертный¹,
С.В. Титова², В.Д. Кругликов², Э.А. Москвитина², И.В. Архангельская²,
М.И. Ежова², Т.А. Кудрякова², Д.А. Зубкова², С.О. Водопьянов²,
А.С. Водопьянов²

¹ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора
²ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

В течение 2014 года на территории 12-ти субъектов Российской Федерации из поверхностных водоемов изолировано 38 штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы биовара Эль Тор сероваров Огава, Инаба и R-вариант, из них 1 токсигенный, гемолизнегативный (Ростов-на-Дону – р. Темерник):

- г. Москва – 1 штамм (река Москва – сбросовый канал Курьяновской станции аэрации);
- Республика Калмыкия – 19 штаммов (г. Элиста – пруды Колонский и Заячий, река Элистинка);
- Республика Крым – 3 (Симферопольский р-н, с. Укромное – река Салгир);
- Республика Татарстан – 2 штамма (г. Казань, искусственные водоёмы – пляж «Комсомольский» и пос. Вознесение);
- Алтайский край – 1 штамм (г. Барнаул – река Пивоварка);
- Забайкальский край – 1 штамм (г. Чита – озеро Кенон);
- Приморский край – 3 штамма (Октябрьский район – река Раздольная, г. Владивосток – река Седанка);
- Иркутская обл. – 1 штамм (г. Иркутск – река Ангара);
- Калининградская обл. – 2 штамма (г. Неман – река Неман);
- Псковская область – 1 штамм (г. Псков – река Великая);
- Ростовская область – 3 штамма (г. Ростов-на-Дону – реки Дон и Темерник);
- Рязанская обл. – 1 штамм (г. Рыбное – река Вожа).

В лабораториях противочумных учреждений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора изолировано 20 (52,6%) и 18 (47,4 %) штаммов соответственно.

Все культуры изолированы из проб воды поверхностных водоемов. Из проб речной воды изолировано 22 штамма (57,9%), прудовой – 13 (34,2 %), озерной – 1 (2,6%), искусственных водоемов – 2 (5,3%).

Наибольшая частота изоляции холерных вибрионов O1 Эль Тор отмечена в августе – 50,0% и июле – 31,6%. В июне и сентябре изолировано 7,9% и 10,5% штаммов соответственно. Первые штаммы выделены в Ростовской области и Республике Калмыкия – в пробах от 2 июня, последние – в Приморском крае и Республике Калмыкия – в пробах от 1 сентября.

Доля атипичных по биологическим свойствам культур составила 73,7% (в 2013 г. – 75,5%). Типичными по основным тестам при выделении или при последующей идентификации в НИПЧИ были штаммы, изолированные в Республике Калмыкия (1 шт.), Республике Татарстан (2), Забайкальском крае (1), Приморском крае (2), Калининградской (1), Псковской (1), Ростовской (1, токсигенный) и Рязанской (1) областях.

Выделение атипичных культур регистрировалось на протяжении всего периода и отмечено в водоемах всех видов, показатель изменчивости для сероваров Огава и Инаба составил соответственно 95,8 и 30,8%.

Среди атипичных (28) фоновыми были культуры, в различной степени резистентные к диагностическому фагу Эль Тор – 96,4%. В то же время, 1 штамм (Республика Калмыкия) лизировался фагом «С» в ДРТ как при выделении, так и при идентификации в Ростовском-на-Дону НИПЧИ. Показатель культур, атипичных по агглютинации холерными диагностическими сыворотками, составил 3,6 %, по протеолитической активности – 3,6%, по диастатической активности – 3,6%. На долю измененных по комплексу признаков пришлось 7,2%.

В отношении к общему числу выделенных культур (38) эти показатели составили соответственно 71,1 – 2,6 – 2,6 – 2,6 – 5,2%.

Все штаммы как при выделении, так и при последующей идентификации в НИПЧИ агглютинировались до титра или ½ титра O1 холерной диагностической сывороткой и одной из серовароспецифических сывороток.

В числе изученных штаммов серовар Огава составил 63,2% (24 штамма), Инаба – 34,2% (13) R-вариант – 2,6% (1 шт.). При этом выделение холерных вибрионов серовара Огава регистрировалось территории 3-х, а Инаба – на территории 9-ти из 12-ти субъектов Российской Федерации.

В июле 2014 года в г. Ростов-на-Дону из воды реки Темерник специалисты Ростовского-на-Дону НИПЧИ изолировали гемолизнегативный, токсигенный штамм холерного вибриона O1 Эль Тор

Инаба (ctx A+, tcr A+).

Остальные изоляты из объектов окружающей среды, протестированные в ПЦР, не содержали генов ctxA и tcr A, а также лизировали эритроциты барана в пробе Грейга как при выделении, так и при последующем изучении в НИПЧИ.

Изоляты 2014 года в 100% случаев не лизировались фагами ctx+ и ctx-.

По результатам типирования фагами Дрожевкиной-Арутюнова в Ростовском-на-Дону НИПЧИ принадлежность к фаговару определена для 3-х штаммов: Республика Калмыкия, пруд Колонский – 17 фаготип, Иркутская область, река Ангара – 11 фаготип, Калининградская область, река Неман – 11 фаготип.

При определении чувствительности культур холерных вибрионов к антибактериальным препаратам минимальная резистентность отмечена к гентамицину 3,3% (1 шт.), максимальная – к рифампицину – 21,2% (7 шт.), доксициклину – 20,0% (6 шт.) и тетрациклину – 19,4% (6 шт.), резистентных к офлоксацину (таривид) отмечено не было. В отношении токсигенного штамма, изолированного из воды реки Темерник, установлена полирезистентность к налидиксовой кислоте, фуразолидону, триметоприму/сульфаметоксазолу, левомицетину и стрептомицину.

Кроме того, в июне 2014 года зарегистрирован один случай завоза холеры из Индии гражданкой Российской Федерации, прибывшей самолетом в Москву. От больной изолирован эпидемический (токсигенный, гемолизотрицательный) штамм холерного вибриона O1 серогруппы биовара Эль Тор серовара Огава, типичный по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам, лизирующий фагом Эльтор в диагностическом титре, чувствительный к тетрациклину, доксициклину, ципрофлоксацину, цефотаксиму, рифампицину и канамицину, резистентный к налидиксовой кислоте, левомицетину, стрептомицину, триметоприму, фуразолидону и ампициллину.

Таблица. Характеристика культур холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Российской Федерации в 2014 году

№ п/п	Административная территория	Источник выделения	Всего изучено культур	В том числе по ТЕСТАМ ИДЕНТИФИКАЦИИ*														В том числе АТИПИЧНЫХ*										
				O1 СЕРОВАР				O13 9	ГЕМОЛИЗ *		ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ и генетические маркеры							ВСЕГО**	по СЕРОВАРАМ*			по ТЕСТАМ**						
				Огава	Инаба	R-вариант	Гикошима		-	+	ПЦР				wbe + wbf-	Комплексный метод	Огава		Инаба	R-вариант	фаг эльтор	агломинация O1 сыворотк.	p-ция гем-агломинации	желатина	крахмал			
											ctx		tcp													tox T		изучено
										+		-		+		-			ctx +		ctx -							
1.	г. Москва	вода	1	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-		-	1(1)	-	-	1	1(1)	1(1)	-	-	-
2.	Респ. Калмыкия	вода	19	19	-	-	-	-	19	-	19	-	19	-	19	19	-	-	18	18	-	-	18	-	-	-	-	
3.	Респ. Татарстан	вода	2	-	2	-	-	-	2	-	2	-	2	-	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
4.	Респ. Крым	вода	3	3	-	-	-	-	3	-	3	-	3	-	3	3	-	-	3	3	-	-	3	-	-	-	-	
5.	Алтайский край	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	
6.	Забайкальский край	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7.	Приморский край	вода	3	-	3	-	-	-	3	-	3	-	3	-	3	3	-	-	1(1)	-	1	-	1(1)	-	-	-	1(1)	
8.	Иркутская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	1	-	
9.	Калининград. обл.	вода	2	-	2	-	-	-	2	-	2	-	2	-	2	2	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	
10.	Псковская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
11.	Ростовская обл.	вода	3	2	1	-	-	1	2	1	2	1	2	1	2	3	3	-	-	2	2	-	2	-	-	-	-	
12.	Рязанская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ИТОГО по Российской Федерации	Всего	38	24	13	1	0	0	1	37	1	37	1	37	1	37	37	38	0	0	28(2)	23	4	1	27(8)	1(1)	0	1	1(1)
	% 2014 г.	63,2	34,2	2,6	-	-	2,6	97,4	2,6	97,4	2,6	97,4	2,6	97,4	97,4	100,0	-	-	73,7	95,8	30,8	2,6	71,1	2,6	-	2,6	2,6	
	% 2013 г.	71,4	28,6	-	-	-	-	100,0	-	100,0	8,2	91,8	8,2	91,8	8,2	91,8	100,0	-	-	75,5	85,7	50,0	-	75,5	-	-	4,1	-
Отношение 2014 г. / 2013 г.			-1,1р.	+1,2р.														=	+1,1р.	-1,6р.		-1,6р.						

О СВОЙСТВАХ КУЛЬТУР ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДЫ ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМОВ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ В ПЕРИОД С 2012-2014гг.

К.Б. Яшкулов, Т.Б. Каляева, Н.Ф. Оброткина, В.Д. Тюнникова,
Б.В. Дандаева

*ФКУЗ Элистинская противочумная станция Роспотребнадзора,
Республика Калмыкия г.Элиста*

Последнее десятилетие (2005 - 2014 гг.) характеризуется продолжающимися крупными эпидемиями и вспышками холеры в странах Африки, Азии, Америки, в регионе Карибского бассейна с межгосударственными и межконтинентальными завозами инфекции в страны Европы, Австралии с Океанией, Америки, в США и Канаду. За период с 2012 по 2014 гг. по данным информационных агентств (ProMed) зарегистрировано 470.034 больных холерой с поражением ежегодно в среднем 40 стран мира. Наряду с эпидемиями, обусловленными генетически измененными вариантами *V.cholerae* O1 El Tor и штаммами с множественной резистентностью к антибиотикам, в странах Юго-Восточной Азии (Китай) ежегодно имеют место вспышки с выделением от больных *V.cholerae* O139 серогруппы [1].

В различных регионах нашей страны ежегодно обнаруживаются холерные вибрионы в поверхностных водоемах. Подавляющее большинство выделяющихся штаммов на территории России в настоящее время неэпидемические, атоксигенные. Однако этот факт вызывает тревогу, указывая на процесс интенсивного загрязнения поверхностных водоемов недостаточно очищенными и обеззараженными сточными водами, в связи с чем сохраняется опасность реализации ведущего—водного пути передачи инфекции. Поэтому микробиологический контроль объектов окружающей среды на наличие вибрионов остается одним из ключевых факторов, способствующих оптимизации системы эпидемиологического надзора на конкретной территории, а лабораторная диагностика холеры - основным прикладным инструментом обнаружения и характеристики выделенных культур[2].

Республика Калмыкия относится к территории II типа по эпидемическим проявлениям холеры. ФКУЗ «Элистинская противочумная станция» Роспотребнадзора совместно с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Республике Калмыкия и его филиалами, проводят мероприятия по профилактике холеры, осуществляя эпидемиологический мониторинг вибриофлоры открытых водоемов в окрестностях г. Элисты и

населенных пунктов, ежегодно в период с 1 июня по 30 сентября. Также бактериологическая лаборатория «Элистинской противочумной станции» проводит верификацию и идентификацию культур холерных вибрионов, с проведением дополнительных исследований, поступающих из бактериологических лабораторий ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии» в РК [2].

Всего в республике 58 стационарных «точек» забора проб воды, в том числе 11 – в г. Элиста.

В течение последних трех лет на территории Республики Калмыкия бактериологической лабораторией ЭПЧС и отделением особо опасных биологических инфекций микробиологической лаборатории ФБУЗ «ЦГиЭ» в РК было изолировано следующее количество холерных вибрионов: в 2012 г. - 35 штаммов (из них 34 штамма - *V. cholerae* O1 El Tor и один штамм - *V. cholerae* RO), в 2013 г. – 27 штаммов, в 2014 г. - 19 штаммов (рис. 1).

Наибольшее количество штаммов изолировано из пруда «Заячий» - 38 штаммов, кроме того из:

р. Элистинка у места сброса сточных вод с очистных сооружений – 13 шт.;

пруд «Колонский» - 11 шт.;

р. Элистинка у Кировского моста – 9 шт.;

р. Элистинка у моста по дороге на Вознесеновку – 5 шт.;

р. Элистинка ул. Папанина – 4 шт.;

пруд с. Вознесеновка – 1 шт.

Вышеуказанные водоемы являются неглубокими, непроточными, подверженными несанкционированному сбросу сточных вод, рН которых колеблется в пределах от 7,9- 8,2. Кроме того, в последние годы на территории РК в июле-августе отмечены высокие показатели температуры воздуха (до +42оС в тени) и воды (до +30оС). Все эти факторы благоприятно сказываются на сохранении и размножении холерного вибриона [3].

Все культуры холерного вибриона выделены в период с июня по сентябрь: в июне - 4 (4,9%) штамма, в июле - 10 (12,3%), в августе – 47 (58,0%), в сентябре - 20 (24,7%). Из вышеизложенного следует, что наибольшее количество выделенных штаммов приходится на август-сентябрь (рис.2).

Изолированные культуры *V.cholerae* O1 обладали типичными культурально-морфологическими свойствами. Биохимическая активность соответствовала виду холерного вибриона.

Восемьдесят штаммов агглютинировались до титра холерной агглютинирующей сывороткой O1, один штамм сывороткой RO до титра.

Из числа выделенных штаммов O1 серогруппы: 77 штаммов (96,3%) были отнесены к серовару «Огава», и три (3,7%) штамма к серовару

«Инаба».

Таблица. Отношение выделенных культур к холерному бактериофагу El Tor

Отношение		2012г.	2013г.	2014г.	Итого
Лизировались	цельным	0	0	1	1 (1,2%)
	10 ⁻¹	1	0	1	2 (2,5%)
	ДРТ (10 ⁻²)	14	3	2	19 (23,5%)
Не лизировались		20	24	15	59 (72,8%)

Из числа выделенных штаммов в период с 2012 по 2014г. лизировались фагом эльтор 22 штамма, что составило 27,2% от числа выделенных культур; не лизировались холерным диагностическим фагом эльтор – 59 штаммов (72,8%)

Определение фаготипа проводилось с использованием типизирующих холерных фагов 1-7 производства ФКУЗ «Ростовский-на-Дону НИПЧИ». У 16 (19,8%) штаммов (в 2012 г. - 14 шт., 2013 г. - 2 шт.) был определен 13-й фаготип. Данные культуры были изолированы из проб воды р. Элистинки у места сброса сточных вод и пруда «Заячий» [3].

Атипичность выделенных культур проявлялась в их отношении к холерным фагам. Другим проявлением атипичности изученных штаммов было наличие спорных результатов в реакции гемагглютинации с 2,5% эритроцитами морской свинки, тем что агглютинация наступала позже регламентированного времени или вообще отсутствовала.

Все штаммы дали положительный результат в реакции Фогес-Проскауэра (образуют ацетилметилкарбинол).

При определении чувствительности холерных вибрионов применяли следующие антибиотики: доксициклин, тетрациклин, левомицетин, ципрофлоксацин, пефлоксацин, гентамицин, ампициллин, цефотаксим, офлоксацин, рифампицин. Основная масса культур чувствительна к данным антибиотикам и составила 70,4%, промежуточно чувствительных 19,8% и устойчивых всего 9,8%.

У нескольких штаммов, выделенных из воды Колонского пруда, отмечалось быстрое снижение способности к агглютинации, в результате чего они были идентифицированы как *V. cholerae* non O1 /non O139.

Кроме постановки тестов, подтверждающих видовую принадлежность выделенных культур, проводилось определение эпидемической значимости комплексным методом с использованием пробы на гемолиз и постановки ПЦР с использованием тест-системы «Ген-Хол для выявления ДНК *Vibrio cholerae* (ctxA+)» (производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»), а так же «Набор реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом ПЦР с

гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс» *Vibrio cholerae* -FL» (Интерлабсервис). Все выделенные штаммы были атоксигенными. Гена *ctxA*+ обнаружено не было, но у двух штаммов в 2012 и 2013 гг., изолированных из р. Элистинка у места сброса сточных вод, был обнаружен пилеобразующий ген *tcpA*.

Вывод:

Проведённый эпидемиологический мониторинг вибриофлоры открытых водоёмов Республики Калмыкия показал, что циркуляция атипичных авирулентных штаммов холерных вибрионов подтверждает наличие в открытых водоемах на территории Калмыкии условий, достаточных для поддержания жизнеспособности и размножения и вирулентных штаммов, при возможном их завозе с неблагоприятных по холере территорий. Поэтому обстановку по холере в Республике считаем напряженной.

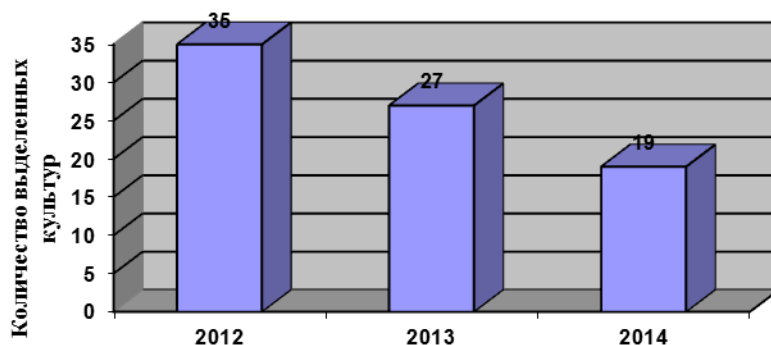


Рисунок 1. Динамика выделения культур холерных вибрионов O1 из водных объектов окружающей среды Республики Калмыкия.

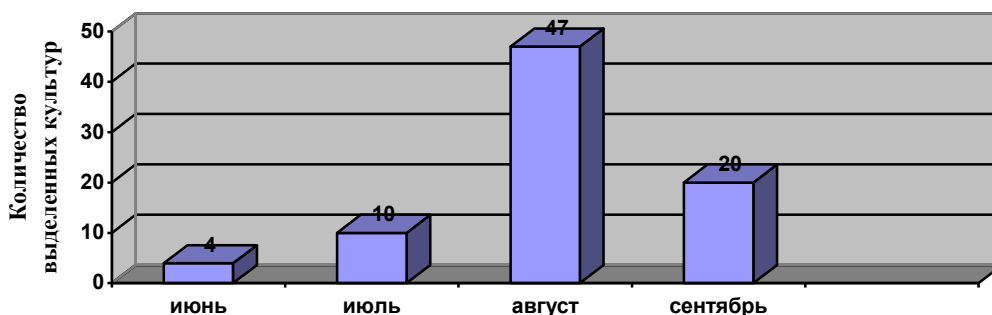


Рисунок 2. Сезонность выделения культур холерных вибрионов из поверхностных водоемов в 2012- 2014 гг.

Литература

1. Информация «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире и прогнозе заболеваемости холерой на 2015г», ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора.

2. Материалы конференции, посвященной 90-летию образования санитарно-эпидемиологической службы РФ, 2012г.

3. О культурах холерных вибрионов, выделяемых на территории Республика Калмыкия (2011 – 2013гг)

СРАВНИТЕЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЁНОК, ОБРАЗОВАННЫХ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ ЭЛЬ ТОР

Н.А. Селянская, С.В. Титова, Л.М. Веркина, Л.К. Лысова, А.В. Тришина
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

В последние годы внимание учёных привлечено к изучению микробных биоплёнок - сообществ, образованных микроорганизмами, клетки которых имеют специализацию, контактируют между собой, вырабатывают межклеточное вещество и ограничены от окружающей среды дополнительными оболочками. В опытах на штаммах *Staphylococcus aureus* было установлено, что при образовании биопленок этими микроорганизмами повышалась антибиотикорезистентность [4]. Вызывает интерес чувствительность к антибактериальным препаратам биоплёнок холерных вибрионов.

Цель работы: изучение активности антибактериальных препаратов в отношении биоплёнок холерных вибрионов Эль Тор.

Материалы и методы.

В работе использованы клинические изоляты с полноценным набором генов вирулентности: *Vibrio cholerae* El Tor P-5879, 19667, 18826, полученные из Музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Получение биопленок холерных вибрионов на пластиковых пластинках во флаконах с водопроводной кипяченой водой (100 мл) проводили способом, описанным ранее [2]. Флаконы с пластиковыми пластинками выдерживали при 37 °С 48 ч. На 3 сутки культивирования пластинки с образовавшимися биоплёнками после трёхкратного промывания в физиологическом растворе переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения антибактериальных препаратов в жидкой питательной среде (бульон Мартена, рН 7,7). Через

24 ч выращивания в термостате (37 °С) высевали биоплёнки и 0,1 мл планктонной культуры на пластинки с агаром Мартена (рН 7,7). Результат учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

Выбор антибактериальных препаратов основывался на их использовании для этиотропной терапии холеры [1].

Эксперименты повторяли три раза. Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием статистических пакетов «Microsoft Office 2007» и «Statistica 6.0» для Windows XP. Достоверность полученных данных оценивали при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Результаты исследования.

Планктонная культура штамма *V.cholerae El Tor* P-5879 обладала чувствительностью ко всем антибактериальным препаратам, взятым в исследование (таблица 1).

Планктонные культуры штаммов *V.cholerae El Tor* 18826 и 19667 проявляли устойчивость к левомецетину, стрептомицину, ампициллину, триметоприму/ сульфаметоксазолу, налидиксовой кислоте (таблица 1).

Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении биоплёнок исследованных штаммов возросли в 2-50 раз, за исключением МПК цiproфлорксацина для штамма *V.cholerae El Tor* P-5879, которые не изменились ($0,001 \pm 0,0003$ мг/л). При этом штаммы в составе биоплёнок достоверно стали устойчивы к тетрациклинам и рифампицину. Биоплёнки штамма *V.cholerae El Tor* P-5879 достоверно приобрели устойчивость к левомецетину, стрептомицину, ампициллину, триметоприму с сохранением чувствительности к цiproфлорксацину и цефтазидиму (таблица 1).

Таблица 1. Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении планктонных и биоплёночных культур холерных вибрионов Эль Тор.

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК, мг/л**		Штамм <i>V.cholerae El Tor</i>					
			P-5879		18826		19667	
	S*	R*	планктон	биоплёнка	планктон	биоплёнка	планктон	биоплёнка
	Средние значения МПК, мг/л							
Доксициклин	$\leq 2,0$	$> 4,0$	0,3±0,1	21,3±5,3	1,3±0,3	10,7±2,7	1,3±0,3	21,3±5,3
Тетрациклин	$\leq 4,0$	$> 8,0$	0,3±0,1	1,3±0,3	3,3±0,7	26,7±5,3	3,3±0,7	42,7±10,7
Левомецетин	$\leq 4,0$	$\geq 16,0$	0,8±0,2	42,7±10,7	21,3±5,3	85,3±21,3	170,2±42,7	426,6±85,3
Налидиксовая кислота	$\leq 4,0$	$\geq 16,0$	3,3±0,7	53,3±10,7	192±80,6	426,7±85,3	85,3±21,3	682,7±170,7
Цiproфлорксацин	$\leq 0,0$	$\geq 1,0$	0,001±0,000	0,001±0,00	1,7±0,3	1,7±0,3	0,13±0,3	0,3±0,6

	1		3	03				
Стрептомицин	$\leq 16,0$	$\geq 32,0$	5,3±1,3	53,3±10,7	683±170	853,3±170	42,6±10,7	85,3±21,3
Гентамицин	$\leq 4,0$	>8,0	2,7±0,6	6,7±1,3	5,3±1,3	10,6±2,7	2,7±0,7	5,3±1,3
Ампициллин	$\leq 4,0$	$\geq 16,0$	2,7±0,7	53,3±10,7	85,3±21,3	106,7±21,3	213,3±42,7	426,6±65,3
Цефтазидим	$< 1,0$	$\geq 4,0$	0,23±0,1	0,7±0,1	0,66±0,1	1,66±0,3	нд	нд
Рифампицин	$\leq 4,0$	$\geq 16,0$	1,3±0,3	21,3±5,3	0,83±0,7	42,7±10,7	1,3±0,3	64
Триметоприм/ сульфаметоксазол	$\leq 2,0/10,0$	$\geq 8,0/40,0$	1,3±0,3	21,3±5,3	213,3±42,7	426±85,3	341,3±85,3	426,6±85,3

Примечание: нд – нет данных;

*S – чувствительный; R – устойчивый;

** - пограничные значения МПК (МУК 4.2.2495-09);

жирным шрифтом выделены достоверные отличия между МПК планктонной и биоплёночной культур.

Устойчивость штамма *V.cholerae El Tor* 18826 к левомицетину, а штамма *V.cholerae El Tor* 19667 к налидиксовой кислоте в биоплёночной форме также достоверно увеличилась.

Заключение.

Повышение резистентности биопленок холерных вибрионов Эль Тор к антибактериальным препаратам в 2-50 раз по сравнению с планктонными культурами согласуется с литературными данными о более высокой устойчивости других микроорганизмов в составе биоплёнок к действию антибиотиков [3] и может обусловить неэффективность антибиотикотерапии.

Литература

1. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУ 4.2.2495-09. М.; 2009.

2. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок *in vitro* с помощью нового методического подхода. // Фундаментальные исследования. - 2014. - №10. - С.375-379.

3. Фролова Я.Н., Харсеева Г.Г., Миронов А.Ю. Чувствительность к антибиотикам биоплёночных культур токсигенных штаммов *Corynebacterium diphtheriae*. // Клиническая лабораторная диагностика. – 2014. - Т.59, №6. – С.51-53.

4. Чеботарь И.В., Маянский А.Н., Кончакова Е.Д. и др. Антибиотикорезистентность биопленочных бактерий. // Клиническая

ВЛИЯНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СТРЕССОРОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ БИОПЛЕНКИ И ПРОДУКЦИЮ ЭКЗОПОЛИСАХАРИДА У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепихина, О.П. Фецайлова
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В данной работе представлен один из этапов изучения влияния различных стрессоров на образование биопленки и продукцию экзополисахарида у холерных вибрионов. Исследование проводили в течение 3 суток в среде М9 [1] и в речной воде на протяжении 9 месяцев. В качестве стрессоров, оказывающих влияние на холерные вибрионы в организме человека, были использованы желчь, низкий и высокий рН (имитирующие условия кислой и щелочной сред желудка и кишечника человека)[2]. В речной воде варьировали температуру ($22^{\circ}\text{C} - 4^{\circ}\text{C}$). Было изучено 26 штаммов холерных вибрионов различной эпидемической значимости (22 штамма вибрионов Эль Тор, 2- классических холерных вибрионов, 2- вибрионов O139 серогруппы). При изучении влияния на процесс биопленкообразования стрессоров, которым подвергаются холерные вибрионы в организме человека, было показано, что на эпидемически значимые (ctx+tcp+) штаммы максимальное влияние оказывал комбинированный стресс (влияние кислоты, желчи и щелочной рН), после воздействия которого вибрионы образовывали в качестве защиты наиболее мощную биопленку, кислота и желчь (как монострессоры) оказывали менее повреждающее действие, рН9 не оказывал влияния на уровень продукции ЭПС, он был даже ниже, чем у штаммов, не подвергавшихся стрессовому воздействию (Рис.1).

У потенциально эпидемически значимых вибрионов (ctx-tcp+) образование достаточно высоких концентраций ЭПС стимулировали все стрессоры, особенно щелочь, желчь и комбинированный стресс. Это подтверждает, что эта группа штаммов с высоким (по нашим данным) персистентным потенциалом обладает выраженными адаптивными способностями, чтобы противостоять стрессовым воздействиям среды в

кишечнике человека и выживать определенное время в организме вибриононосителя. Авирулентные штаммы, в большинстве своем, снижали способность к продукции ЭПС, отмечено незначительное повышение ЭПС в присутствии желчи, что косвенно свидетельствует об отсутствии способности длительно сохраняться в организме человека в указанных стрессовых условиях. Полученные результаты были подкреплены результатами экспериментов, в которых, помимо перечисленных стрессоров, использовались микроаэрофильные условия, соответствующие условиям в тонком отделе кишечника, в котором происходят все процессы, ответственные за патогенез холеры.

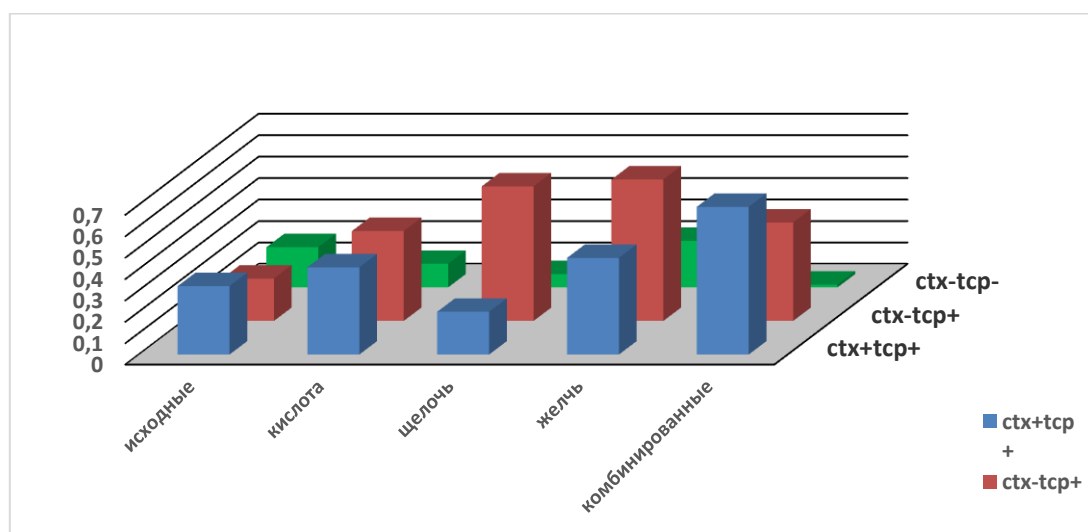


Рисунок 1. Влияние стрессоров на биопленкообразование в среде М9.

С учетом значимости проблемы выяснения закономерностей персистенции холерных вибрионов различной эпидемической значимости в воде открытых водоемов были проведены масштабные по продолжительности эксперименты (9 месяцев) по оценке влияния температурных стрессовых условий и гипоксии на процесс биопленкообразования.

В первой серии опытов, проводимых с использованием речной воды при температуре 22⁰С (Рис.2) установлено, что у токсигенных штаммов незначительная часть популяции при 22⁰С сохранялась на протяжении всего срока исследования и формировала «слабые» биопленки, значения ОП которых незначительно увеличивалось к 4-5 месяцу культивирования, а при 4⁰С - отмирала к 4-5 месяцу исследования. У атоксигенных вибрионов, напротив, большая часть популяции вибрионов сохранялась при 4⁰С (показатели продукции ЭПС были выше, чем при 22⁰С) на протяжении всего срока исследования. Потенциально патогенные вибрионы сохранялись на протяжении всего срока исследования при обеих температурах, но продукция ЭПС была гораздо выше при 22⁰С. При культивировании при 4⁰С уровень биопленкообразования этих штаммов

несколько увеличивался к 4 месяцу, а затем существенно снижался.

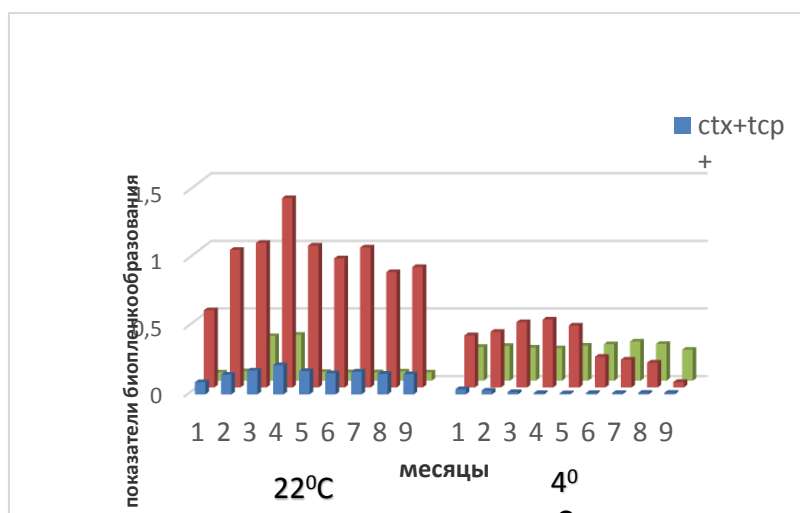


Рисунок 2. Биоупленкообразование у холерных вибрионов в речной воде при разных температурах.

Завершением этой серии экспериментов было моделирование условий пребывания холерных вибрионов в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время при разных температурах (2 месяца - 22°C, 2 месяца - 10°C, 5 месяцев - 4°C) (Рис.3). При этих условиях токсигенные вибрионы к концу эксперимента практически отмирали (биоупленки отсутствовали), ctx-tcp+ - варианты сохранялись на протяжении всего срока наблюдения, но показатели ОП постепенно снижались, хотя были довольно высокими, атоксигенные варианты, напротив, начинали размножаться при низкой температуре и к 9 месяцам достигали максимума.

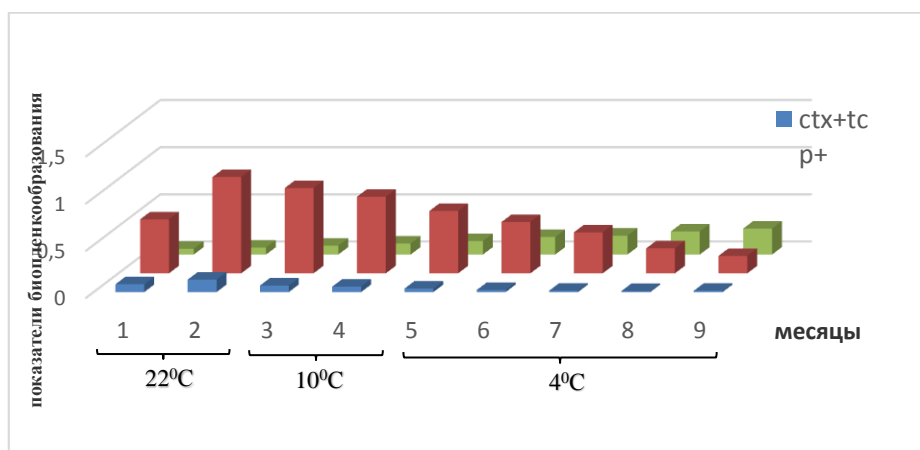


Рисунок 3. Биоупленкообразование у холерных вибрионов в речной воде при изменении температуры культивирования.

Таким образом, было показано, что токсигенные холерные вибрионы могут персистировать в воде открытых водоемов при достаточно высокой температуре (до 10°C) в течение нескольких месяцев, но при снижении

температуры достаточно быстро отмирают и биопленки не сохраняются. Атоксигенные и потенциально патогенные штаммы, напротив, сохраняются в таких стрессовых условиях и участвуют в формировании биопленки.

Литература

1. Watnick P.L., Kolter R. Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm //Mol.microbiol., - 1999. – 34(3) – p.586-595
2. Шелемех О.В. Ответные реакции микроорганизмов на одновременное воздействие нескольких стрессорных факторов: гипо- и гиперосмотических условий, гипоксии, неблагоприятных значений рН //Автореф. дис....канд. биол. наук – М., 2008

ДИНАМИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/ НЕ O139 СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, И.В. Архангельская, Е.А. Березняк,
Н.Г. Железняк

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

В последние десятилетия наблюдается рост антибиотикорезистентности возбудителей инфекционных заболеваний, в том числе холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп [3]. В то же время, в Ростовской области практически ежегодно регистрируются острые кишечные инфекции, вызванные этими возбудителями.

Цель исследования: изучить динамику антибиотикорезистентности *Vibrio cholerae* non O1/ non O139, выделенных от людей в Ростовской области.

Материалы и методы.

Штаммы: *V.cholerae* non O1/ non O139 (ctx⁻tcp⁻), выделенные от людей в Ростовской области: в 1968-1975гг. (57 штаммов) и в 2005-2014гг. (29 штаммов). Антибиотикочувствительные штаммы *V.cholerae* O1 P-5879 ctx⁺tcpA⁺toxR⁺ (1972г., г.Таганрог) и *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 (КМ 162) (ctx⁻tcp⁻) служили в качестве контроля. Все штаммы получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт

Роспотребнадзора.

Чувствительность/устойчивость к 12 антибактериальным препаратам изучали методом серийных разведений в плотной питательной среде [агар Мюллера-Хинтона, рН 7,5 (HIMEDIA, Индия)] в соответствии с МУК 4.2.2495-09 (2009) [2].

Доверительные интервалы для частот и долей рассчитывали по методу Вальда с коррекцией по Агрести-Коуллу с вероятностью 95% [1].

Результаты исследования.

Установлено, что среди *V.cholerae* non O1/ non O139, выделенных в 1968-1975гг., 7% культур были устойчивы к ампициллину (МПК=128,0 мг/л); 17,8% - к канамицину (МПК=32,0 мг/л); 3,5% - к рифампицину (МПК=128,0 мг/л); 14% - к триметоприму/ сульфаметоксазолу (МПК=128,0/640,0 мг/л) (таблицы 1, 2).

Среди культур, выделенных в 2005-2014гг., резистентность к канамицину (МПК=32,0 мг/л) составила 6,9%, к ампициллину - 69% (МПК=16,0 мг/л), к триметоприму/ сульфаметоксазолу - 10,3% (МПК=16,0/80,0 мг/л), к стрептомицину - 27,6% (МПК=64,0 мг/л), к фуразолидону - 69% (МПК=16,0 мг/л) (таблицы 1,2).

Таблица 1. Антибиотикограммы штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп (ctx⁺tcp⁺), выделенных от людей в Ростовской области в 1968-1975 гг. (57 штаммов) и в 2005-2014 гг. (29 штаммов).

№ п/п	Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК, мг/л**		Значения МПК для контрольных штаммов, мг/л		Диапазон значений МПК для <i>V.cholerae</i> non O1/ non O139, мг/л	
		S*	R*	P-9741	P-5879	1968-1975 гг.	2005-2014 гг.
1	Доксициклин	≤2,0	>4,0	0,25	0,25	0,5	0,25-1
2	Тетрациклин	≤4,0	>8,0	1,0	1,0	0,5	0,5-1
3	Левомецетин	≤4,0	≥16,0	2,0	2,0	0,5-4	0,5-4
4	Налидиксовая кислота	≤4,0	≥16,0	2,0	1,0	1-4	0,5-4
5	Ципрофлоксацин	<0,1	≥1,0	0,015	0,015	0,01-0,5	0,01
6	Стрептомицин	≤16,0	≥32,0	4,0	2,0	4-8	4-64
7	Канамицин	≤16,0	≥32,0	16,0	8,0	4- 32	4-32
8	Ампициллин	≤4,0	≥16,0	4,0	2,0	2-128	4-16
9	Цефтазидим	<1,0	≥4,0	0,04	0,01	0,04	1- 32
10	Рифампицин	≤4,0	≥16,0	2,0	1,0	4- 32	1-8
11	Фуразолидон	≤4,0	≥16,0	2,0	2,0	8	2-16
12	Триметоприм/ сульфаметоксазол	≤2,0/10,0	≥8,0/40,0	1,0/5,0	2,0/10,0	2/10- 128/640	0,5/2,5- 16/80

Примечание. *S – чувствительный; R – устойчивый;

** - пограничные значения МПК (МУК 4.2.2495-09);

*** - количество исследованных штаммов.

Все изученные штаммы сохраняли чувствительность к

тетрациклином (МПК=0,5-1,0 мг/л), левомицетину (МПК=0,5-4,0 мг/л), ципрофлоксацину (МПК=0,01-0,05 мг/л) (таблица 1).

Распределение штаммов по устойчивости к антибактериальным препаратам представлено в таблице 2.

Таблица 2. Количество (%) антибиотикорезистентных штаммов *V.cholerae non O1/non O139* из числа изученных, выделенных от людей в период с 1968 по 2014гг.

Год выделения	Количество изученных штаммов	Количество (%) устойчивых штаммов всего	Количество (%) штаммов, устойчивых к антибактериальным препаратам						
			<i>Ap</i>	<i>Ctz</i>	<i>Sm</i>	<i>Km</i>	<i>Rif^r</i>	<i>Tmp/Smz</i>	<i>Fur^r</i>
1968-75	57	19	7	0	0	17,8	3,5	14	0
2005-2014	29	69	69	6,9	27,6	6,9	0	10,3	69

Примечание: *Ap* – устойчивость к ампициллину; *Ctz* – цефтазидиму; *Sm* – стрептомицину; *Km* – канамицину; *Rif^r* – рифампицину; *Tmp/Smz* – триметоприму/ сульфаметоксазолу; *Fur^r* – фуразолидону.

У штаммов, выделенных в 2005-2014 гг., в сравнении со штаммами, выделенными в 1968-1975гг., увеличилось количество культур, устойчивых к ампициллину, появилась устойчивость к стрептомицину, фуразолидону, цефтазидиму при некотором снижении процента резистентности к триметоприму/сульфаметоксазолу и канамицину, что вероятно связано с редким применением этих антибиотиков для лечения. В 2005-2014 гг. все штаммы холерных вибрионов оказались чувствительны к рифампицину.

При этом, количество антибиотикочувствительных культур, выделенных в 2005-2014гг., уменьшилось в 2,6 раза в сравнении с 1968-1975гг. Произошло увеличение в два раза числа штаммов, имеющих устойчивость одновременно к одному, двум и трём антибактериальным препаратам, а также появились культуры, устойчивые к 4 антибиотикам. Множественная лекарственная устойчивость штаммов возросла с 7% до 27,8%.

Анализ профилей антибиотикорезистентности штаммов *V.cholerae non O1/ non O139*, выделенных в Ростовской области в разные периоды времени, показал вариабельность фенотипов устойчивости к антибактериальным препаратам. Штаммы имели до 10 различных профилей антибиотикорезистентности, включающие как чувствительные, так и с множественной (более 3 АБП) антибиотикоустойчивостью.

Заключение.

Таким образом, у *V.cholerae non O1/ non O139*, выделенных от людей в Ростовской области в 2005-2014гг., наблюдается уменьшение количества антибиотикочувствительных культур, нарастание числа штаммов, имеющих множественную антибиотикоустойчивость, а также расширение спектра устойчивости к антибактериальным препаратам в сравнении со

штаммами, выделенными ранее.

Выбор средств этиотропной терапии острых кишечных инфекций, вызванных этими микроорганизмами, должен основываться на данных антибиотикограммы каждой выделенной культуры.

Литература

1. Гржибовский А.М. Доверительные интервалы для частот и долей. // Экология человека. – 2008. - №5. – С. 57-60.
2. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллёз, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУ 4.2.2495-09. М.; 2009.
3. Селянская Н.А., Рыжко И.В., Веркина Л.М., Тришина А.В., Миронова А.В., Акулова М.В. Антибиотикограммы штаммов *V.cholerae* не O1/ не O139, выделенных от людей в 1968-2009 гг. // Антибиотики и химиотерапия. – 2011. - № 1-2. - С. 18-21.

ПРИБРЕТЕНИЕ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМИ ВИБРИОНАМИ ПОД ВЛИЯНИЕМ УМЕРЕННЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Т.А. Кудрякова, Н.Е. Гаевская, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина,
Л.В. Романова, С.Ю. Лупилина

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Интерес к бактериофагам, с целью использования их в качестве специфических антибактериальных агентов, возродился прежде всего из-за возникновения и распространения множественноустойчивых к антибиотикам возбудителей инфекционных болезней и отсутствия новых антибиотиков [3, 4]. В последние годы бактериофаги применяют не только для индикации и идентификации гомологичных микроорганизмов, но также в целях деконтаминации пищевых продуктов и профилактики пищевых токсинов и токсикоинфекций бактериальной этиологии.

Заболевание, вызываемое *Vibrio parahaemolyticus* серогруппы O3:K6, привлекает внимание исследователей в связи со вспышками токсикоинфекций, ассоциирующихся с загрязнением морепродуктов

галофильными вибрионами [8].

Несмотря на накопленный научный материал по изучению биологических свойств бактериофагов *V. parahaemolyticus*, многие вопросы их биологии и применения требуют дополнительных исследований. Актуальность проблемы сохраняется в решении задачи использования умеренных бактериофагов галофильных вибрионов в генетических исследованиях, неразрывно связанных с возможностью генетического обмена между бактерией и фагом, а также связи генома хозяина с профагом [3, 4, 7]. В этом аспекте парагемолитические вибрионы и их фаги являются удобными, но недостаточно изученными объектами, в частности, в вопросах вероятности переноса между микроорганизмами генов антибиотикорезистентности и возникновения фагоустойчивых лизогенных бактериальных культур.

Целью работы явилось осуществление переноса маркеров антибиотикорезистентности штаммам парагемолитических вибрионов умеренными бактериофагами, изолированными из лизогенных стрептомицин- и полимиксинрезистентных штаммов-доноров гомологичных вибрионов серогруппы O3:K6.

В исследовании использовали 121 штамм *V. parahaemolyticus*, из которых 33 культуры относились к серогруппе O3:K6. Продукцию бактериофагов выявляли на газонах фагочувствительных культур парагемолитических вибрионов КМ-97 и КМ-184 [2] по общепринятым методам [1].

Штаммами-донорами в опытах трансдукции маркеров стрептомицин- и полимиксинрезистентности служили вирулентные полимиксинустойчивые бактерии *V. parahaemolyticus* 17036 Sm^r, 17748 Sm^r, полученные методом селекции на агаровых пластинках при возрастающих дозах антибиотика.

В качестве штаммов-реципиентов применяли *V. parahaemolyticus* 3 (КМ-184, tdh⁻trh⁻), 13 (КМ-97, tdh⁻trh⁻), 16200 (tdh⁻trh⁻), чувствительные к стрептомицину и полимиксину (25 мкг/мл и 10 ЕД/мл соответственно). Трансдукцию осуществляли умеренными бактериофагами 17748 и 17036 в титре $n \times 10^9$ БОЕ/мл [5].

Испытание чувствительности отобранных штаммов-доноров и реципиентов к фагам парагемолитических вибрионов IV серотипа показало, что 2 фага лизируют штаммы-реципиенты КМ-184 (3), КМ-97 (13) и 16200 и не активны к штаммам-донорам.

Использование в качестве фаговых доноров лизогенных штаммов *V. parahaemolyticus* 17748 Sm^r, 17748 Sm^r серогруппы O3:K6 позволило получить положительные результаты в опытах трансдукции антибиотикорезистентности фагами 17748 и 17036. Умеренные фаги были способны при взаимодействии со штаммами, чувствительными к стрептомицину и полимиксину, передавать маркер устойчивости к

антибиотикам с частотой $n \times 10^{-7}$. Получены 291 трансдуктант Sm^r и Pm^x , из которых с использованием фага 17748 и штамма КМ-184 – 122 клон Sm^r , фага 17036 и того же штамма – 110 Sm^r , реципиента КМ-97 и фага 17036 – 16 Pm^x , штамма 16200 и фага 17036 – 19 Pm^x , фага 17748 – 34 Pm^x .

Трансдукция маркеров антибиотикорезистентности сопровождалась приобретением вибрионами профагоносительства. Присутствие профага придавало трансдуктантам новые свойства: потенциальную способность образовывать фаг, иммунитет в отношении суперинфекции гомологичными фагами 17036 и 17748 и новые физиологические свойства – экспрессию подвижности клеток в полужидком агаре.

При изучении стабильности биологических свойств трансдуктантов было установлено сохранение маркеров антибиотикорезистентности у вибрионов на питательных средах, содержащих стрептомицин (500 мкг/мл) и полимиксин (25-50 мкг/мл), через 1, 3, и 12 месяцев хранения [9].

Устойчивость к гомологичному фагу и фагопродукция свидетельствовали о лизогении трансдуктантов. Исследование фагов, присутствующих в лизатах трансдуктантов, показало, что титр фагочастиц составлял 10^2 - 10^5 БОЕ/мл.

Впервые нами была изучена структура трансдуцирующих фагочастиц в электронном микроскопе (JEM-1011). Установлено, что они относятся к IV морфогруппе по классификации А.С. Тихоненко, фаг имеет многогранную головку и длинный отросток. По серологическим свойствам фаги принадлежат к IV серотипу. Негативные колонии умеренных фагов характеризовались плотным центром с ровным краем, в диаметре 0,5-2 мм.

Изучение чувствительности трансдуктантов к 10 фагам из коллекции лаборатории показало литическую активность фагов ФК-44 и ФК-46, которые типировали полученные резистентные к гомологичным фагам штаммы. Следует отметить, что возникновение под влиянием трансдуцирующих фагов антибиотикорезистентных клонов является важной проблемой. В то же время, вирулентные бактериофаги с широким спектром литической активности являются подходящими кандидатами для борьбы с такими патогенными бактериями в качестве альтернативы антибиотикотерапии.

При генотипировании трансдуцирующих фагов 17036, 17748 использовали однопраймерный вариант ПЦР. Набор универсальных праймеров (Ap7, M13, pUc/M13) оказался способным амплифицировать последовательность хромосомной ДНК исследуемых бактериофагов и образовывать ПЦР-профили в виде фрагментов ДНК количеством от 21 до 1 и размером от 2356 до 100 п.н.

Установлено, что бактериофаги обладают выраженной специфичностью к бактериям вида *V. parahaemolyticus* и проявляют себя неактивными по отношению к бактериям других родов, видов.

В результате изучения влияния температурного фактора на

бактериофаги 17748 и 17036 определено, что они проявляют чувствительность к воздействию высокой температуры, то есть являются термолабильными: температура в пределах 58-64°C снижает литическую активность фагов с 10^8 до 10^6 активных фаговых корпускул в 1 мл фаголизата, температура выше 66°C полностью их инактивирует. Обработка хлороформом в течение 60 минут не оказывает существенного влияния на активность фагов, выживаемость которых составляет от 14,29 до 26,91%. Воздействие хлороформом на культуры трансдуктантов в течение 15 минут вызывает полную инактивацию клеток.

Таким образом, осуществлен перенос умеренными фагами парагемолитических вибрионов маркеров стрептомицин- и полимиксинрезистентности от эффективных штаммов-доноров серогруппы ОЗ:К6. Впервые охарактеризованы трансдуцирующие фаги, биологическими признаками которых являются принадлежность к IV морфогруппе, к IV серотипу.

Литература

1. Адамс, М. Бактериофаги / М. Адамс. – М., 1961 – 522 с.
2. Гаевская, Н.Е. Индикаторные штаммы *Vibrio parahaemolyticus* для обнаружения и первичной идентификации парагемолитических фагов / Н.Е. Гаевская, Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина, А.А. Алиева, С.Р. Саямов // Клиническая диагностика. – 2006. – № 1. – С.39-40.
3. Зуева, В.С. Роль профагов в формировании антибиотикоустойчивых популяций стафилококков в процессе трансформации, трансдукции и конъюгации / В.С. Зуева, О.А. Дмитриенко, Н.В. Клицунова // Антибиотики и химиотерапия. —1996. – Т. 41, № 10. – С. 35-41.
4. Каттер, Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе; пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. – Москва: науч. мир, 2012. – 636 с.
5. Кудрякова, Т.А. Получение прототрофных штаммов *Vibrio cholerae* путем трансдукции / Т.А. Кудрякова, Л.Р. Черкасова, Л.Д. Македонова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 1990. – №2. – С.110-111.
6. Кудрякова, Т.А. Бактериофаги парагемолитических вибрионов серогруппы ОЗ:К6 / Т.А. Кудрякова, Н.Е. Гаевская, Л.Д. Македонова, Г.В. Качкина // Инфекция и иммунитет. – 2012. – Т. 2, № 1-2. – с.285-286.
7. Миллер, Дж. Эксперименты в молекулярной генетике / Дж. Миллер // М.: «Мир», 1976. – С. 73-120.
8. Рыковская, О.А. *Vibrio parahaemolyticus* серогруппы ОЗ:К6 – возбудитель вспышек пищевой токсикоинфекции в Приморском крае Российской Федерации / О.А. Рыковская, А.Б. Мазрухо, Л.М. Смоликова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2014. – № 4. – С. 57-

61.

9. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. МУК 4.2.1890-04. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

РЕКЛАССИФИКАЦИЯ КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ АЭРОМОНАД И ФОСФОРЕСЦИРУЮЩИХ ВИБРИОНОВ

О.С. Чемисова, Л.М. Смоликова, О.А. Рыковская, Е.М. Санамянц,
М.М. Сагакянц, Р.Р. Даликова, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Согласно второму изданию Руководства по систематике бактерий [3], роды *Vibrio* и *Aeromonas* относятся к классу протеобактерий, порядкам XI. *Vibrionales* и XII. *Aeromonadales*, семействам *Vibrionaceae* и *Aeromonadaceae*. Ранее род *Aeromonas* наряду с *Vibrio*, *Photobacterium* и *Plesiomonas*, принадлежал к семейству *Vibrionaceae* [8]. Результаты последующих филогенетических исследований обосновали необходимость перевода аэромонад во вновь организованное семейство *Aeromonadaceae* [5]. В него в настоящее время включен один род, представленный 14 видами аэромонад [3]. Классификация вибрионов также претерпела серьезные изменения, что связано с использованием с 60-х - 70-х годов таких методов как ДНК-ДНК гибридизация, рРНК-ДНК гибридизация, определение иммунологической связи ферментов и других белков. В настоящее время семейство *Vibrionaceae* объединяет роды: *Vibrio* (типовой род, 44 вида), *Photobacterium* (6 видов) и *Salinivibrio* (1 вид). Светящиеся вибрионы, характерным признаком которых является способность испускать видимое глазом свечение от желтого до синевато-зеленого, ранее классифицированные как *Vibrio cholerae biotype albensis*, в настоящее время не выделены в самостоятельную таксономическую группу. К числу биолюминесцирующих видов вибрионов отнесены *V. fischeri*, *V. harveyi*, *V. logei* и *V. splendidus*. Отмечено, что способностью к свечению обладают редкие штаммы *V. cholerae* и *V. vulnificus* [3].

В Ростовском противочумном институте на протяжении более 60-ти лет собрана коллекция аэромонад и вибрионов, классифицированных как *V.*

cholerae биотип *albensis*, выделенных из объектов внешней среды и от людей на территории Российской Федерации. Штаммы аэромонад были идентифицированы по основным таксономическим фенотипическим признакам до рода. К виду *V. cholerae biotype albensis* относили микроорганизмы, обладающие феноменом свечения, признаками холерных вибрионов и не агглютинирующиеся холерной O1 сывороткой. Использование новых таксономических критериев и происшедшие изменения в классификации аэромонад и вибрионов требовали ревизии собранной коллекции. Трудности фенотипической идентификации, связанные с вариабельностью диагностических признаков, определили необходимость привлечения для изучения коллекционных штаммов современных молекулярно-биологических методов. В связи, с этим **целью** настоящей работы явилось уточнение, согласно современной классификации бактерий, видовой принадлежности коллекционных штаммов аэромонад и фосфоресцирующих вибрионов с помощью ПЦР-детекции видоспецифических генов и MALDI TOF – масс-спектрометрии.

Материалы и методы. Всего было изучено 74 музейных штамма аэромонад, из них 58% выделены из клинического материала, а остальные из речной, морской и сточных вод. Штаммы светящихся вибрионов изолированы от людей и объектов окружающей среды в разные годы. Все культуры хранились в лиофилизированном состоянии. Для их идентификации использован традиционный микробиологический подход, метод масс-спектрометрии и ПЦР-детекция видоспецифических маркеров с помощью праймеров, предложенных для идентификации *V. fluvialis*: *Vf.toxR* - ген трансмембранного регуляторного белка, *vfh* - ген гемолизина, *fmp* – ген металлопротеазы [4,7]. В качестве контрольного использовали типовой штамм вида *V. fluvialis* ATCC 33809/606. Идентификация микроорганизмов с помощью метода MALDI TOF – спектрометрии осуществлялась на масс-спектрометре Bruker Daltonics (Германия) с программным обеспечением Biotyper. Принцип метода заключается в том, что видовая принадлежность микроорганизмов определяется по спектру молекулярных масс, который в свою очередь оценивается по времени пролета ионизированных частиц белка от источника ионизации к детектору. Преобразование времени пролета частиц в спектр молекулярных масс белка происходит с помощью программного обеспечения. База данных прибора включает спектры белков 40 видов вибрионов и не содержит масс-спектры белков холерного вибриона. Для видовой идентификации и внутривидовой дифференциации *V cholerae* пользовались персональной базой данных протеомных спектров холерных вибрионов, созданной в Ростовском противочумном институте в дополнение к MALDI Biotyper [1]. Управление прибором осуществляли с помощью программы Flex-control. Результаты MALDI TOF оценивали с учетом показателя достоверности идентификации: 2.300 ... 3.000 - высокая

достоверность определения видовой принадлежности (+++), 2.000 ... 2.299 - высокая достоверность до рода, достоверно определение вида (++), 1.700 ... 1.999 - достоверно определение рода (+), 0.000 ... 1.699 - не идентифицировано (-).

Результаты. По результатам проведенного масс-спектрометрического анализа к роду *Aeromonas* был отнесен 31 штамм, представленный 4 видами: *A. caviae*, *A. veronii*, *A. hydrophilla* и *A. enteropelogenes*. Среди них преобладали микроорганизмы вида *A. caviae*, выделенные из испражнений человека и из проб морской и речной воды. Из числа остальных коллекционных культур, идентифицированных ранее как аэромонады, 42 при повторном изучении с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии были отнесены к *V. fluvialis* и 1 – к *V. furnissii*. Все штаммы аэромонад и *V. fluvialis* были подвижны, обладали индофенолоксидазой, нитратредуктазой, аргининдигидролазой при отсутствии лизин- и орнитидекарбоксилазы, ферментировали глюкозу, арабинозу, сахарозу, маннозу, мальтозу, маннит и были неактивны по отношению к адониту, дульциту, инозиту. Отмечена вариабельность признаков, позволяющих дифференцировать представителей рода *Aeromonas* и *V. fluvialis*, таких как рост в среде, не содержащей NaCl, рост на среде с 6% NaCl, проба тяжа и способность продуцировать ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра. Представители *A. caviae* и *A. enteropelogenes* отличались от аэромонад других видов отсутствием способности продуцировать ацетилметилкарбинол, а *A. caviae* и сероводород. Штаммы *A. veronii*, *A. hydrophilla* и *A. enteropelogenes* обладали гемолитической активностью, выявленной на среде, содержащей эритроциты барана. Однако фенотипической характеристики оказалось недостаточно для дифференциации некоторых штаммов *V. fluvialis* и аэромонад, и их таксономический статус был определен по результатам масс-спектрометрии. Кроме того, видовая принадлежность всех представителей *V. fluvialis* была дополнительно определена с помощью ПЦР. Видоспецифические гены *Vf.toxR*, *vfh*, *fmp* были выявлены у всех штаммов *V. fluvialis* и не обнаружены у аэромонад разных видов. Совпадение результатов двух методов подтверждает высокую специфичность генов: трансмембранного регуляторного белка, гемолизина, металлопротеазы.

Номенклатурная ревизия музейных штаммов флюоресцирующих вибрионов также была проведена с использованием метода MALDI TOF масс спектрометрии. По ее результатам у всех штаммов была подтверждена принадлежность к *V. cholerae non 01*.

Известно, что представители родов *Vibrio* и *Aeromonas* могут быть причиной заболеваний людей, вызывая диарею, раневые инфекции, бактериемию и другие внекишечные инфекции. Среди аэромонад наиболее частой причиной заболеваний человека являются *A. caviae*, *A. veronii*, *A.*

hydrophilla. Так, по данным S.L.Abbot et al. [2], к микроорганизмам этих видов принадлежало примерно 85% клинических изолятов аэромонад. Одним из факторов патогенности *A. veronii*, как установлено недавно, является термостабильный гемолизин (TRH), характерный для парагемолитических вибрионов [6]. Интересно отметить, что все изученные штаммы *A. enteropelogenes* были выделены из желчи пациентов, обследованных с целью выявления вибриононосительства. Т.е. нами отмечен факт устойчивости аэромонад названного вида к содержимому желчного пузыря.

Таким образом, проведенная таксономическая ревизия позволила установить видовой состав музейных штаммов аэромонад и выявить преобладание в этой группе представителей *A. caviae* - патогена рыб, земноводных и млекопитающих. Среди культур, отнесенных ранее к роду *Aeromonas* определен высокий процент *V. fluvialis*, известного в настоящее время в качестве возбудителя вспышек и sporadических случаев острого гастроэнтерита человека. В ходе проведенного исследования получены совпадающие результаты ПЦР-детекции видоспецифичных генов *V. fluvialis* и метода MALDI TOF – масс-спектрометрии, что свидетельствует о высокой специфичности праймеров: *Vf.toxR*, *vfh*, *fmp* и целесообразности использования их для идентификации *V. fluvialis* и дифференциации с представителями рода *Aeromonas*.

Литература

1. Телесманич Н.Р., Чайка И.А., Агафонова В.В. и др. MALDI масс-спектрометрический анализ в типировании и внутривидовой дифференциации холерных вибрионов на основе создания референс-библиотеки протеомных профилей// Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2013.- Вып.№26.- С.143-148
2. Abbott S.L., Cheung W.K.W., Janda J.M. The genus *Aeromonas*: biochemical characteristics, atypical reactions, and phenotypic identification schemes // J. Clin. Microbiol. 2003. – Vol. 41, № 6. – P. 2348–2357.
3. Brenner D.J. et al. Bergey ,s manual of systematic bacteriology, 2nd Ed.//The Proteobacteria. East Lansing, USA. – 2005.
4. Chakraborty R., Sinha S., Mukhopadhyay F.K. et al. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene. //J. Med. Microbiol. - 2006.- Vol. 5 – P. 805-808
5. Colwell, R.R., M.T., Macdonell and J.De Ley, Proposal to recognize the family *Aeromonadaceae* fam. nov. // Int J Syst. Bacteriol. – 1986. - 36. – P. 473-477
6. Raghunath, P., Maiti, B., Shekar, M. et al. Clinical isolates of *Aeromonas veronii* biovar *veronii* harbor a nonfunctional gene similar to the

thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh) gene of *Vibrio parahaemolyticus* // FEMS Microbiol. Lett.- 2010. – Vol. 307. – P. 151-157

7. Ramamurthy, T., Chowdhury, G., Pazhani, G., Shinoda, S. *Vibrio fluvialis*: an emerging human pathogen//Front. Microbiol., 2014, 5:91, doi: 10.3389/fmicb.2014/00091

8. Veron M.M., La position taxonomique des *Vibrio* et de certaines bacteries comparables // C.R. Acad.Sci. Paris – 1965. – Vol. 261. – P. 5243-524.

МОНИТОРИНГ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ

А.В. Тришина, Е.А. Березняк, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Интенсивное распространение антибиотикоустойчивости микроорганизмов связано с широким применением антибактериальных препаратов (АБП) в медицине, ветеринарии, сельском хозяйстве и других отраслях деятельности человека. Применение химиопрепаратов изменяет состав и функциональные свойства микрофлоры в природных местах обитания в сторону увеличения антибиотикоустойчивости микробного сообщества. Поэтому целесообразно расширить круг исследуемых проблем, связанных с распространением антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов, включив в него процессы накопления и обмена генов антибиотикорезистентности среди бактерий в природных экосистемах [1,2].

Одним из важнейших аспектов фенотипической характеристики условно-патогенных энтеробактерий является их резистентность к АБП [3]. При этом массовое распространение антибиотикорезистентных штаммов в популяциях условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) стало важной проблемой в связи с их более высокими адаптационными возможностями по сравнению с возбудителями классических инфекций [4, 5]. Разнообразный микробный пейзаж возбудителей УПМ, высокий уровень их антибиотикорезистентности говорят о необходимости мониторинга за устойчивостью к АБП. Такой мониторинг позволит

осуществлять надзор за устойчивостью к антибиотикам, а также идентифицировать специфические случаи появления генетически-модифицированных микроорганизмов с неустановленным влиянием на экосистему [6].

Цель настоящего исследования – проведение мониторинга чувствительности/устойчивости к АБП условно-патогенных микроорганизмов порядков *Enterobacteriales* и *Pseudomonadales*, выделенных из поверхностных водоемов с мая по сентябрь 2014 г., результаты которого могли бы служить индикатором состояния антибиотикорезистентности микроорганизмов поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону.

Материалы и методы: Объекты исследования: условно-патогенные микроорганизмы порядков *Enterobacteriales* и *Pseudomonadales*, выделенные из стационарных точек поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону. Пробы воды из поверхностных водоемов отбирали в соответствии с общими требованиями к отбору проб; ГОСТ 31942-2012 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа».

Идентификацию микроорганизмов начинали с изучения морфологии выросших колоний на агаре Хоттингера (рН 7,3±0,2) и на селективных средах: Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агаре.

Определение родовой и видовой принадлежности условно-патогенных бактерий осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов. Для быстрой выборочной идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper.

Каждый штамм был протестирован на чувствительность/устойчивость к различным АБП, методом серийных разведений в агаре. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.12.1890-04 путем сопоставления величин минимальной подавляющей концентрации (МПК). Критерии интерпретации значений минимальной подавляющей концентрации антибактериальных препаратов в отношении порядка *Enterobacteriales* оценивали по таблицам для энтеробактерий, а для порядка *Pseudomonadales* - по таблицам для неферментирующих микроорганизмов. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel».

Результаты. Всего за период исследования было выделено 225 штаммов условно-патогенных микроорганизмов, относящихся к 16 родам: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Raoultella*, *Kluyvera*, *Yersinia*, *Providencia*, *Morganella*, *Serratia*, *Rahnella*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*.

Порядок *Enterobacteriales*. За время исследования было выделено 156 штаммов порядка *Enterobacteriales*. Изучение влияния антимикробных

препаратов на изолированные из воды микроорганизмы показало, что к гентамицину в мае, июне и сентябре были чувствительны 100 % штаммов (таблица 1).

Таблица 1. Доли штаммов энтеробактерий, выделенные в 2014 г.

	май		июнь		июль		август		сентябрь	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
ципрофлоксацин	100	0	100	0	100	0	95	5	100	0
налидиксовая к-та	65,8	34,2	94,4	5,6	61,6	38,9	70	30	100	0
ампициллин	0	94,7	46,3	11,1	16,7	83,3	5	95	65,4	23,1
цефтриаксон	86,8	2,6	100	0	100	0	100	0	100	0
доксциклин	92,1	0	94,4	5,6	88,9	11,1	90	10	96,2	0
левомицетин	50,0	15,8	92,6	1,9	77,8	22,2	75	10	84,6	11,6
нитрофурантоин	18,4	81,6	92,6	5,6	50	50	90	10	80,7	11,6
ко-тримоксазол	41,8	58,2	42,6	57,4	33,6	66,7	30	70	50	50
гентамицин	100	0	100	0	88,9	11,1	95	5	100	0

Примечание: S – чувствительные; R - устойчивые

Высокая чувствительность к ципрофлоксацину, цефтриаксону и доксициклину регистрировалась в течение всего периода наблюдения. Доля штаммов, чувствительных к налидиксовой кислоте варьировала от 61 % в мае до 100 % в сентябре. Частота встречаемости чувствительных к левомицетину микроорганизмов менялась в пределах от 56 % до 92,6 %. Изменения уровней чувствительности выделенных штаммов к ампициллину в разные месяцы были от 0 до 65,4 %, к нитрофурантоину - 18,4 % до 92,6 %. Уровень чувствительности к ко-тримоксазолу в течение периода наблюдения менялся от 30 % до 50 %.

Анализ распространенности антибиотикорезистентности к различным антимикробным препаратам в популяции условно-патогенных энтеробактерий, выделенных в 2014 году из поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону, показал высокую резистентность к ампициллину и ко-тримоксазолу. Интересно отметить, что в июне 2014 г. наблюдалось снижение уровней резистентности ко всем антибактериальным препаратам, за исключением ко-тримоксазола.

Порядок *Pseudomonadales*. Всего за 2014 г. проанализировано по чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам 69 штаммов неферментирующих бактерий родов *Acinetobacter* (57 штаммов) и *Pseudomonas* (12 штаммов). Все исследуемые штаммы показали стопроцентную чувствительность к цефтриаксону (таблица 2).

Таблица 2. Доли неферментирующих бактерий, выделенные в 2014 г.

	май		июнь		июль		август		сентябрь	
	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R
ципрофлоксацин	100	0	100	0	100	0	63,2	36,8	100	0
цефтриаксон	100	0	100	0	100	0	100	0	100	0

левомецетин	20	80	74	26	0	100	63,2	36,8	83,4	16,6
ко-тримоксазол	100	0	55,6	44,4	0	100	26,3	73,7	83,4	16,6
гентамицин	100	0	100	0	66,7	33,3	79	21	100	0

Примечание: S – чувствительные; R - устойчивые

Выделенные в мае, июне, июле и сентябре штаммы были чувствительны к ципрофлоксацину, только 36,8 % изолятов, проанализированных в августе, проявили устойчивость к этому АБП. Активность гентамицина *in vitro* по отношению к исследуемым штаммам была 100 % в мае, июне и сентябре. В июле и августе доля чувствительных штаммов составила 66,7 % и 79 % соответственно.

Резистентность к левомецетину и ко-тримоксазолу у выделенных штаммов варьировала от 16,6 % до 100 % в разные месяцы. Больше всего устойчивых к различным АБП штаммов неферментирующих бактерий было выделено в августе (к ципрофлоксацину - 36,8 %, левомецетину - 36,8 %, ко-тримоксазолу - 73,7 %, гентамицину - 21 %).

Род *Acinetobacter* показал высокую устойчивость к ко-тримоксазолу (49,1 %) и левомецетину (35,0 %). Доля устойчивых к ципрофлоксацину и гентамицину штаммов *Acinetobacter* составила 10,5 %. Среди выделенных изолятов устойчивых к цефтриаксону штаммов выделено не было.

Среди представителей рода *Pseudomonas* 50 % штаммов были устойчивы к левомецетину и 50 % к ко-тримоксазолу. Штаммов псевдомонад, устойчивых к ципрофлоксацину, цефтриаксону и гентамицину, обнаружено не было.

Заключение. Проведено исследование условно-патогенных и патогенных микроорганизмов стационарных точек водных объектов города Ростова-на-Дону в 2014г.

Выявлена гетерогенность микробных популяций условно-патогенных микроорганизмов водоемов.

Анализ антибиотикорезистентности к различным антимикробным препаратам в популяции условно-патогенных энтеробактерий, выделенных в 2014 году, показал высокую резистентность к ампициллину и ко-тримоксазолу. Представители неферментирующих микроорганизмов в половине случаев были устойчивы к левомецетину и ко-тримоксазолу.

Литература

1. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, ее объем, разнообразие и развитие. // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. – № 5-6(58). – С. 38-48.
2. Супотницкий М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий. // Биопрепараты. – 2011. – № 2. – С. 4-44.
3. Tenover F.C. Global problem of antimicrobial resistance. //

Russ.Med.J. – 2005. – Vol. 4. – P. 1-6.

4. Веркина Л.М., Березняк Е.А., Титова С.В. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности условно-патогенных микроорганизмов поверхностных водоемов. // Медицинский альманах. – 2014. – № 4(34) – С. 46-48.

5. Анганова Е.В. Условно-патогенные энтеробактерии: доминирующие популяции, биологические свойства, медико-экологическая значимость: Автореф. дисс...-ра мед. наук. Иркутск, 2012. – 47 с.

6. Онищенко Г.Г. Актул. Пробл. Биол. безопасности. Вестник РАМН. – 2013. – № 11(2) – С. 4-11.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ К ФАЗОВЫМ ПЕРЕХОДАМ S-ВАРИАНТОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*

О.В. Маркина, А.И. Шелухович, Е.Ю. Люкшина, А.Н. Терентьев,
А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Феномен бактериальной диссоциации описан в многочисленных отечественных и зарубежных работах прошлого века. Еще в 50-е годы С.Г. Смирнов рассматривал микробную колонию как «пространственно-временной континуум», состоящий из "клеточных кластеров" с различающимися свойствами. При этом на каждом этапе развития культуры доминирует свой субколониальный кластер [4]. Другой отечественный микробиолог Н.Д.Иерусалимский считал, что фенотипическая гетерогенность является функцией развития всей культуры в целом, а не «частным делом» тех вегетативных клеток, из которых они образовались [1], обозначая тот факт, что бактериальная культура сама контролирует необходимость присутствия в своем составе тех или иных типов клеток, появление которых находится в прямой зависимости от сигналов окружающей среды. Следовательно, гетерогенность культуры является необходимым условием её нормального развития и существования. При этом разные типы клеток (экзополисахарид-продуцирующие, некультивируемые, L-формы, и др.) одного и того же штамма по-своему отвечают за её сохранность в

неблагоприятных условиях окружающей среды [2]. Ранее нами было показано, что некоторые клетки штамма *V.cholerae* El Tor P-18895, выдержанного в среде М9, начинают продуцировать экзополисахарид (ЭПС) с образованием мутных и складчатых колоний. Стабилизированные ругозные и О-варианты (от англ. oaque) данного штамма были отобраны и исследованы в некоторых диагностических тестах: чувствительность к бактериофагам, РАО с сывороточными антителами, характер роста на питательных средах [3]. Однако было показано, что большое число клеток популяции все еще продолжало формировать гладкие прозрачные S-колонии (от англ. – smooth) независимо от срока их выдерживания в среде М9. В связи с этим, целью настоящей работы явилась оценка способности к фазовым переходам S-вариантов *V.cholerae*.

Для этого клетки S-вариантов *V.cholerae* El Tor P-18895 были внесены в среду М9 (рН 9,0) следующего состава: Na_2HPO_4 – 6 г/л, KH_2PO_4 – 3 г/л, NaCl – 0,5 г/л, NH_4Cl – 1 г/л, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,01 г/л, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,49, LiCl – 0,01 г/л, казаминовые кислоты – 5 г/л, глюкоза – 0,1 г/л, манноза – 1 г/л, вода дистиллированная и помещены в термостат (23⁰С) на 5 месяцев. Раз в 4 дня, производили высевы на агар Мартена и учитывали морфологию выросших колоний. В результате на протяжении всего срока наблюдения регистрировали образование только прозрачных и гладких колоний. Этот вариант в отличие от ругозного, используемого в качестве контроля, практически не формировал пленки на поверхности жидкости и стекла (рис.1). В полужидком агаре подвижность вибрионов всех S-вариантов *V.cholerae* El Tor P-18895 была резко снижена, либо отсутствовала. В работе Laugiano С.М. с коллегами [5] на примере *V.cholerae* O139 MO10 показано, что неподвижные вибрионы формировали колонии только S-фенотипа и были неспособны к фазовым переходам, если несли мутацию в sodium-driven motor. Учитывая эти данные, можно предположить, что некоторые S-варианты штамма *V.cholerae* El Tor P-18895 являются мутантами.

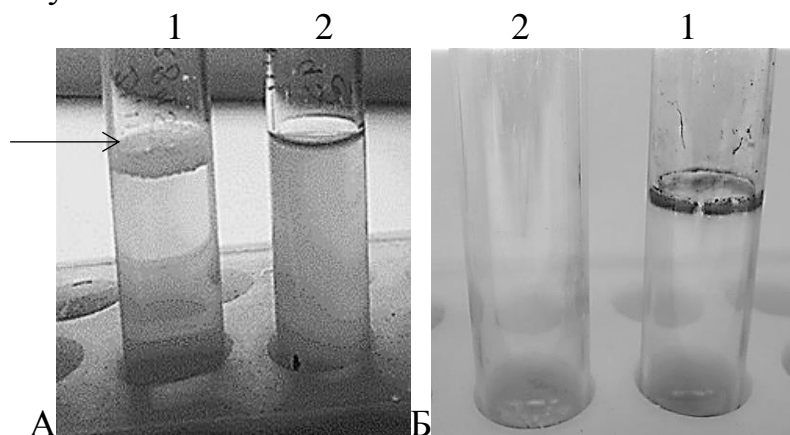


Рисунок 1. Образование пленок *V.cholerae* El Tor P-18895: ругозный (1) и гладкий (2) варианты на поверхности жидкости (А) и стекле (Б). Окраска генцианвиолетом.

Одновременно в работе были испытаны ругозные и S-варианты других штаммов: *V.cholerae El Tor* P-15865, P-14932 и *V.cholerae* O139 P-16064, которые были получены аналогичным способом, что и варианты *V.cholerae El Tor* P-18895. Индекс их диссоциации составил 20-30%. В среде М9 гладкие варианты формировали тонкие пленки, тогда как ругозные – плотные и рельефные. Длительное нахождение вибрионов S-колоний в минимальной среде М9 (в течение 2-х недель) не способствовало их переходу в ругозный фенотип, в некоторых случаях регистрировали появление O-колоний.

Таким образом, можно заключить, что стабилизированные S-варианты штамма *V.cholerae El Tor* P-18895 формируют только гладкие прозрачные колонии и не способны как к переходу в ругозный фенотип, так и к образованию биопленок после их длительного выдерживания в среде М9. Отсутствие у них подвижности позволяет предположить, что они несут мутации в жгутиковых генах. S-варианты других штаммов холерных вибрионов также не формировали ругозные колонии, но в отдельных случаях регистрировали их фазовые переходы в O-фенотип. Не исключено, что активация генов синтеза ЭПС у них может происходить под влиянием каких-то других условий окружающей среды. Поиск их и является предметом нашего дальнейшего изучения.

Литература

1. Головлев Е.Л. Академик Н.Д. Иерусалимский. Микробиология.- 1999.- Том 68.- № 6.
2. Магданова Л.А., Голясная Н.В. Гетерогенность как адаптивное свойство бактериальной популяции. Микробиология.- 2013.- Т.82.- №1.- с.3-13.
3. Маркина О.В., Шелухович А.И., Терентьев А.Н., Татаренко О.А., Водопьянов С.О., Мазрухо А.Б., Македонова Л.Д., Каминский Д.И., Шестиалтынова И.С. Стабилизированные варианты *Vibrio cholerae El Tor* P-18895. Проблемы особо опасных инфекций. – 2015.- Вып.1. - С.67-70.
4. Олескин А.В., Ботвинко И.В., Цавкелова Е.А. Колониальная организация и межклеточная коммуникация у микроорганизмов <http://evolution.powernet.ru/library/colony.htm.-1999>.
5. Lauriano С.М., Chosh С., Correa N.E., Klose K.E. The sodium-driven flagellar motor controls exopolysaccharide expression in *Vibrio cholerae*. J. of bacteriology. - 2004.-V.186.- №15. - P. 4864-487

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ К ФАГОЦИТОЗУ РУГОЗНЫХ И ГЛАДКИХ ВАРИАНТОВ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ EL TOR P-18895*

О.В. Маркина, А.И. Шелухович, Е.Ю. Люкшина, А.Н. Терентьев
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Известно, что при высеве холерных вибрионов на твердых питательных средах регистрируются колонии как типичного S-фенотипа (от англ. – smooth), так и измененные: плотные, складчатые, слизистые и др. Сегодня уже известно, что причиной образования одного из фенотипических вариантов колоний - плотных складчатых - является присутствие экзополисахарида (ЭПС). Благодаря ему вибрионы приобретают устойчивость ко многим факторам окружающей среды, в том числе, и к фагоцитозу простейшими [1,3,4,6-9]. Однако насколько чувствительны клетки ругозных колоний к этому процессу на самой начальной стадии их роста, когда полисахаридный слой на их поверхности еще не выражен, данных практически нет. Ранее нами были получены фазовые варианты штамма *V.cholerae El Tor P-18895*, в том числе и ругозный, с низким индексом диссоциации – не более 10% [2]. Целью настоящей работы явилась сравнительная оценка их устойчивости к фагоцитозу простейшими.

За рубежом, как правило, в подобных экспериментах используют *Acanthamoeba castellanii*, *Rhynchonomas nasuta* и др. Но поскольку это свободноживущие в воде организмы, то все эксперименты *in vitro* проходят в жидкой среде, и учет результатов фагоцитоза проводится путем подсчета клеток вибрионов после их совместного культивирования с Protozoa. Если изучается устойчивость бактериальных биопленок, то исследования проводят с использованием электронного микроскопа. Использование же простейших, способных расти на агаризованных средах, позволило бы получить быструю визуальную оценку результатов фагоцитоза по появлению зон просветления. Таким модельным организмом может стать *Dictyostelium discoideum* - клеточный слизевик, относящийся к типу Mycetozoa, который с успехом применяют для изучения контакт-зависимых систем секреции. Однако для постановки эксперимента необходимо было подобрать оптимальные условия как для роста самих миксамеб, так и фазовых вариантов холерного вибриона. Связано это с тем, что на агаре Мартена вибрионы способны формировать ругозный фенотип, однако на нем миксамебы практически не

размножаются, возможно, этому препятствует неоптимальный для их роста состав питательных веществ и/или pH среды - 7,7. Среда SM и SM/5, используемые для культивирования *D.discoideum* [5], содержат в своем составе глюкозу, поэтому на ней измененные варианты холерных вибрионов, как правило, переходят в исходный S-фенотип, при этом продукция ЭПС снижается; кроме того pH данных сред составляет не более 6,4, что также не является оптимальным для роста вибрионов. В ходе работы было установлено, что требованиям эксперимента удовлетворяют такие питательные среды как ВСУЕАα, СЭЛ и некоторые варианты БАЛ, используемые для культивирования легионелл, на которых одновременно сохраняются основные фенотипы вибрионов, и поддерживается рост простейших. Несмотря на то, что среды содержат в своем составе L-цистеин, который согласно данным литературы препятствует развитию амёб, она поддерживала рост *D.discoideum*. Эксперимент был проведен по следующей схеме: бактериальные взвеси S- и ругозного вариантов *V.cholerae* El Tor P-18895 в концентрации 10^9 КОЕ/мл засеивали на агар, подсушивали и наносили споры *D. discoideum*, после чего оставляли на ночь во влажной камере при 23⁰С (условия термостата). Через 24 часа на газоне обоих вариантов регистрировали зоны просветления (бляшек). Их наличие свидетельствовало о фагоцитирующей активности миксамёб. Через 48 часов внутри бляшек на чашке, засеянной клетками ругозного варианта штамма, появлялись плоские вросшие в агар колонии, которые при отсеивании давали исходный ругозный фенотип. Присутствие их внутри зон просветления можно объяснить наличием скоплений клеток, которые оказались устойчивыми к фагоцитозу простейшими. Кроме того, увеличения размера бляшек на агаре, засеянном ругозным вариантом штамма практически не было, тогда как на агаре с газоном бактерий S-фенотипа зона продолжала медленно увеличиваться.

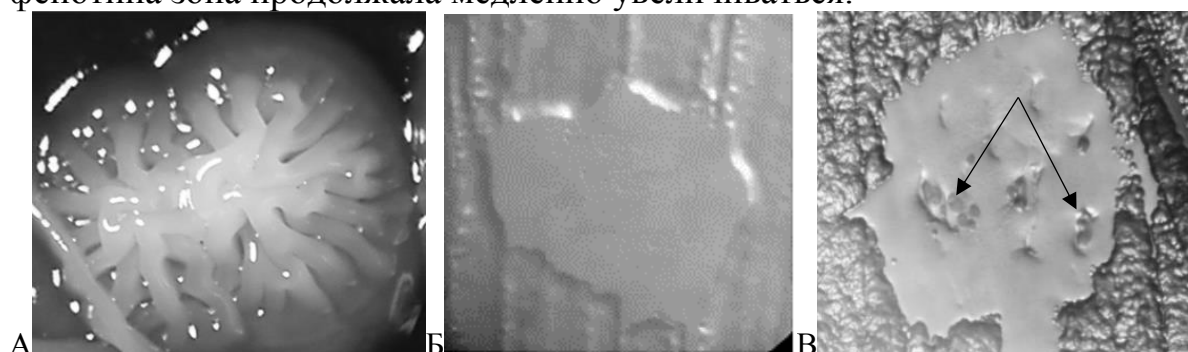


Рисунок 1. Вид ругозных колоний *V.cholerae* El Tor P-18895 на среде СЭЛ (А). Зоны просветления, образованные *D.discoideum*, на агаре с *V.cholerae* El Tor P-18895 через 48 часов: S-фенотип (Б), ругозные колонии (В). Стрелками обозначены плоские вросшие в агар колонии вибрионов.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что на стадии одиночных клеток ругозный вариант фагоцитировался

простейшими, тогда как формирующийся полисахаридный слой на поверхности рогозных колоний препятствовал этому процессу. Не исключено, что на него оказывали влияние и антипротозойные факторы, которые могут синтезироваться вибрионами в составе биопленок [6]. Экспериментальная проверка данного предположения является предметом наших дальнейших исследований.

Литература

1. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. Проблемы особо опасных инфекций. – 2010.- Вып.105. - С.13 - 19.
2. Маркина О.В., Шелухович А.И., Терентьев А.Н., Татаренко О.А., Водопьянов С.О., Мазрухо А.Б., Македонова Л.Д., Каминский Д.И., Шестиалтынова И.С. Стабилизированные варианты *Vibrio cholerae* El Tor P-18895. Проблемы особо опасных инфекций. – 2015.- Вып.1. - С.67-70.
3. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Nair G.B., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O1 strains are facultative intracellular bacteria, able to survive and multiply symbiotically inside the aquatic free-living amoeba *Acanthamoeba castellanii*. FEMS Microbiol. Ecol. – 2007.- V.60. - №1.- P.33-39.
4. Abd H., Saeed A., Weintraub A., Sandstrom G. *Vibrio cholerae* O139 requires neither capsule nor LPS O side chain to grow inside *Acanthamoeba castellanii*. J. Med. Microbiol. – 2009. - V.58. - Pt1. - P.125-131.
5. Dictyostelium discoideum protocols. Methods in molecular biology. - 346. - 2006. - P.113-115.
6. Erken M, Weitere M, Kjelleberg S, McDougald D. In situ grazing resistance of *Vibrio cholerae* in the marine environment.// FEMS Microbiol Ecol. – 2011.- V.76. - №3. - P.504-512.
7. Sandstrom G., Saeed A., Abd H. *Acanthamoeba polyphaga* is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments. Exp. Parasitol. - 2010.- V.126. - №1. - P.65-68.
8. Shuyang Sun, Staffan Kjelleberg, Diane McDougald. Relative Contributions of *Vibrio* Polysaccharide and Quorum Sensing to the Resistance of *Vibrio cholerae* to Predation by Heterotrophic Protists. PLoS One. - 2013. - V.8. - №2. - P.56338.
9. Valeru S.P, Wai S.N., Saeed A., Sandström G. and Abd H. BMC Research. Notes. – 2012. - V.5. – P.33 <http://www.biomedcentral.com/1756-0500/5/33>

ОБ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ N-АЦЕТИЛ-β-D-ГЛЮКОЗАМИНИДАЗЫ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Хитин является одним из широко распространенных биополимеров в природе после целлюлозы, состоящий, в основном, из соединенных β-1,4-гликозидной связью остатков N-ацетил-β-D-глюкозамина (GlcNAc). В качестве источника углерода и азота он играет важную роль в защите и удовлетворении питательных потребностей многих бактерий, включая вибрионы, которые расщепляют этот полимер до олигосахаридов и далее моносахаридов (N-ацетилглюкозамин или глюкозамин) кооперативным действием хитиназ (КФ 3.2.1.14), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (хитобиазы) (КФ 3.2.1.30) и N-ацетилглюкозаминдеацетилазы олигосахаридов (КФ 3.5.1.41). N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза отщепляет по экзо-типу крайне расположенные с невосстанавливающего конца остатки N - ацетилглюкозамина у образующихся из полимеров хитина под действием хитиназы (эндо-тип) высших олигосахаридов (GlcNAc)_n ≥2, а также атакует димерное звено хитобиозы (β-GlcNAc1-4GlcNAc) с последующим превращением ее в N-ацетилглюкозамин.

Гидролизующие хитин ферменты (хитиназы) встречаются у широкого круга организмов, включая вирусы, бактерии, грибы, насекомые, растения и животные. Ранее нами был изучен хитинолитический комплекс холерного вибриона [2]. Исследование же N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (хитобиазы) (КФ 3.2.1.30) - фермента, входящего в состав этого комплекса у вибрионов, было проведено сравнительно недавно [1]. Несмотря на то, что этот уникальный фермент был выделен, очищен и частично изучен, ряд его свойств, лежащих в основе его биологического действия, остаются мало понятными. Между тем, из литературы известно, что хитиназы защищают растения от патогенных грибов, участвуют в патогенезе вирусных инфекций и необходимы грибам и бактериям (*Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus lugdunensis* и др. [4] для реализации функции аутолиза. Принимая во внимание существование у холерного вибриона мощного хитинолитического комплекса и его роль в сохранении возбудителя в окружающей среде, представляет интерес оценка возможной антибактериальной активности глюкозаминидазы для последующего выяснения её значения в биологии холерных вибрионов.

В настоящей работе исследовали влияние очищенного препарата глюкозаминидазы [1] на штаммы ряда гетерологичных микроорганизмов,

полученных из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: *Micrococcus luteus*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis EV*, *Escherichia coli* HB101 и *E. coli* QD5003, где они находились в лиофилизированном состоянии. Для изучения антимикробной активности ферментативного препарата на поверхность чашек с агаром Хоттингера (рН 7.2) и эритрит-агаром засеивали 10^9 микробных клеток по стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича, и после распределения культуры шпателем устанавливали металлические колодцы диаметром 5 мм, в которые вносили испытуемый очищенный препарат в концентрации 0.05-0.7 мкг белка на пробу. Учет результатов производили на 2-3 сутки роста при 37° С.

Анализ полученных результатов показал, что испытуемый препарат фермента глюкозаминидазы обладал антибактериальным действием, подавляя в низких концентрациях рост лабораторных штаммов кишечной палочки *E.coli* HB101, *E.coli* QD5003, *M. luteus*, *S. typhimurium*, *Y.pestis EV*. Диаметры зон ингибирования роста были различными (3-10 мм), максимально выраженный антибактериальный эффект проявлялся в отношении *M. luteus* и *S. typhimurium*. Таким образом, N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза наделена литической способностью. Можно полагать, что препарат N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы может быть активен и в отношении других микроорганизмов.

Неожиданно выявленная антибактериальная способность у очищенного фермента N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы из *Vibrio cholerae*, представляется интересной, так как она перекликается с предположением J. В. Kaplan et. al. [3] о возможном участии аналогичного фермента из *Actinobacillus* sp. (в качестве фактора колонизации) в явлении устранения биопленок других бактерий с целью освобождения поверхностей для собственного укоренения в конкретной экологической нише. Обнаруженное свойство фермента мы рассматриваем в качестве материальной основы конкурентных возможностей холерных вибрионов в сложных механизмах их циркуляции в разнообразных природных условиях.

Дальнейшие исследования фермента позволят расширить наши представления о механизме его действия, роли в персистенции, адаптации и экологии холерных вибрионов с разной эпидемиологической значимостью и выделенных из различных источников.

Литература

1. Дуванова, О.В. Активность N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы холерных вибрионов / О.В. Дуванова. Б.Н. Мишанькин // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону. -2014.-Вып. 27.-С.105-108.
2. Мишанькин, Б.Н. Изучение хитинолитического комплекса

холерного вибриона сероварианта O139./ Б.Н. Мишанькин, Н.Я. Шиманюк, С.О. Водопьянов, Л.В. Романова, А.С. Водопьянов, О.В. Дуванова, Г.Т. Атарова, С.В. Демьяненко.// Биотехнология.-2010. - № 1.-С. 32-40.

3. Kaplan, J.B. Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous β -hexosaminidase activity./ J.B. Kaplan, C. Rangunath, N. Ramasubbu, D.H. Fine// J. Bacteriol.-2003.-Vol. 185, N 16.-P. 4693-4698.

4. Huard C. Characterization of AcnB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactobacillus lactis* /C. Huard, G. Miranda, F.Wessner, A. Bolotain, Y.Hansen, S.Y. Foster, M.-P. Chapot-Ehartier //Microbiology.-2003.-Vol. 149.-P. 695-705.

СТАБИЛЬНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ

М.В. Овчинникова, М.Н. Исляева, М.Н. Киреев, Е.Г. Абрамова

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов*

В современных условиях развития биотехнологии большой интерес для фармакологии представляют комплексные лекарственные системы с использованием синтетических и природных полимеров.

Известно, что хитозан проявляет иммуномодулирующие, антианемические и цитопротекторные свойства; нетоксичен, биосовместим, механически прочен, нетравматичен для слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта [1]. Эти и другие ценные свойства хитозана позволяют его использовать в качестве основы при конструировании сложных биологически активных систем [3].

В целях создания специфического энтеросорбента, обладающего антитоксической направленностью по отношению к экзотоксину холерного вибриона, в качестве сорбционной матрицы-носителя антитоксического иммуноглобулина (активного компонента) был выбран природный полимер хитозан. Такая полимерная основа в системе матрица-белок может осуществлять функции, гарантирующие эффективность проводимой терапии: пролонгирование действия иммобилизованного вещества; контроль над процессом высвобождения и доставки активного компонента в соответствии с необходимостью для организма; обеспечение стабильности свойств биологически активного комплекса в негативных

условиях среды желудочно-кишечного тракта при пероральном применении [2].

В связи с этим, целью данной работы являлось изучение влияния хитозановой матрицы на сохранность антитоксической активности экспериментального противохолерного энтеросорбента при взаимодействии с протеолитическими ферментами.

В работе использовали три серии неиммобилизованного антитоксического иммуноглобулина и три серии экспериментального специфического энтеросорбента. Протеолитические ферменты – пепсин кристаллический и трипсин кристаллический применяли для моделирования условий желудочно-кишечного тракта. Опыт проводили в два этапа.

Первый этап: взаимодействие исследуемых образцов с пепсином. К растворам неиммобилизованного иммуноглобулина и специфического энтеросорбента добавляли 200 мл фермента и 1 мл 0,1 М раствора соляной кислоты, рН смесей определялся в диапазоне $2,0 \pm 0,1$, что является оптимумом для пепсина. Смеси инкубировали в течение 2 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Далее проводили нейтрализацию 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН $7,8 \pm 0,1$, данное значение рН является оптимальным для трипсина.

Второй этап: взаимодействие исследуемых образцов с трипсином. В полученные «нейтрализованные» реакционные смеси добавляли 300 мл фермента и инкубировали в течение 3 ч при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. После экспозиции с целью инактивации трипсина добавляли 0,1 М раствор соляной кислоты до установления рН $4,0 \pm 1,0$ и нейтрализовали 0,1 Н раствором натрия гидроксида до рН $7,2 \pm 0,1$. Экспериментальные образцы центрифугировали. Супернатанты декантировали. Из осажденных взвесей готовили 10 % растворы в 0,01 М фосфатном буфере рН $7,3 \pm 1,0$ для определения специфической активности образцов антитоксического иммуноглобулина и специфического энтеросорбента в непрямом варианте дот-иммуноанализа (ДИА) с использованием диагностикума на основе наночастиц коллоидного золота.

Результаты экспериментов представлены в таблицах 1, 2.

Таблица 1. Специфическая активность неиммобилизованного антитоксического иммуноглобулина.

№ серии антитоксического иммуноглобулина	Обратный титр специфических антител в ДИА до обработки ферментами	Обратный титр специфических антител в ДИА после обработки ферментами
06	12800	640
07	6400	640
08	6400	640

Таблица 2. Специфическая активность антитоксического энтеросорбента.

№ серии антитоксического энтеросорбента	Обратный титр специфических антител в ДИА до обработки ферментами	Обратный титр специфических антител в ДИА после обработки ферментами
05	12800	6400
06	12800	6400
07	6400	3200

Полученные данные свидетельствовали, что после взаимодействия с протеолитическими ферментами произошло снижение специфической активности как неиммобилизованных иммуноглобулинов, так и специфического энтеросорбента, титры антитоксических антител составили 1:640 и 1:3200-1:6400 соответственно. Однако специфический энтеросорбент сохранял свои антитоксические свойства на высоком уровне, в отличие от неиммобилизованного иммуноглобулина, наиболее чувствительного к действию пепсина и трипсина. Стабильность энтеросорбента можно объяснить наличием в его составе хитозановой матрицы, которая является устойчивым агентом в деструктивной среде ферментов желудочно-кишечного тракта [4].

Таким образом, в энтеросорбционной системе «основа-белок» хитозан оказывает стабилизирующее действие на структуру антигенсвязывающих центров антитоксического иммуноглобулина, обеспечивая эффективность его направленного действия в отношении экзотоксина холерного вибриона.

Литература

1. Жоголев К.Д., Никитин В.Ю., Цыган В.Н., Егоров В.Н. Разработка и изучение некоторых лекарственных форм препаратов на основе хитозана // Новые достижения в исследовании хитина и хитозана. – М.: Издательство ВНИРО, 2001. – С.163–167.
2. Петрович Ю.А., Григорьянц Л.А., Гурин А.Н., Гурин Н.А. Хитозан: структура и свойства. Использование в медицине // Стоматология. –2009. – Т.85, №4. – С. 72–77.
3. Хитин и хитозан: Получение, свойства и применение / Под ред. К.Г. Скрябина, Г.А. Вихоревой, В.П. Варламова. – М: Наука, 2002. – 368 с.
4. Чернова В.В. Деструкция хитозана под действием некоторых ферментных препаратов медицинского назначения: автореф. дис. ... канд. хим. наук. – Уфа, 2011. – 24 с.

ЗИМОГРАФИЧЕСКОЕ ОБНАРУЖЕНИЕ ПЕПТИДОГЛИКАНГИДРОЛАЗ И ХИТИНАЗ У *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 И O139 СЕРОГРУПП

С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев, Л.Я. Урбанович, Т.А. Иванова,
О.И. Витязева

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

Пептидогликангидролазы – это большая группа гидролитических ферментов [гликозидазы (*N*-ацетилглюкозаминидазы и *N*-ацетилмурамидазы), амидазы и эндопептидазы], разрушающих пептидогликан клеточной стенки бактерий. Бактериальные пептидогликангидролазы выполняют множество функций, прежде всего связанных с регуляцией и стимуляцией роста бактериальной клетки, её делением, формированием систем секреции, синтезом сигнальных молекул, сборкой некоторых компонентов клетки (жгутиков, пилей) [6]. Пептидогликангидролазы лизируют пептидогликан клеток бактерий-антагонистов, участвуют в модификации компонентов клеточной стенки для уклонения от распознавания иммунной системой организма хозяина (при проникновении патогена в макроорганизм). Их роль в персистенции обусловлена участием в образовании биоплёнки и лизисе фаговых частиц (бактериофагов) [4]. Данные о наличии и характеристике пептидогликангидролаз у холерного вибриона практически отсутствуют, за исключением сообщения о способности белка VgrG-3, входящего в состав контакт-зависимого аппарата секреции шестого типа, расщеплять пептидогликан, тем самым потенцируя эффект дополнительных токсинов *Vibrio cholerae* [2]. Хитиназы (ЕС. 3.2.1.14) – это семейство ферментов, осуществляющих гидролиз β -1,4 гликозидных связей хитина – природного биополимера, являющегося главным структурным компонентом экзоскелета ракообразных, представителей зоопланктона и клеточных стенок большинства патогенных грибов. Продукты гидролиза хитина являются важным источником азота, углерода и энергии для многих представителей морских бактерий, включая *V. cholerae*, что имеет определённое значение для персистенции этого патогена в окружающей среде. У холерного вибриона обнаружено шесть хитиназ, при этом прослеживается корреляция между наличием у микроорганизма хитиназ и развитием заболевания у человека, более того, водные штаммы *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, обладающие разной удельной хитинолитической активностью, различаются по вирулентности [1]. Наиболее информативным и наглядным способом, позволяющим определить наличие, свойства и состав гидролаз, активных в отношении

пептидогликана и хитина, является субстратный электрофорез в полиакриламидном геле, так как использование стандартных биохимических (прежде всего, спектрофотометрических) методов изучения ферментов в рутинных лабораторных исследованиях не даёт полного представления о межштаммовых различиях в отношении хитиназной и пептидогликангидролазной активности и поэтому не представляет возможным косвенно оценить патогенный потенциал штаммов холерного вибриона по этим признакам.

Цель работы: выявление секретируемых гидролитических ферментов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в ДСН-электрофорезе в полиакриламидном геле, импрегнированном клетками *Micrococcus luteus* или гликольхитином.

Материалы и методы. В работе использовано 10 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных во время эпидосложнений и в благополучный по холере период. Бактерии культивировали на щелочном мясо-пептонном агаре при 37 °С в течение суток. Суточную культуру смывали физиологическим раствором, определяли концентрацию взвеси и помещали во флаконы с мясо-пептонным бульоном (рН 7,6) с тем расчётом, чтобы в 1 мл содержалось 2×10^8 м.к. Через 2 часа инкубации при комнатной температуре во флаконы с бактериальной взвесью добавляли с целью обеззараживания мертиолят натрия с конечной концентрацией 0,01% и инкубировали их в течение двух суток на холоде. Все последующие манипуляции осуществляли после контроля материала на специфическую стерильность. Далее проводилось центрифугирование материала при 10000 об/мин, супернатант (бесклеточная культуральная жидкость) диализовали и лиофильно высушивали.

Зимографический анализ выполняли посредством SDS-электрофореза в блоках 8 % полиакриламидного геля, импрегнированном обеззараженными автоклавированием клетками *M. luteus* NCTC 2665 (в конечной концентрации 0,1 %) [5] или гликольхитином (в конечной концентрации 0,1 %) [3] в качестве субстратов пептидогликангидролаз и хитиназ, соответственно. Гидролитическую активность параллельно контролировали постановкой тестов радиальной энзимодиффузии в 1 % агарозном геле с 0,5 % (*m/v*) клеточными стенками и гликольхитином. О наличии пептидогликангидролазной и хитиназной активности судили визуально по образованию прозрачных зон гидролиза на фоне денатурированных субстратов.

Результаты. При помощи субстратного электрофореза установлено, что 0,01 % раствор мертиолята натрия, использованный для обеззараживания культуральной жидкости взятых в опыт штаммов холерного вибриона, не оказывает ингибирующего влияния на активность обнаруженных хитиназ и пептидогликангидролаз. Сравнительный зимографический анализ культуральной жидкости штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп разной

эпидзначимости показал, что большинство из них обладает пептидогликангидролазной и хитиназной активностью. Менее активными в субстратном электрофорезе оказались препараты культуральной жидкости клинических штаммов холерного вибриона, у которых выявлено 3 полосы гидролиза пептидогликана и 4 полосы гидролиза хитина, в то время как препараты штаммов, выделенных из объектов окружающей среды в благополучный по холере период, характеризуются наличием до 7–8 полос просветления субстрата. Интересно отметить, что в отличие от вибрионов O1 серогруппы у вибрионов, относящихся к O139 серогруппе, более активными оказались токсигенные штаммы, чем нетоксигенные, что проявилось в виде 2 полос гидролиза пептидогликана и 3 зон гидролиза гликольхитина.

Заключение. Таким образом, с помощью субстратного электрофореза препаратов культуральной жидкости штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп выявлены количественные и качественные различия состава пептидогликангидролаз и хитиназ в зависимости от эпидзначимости штаммов. Показана пригодность методов зимографии для определения наличия и спектра гидролитических ферментов, что может быть использовано для последующего их выделения и изучения.

Литература

1. Мишанькин Б.Н., Шиманюк Н.Я., Водопьянов С.О. Изучение хитинолитического комплекса холерного вибриона сероварианта O139 / Б.Н. Мишанькин, Н.Я. Шиманюк, С.О. Водопьянов, Л.В. Романова, А.С. Водопьянов, О.В. Дуванова, Г.Т. Атарова, С.В. Демьяненко // Биотехнология. – 2010. – №1. – С. 32–40.
2. Brooks T.M. Lytic activity of the *Vibrio cholerae* type VI secretion toxin VgrG-3 is inhibited by the antitoxin TsaB / T.M. Brooks, D. Unterweger, V. Bachmann, B. Kostiuk, S. Pukatzki // J. Biochem. – 2013. – Vol. 288, N11. – P. 7618–7625.
3. Cho E.K., Choi I.S., Choi Y.J. Overexpression and characterization of thermostable chitinase from *Bacillus atrophaeus* SC081 in *Escherichia coli* / E.K. Cho, I.S. Choi, Y.J. Choi // BMB reports. – 2011. – Vol 44, N 3. – P. 193–198.
4. Heijnen J. Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli* / J. Heijnen // Microbiol.Mol.Biol.Rev. – 2011. – Vol. 75, N 4. – P. 636–663.
5. Leclerc D., Asselin A. Detection of bacterial cell wall hydrolases after denaturing polyacrylamide gel electrophoresis / D. Leclerc, A. Asselin // Can. J. Microbiol. – 1989. – Vol. 35, N 8. – P.749–753.
6. Vollmer W. Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases / W. Vollmer, B. Joris, P. Charlier, S. Foster // FEMS Microbiol. Rev. – 2008. – Vol. 32, N 2. – P. 259–286.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2013-2014 ГОДАХ

А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин,
В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Эпидемиологическая обстановка и прогноз по холере в мире остаются неблагоприятными, существует опасность распространения этого заболевания. Водные объекты окружающей среды, содержащие вибрионы, могут представлять эпидемическую опасность и эта угроза определяет необходимость постоянного мониторинга холеры [1]. Составной частью мониторинга является всестороннее изучение штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территории страны [1, 2, 3].

В последние годы для изучения свойств вибрионов широко используется метод выявления числа вариабельных тандемных повторов (VNTR-типирование) [2-4]. Недавно предложен новый перспективный метод молекулярного типирования вибрионов, основанный на выявлении различий INDEL-маркеров [5].

Цель работы состояла в изучении генотипического разнообразия штаммов холерного вибриона, выделенных в объектах окружающей среды в 2013-2014 годах на территории Российской Федерации методами VNTR- и INDEL- типирования.

Материалы и методы.

В работе использовали 79 штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации (44 штамма в 2013 г. и 35 штаммов в 2014 г.). Все штаммы были лишены гена холерного токсина (ctxAB) и являлись типичными по своим биохимическим и культуральным свойствам. Пять штаммов содержали ген токсин-корегулируемых пилей (tcpAB).

VNTR-анализ по пяти локусам вариабельных тандемных повторов и ПЦР со сконструированными праймерами к четырем INDEL-локусам вибрионов проводили по методикам, описанным ранее [2-5]. Кластерный

анализ распределения аллелей проводили по методу UPGMA с использованием аппарата анализа геоинформационной системы «Холера. Штаммы -VNTR» [4].

Результаты и обсуждение.

Проведенный INDEL- и VNTR-анализ 79 штаммов *Vibrio cholerae* позволил выявить 48 уникальных генотипов, которые на основании кластерного анализа по методу UPGMA распределились между 12 кластерами, обозначенными буквами латинского алфавита с «А» по «L» (Рис 1).

Пять штаммов, содержащих ген токсинкорегулируемых пилей и островок патогенности VcB [6], четко дискриминировались от апилированных штаммов и составили четко дискриминируемый отдельный кластер «L». В эту же группу вошел токсигенный штамм 81 (генотип «L1»), выделенный из поверхностного водоема летом 2014 в г. Ростове-на-Дону.

При анализе мест выделения штаммов для большинства генотипов выявлена четкая географическая привязанность. Так штаммы, составляющие кластер «С», выделялись исключительно на территории Ростовской области; штаммы кластера «G» – только на территории Республики Крым; кластер «H» обнаруживался только в Республике Калмыкия. Интересно отметить, что идентичные штаммы генотипа «H3» выделены в Республики Калмыкия в 2013 и 2014 годах, что может указывать на их возможное укоренение.

Вместе с тем, штаммы, составляющие кластер «E», выделялись на территориях Ростовской области и Республики Калмыкия, что, по-видимому, может объясняться их географической близостью.

Штаммы, составившие кластер «B», выделялись на обширной территории – в Забайкальском крае, Республиках Коми и Бурятия и Иркутской области. Интересно отметить, что штаммы генотипа «B5» были выделены в 2013 году в Республике Коми, а в 2014 году в Иркутской области. В целом для штаммов была характерна низкая клональность – большинство генотипов было представлено одним или двумя изолятами. Наибольшая клональность установлена для штаммов из Республики Калмыкия – генотипы «H6», «H8», «E3» и «E4» были представлены 8, 6 5 и 4 изолятами.

Результаты проведенного анализа подтверждают полученные ранее данные о географической привязанности различных штаммов холерного вибриона [3]. На основании исследования методами VNTR- и INDEL-типирования можно заключить, что апилированные штаммы холерного вибриона, выделенные из объектов окружающей среды в 2013-2014 годах на территории Российской Федерации имеют происхождение отличное от токсигенного штамма 81, выделенного летом 2014 в г. Ростове-на-Дону.

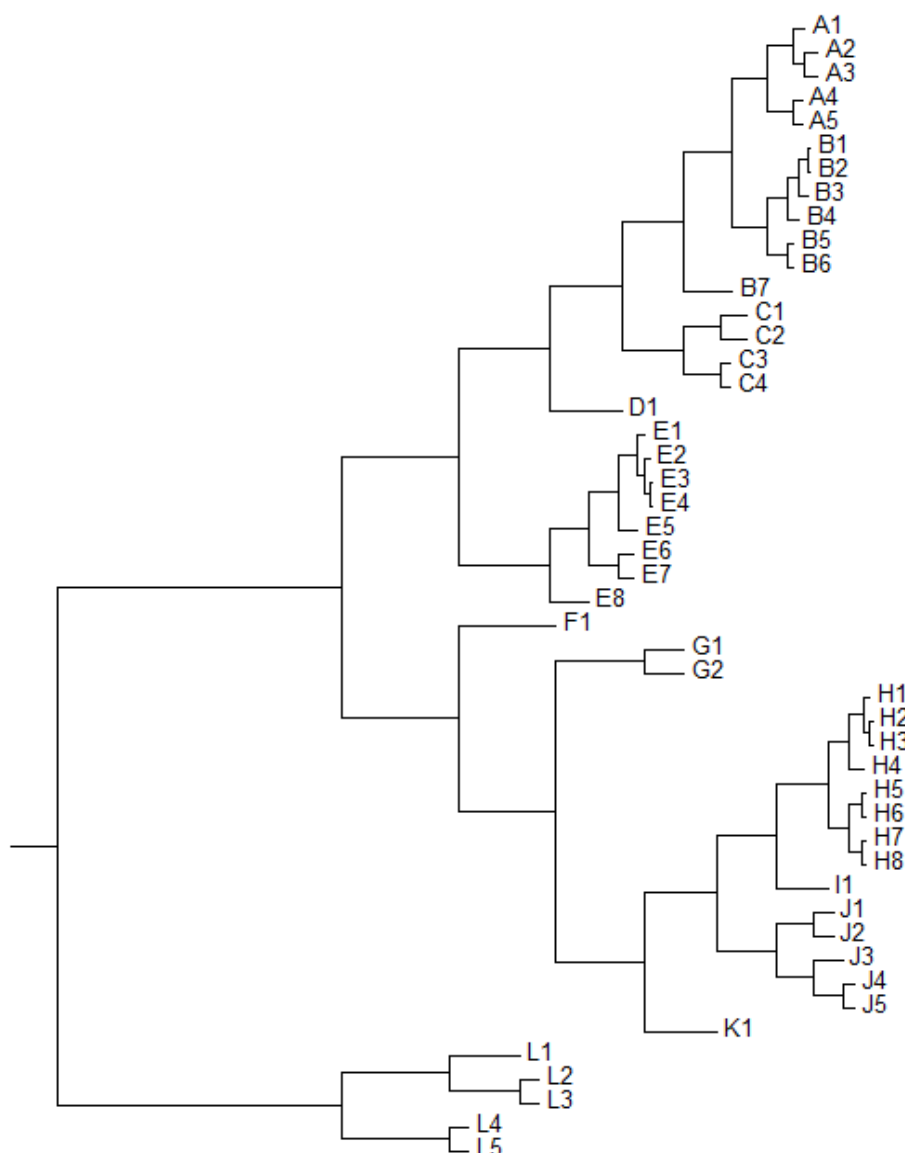


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная на основании кластерного распределения VNTR- и INDEL-аллелей у штаммов *V. cholerae*, выделенных в 2013-2014 годах на территории РФ.

Регион	2013	2014
Ростовская область	C1 C2 C3 C4 D1 E5	E8 L1
Республика Калмыкия	E6 E7 H2 H3 H5 H6 H7 H8 J4 J5 L4 L5	E1 E2 E3 E4 H1 H3 H4 J1 J2 J3 K1
Забайкальский край	B2 B3 B7	A3
Республика Бурятия	B6	
Хабаровский край	L2 L3	
Республика Коми	B4 B5	
Краснодарский край	I1	
Республика Крым		G1 G2
Иркутская область		B1 B5
Рязанская область		A5
Приморский край		A4 F1
Калининградская область		A2
Псковская область		A1

Рисунок 2 – Распределение по регионам VNTR- и INDEL-генотипов у штаммов *V. cholerae*, выделенных в 2013-2014 годах на территории РФ.

Литература

1. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания. МУК 4.2.2870-11. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.
2. Мишанькин, Б.Н. Мультилокусное VNTR-типирование культур холерных вибрионов, выделенных в г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 года / Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2003. – № 6. С. 11-15.
3. Водопьянов А.С., Мазрухо А.Б., Водопьянов С.О. и др. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году.// Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2014. – № 2. – С.46-51.
4. Водопьянов, А.С. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2007620389. Холера. Штаммы –VNTR / Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. -2007.
5. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование// Свидетельство об официальной регистрации базы данных № 2014620308 от 20 февраля 2014 г.
6. Водопьянов, А.С. Корреляция области варибельного тандемного повтора VcB (VNTR VcB) и гена токсин-корегулируемых пилей (tcpA) у возбудителя холеры: компьютерный анализ/ Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. // Здоровье населения и среда обитания. – 2014. – № 4(253). – С.14-16.

ПОТЕНЦИАЛЬНО ЭПИДЕМИЧЕСКИ ОПАСНЫЕ ШТАММЫ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА: МЕХАНИЗМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ И СТРУКТУРА ГЕНОМА

Т.А. Кульшань, Е.Ю. Баранихина, Д.А. Агафонов, Я.М. Краснов,
Н.И. Смирнова

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов*

Штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор отличаются значительной

вариабельностью их генома, которая связана как с приобретением новой генетической информации, так и с утратой различных мобильных элементов или входящих в их состав генов. Одним из следствий такой вариабельности является появление в начале 90-х годов прошлого столетия новых генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, несущих в своем геноме ген *ctxB* классического типа (*ctxB1*), характерный для холерных вибрионов классического биовара, а так же появлением у данных штаммов в острове пандемичности VSP-II делеции различной протяженности [3,4]. Кроме того, из внешней среды часто выделяют штаммы *V. cholerae*, лишенные генов холерного токсина, но сохранившие ген основного фактора колонизации *tcpA*. Данные изоляты представляют большой интерес, поскольку не только могут обусловить появление вибрионосителей, но и существует реальная возможность превращения их в токсигенные в результате фаговой конверсии [2]. Вместе с тем точное происхождение таких изолятов до сих пор неизвестно, а структура их генома остается малоизученной.

В связи с этим, целью нашей работы явилось изучение возможности формирования нетоксигенных штаммов из токсигенных при попадании последних в водную среду и анализ структуры генома Tox^+ и Tox^- штаммов геноварианта на основе полногеномного секвенирования.

В ранее проведенных нами модельных экспериментах по инкубированию 11 токсигенных штаммов в автоклавированной речной воде было установлено, что более 50% изученных типичных клинических штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, содержащих одну копию профага СТХф, утрачивали этот профаг, несущий гены холерного токсина. Вместе с тем, сведения о спонтанной утрате профага СТХф геновариантом до сих пор отсутствуют. В этой связи аналогичные эксперименты были проведены с 11 штаммами геновариантов, 10 из которых содержали в геноме две копии профага и лишь 1 (P18899, выделенный в 2006 году в г. Мурманске) имел одну копию СТХф. Кроме того, мы провели дополнительный ПЦР-анализ ранее полученных нетоксигенных вариантов типичных штаммов. В результате ПЦР-анализа было установлено, что после пребывания в воде популяция всех штаммов геновариантов с двумя копиями профага СТХф была однородная, поскольку не было выявлено ни одного нетоксигенного клона. В тоже время популяция штамма P18899 оказалась неоднородной и состояла *ctxA*⁺ и *ctxA*⁻ клонов. При этом у нетоксигенных вариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор P18899 наряду с утратой всех генов профага СТХф была обнаружена потеря генов *rstC* и *tlcR*, входящих в состав геномов профагов RS1ф и TLCф соответственно. Поскольку геноварианты в настоящее время имеют глобальное распространение, мы провели полногеномное секвенирование как токсигенного штамма P18899, так и его нетоксигенного мутанта P18899D.

Наибольший интерес для нас представляли нуклеотидные

последовательности мобильных элементов, несущих в своем составе ключевые и дополнительные гены, связанные с патогенностью и адаптацией к стрессовым условиям окружающей среды: профага СТХφ, островов патогенности VPI-1 и VPI-2, а также островов пандемичности VSP-I и VSP-II.

В результате сравнительного анализа участка хромосомы I, содержащего профаг СТХφ токсигенного штамма P18899 с референс-штаммом N16961 было установлено, что в гене *ctxB* присутствовали две мутации – несинонимические однонуклеотидные замены Т/С в позициях 115 и 203 соответственно. Это означает присутствие в геноме профага СТХφ аллеля *ctxB1*, характерного для холерных вибрионов классического биовара. Другой фаговый ген *rstR* представлен *rstR^{EITor}*. Присутствие в геноме профага генов холерных вибрионов двух разных биоваров (*ctxB^{cla}* и *rstB^{EITor}*) указывает на то, что профаг СТХ^{EITor}φ является гибридным. Что касается нетоксигенного варианта P18899D, то было обнаружено присутствие в анализируемом участке ДНК протяженной делеции, захватывающей гены трех профагов (СТХφ, RS1φ, TLCφ), составляющей 17,4 т.п.н. Однако, в геноме этого нетоксигенного варианта сохранилась последовательность *attRS1*, необходимая для внедрения в хромосому профагов СТХφ и RS1φ [1].

Анализ структуры генома острова патогенности (ОП) VPI-1, содержащего ключевые структурные (*tcpA-F*) и регуляторные (*toxT*, *tcpP*, *tcpH*, *tcpI*) гены вирулентности, обнаружил наличие протяженных участков гомологии у сравниваемых штаммов. Так, не было выявлено никаких различий в нуклеотидной последовательности генов *toxT*, *tcpH*, *tcpI*, *tcpP*. Однако в гене *tcpA*, ответственном за синтез токсин-корректируемых пилей адгезии, которые являются рецептором для профага СТХφ, у токсигенного и нетоксигенного вариантов была обнаружена однонуклеотидная замена А/Г в позиции 266 в кодирующей области гена, приводящая к замене в аминокислотной последовательности белка, а также однонуклеотидная замена С/Т на 128 п.н. выше стартовой точки.

Что касается ОП VPI-2 (53,7 т.п.н.), то этот фрагмент ДНК у обоих штаммов был идентичен референс-штамму N16961.

Острова пандемичности VSP-I и VSP-II были идентичны у сравниваемых штаммов P18899 и P18899D. Следует лишь отметить, что в острове пандемичности VSP-II изогенных токсигенного и нетоксигенного штаммов имелась делеция (VC0495-VC0512) протяженностью 13 105 п.н.

Таким образом, получены экспериментальные доказательства того, что пребывание в водной среде токсигенных типичных клинических и генетически измененных штаммов может привести к изменению их генома. Такие изменения прежде всего выражаются в утрате генома профага, несущего гены *ctxAB*, ответственные за синтез холерного токсина. Однако типичные и генетически измененные варианты

различаются друг от друга протяженностью утраченного генетического материала. Особо важен тот факт, что штаммы профага СТХф, но сохранившие VPI-1 с генами *tcpA-F*, являются потенциально опасными, поскольку в результате фаговой конверсии они могут снова приобретать профаг вирулентности СТХф как с типичными, так и с измененными свойствами.

Подтверждением этому служат результаты проведенного нами эксперимента по введению в клетки нетоксигенного геноварианта P18899D рекомбинантной плазмиды с клонированными генами *stxAB1*. В результате оказалось, что полученные клоны, содержащие введенные на плазмиде гены *stxAB1*, способны к эффективной продукции холерного токсина классического типа.

Литература

1. Davis B.M., Waldor M.K. Filamentous phages linked to virulence of *Vibrio cholerae* // *Curr. Opin. in Microbiol.* - 2003. – Vol. 6 – P.1-8.
2. Faruque S.M., Nair G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* // *Microbiol. Immunol.* - 2002. – Vol. 46 – P. 59-66.
3. Nair G. B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A. M. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol.44. – P. 4211-4213.
4. Taviani E., Grim C.J., Choi J. et al. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis // *FEMS Microbiol Lett.* – 2010. – Vol. 308, N2. - P.130-7.

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОЦЕНКИ ВНУТРИВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Л.К. Лысова,
С.В. Титова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

На территории Российской Федерации в пробах воды поверхностных водоемов регулярно обнаруживают атоксигенные штаммы холерных вибрионов, что указывает на их возможное сохранение в окружающей среде, в то же время выделение токсигенных культур из воды и от людей

носит единичный и спорадический характер [1,2]. Значимость атоксигенных штаммов холерных вибрионов, циркулирующих в поверхностных водоемах, не установлена. Высказано предположение о возможности горизонтального обмена генетической информацией [3], что может приводить к появлению новых форм возбудителя. Практически не исследована их возможная роль во внутривидовой конкуренции, приводящей к последующему исчезновению одних видов возбудителя и распространению новых. На настоящее время имеются лишь единичные работы такого плана [4]. На наш взгляд, это обусловлено отсутствием простых и точных генодиагностических методов, способных уверенно дифференцировать в смеси различные штаммы вибрионов

Целью настоящей работы была разработка способа быстрого определения внутривидовой ингибирующей активности холерных вибрионов на основе INDEL-маркеров.

При анализе базы данных INDEL-маркеров [5] был отобран ген «VC2429», в котором у токсигенных штаммов была обнаружена делеция участка в 16 нуклеотидов. Поэтому в ПЦР со сконструированными нами специфическими праймерами штаммы с делецией формировали амплификат размером 84 п.н., в то время как атоксигенные штаммы образовывали фрагмент в 100 п.н. (Табл. 1).

Таблица 1. Размер амплифицированного в ПЦР фрагмента аллели INDEL-маркера «VC2429» у ctx- и ctx+ штаммов холерного вибриона.

Группа	Число штаммов	Размер аллели INDEL-маркера «VC2429» п.н.
<i>V. cholerae</i> ctx+	38	84
<i>V. cholerae</i> ctx-	37	100

При постановке ПЦР со смесью ДНК ctx-tcpA- и ctx+tcpA+ штаммов было установлено, что амплификация успешно проходит с обеих матриц (84 и 100 п.н.), а различие в молекулярной массе ампликонов позволяет надежно детектировать даже минорное количество аллеля INDEL-ген. Практически стабильно выявлялось присутствие даже 10% минорного аллеля в смеси ДНК двух штаммов (Рис. 1). Таким образом, разработанный метод ПЦР с праймерами к INDEL-маркеру «VC2429» позволял в одной пробирке определять относительное соотношение в смеси каждого из двух изучаемых ctx-tcpA- и ctx+tcpA+ штаммов.

В первой серии экспериментов мы установили, что три исследованных ctx⁻tcpA⁻ штамма (16, 54 и 55), выделенные из воды поверхностных водоемов в 2014 году, обладают различной ингибирующей активностью в отношении токсигенных штаммов.

В следующей серии экспериментов в парных опытах определяли взаимодействие ctx⁻tcpA⁻ штамма 55 с 13 ctx⁺tcpA⁺ штаммов. Объектом

исследования служили исходные смесь культур в водопроводной воде или пробы первого и второго пептона после подрачивания в течение 3 часов. Изученные ctx^+tcpA^+ штаммы по отношению к ингибирующей активности атоксигенного штамма разделились на две группы: подавляемые ctx^- штаммом при совместной инкубации и штаммы резистентные, т.е. сохраняющие свое количество на уровне штамма-антагониста (Рис. 2).

Таким образом, на основании использования разработанного метода оценки внутривидовой конкуренции обнаружена гетерогенность ctx^+tcpA^+ штаммов холерного вибриона по способности конкурировать с ctx^-tcpA^- штаммом. На наш взгляд, наибольшую опасность при попадании в водоемы представляют штаммы первой группы, способные противостоять ингибирующей активности ctx^-tcpA^- штамма.

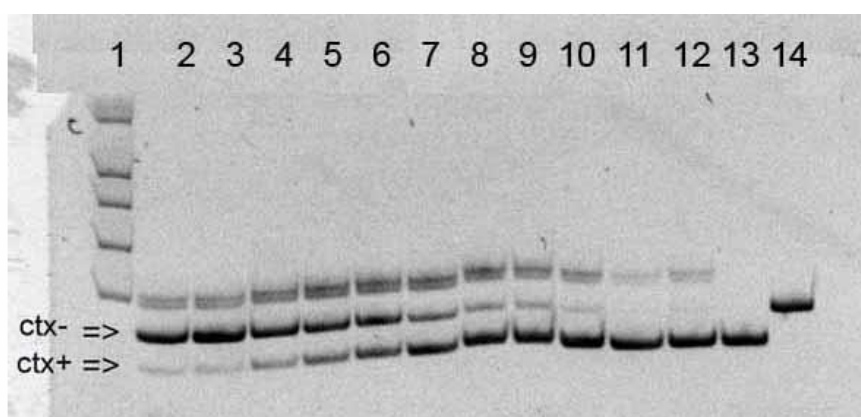


Рисунок 1. Использование ПЦР к INDEL-маркеру «VC2429» холерного вибриона для оценки относительного содержания ctx^- и ctx^+ штаммов по соотношению амплификатов соответствующих аллелей.

Электрофорез в 10 % геле полиакриламида. Лунки: 1- маркеры молекулярного веса, 2-12 пробы, содержащие смесь ДНК ctx^- и ctx^+ штаммов в соотношении 1/32, 1/16, 1/8, 1/4, 1/2, 1/1, 2/1, 4/1, 8/1, 16/1 и 32/1 соответственно; 13 и 14 ДНК ctx^+ и ctx^- штаммов холерного вибриона. Стрелками отмечено расположение аллелей INDEL-маркера у ctx^- и ctx^+ штаммов.

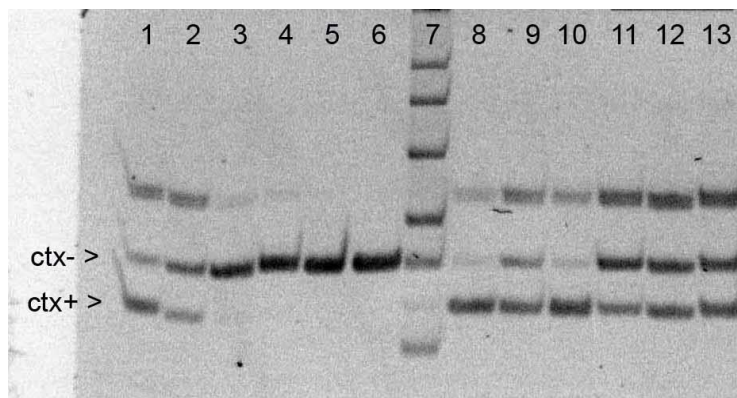


Рисунок 2. Использование ПЦР к INDEL-маркеру «VC2429» для оценки внутривидовой конкуренции ctx+ и ctx- штаммов холерного вибриона.

Электрофорез в 10 % геле полиакриламида Лунки 1 и 8 – исходная смесь ctx+ и ctx- штаммов, 2, 9 и 3,10- пробы инкубированы в пептонной воде после двух последовательных пассажей; 4,11- исходная смесь через 24 часа инкубации при комнатной температуре; 5,12 и 6,13 - пробы инкубированы в пептонной воде после двух последовательных пассажей. Лунки 1-6 и 8-13 содержат клетки ctx+ 18252 и 18368 соответственно. Видно полное исчезновение аллели INDEL-маркера ctx+ штамма 18252 после совместной инкубации с клетками ctx- штамма 55 из исходной смеси и из проб пептонной воды после подращивания и ее сохранение в случае клеток штамма 18368.

Литература

1. Ежова, М.И. Холерные вибрионы O1 серогруппы, выделенные из водных объектов Ростова-на-Дону в ходе мониторинга в 2008–2012 / М.И. Ежова, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.С. Шестиалтынова, И.П. Олейников, Н.Б. Непомнящая, О.А. Подойницына // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 4. – С. 56-59.
2. Водопьянов, А.С. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году / А.С. Водопьянов, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, И.П. Олейников, Д.А. Зубкова, Е.В. Монахова, Л.В. Григоренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – № 2. – С. 46-51.
3. Borgeaud, S. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer / S. Borgeaud, L.C. Metzger, T. Scrinari, M. Blokesch // Science. – 2015. – Vol. 347 (6217) – P. 63-67.
4. Paul K, Ghosh A., Sengupta N., and Chowdhury R.. Competitive Growth Advantage of Nontoxic Mutants in the Stationary Phase in Archival Cultures of Pathogenic *Vibrio cholerae* Strains / K. Paul, A. Ghosh, N. Sengupta, R. Chowdhury // Infection and immunity. – 2004. – Vol. 72, No. 9. – P. 5478–5482.
5. Водопьянов, А.С. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014620308. Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование // Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. -2014.

К ВОПРОСУ О ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ДЕТЕРМИНИРОВАННОСТИ АНТИЛАКТОФЕРРИНОВОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

В.А. Коршенко, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Е.В. Монахова,
И.Я. Черепахина

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

В процессе изучения механизма антилактоферриновой активности (АЛФА) как одного из свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов в организме человека, возник вопрос о генетической детерминированности данного признака.

В предварительных исследованиях была установлена корреляционная связь между уровнем АЛФА и адгезии холерных вибрионов. Известно, что за адгезию и колонизацию в кишечнике человека отвечают, в первую очередь, токсинкорегулируемые пили адгезии TSP, кодируемые генами *tcpA*. Кроме них известны и другие пили, в частности, маннозочувствительные пили адгезии (MSHA), кодируемые геном *mshA*. В последние годы пили MSHA считаются существенными факторами персистенции [2].

Учитывая вышеизложенное, можно предположить, что MSHA, наряду с токсинкорегулируемыми пилиями, принимают участие как в адгезии холерных вибрионов, так и в связывании лактоферрина. Ранее нами было показано [4], что АЛФА резко снижается в присутствии маннозы, которая блокирует маннозочувствительные рецепторы на поверхности холерных вибрионов.

На сегодняшний день способность к инактивации лактоферрина достоверно установлена только для НА/Р [7,10], расщепляющей ее на 2 крупных фрагмента [10]. Несмотря на то, что ею обусловлено до 90% суммарной протеолитической активности холерных вибрионов [8,11], в геноме последних содержится как минимум еще 14 генов известных и предполагаемых протеаз [5], причастность которых к АЛФА никем не изучалась, поэтому представляло интерес определить распространение детерминант некоторых из них среди исследуемых штаммов.

Целью данной работы было изучение частоты встречаемости у холерных вибрионов генов, предположительно «участвующих» в реализации антилактоферриновой активности.

В качестве мишеней, помимо генов *mshA*, *hapA* (НА/Р) и *hapR* (регуляторного белка), мы дополнительно использовали следующие гены:

tagA, кодирующий продукцию муциназы, способствующей адгезии холерных вибрионов [9], *VC1649*, кодирующий продукцию сериновой протеазы, участвующей в деструкции ворсин и повреждении слизистой кишечника [8], *VC1650* – коллагеназы, вероятного фактора персистенции в различных экологических нишах, *pvtV* – протеазы, способной вызывать гибель питающихся бактериями нематод [11].

Материалом для ПЦР служили супернатанты прогретых при 100°C взвесей суточных агаровых культур холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в дистиллированной воде. Амплификацию фрагментов искомым генов с помощью специфических праймеров осуществляли как описано ранее [1] на программируемом термостате «Терцик» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Москва). Нуклеотидные последовательности использованных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1. Праймеры для детекции генов холерных вибрионов.

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Длина ампликона, п.н.	Ссылка
<i>mshA</i>	TCTCGGTATCTTGGCCGTCACA TGCATAGCAACCGTTGCAGGAT	432	[5]
<i>hapA</i>	TCAACTACAACACCGCAGAC GACGACAATCCCAAGAAGAG	270	[3]
<i>hapR</i>	TCGAAAAACGCCCTCGAACTCG ATTCGCCACGCTCCATCGCTT	447	[5]
<i>tagA</i>	CAATGGAGTGGTTGTGCATGGA CGAGCATCGTATGCCAATGTGT	680	[1]
<i>VC1649</i>	GGTGGTAGTTATCTTGGTGG GTCACAACCTCGCTCCTGAA	843	[9]
<i>VC1650</i>	CGGCGTGGCTGGATACATTG GTCACACTTAAATAGTAGCGT	389	[6]
<i>pvtV</i>	CATACTGAGATGCTCTACGAT TTTCACCATGTTCTGGGCGTGA	864	[9]

Результаты проведенных исследований представлены в таблице 2.

Как и следовало ожидать, все изученные штаммы, вне зависимости от биовара, серогруппы и эпидемиологической значимости, содержали в своем геноме видоспецифичный ген *hapA*, что свидетельствует о высокой потенциальной способности вызывать гидролиз белков, в том числе лактоферрина. Но при этом обращает на себя внимание, что в группе классических холерных вибрионов, обладающих очень низкой антилактоферриновой активностью (20,1 нг/мл) лишь у 67% штаммов обнаружен ген *hapR* – положительный регулятор НА/Р, у остальных вибрионов с высокой и средней АЛФА эти гены присутствовали в 100% случаев. Возможно, у части классических вибрионов низкий уровень

АЛФА связан именно с отсутствием *hapR*, который также необходим и для «запуска» транскрипции гена *prtV* [12], выявленного у всех штаммов этой группы. Ген *prtV* отсутствовал лишь у меньшего количества *ctx⁺tcpA⁺* и *ctx⁻tcpA⁺* и почти половины *ctx⁻tcpA⁻* штаммов Эль Тор, что не отразилось на их АЛФА, обусловленной, вероятно, в основном НА/Р.

Таблица 2. Результаты ПЦР-детекции генов у холерных вибрионов.

Штаммы <i>V.cholerae</i>	Группы	Кол-во	Наличие генов в группах штаммов (в %)*						Среднее значение АЛФА в группе нг/мл
			<i>hapR</i>	<i>tagA</i>	<i>prtV</i>	<i>VC 1649</i>	<i>VC 1650</i>	<i>mshA</i>	
El Tor	<i>ctx⁺tcp⁺</i>	19	100	100	90	90	90	84	66,45
	<i>ctx⁻tcp⁺</i>	13	100	100	92	100	100	61	96,5
	<i>ctx⁻tcp⁻</i>	15	100	0	53	40	93	33	72,62
Classical	<i>ctx⁺tcp⁺</i>	9	67	100	100	22	67	56	20,1
O139	<i>ctx⁺tcp⁺</i>	4	100	100	100	100	100	100	40,25
	<i>ctx⁻tcp⁻</i>	8	100	100	100	100	100	0	58,5

*Видоспецифичный ген *hapA* в таблице не указан, т.к. присутствует у всех штаммов.

Ген *tagA* был выявлен только у штаммов, содержащих *tcpA*, что вполне естественно, поскольку оба входят в состав острова патогенности VPI. TagA имеет узкий спектр субстратной специфичности, она активна по отношению к муцину, не расщепляет казеин и желатину [10] и судя по тому, что лишенные VPI штаммы обладают высокой, а многие содержащие VPI – низкой АЛФА, очевидно, не имеет к ней отношения. Корреляция между частотой обнаружения генов *VC1649* и *VC1650* и показателями АЛФА также отсутствовала.

Анализ распространения в группах штаммов генов *mshA*, кодирующих маннозочувствительные пили адгезии, свидетельствует об определенной зависимости частоты их встречаемости от эпидемиологической значимости штаммов – наиболее часто они обнаруживаются у *ctx⁺tcpA⁺* и *ctx⁻tcpA⁺* вариантов (56-100%), гораздо реже – у *ctx⁻tcpA⁻* (0-33%). Если говорить о зависимости показаний АЛФА от частоты обнаружения генов *mshA*, то на первый взгляд она отсутствует, поскольку корреляции между ними нет. Можно предположить (учитывая результаты наших опытов по блокированию маннозочувствительных рецепторов [4]), что маннозочувствительные пили, не могут нейтрализовать лактоферрин, а участвуют только в его связывании.

Таким образом, проведенное исследование показало, что основная роль в расщеплении лактоферрина, по-видимому, все же принадлежит НА/Р. Вместе с тем, следует иметь в виду, что разные штаммы могут обладать неодинаковой способностью к экспрессии различных генов, в том

числе и кодирующих синтез протеолитических ферментов. Поэтому на данном этапе невозможно однозначно ответить на вопрос о том, обладает ли НА/Р абсолютной «монополией» на АЛФА, либо имеет «дублеров» на случай повреждения генов *hapA/hapR*, как это имеет место у генов некоторых токсинов, различающихся по структуре, но сходных функционально [5]. Для решения этого вопроса необходимо изучение АЛФА препарата каждой отдельной протеазы либо рекомбинантных штаммов кишечной палочки, содержащих клонированные гены. На уровне штаммов холерных вибрионов уровни экспрессии генов можно определить в ОТ-ПЦР по количеству матричной РНК, и наличие в нашем распоряжении набора генетически охарактеризованных в рамках данной работы штаммов будет способствовать дальнейшим исследованиям в указанном направлении.

Литература

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов не О1/не О139 серогрупп, выделенных в Ростовской области // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып.27. – С.66-70.
2. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. и др. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке: результаты и направления совершенствования // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов н/Д, 2014. – ып.27.- С.28-35.
3. Ерошенко Г.А., Осин А.В., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Генетические особенности авирулентных штаммов холерных вибрионов О139 серогруппы, выделенных на территории России // Пробл. особо опасных инф. – 2001. – Вып.1 (81). – С.69-75.
4. Коршенко В.А., Черепахина И.Я. Роль лектинов в механизме реализации антилактоферриновой активности холерных вибрионов// Прил. Журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.: Матер. Юбил. Двадцатой Объед. Рос. Гастроэнтерол. недели.- М., 2014.- Т. XXIV.- №5. Приложение 44. - С. 100.
5. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: Автореф. дис...д-ра. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2012. – 48 с.
6. Нефедов, К.С. Сравнительный анализ фенотипических и молекулярно-генетических свойств холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в период седьмой пандемии: Автореф. дис. ... канд. мед.наук. – Саратов, 2009. – 24с.
7. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Holt P. *Vibrio cholerae*

hemagglutinin/lectin/protease hydrolyses fibronectin and ovomucin: F.M.Burnet revisited // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1983. – Vol.80. – P.1092-1095.

8. Syngkon A., Elluri S, Koley H. *et al.* Studies on a novel serine protease of a *ΔhapAΔprtV* *Vibrio cholerae* O1 strain and its role in hemorrhagic response in the rabbit ileal loop model // PLoS ONE. – 2010. – No.9. – e13122.

9. Szabady R.L., Yanta J.H., Halladin D.K. *et al.* TagA is a secreted protease of *Vibrio cholerae* that specifically cleaves mucin glycoproteins // *Microbiology*. – 2011. – Vol. 157, Pt 2. – P.516-525.

10. Toma C., Honna Y., Iwanaga M. Effect of *Vibrio cholerae* protease on lysozyme, lactoferrin and secretory immunoglobulin // FEMS Microbiol. Lett. – 1996. – Vol.135, No.1. – P. 143-147.

11. Vaitkevicius K., Lindmark B., Ou G. *et al.* A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grazing // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2006. – Vol.103. – P.9280–9285.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/НЕ O139 СЕРОГРУПП РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов,
Н.Б. Непомнящая

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

В 1960-70е годы в Ростовской области наблюдались вспышки ОКИ, вызванные холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп, после чего в тех же районах периодически регистрировались спорадические заболевания. С 2000 по 2014 г. в инфекционные отделения стационаров Ростовской области поступило 30 больных, зараженных *V.cholerae* по O1/по O139. Ранее выделенные от них, а также из воды и гидробионтов штаммы были охарактеризованы по фено- и генотипическим признакам, выявлена значительная гетерогенность популяции [1,3,4]. Однако для выяснения особенностей циркуляции штаммов с разными свойствами представлял интерес дальнейший анализ полученных данных с привлечением полногеномного секвенирования ДНК отдельных представителей.

Целью настоящей работы явилось изучение распространения

штаммов *V.cholerae* non O1/non O139 с разными генотипами в Ростовской области.

При биоинформационном анализе результатов ПЦР-генотипирования 169 штаммов, изолированных с 1968 по 2014 год, с помощью авторского программного обеспечения [2] было выявлено 165 генотипов в составе 15 кластеров (рис.1). При этом кластер O представлен всего одним штаммом – единственным, содержащим профаг pre-STX. Внутри остальных кластеров штаммы отличались друг от друга наличием/отсутствием 1-2 генов. Клинические штаммы характеризовались большим разнообразием генотипов и вошли в состав всех кластеров, кроме С, а штаммы из окружающей среды – только в кластеры А-Е. «Водные» культуры чаще были похожи между собой, что скорее связано с постоянной циркуляцией этих микроорганизмов в данной экологической нише. При попадании в организм человека возникает необходимость приобретения генов, ответственных за продукцию дополнительных токсинов и выживание в другой среде обитания, что и ведет к изменению генотипа. Мы не исключаем возможности заражения человека сразу несколькими штаммами с разными наборами детерминант факторов патогенности и генетического обмена между ними в организме хозяина. Во всяком случае, в литературе имеется единственное пока сообщение о выделении от одного и того же больного (в Таиланде) штаммов O111 и O159 серогрупп [5].

1968	E	F	G	H															
1969	E	H	I																
1971	H	K	M																
1973	E	F	M																
1974	A	B	D	F	H	I	J	M											
1975	A	E	F	G	H	I	K	L	M	N									
1976	D	E	L																
1977	I																		
1978	E																		
1993	G	O																	
2000	E																		
2005	I																		
2006	I																		
2007	B	I	M																
2008	I	N																	
2009	H	I	J																
2011	A	F	J																
2012	A	B	C	D	E	M													
2014	A	B	E	G	M														

Клинические штаммы	г.Батайск	E F	
	х.Веселый	E G H	
	г.Новочеркасск	E	
	г.Ростов	A B D E F G H I J K L M N O	
	Азовский р-н	E I J	
	г.Таганрог	A B D E F G H I J M N	
	с. Кормовое	E	
	Кам. р-н, п. Чистоозерный	I	
	Неклиновский р-н	B D E H I	
	с. Петрушино	A	
п. Тольяти	A		
Азовское море пляж ДОЦ Орленок с.Красный десант		F	
Азовское море пляж ДОЦ Дмитриадовский с. Дмитриадовка		A	
Азовское море		A	
Азовское море рыбцех "Красная звезда"		B C	
Азовское море пляж"Красный десант"		B C	
Азовское море бухта Андреева лодочная станция		C	
Азовское море пляж ДОЦ "Морская" ст.Морская		B C	
Азовское море пляж "Спутник"		B C	"Водные" штаммы
Азовское море акватория порта причал № 8		A C D	
Азовское море пляж "Солнечный"		A C	
Азовское море пляж "Тополь"		A	
Азовское море пляж "Приморский"		A C D	
Азовское море пляж "Центральный"		A C D	
Азовское море пляж "Маяковка"		B C E	
Азовское море место сброса ливневой канализации г.Таганрога		E	
Азовское море пляж "Чайка"		A C	

Рисунок 1. Распределение ПЦР-генотипов *V.cholerae* non O1/non O139 по времени (вверху) и местам (внизу) выделения.

По результатам анализа данных VNTR-типирования также выявлено большое число генотипов в составе 16 кластеров, причем не обнаруживалось никакой взаимосвязи ни с ПЦР-генотипами, ни с серогрупповой принадлежностью. Что касается распределения вибрионов с разными VNTR-генотипами в зависимости от времени и источника выделения (рис. 2), то здесь мы наблюдаем картину, аналогичную таковой распределения ПЦР-генотипов. Смена VNTR-генотипов происходила так же быстро, как и ПЦР-генотипов с течением времени и при циркуляции в разных объектах. Даже 11 культур, выделенных в 2014 году в течение месяца в г. Таганроге от больных ОКИ, были далеко не идентичны.

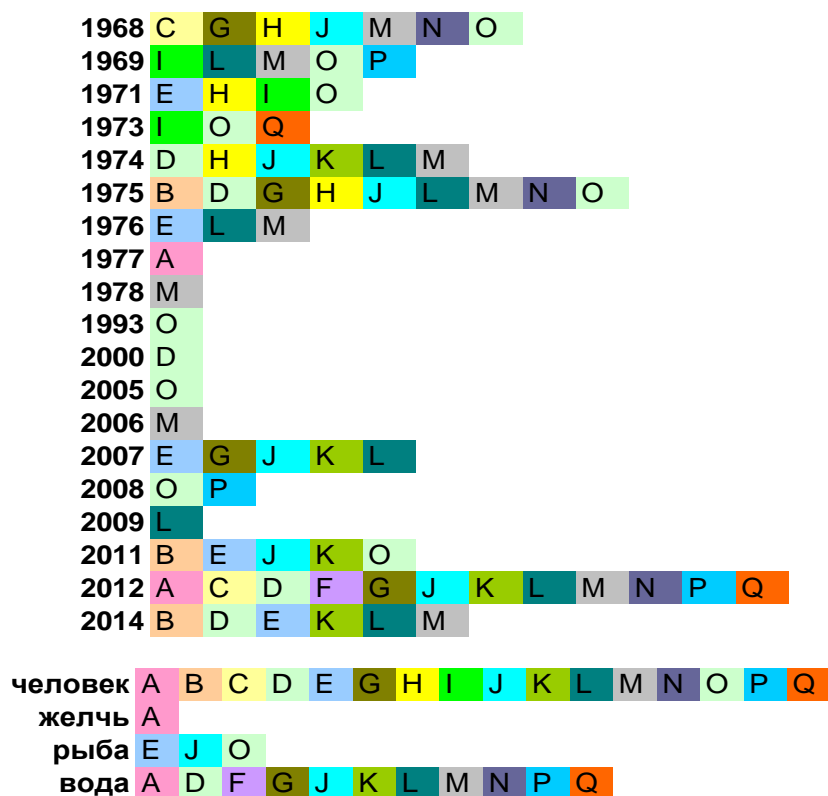


Рисунок 2. Распределение VNTR- генотипов *V.cholerae* nonO1/nonO139 по годам (вверху) и источникам выделения (внизу).

На следующем этапе нами было проведено полногеномное секвенирование ДНК 16 клинических штаммов *V.cholerae* non O1/non O139. При анализе полученных данных методом UPGMA было выявлено большое количество точковых мутаций в 1747 генах. На рис.3 можно наблюдать кластеры из 2-3 близких друг другу (но не идентичных) штаммов, однако данное распределение никак не коррелирует с серологическими и другими генетическими характеристиками.

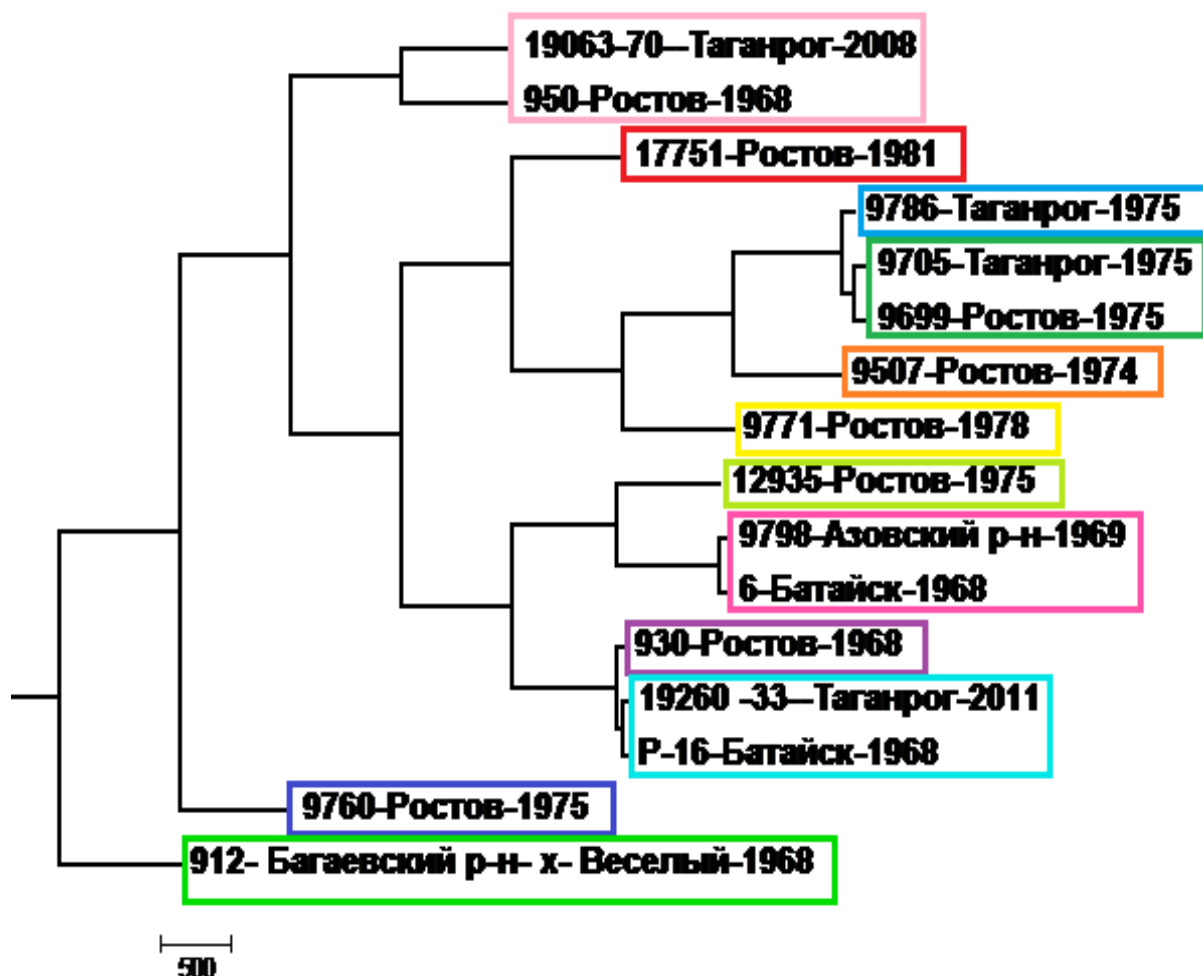


Рисунок 3. Дендрограмма, построенная на основании кластерного анализа 1747 генов методом UPGMA.

Таким образом, с помощью разных подходов к молекулярному типированию была подтверждена генетическая неоднородность популяции *V.cholerae* non O1/non O139 Ростовской области. Несмотря на то, что все изученные штаммы лишены генов холерного токсина, они способны вызывать заболевания за счет экспрессии генов других «взаимозаменяемых» факторов патогенности. Вероятно, содержание полного набора всех генов в геноме одного штамма энергетически невыгодно при постоянном обитании в водных объектах окружающей среды, но наличие этого набора в целом в популяции в конкретном географическом регионе позволяет сохранять ее патогенетический потенциал.

Литература

1. Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. и др. Сравнительный анализ свойств штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, циркулирующих на территории Ростовской области // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. –

Ростов н/Д, 2012. – Вып. 25. – С. 124-127.

2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2007620389. Холера. Штаммы –VNTR. – 2007.

3. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных в Ростовской области // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора. – Ростов н/Д, 2014. – Вып. 27. – С. 66-70.

4. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/ nonO139, выделенных в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С.25-27.

5. Dalsgaard A., Forslund A., Bodhidatta L. *et al.* A high proportion of *Vibrio cholerae* strains isolated from children with diarrhoea in Bangkok, Thailand are multiple antibiotic resistant and belong to heterogenous non-O1, non-O139 O-serotypes // *Epidemiol. Infect.* – 1999. – Vol.122, No.2. – P.217-226.

ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ПРОФАГА СТХ, ИНТЕГРИРОВАННОГО В ГЕНОМ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* non O1/non O139

Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.В. Титова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Как известно, на современном этапе седьмой пандемии ведущая роль в этиологии холеры принадлежит генетически измененным штаммам *V.cholerae*, несущим гибридные профаги СТХ [5]. Изучение их структуры актуально для установления источника инфекции при эпидрасследовании, а также для определения возможных путей эволюции и возникновения новых геновариантов за счет процессов рекомбинации. Установлено, что гибридные профаги могут присутствовать в геномах представителей не только O1, но и не O1/не O139 серогрупп [8]. В базах GenBank представлено множество нуклеотидных последовательностей СТХ,

интегрированных в геномы разных штаммов возбудителя и содержащих разные аллели входящих в их состав генов, что широко используется в сравнительном анализе.

В коллекции Музея живых культур Ростовского противочумного института имеются клинические холерогенные штаммы вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенные в конце прошлого столетия в Узбекистане. Они были охарактеризованы рядом авторов [1,2,4] по многим фено- и генотипическим свойствам, однако полная структура интегрированных в их геном профагов СТХ остается неизвестной.

Целью настоящей работы явился биоинформационный анализ полной последовательности профага СТХ штамма *V.cholerae* nonO1/nonO139 16150, выделенного в Узбекистане в 1987 г. от больного холероподобной диареей. Ранее нами было показано, что этот штамм вызывает типичный холерогенный эффект на модели кроликов-сосунков, что сопровождается соответствующими ультраструктурными изменениями в тканях тонкого кишечника [3]. В рамках настоящего исследования мы провели полногеномное секвенирование ДНК данного штамма и с помощью программы BLASTN 2.2.29 идентифицировали контиг, содержащий полную последовательность профага СТХ с генами *rstR*, *rstA*, *rstB*, *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *ctxAB*, а также сайт его специфической интеграции *attRS1*. Данная последовательность депонирована в NCBI GenBank под номером KR072210. Результаты Blast-анализа этой последовательности с использованием программ BLASTN и Align X (Vector NTI suit 11) показали, что ген *rstR* штамма 16150 полностью идентичен таковому холерных вибрионов Эль Тор, таких как N16961, P-19241 (301), 19613 (81) и многие другие, тогда как ген *ctxB* помимо двух «основных» однонуклеотидных замен (SNP) T/C в позициях 115 и 203 (характерных для *ctxB* классического типа) имел 2 дополнительных – T/G-138 и A/C-165, что привело к соответствующим заменам аминокислотных остатков (aa) в его продукте. На сегодняшний день известно 7 аллелей гена *ctxB* [6,9,10], плюс т.н. *ctxB-NT*, выявленный у вибрионов не O1/не O139 серогрупп (таблица). Поскольку авторы, описавшие *ctxB-NT* [8], не присвоили ему цифрового обозначения, мы предлагаем определить его как *ctxB-8*. Аллели различают по сочетаниям нескольких SNP в разных позициях. Аллель *ctxB* штамма 16150 оказался идентичным таковому трех штаммов O37 серогруппы (AF45283, D30052, AAKJ2.1). Он близок *ctxB-2* и *ctxB-8*, но по сочетанию SNP уникален, в связи с чем был обозначен нами как *ctxB-9*. Таким образом, СТХ-профаг, интегрированный в геном штамма 16150, является гибридным, содержащим ген *rstR* типа Эль Тор и *ctxB* классического типа. Интересно отметить, что SNP в *ctxB* «привязаны» лишь к определенным позициям и в 6 из 8 случаев приводят к несинонимичным заменам aa (кроме His/Asn-20 и Phe/Leu-46). Влияние этих замен на свойства белка не установлено, лишь высказывались

предположения о том, что они могут быть одной из причин более тяжелых клинических проявлений холеры [10].

Таблица. Аминокислотные замены в продуктах разных аллелей гена *ctxB*.

аллель <i>ctxB</i>	Позиции aa в белках								Обнаружены у штаммов:	Ссылка, и/или ID
	20	28	34	36	39	46	55	68		
1	His	Asp	His	Thr	His	Phe	Lys	Thr	Класс. и Эль Top Gulf Coast	[9]
2	His	Asp	His	Thr	His	Leu	Lys	Thr	Эль Top Австралия	[9,12] EU828583
3	His	Asp	His	Thr	Tyr	Phe	Lys	Ile	Эль Top, O139	[9]
4*	His	Asp	His	Thr	Tyr	Phe	Lys	Thr	O139 Бангладеш	[6]
5*	His	Ala	His	Thr	His	Phe	Lys	Thr		
6	His	Asp	Pro	Thr	His	Phe	Lys	Thr		
7	Asn	Asp	His	Thr	His	Phe	Lys	Thr	Эль Top Индия, Бангладеш	[10]
8**	His	Asp	His	Ala	His	Leu	Asn	Thr	O26,O44,O105 Таиланд, Китай	[8]
9	His	Asp	His	Thr	His	Leu	Asn	Thr	O37 Судан	D30052
									O37	ААКJ2.1 AF45283
									16150Узбекистан	KR072210

* аллели *ctxB-4* и *ctxB-5* приведены по данным Bhuyan N.A. *et al.* [6], тогда как в работе Raichoudhuri A. *et al.* [11] *ctxB-4* обозначен как *ctxB-5* и наоборот.

**мы обозначили как *ctxB-8* аллель «NT», описанный Li M. *et al.* [8].

Поскольку один из выявленных в результате Blast-анализа штаммов O37 серогруппы, V52, содержащий *ctxB-9*, был выделен в Судане во время крупной вспышки холероподобной диареи 1968 г., унесшей 125 жизней [13], и в базах NCBI представлен его полногеномный сиквенс (ААКJ2.1), мы провели сравнение и всех остальных генов СТХ штамма 16150 именно с этим геномом. Нам удалось найти в нескольких его контигах все гены и межгенные области профага СТХ, который оказался полностью идентичным СТХ 16150, в том числе по наличию 3 tandemных повторов TTTTGAT в промоторной области *ctxA*. Что касается двух других вибрионов O37 серогруппы (S7 и 1300-69), то в базах представлены нуклеотидные последовательности только генов *ctxAB* (D30052, AF45283, AF45284), а происхождение штаммов в аннотациях не указано. Тем не менее, оба гена идентичны *ctxAB* V2, а D30052 содержит и часть промоторной области *ctxA* с тремя повторами TTTTGAT, позволяя предположить причастность хотя бы одного из этих штаммов к Суданской вспышке. Поэтому мы условно обозначили исследуемый профаг как СТХ-Sudan.

Ген *ctxA* профага СТХ-Sudan имел 100% идентичности с *ctxA* еще одного штамма Эль Top Gulf Coast, содержащего *ctxB-1* (KJ619459); от

ctxA всех остальных штаммов он слегка отличался. По сравнению с *ctxA* референс-штамма Эль Тор N16961 и классического 569B *ctxA* 16150 имел 1 SNP, C/A-137.

Последовательности всех остальных коровых генов оказались уникальными: в базах не удалось найти полностью идентичных им, хотя многие обладали 99% идентичности, содержа разное число SNP, а также ряд делеций либо вставок 2-3 нуклеотидов. В частности, ген *ser* был близок, но не идентичен *ser* того же штамма Эль Тор Gulf Coast (KJ619459), отличаясь от него одной SNP, от *ser* многих других штаммов – 3-6 SNP. Идентичность гена *orfU* CTX-Sudan таковому других холерных вибрионов составляла от 95 до 99%, при этом только у него была выявлена делеция одного из трех тандемных кодонов AGC (889-897), которая не привела к сдвигу рамки считывания, а лишь к «выпадению» одного остатка серина в продукте. Ген *ace* CTX-Sudan отличался от *ace* классических штаммов 1 SNP, от *ace* штаммов Эль Тор – 1-3 SNP; ген *zot* имел от 11 до 21 SNP по сравнению с *zot* других штаммов. Это же касается генов RS2-элемента *rstA* (6-9 SNP) и *rstB* (2-7 SNP).

Идентификация профага CTX-Sudan в составе генома штамма другой серогруппы, выделенного на другой территории и спустя почти 20 лет после Суданской вспышки, свидетельствует о том, что этот профаг сохранил свою уникальную структуру в неизменном виде не случайно, а в результате естественного отбора. Не исключено, что штаммы, содержащие такой профаг, циркулируют в природе и по настоящее время, и, обладая высоким патогенетическим потенциалом, представляют потенциальную угрозу серьезных эпидосложнений. Кроме того, согласно современному общепринятому мнению [7,8 и др.], они могут служить донорами генов факторов патогенности, горизонтальная передача которых другим холерным вибрионам приводит к формированию высоковирулентных клонов. Поэтому особую актуальность приобретает дальнейший поиск штаммов с профагом CTX^{Sudan} среди представителей не только не O1/не O139, но и O1/O139 серогрупп и определение широты их распространения. К сожалению, в нашем распоряжении имеется лишь небольшая коллекция узбекских холерогенных штаммов, выделенных в прошлом столетии, и дальнейшая их судьба неизвестна, как и то, был ли штамм 16150 возбудителем спорадического заболевания или представителем клона, вызвавшего вспышку в Ташкентской области. Согласно данным Ерошенко Г.А. с соавт. [2], полученных при секвенировании участков нескольких генов и их биоинформационном анализе, этот штамм значительно отличается от всех полученных из других регионов Узбекистана (1986-1990 гг.) и имеет близкое родство только с одним, выделенным в Сыр-Дарьинской области в 1971 г. Тем не менее, изучение структуры интегрированных в их геномы CTX, а также способности к персистенции в различных экологических нишах, возможно, позволит оценить вероятность

сохранения аллеля *ctxB-9* в популяции. Вопрос о наличии/отсутствии повышенной биологической активности холерного токсина с субъединицей CtxB-9 может быть решен путем клонирования *ctxAB-9*-оперона в *E.coli* и последующего тестирования рекомбинантного белка в сравнении с продуктами других аллелей.

Литература

1. Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Воронежская Л.Г. и др. Характеристика энтеропатогенных *Vibrio cholerae* не O1/не O139, выделенных в Узбекистане // Журн. микробиол., вирусол. и иммунобиол. // 2005. – № 3. – С. 80–82.
2. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Фадеева А.В. и др. Генетическая характеристика токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* неO1/не O139 из Средней Азии // Генетика. – 2013. – Т. 49, № 10. – С.1165-1173.
3. Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Бардахчян Э.А. Ультраструктурные изменения в тонкой кишке кроликов-сосунков, зараженных холерогенным и нехолерогенным штаммами *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2011. – Т. XXI, №5 (Прилож. № 38, Матер. XVII РГЭН). – С.44.
4. Онищенко Г.Г., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. и др. Холерные вибрионы серогрупп неO1, выделенные в Узбекистане в 1987-1990 гг.: ретроспективный VNTR-анализ // Эпидемиол. и инфекц. бол. – 2003. – № 6. – С.25-29.
5. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор, изолированных на территории России в современный период // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2011. – №3. – С.11-18.
6. Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Changing genotypes of cholera toxin (CT) of *Vibrio cholerae* O139 in Bangladesh and description of three new CT genotypes // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 57, No.2. – P.136-141.
7. Khouadja S., Suffredini E., Baccouche B. et al. Occurrence of virulence genes among *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from treated waste waters // Environ. Monit. Assess. – 2014. – Vol.186, No.10. – P.6935-6945.
8. Li M., Kotetishvili M., Chen Y., Sozhamannan S. Comparative genomic analyses of the *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69, No. 3. – P.1728–1738.
9. Olsvik O., Wahlberg J., Petterson B. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains // J. Clin. Microbiol. – 1993. – Vol.31, No.1. – P.22-25.

10. Rashed S.M., Mannan S.B., Johura F.T. *et al.* Genetic characteristics of drug-resistant *Vibrio cholerae* O1 causing endemic cholera in Dhaka, 2006-2011 // J. Med. Microbiol. – 2012. – Vol.61, Pt 12. P.1736-1745.

11. Raychoudhuri A., Mukherjee P., Ramamurthy T. *et al.* Genetic analysis of CTX prophages with special reference to *ctxB* and *rstR* alleles of *Vibrio cholerae* O139 strains isolated from Kolkata over a decade // FEMS Microbiol. Lett. – 2010. – Vol.303, No.2. – P.107-115.

12. Safa A., Bhuiyan N.A., Murphy D. *et al.* Multilocus genetic analysis reveals that the Australian strains of *Vibrio cholerae* O1 are similar to the pre-seventh pandemic strains of the El Tor biotype // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol.58, Pt 1. – P.105-111.

13. Zinnaka Y., Carpenter C.C. An enterotoxin produced by noncholera vibrios // John Jopkins Med. – 1972. – Vol.132. – P.403-411.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/ NON O139*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ И АКВАТОРИИ ПОРТОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

С.Ю. Водяницкая¹, И. Б. Захарова², М.В. Подшивалова², В.Д. Кругликов¹,
И.В. Архангельская¹, Д.В. Викторов²

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону;

²ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора, г. Волгоград

В системе эпидемиологического надзора по холере одно из ведущих мест занимают исследования открытых водоемов. В процессе проведения мониторинга поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых стоков на наличие возбудителей холеры в водных объектах Ростовской области обнаруживаются *Vibrio cholerae* non O1/non O139 серогрупп, а также имеют место случаи выделения штаммов от больных ОКИ, вибрионосителей и лиц, контактировавших с ними.

Обнаружение штаммов обуславливает необходимость выяснения основных причин и условий, способствующих появлению и распространению вибрионов в поверхностных водоемах. Многочисленными исследованиями установлена связь между

обнаружением вибрионов и сбросом в водоемы недостаточно очищенных хозяйственно-бытовых, производственных и ливневых сточных вод, а также загрязнениями, поступающими с прибрежных территорий селитебных зон. Определенное значение в распространении вибрионов принадлежит морскому транспорту, который заносит с балластом различные виды бактерий, патогенных для человека.

Холерные вибрионы не O1/не O139 сегодня являются предметом пристального внимания исследователей и практических эпидемиологов, учитывая то обстоятельство, что их штаммы являются, по сути, природными резервуарами генов, расширяющих эпидемический потенциал и способных передаваться *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Так, штаммы *V. cholerae* non O1/ non O139 могут служить «источником» для вибрионов эпидемически значимых серогрупп новых комбинаций генов устойчивости к антимикробным соединениям [3].

Нами проведен сравнительный анализ генотипов штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139, выделенных из судового балласта и прибрежной зоны Таганрогского залива, по маркерам множественной антибиотикорезистентности, связанных с мобильными генетическими элементами холерного вибриона с целью доказательства заносного характера обнаруживаемых в балластных водах судов *V. cholerae* non O1/ non O139.

В исследование были взяты 10 штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139 (табл. 1).

Таблица 1. Исследуемые штаммы *V. cholerae* non O1/ O139.

Штамм	Дата забора	Место забора (судно, порт)	Источник выделения
27	09.08.13	Волго-Балт 220, Таганрог	Балластные воды судов
28	16.08.13	Волго-Балт 220, Таганрог	
32	23.08.13	Сандра 2, Таганрог	
33	24.08.13	ВФ Танкер 4, Таганрог	
38	01.09.13	ВФ Танкер 4, Таганрог	
36	01.09.13	Астон Трэвелер, Ростов	
52	22.09.13	ВФ Танкер 8, Таганрог	
59	20.05.13	Пляж «Тополь», Таганрог	Азовское море
117	10.06.13	Акватория порта г. Таганрог	Азовское море
182	01.07.13	Пляж «Маяковка», Таганрог	Азовское море

Для выделения геномных ДНК, 200 мкл бактериальной суспензии в 0.15 М NaCl рН 7.2 плотностью 2×10^9 м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-HCl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0.2 мг/мл желатина, 0.9 % Nonidet P-40, 0.9 % Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 65°C 120 мин и прогревали при 96°C 30 мин. для инактивации фермента. Далее пробы центрифугировали (10000

об/мин, 1 мин), 10 мкл супернатанта использовали при постановке ПЦР.

Наличие в геномах исследуемых штаммов нуклеотидных последовательностей интегронов класса 1 (*In1*) и интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 исследовали в ПЦР с использованием набора ген-специфических праймеров, перечисленных в таблице 2. Амплификацию участка 3' – консервативного сегмента интегронов *In1* (праймеры *qacEd1-sul*) и фрагмента гена интегразы *int* SXT (праймеры SXT-F – SXT-B) проводили по программе: прогрев 95 °С 5 мин, 40 циклов (94 °С - 30 с, 57 °С - 30 с, 72 °С - 60 с), финальная элонгация 72°С - 10 мин, температура отжига праймеров составляла 58 °С и 55 °С, соответственно. Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозных гелях.

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе.

Праймер	Последовательность 5' – 3'	Мишень*
<i>qacEd1</i>	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Ген устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям <i>qacEdelta1</i> 3' - консервативного сегмента интегронов <i>In1</i> (accession no. X15370, 211–230)
<i>sul</i>	GCAAGGCGGAAACCCGCC	Ген устойчивости к сульфонидам <i>sul1</i> 3' - консервативного сегмента интегронов <i>In1</i> (accession no. X12869, 1360–1341)
SXT-F SXT-B	TTATCGTTTCGATGGC GCTCTTCTTGTCGGTTC	Ген интегразы <i>int</i> SXT-элемента (accession no. AF099172, 129–144 и 915–931)

* - указаны позиции праймеров на последовательностях *In1* и SXT, представленных в Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)

Множественная устойчивость к антибиотикам у *V. cholerae* может формироваться в результате горизонтального генетического переноса, опосредованного трансмиссивными плазмидами, интегронами, а также трансмиссивными интегративными элементами (ICE).

Интегроны, локализованные на хромосомах, либо внехромосомных элементах, способны включать в свой состав индивидуальные генные кассеты по механизму сайт-специфической рекомбинации. Структурно интегроны состоят из центрального вариабельного региона, несущего вставки генных кассет, и фланкирующих его 5' и 3' консервативных сегментов. Общими элементами интегронов являются ген *intI*, кодирующий интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ, сайт рекомбинации *attI* и промотор *P_c*, обеспечивающий транскрипцию внедренных генных кассет. В составе каждой из генных кассет присутствует сайт узнавания интеграз *attC* (59bp элемент). Область кассетной вставки *In1* может включать от одной до десятка кодирующих последовательностей генов устойчивости к антимикробным соединениям

различных классов (бета-лактамы, аминогликозиды, хлорамфеникол, сульфонамиды, макролиды, отдельные антисептики) [2].

ICE (SXT-элементы) - крупные (60-100 bp) транспозоноподобные структуры, интегрированные в определенные хромосомные локусы возбудителя холеры, способные к вырезанию и конъюгативному переносу, однако неспособные к автономной репликации. Наряду с генами транспоназ и генами *Tra*⁺ фенотипа, в составе различных типов ICE обнаружены гены резистентности к триметоприму (*dfr*), стрептомицину (*strA*, *strB*), сульфаметоксазолу (*sul2*) и хлорамфениколу (*floR*) [4].

Результаты проведенного ПЦР-анализа приведены на рис. 1. Полноразмерные специфические фрагменты последовательностей 3'-консервативного сегмента интегროнов класса 1 (гены *qacEdelta1-sul*, размер ампликона 800 bp) детектированы в 4 исследуемых штаммах (№ 28,33,59,182), причем в штамме *V. cholerae* 28 выявлен дополнительный ампликон размером порядка 700 bp, что может свидетельствовать о дупликации таргетной последовательности вследствие рекомбинационных событий. Результат амплификации с праймерами *qacEdelta1-sul* ДНК штамма *V. cholerae* 52, где детектируется фрагмент 300 bp (трек 7, левая часть), может быть следствием делеции во внутренней области 3'-консервативного сегмента. Специфический фрагмент интегразы *int*_{SXT} размером 870 bp обнаружен в 7 из 10 исследованных штаммов вибрионов не O1/ не O139, что свидетельствует о наличии в их геномах ICE элемента семейства SXT/R391 (рис. 1, правая часть электрофореграммы). В качестве положительного контроля был использован штамм *V. cholerae* B-191 O139 серогруппы, несущий ICE элемент семейства SXT/R391 тип SXT^{MO10} [1].

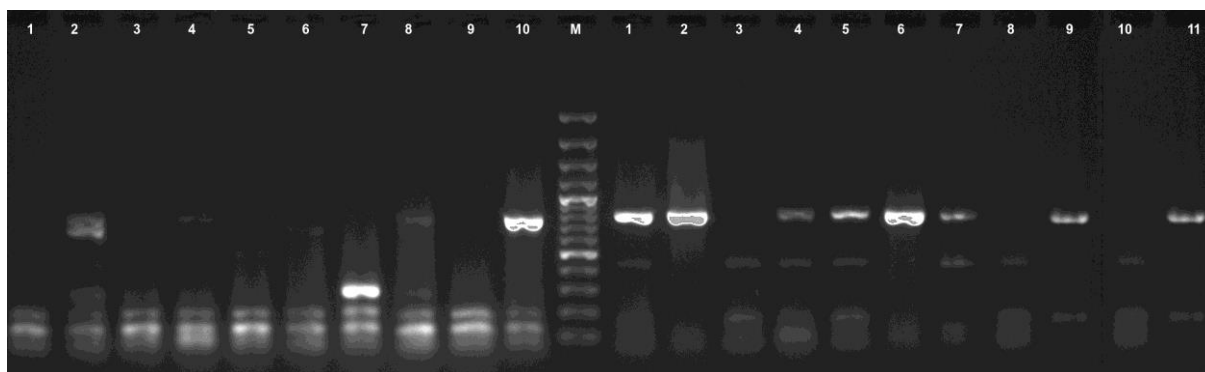


Рисунок 1. Детекция последовательностей интегროнов класса 1 (треки 1-10, левая часть рисунка) и ICE элемента семейства SXT/R391 (треки 1-11, правая часть рисунка) в штаммах *V. cholerae* non O1/ non O139. Обозначения: 1 – 27, 2 – 28, 3 – 32, 4 – 33, 5 – 36, 6 – 38, 7 – 52, 8 – 59, 9 – 117, 10 – 182, 11 – *V. cholerae* B-191.

Судя по результатам проведенного анализа, единый (но независимый друг от друга) источник происхождения могут иметь группы штаммов №

27,36,38,117 и № 59, 182. Штаммы № 28,32,33,52, выделенные из образцов балласта судов, характеризуются уникальными генотипами по анализируемым маркерам, что указывает на их различные источники происхождения и отличия от штаммов, выделенных на пляжах и в акватории порта (табл. 3).

Таким образом, результаты проведенного генетического анализа штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139, изолированных в прибрежной зоне Таганрогского залива и выделенных из судовых балластных вод, подтверждают заносной характер последних, что свидетельствует о выявлении нового объекта эпидемиологического надзора при холере в Российской Федерации.

Таблица 3. Характеристика штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139 по генетическим маркерам множественной антибиотикорезистентности

Штамм <i>V. cholerae</i> non O1/O139	Генетические маркеры			Генотип
	<i>qacEdelta1-sul</i>	<i>qacEdelta1-sul</i> рекомбинированный	<i>int_{SXT}</i>	
27	-	-	+	A
28	+	+	+	B
32	-	-	-	C
33	+	-	+	D
36	-	-	+	A
38	-	-	+	A
52	-	+	+	E
59	+	-	-	F
117	-	-	+	A
182	+	-	-	F

Литература

1. Подшивалова М.В., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б. и др. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT типа. // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2014. – Т. 18, № 3. – С. 34-39.
2. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution // Nat. Rev. Microbiol. – 2006 – Vol. 4. – P. 608-620.
3. Rodríguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. Antimicrob Agents Chemother. – 2012. – Vol. 56, №5. – P. 2619–2626.
4. Wozniak R., Fouts D., Spagnoletti M., et al. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. PLoS Genet. 2009 – 5(12): e1000786. doi:10.1371/journal.pgen.1000786.

СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ И БЕЛКОВ CEF (CNO CELL ELONGATION FACTOR) ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, И.В. Архангельская

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Cef (CNO cell elongation factor), продуцируемый практически всеми холерными вибрионами (за исключением нехолерогенных штаммов O139 серогруппы, выделяемых из воды открытых водоемов), представляет собой белок с двойной функцией: он обладает одновременно эстеразной и биологической активностями [1-4, 6-8], в связи с чем может быть отнесен к факторам патогенности/персистенции. В молекуле Cef идентифицировано несколько функциональных доменов, определяющих основные свойства белка. Ранее [3] нами был проведен биоинформационный анализ генов и белков Cef четырех холерогенных (СТХ⁺) штаммов O1 и O139 серогрупп, и результаты его показали достаточно высокую консервативность данного фактора. Вместе с тем, было обнаружено, что ген *cef Vibrio cholerae* non O1/non O139 (AY7772386) содержит множество точковых мутаций. В связи с этим представляло интерес проведение более подробного анализа с привлечением других штаммов холерных вибрионов, в том числе нехолерогенных (СТХ⁻), поскольку последние отличаются значительно большей генетической неоднородностью по сравнению с СТХ⁺.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительном биоинформационном анализе генов и белков Cef холерных вибрионов разных серогрупп.

Объектами исследования служили 11 штаммов *V.cholerae* O1 и 20 штаммов не O1/не O139 серогрупп различного происхождения из коллекции Музея живых культур Ростовского противочумного института. Гены *cef* идентифицировали в режиме on-line с помощью программы BLASTN 2.2.29 в полных геномах исследуемых штаммов, секвенированных нами на платформе MiSeq Illumina. Нуклеотидные последовательности генов депонированы в NCBI GenBank под номерами KM456178-456194, KM522859-522866, KM588824-588827, KR029082-029082, аминокислотные последовательности их продуктов – AIZ08948-08954, AJA06056-06064, AJA31759-31762. Для сравнения в анализ были включены гены *cef V.cholerae* O1 и nonO1/nonO139 (AY7772384-AY7772386), белки Cef *V.cholerae* O1 (AAV40602-603, ZP_01953122, ZP_01969650, ZP_01978055, ZP_01918416) и nonO1/nonO139 (AAV40604, ZP_01918416), а также секвенированный нами ранее [4] ген *cef V. cholerae*

O139 и его продукт (JF499787, AEC04822). Анализ проводили с использованием программ AlignX (Vector NTI 11), SMART DOMAINS (www.dove.embl-heilderberg.de) и SCOP (www.scop.mrc-lmb.cam.ac.uk).

Результаты анализа нуклеотидных последовательностей с помощью программы AlignX показали полную идентичность генов *cef* CTX⁺ штаммов биовара Эль Тор независимо от источника и времени их выделения, а также CTX⁻ штамма 14157 и pre-CTX⁺ штамма 15500). Незначительными отличиями от них обладали гены штаммов O1 классического биовара и O139 серогруппы, что было показано нами и ранее [3,5]. Из 2 CTX⁺ штаммов не O1/не O139 один (16150, Узбекистан, 1987) имел *cef*, идентичный таковым штаммов Эль Тор, второй (V51, ZP_04918416) – существенно отличный от них и всех прочих. Гены *cef* большинства CTX⁻ вибрионов проявляли значительную вариабельность: в группе из 23 штаммов было выявлено 15 аллелей. При этом идентичными генами обладали: 1). 2 клинических штамма неO1/неO139, выделенные в Батайске Ростовской области в 1968 г.; 2). 3 клинических штамма неO1/неO139, выделенные в Ростове и Таганроге в 1975 г.; 3). 2 клинических штамма не O1/не O139, выделенные в Узбекистане в 1987 г.; 4). 3 клинических штамма O1, выделенные в Одесской обл., Бердянске (Украина) и Молдове в 1991 г., и 1 выделенный в Ростове в 2007 г. из воды р.Темерник. Остальные штаммы содержали уникальные аллели. За счет наличия вставок и делеций нуклеотидов общая длина открытых рамок считывания у разных штаммов составляла от 1824 до 2400 п.н.; 14 генов имели «нормальную» длину 2391 п.н. Интересно, что в случаях наличия вставок или делеций число «лишних»/«недостающих» нуклеотидов, как правило, равнялось 3, что не приводило к сдвигу рамки. Исключение составляли гены *cef* двух штаммов: 9786, у которого за счет однонуклеотидной вставки G-1810 произошел сдвиг рамки и образование стоп-кодона TAA в позиции 1822-24, (т.е. ген оказался «укороченным» до 1824 п.н.), и 19063, содержащего 3 вставки из 5, 3 и 1 нуклеотидов на небольшом расстоянии друг от друга, что привело к восстановлению рамки после сдвига внутри гена и увеличению ее длины до 2400 п.н.

При проведении анализа аминокислотных последовательностей (рисунок) продуктов перечисленных генов мы добавили к ним еще 4 белка Cef из NCBI, кодирующие гены которых в базах отсутствовали. В итоге наш «набор» пополнился еще двумя уникальными белками, принадлежащими штаммам не O1/не O139 серогрупп: Cef CTX⁻ штамма MZO-2 (O14) содержал 796 аминокислотных остатков (как большинство), а CTX⁺ штамма V51 (O141) – 799 (как и Cef одного из CTX⁻ штаммов из Ростовской области).

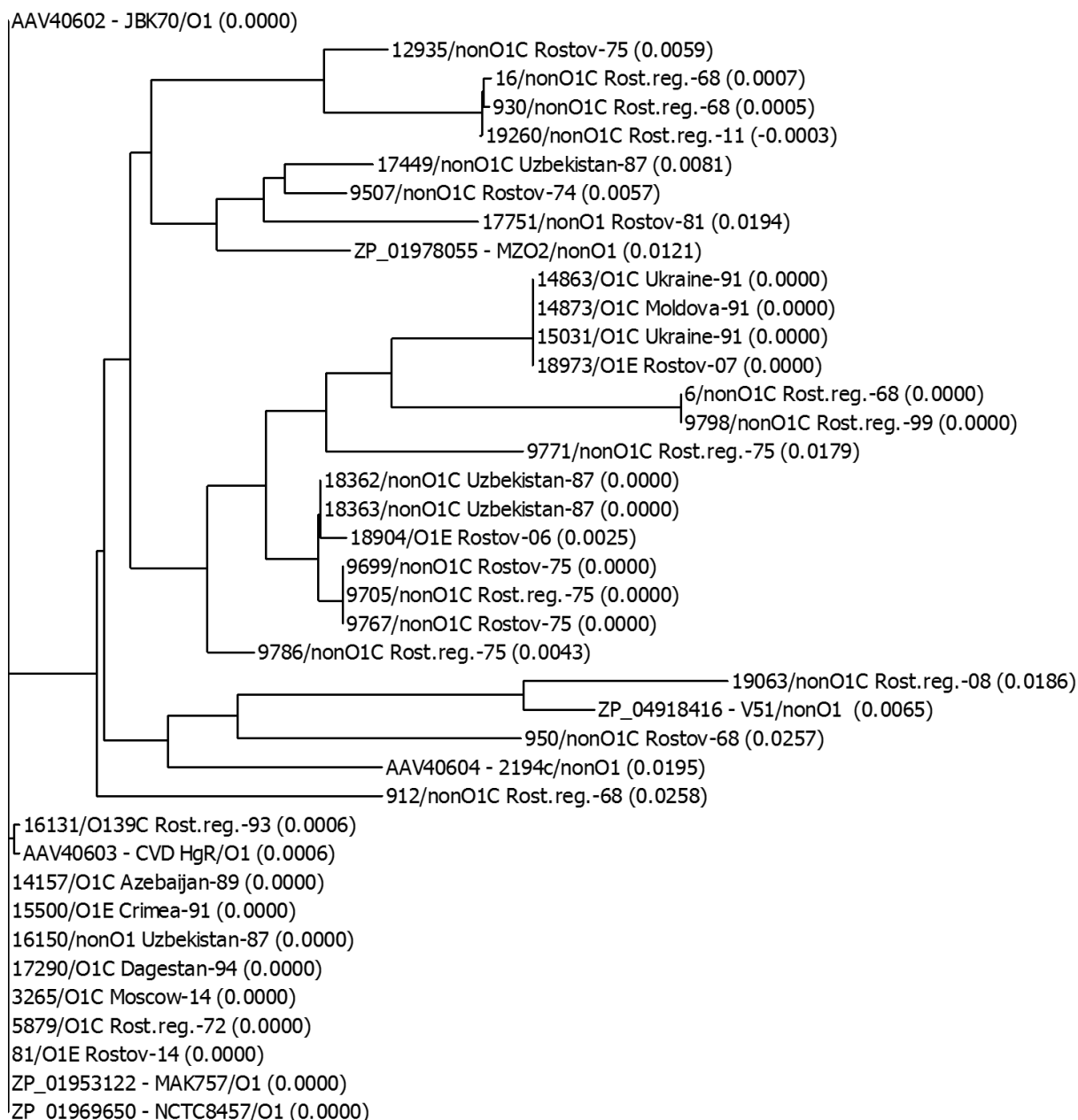


Рисунок. Дерево, отражающее сходство и различия белков Cef *V.cholerae*.

С – клинический штамм, Е – штамм из объектов окружающей среды.

Несмотря на значительную вариабельность аминокислотных последовательностей, все белки Cef сохранили активные домены, которые были идентифицированы программами SMART DOMAINS и SCOP и проанализированы с помощью AlignX (таблица). Домен Куница, свойственный ингибиторам протеаз, у всех находился в одной и той же позиции 179-196. Локализация остальных доменов у некоторых штаммов отличалась от большинства. Это лейциновая молния, обеспечивающая формирование димерной структуры белков и взаимодействие с ДНК, а/бН (домен альфа-бета-гидролаз) с входящим в его состав консервативным субстрат-связывающим доменом GHSLG и характерный для большинства

триацилглицероллипаз домен LIP, перекрывающийся с доменом a/bH. Два последних характеризовались наибольшей вариабельностью. У вышеупомянутого штамма 9786, имеющего «укороченный» ген, продукт трансляции состоял всего из 607 аминокислотных остатков (aa) и имел С-концевую последовательность WSEDQA (602-607), отсутствующую в LIP-доменах всех остальных включенных в исследование белков. Тем не менее, этот «усеченный» белок содержит интактный домен a/bH с GHSLG, что позволяет предположить сохранение им функциональной активности.

Таблица. Локализация доменов в молекулах *Cef V.cholerae*

штаммы	ММ, КДа	Число aa	Leucine zipper	a/bH	LIP	GHSLG
Все СТХ+O1, O139 и СТХ+nonO1/nonO139 16150	83,6	796	352-373	424-563	444-723	549-553
12935	83,6	795	352-373	424-563	444-723	549-553
16	83,6	795	352-373	424-563	444-723	549-553
930, 19260	83,6	795	352-373	424-563	444-723	549-553
17449	83,6	796	352-373	424-563	444-723	549-553
9507	83,6	796	352-373	424-563	444-723	549-553
17751	83,7	796	352-373	424-563	444-723	549-553
MZO2	83,7	796	352-373	424-563	444-723	549-553
14863, 14874, 15031, 18973	83,9	797	352-373	424-564	444-724	550-554
6, 9798	84,0	796	352-373	424-564	444-724	550-554
9771	83,8	796	352-373	424-563	444-723	549-553
18362, 18363	83,7	796	352-373	424-563	444-723	549-553
18904	83,7	796	352-373	424-563	444-723	549-553
9699, 9705, 9767	83,7	796	352-373	424-563	444-723	549-553
9786	63,7	607	352-373	424-563	444-601	549-553
19063	84,0	799	355-376	427-566	447-726	552-556
V51	84,1	799	355-376	427-566	447-726	552-556
950	83,9	797	352-373	424-563	444-724	550-554
2194c	83,5	796	352-373	424-563	444-723	549-553
912	83,4	796	352-373	424-563	444-723	549-553

Примечание: домен Куница в таблице не показан, т.к. у всех штаммов находится в одной и той же позиции 179-196.

Таким образом, гены *cef* холерных вибрионов и их продукты, которые считались достаточно консервативными, оказались крайне вариабельными. В результате проведенного анализа нам удалось выявить среди них уникальные варианты, свойственные в основном СТХ штаммам O1 и не O1/не O139 серогрупп. Принимая во внимание установленный нами ранее факт изменения субстратной специфичности *Cef V. cholerae* O139 вследствие единственной точковой мутации в его гене [5] мы не исключаем, что продукты разных аллелей последнего также могут различаться по биохимической и биологической активностям, с которыми связана способность вибрионов как к персистенции в разных

экологических нишах, так и к проявлению патогенных свойств. Возможно, что существование множества аллелей гена *cef* не является случайным, но несет определенный биологический смысл, тем более, что идентичные либо обладающие высоким уровнем сходства аллели были выявлены у ряда штаммов, не связанных общностью происхождения. Однако для проверки этого предположения необходимо клонировать измененные гены и изучить фенотипические свойства рекомбинантных белков в сравнении с таковыми, полученными нами ранее [2] .

Литература

1. Мазрухо А.Б., Монахова Е.В., Дуванова О.В. и др. Изучение генетической детерминации твиназной активности холерных вибрионов // Пробл. особо опас. инф. – 2012. – Вып. 114. – С. 44-46.
2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В. и др. Клонирование гена цитотонического фактора Cef (CHO-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P_{ВAD}-промотора // Биотехнология – 2005. – №6. – Р.12-18.
3. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Мазрухо А.Б. и др. Свойства Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов: биоинформационный анализ и экспериментальные данные // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2012. – № 2. – С.10–14.
4. Монахова Е.В., Федоренко Г.М., Мазрухо А.Б. и др. Изучение биологического действия цитотонического фактора Cef холерных вибрионов на моделях *in vitro* и *in vivo* // Пробл. особо опас. инф. – 2012. – Вып.1. – С.62-65.
5. Писанов Р.В., Монахова Е.В., Шалу О.А. Точковая мутация в гене *cef* (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* O139 приводит к изменению субстратной специфичности его продукта // Генетика. – 2012. – Т.48. – №2. – С.275-279.
6. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1 // Microb. Pathog. – 2000. – Vol.29, No.1. – P.1-8.
7. McCardell B.A., Sathyamoorthy V., Michalski J. *et al.* Cloning, expression and characterization of the CHO cell elongating factor (Cef) from *Vibrio cholerae* O1 // Microb. Pathog. – 2002. – Vol.32, No.4. – P.165-172.
8. Sathyamoorthy V., Hall R.H., McCardell B.A. *et al.* Purification and characterization of a cytotonic protein expressed *in vitro* by the live cholera vaccine candidate CVD 103-HgR // Infect. Immun. – 2000. – Vol.68, No.10. – P.6062-6065.

КОНСТРУИРОВАНИЕ ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА В-СУБЪЕДИНИЦЫ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НА МОДЕЛИ АТОКСИГЕННОГО ГЕНОВАРИАНТА *VIBRIO CHOLERAЕ*

Е.Ю. Щелканова, Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов,
Н.И. Смирнова

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб», г. Саратов

Возбудителем холеры являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы классического и Эль Тор биоваров, а также штаммы *V. cholerae* O139 серогруппы. Современный период пандемии (с 1991 г. по настоящее время) характеризуется широким распространением на эндемичных по холере территориях генетически измененных штаммов (геновариантов) *V. cholerae*, которые по всем биовароспецифическим свойствам относятся к холерным вибрионам биовара Эль Тор [7]. При этом геноварианты синтезируют холерный токсин I типа, приближаясь по его продукции к классическим вибрионам, что приводит к повышению их вирулентности. Установлено, что более высокая вирулентность геновариантов по сравнению с типичными штаммами связана с присутствием в геноме профага СТХφ гена *ctxB* холерных вибрионов классического биовара [5]. Более того, в геноме ряда штаммов геновариантов изменена нуклеотидная последовательность гена *tcrA*, кодирующего основную субъединицу токсин-корегулируемых пилей адгезии. Эти пили, обеспечивая вибрионам колонизацию тонкого кишечника, являются также важным протективным антигеном, определяющим формирование антиколонизирующего иммунитета при холере. Вместе с тем, среди природных штаммов геновариантов пока не обнаружены изоляты, продуцирующие только В-субъединицу холерного токсина. Такие штаммы могли бы использоваться в качестве продуцента иммуногенной В-субъединицы холерного токсина классического типа. В этой связи цель нашей работы состояла в получении атоксигенного штамма геноварианта *V. cholerae* биовара Эль Тор, способного к продукции В-субъединицы холерного токсина классического типа.

В работе использованы микробиологические, генетические, иммунологические и молекулярно-биологические методы исследования. На первом этапе работы в полученный нами спонтанный нетоксигенный мутант *V.cholerae* биовара Эль Тор P18899-Д (Str^RTox-Hly⁺) методом конъюгации была введена плаزمиды-«самоубийца» pRT733, несущая транспозон Tnp_{rhoA}, с целью получения транспозонных мутантов

указанного штамма, утратившего гемолитическую активность [1]. Гемолитическая активность Тох-Н₂у⁺ изолятов Р18899-Д не позволяла использовать простой чашечный метод (РПИГ) при изучении на продукцию В-субъединицы большого числа колоний. Скрещивание проводили на плотной питательной среде (агар LB). Селективной средой служила питательная среда с добавлением канамицина (50 мкг/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Селектируемым классом являются трансконъюганты Str^RKm^RAp^S, поскольку такой фенотип должны иметь клоны холерного вибриона, несущие внедренный в хромосому транспозон Tnp_hoA (Km^R), но утратившие плазмидный репликон с маркером Ap^R. Частота переноса транспозона была 4×10⁻⁶. Поскольку этот транспозон беспорядочно внедряется в любую область хромосомы, включая гены, участвующие в продукции гемолизина, то у полученных трансконъюгантов была проверена способность продуцировать этот белок [8]. Проверено 1200 трансконъюгантов штамма Р18899 (Km^RAp^S), среди них оказалось 14 клонов, не продуцирующих гемолизин (Тох-Н₂у⁻), три из которых были взяты для дальнейших исследований. Все полученные клоны стабильно наследовали приобретенные признаки.

Следующий этап нашей работы состоял во введении в полученные Тох-Н₂у⁻ клоны штамма Р18899 конъюгативной рекомбинантной плазмиды pIEM3(Tc^RKm^R) с клонированным геном *ctxB1*, кодирующим биосинтез В-субъединицы холерного токсина классического типа [2,4]. Частота конъюгационного переноса плазмиды pIEM3 из *E.coli* KS164 в клетки *V. cholerae* Р18899 (Тох-Н₂у⁻) составляла 5×10⁻⁵. Полученные клоны Tc^RKm^R проверяли на продукцию В-субъединицы холерного токсина методом РПИГ [3]. Среди них действительно были обнаружены клоны, продуцирующие и секретирующие из клеток этот белок.

При количественном определении уровня биосинтеза В-субъединицы иммуноферментным методом GM1 ELISA [9] было установлено, что проверенные клоны Tc^RKm^R продуцировали 4,0-7,0 мкг/мл этого белка. Клон с наибольшей продукцией В-субъединицы холерного токсина (7,0 мкг/мл) был выбран для дальнейшего исследования. Сопоставление уровня биосинтеза В-субъединицы геноварианта Р18899-Д (pIEM3) с таковым штамма *V.cholerae* классического биовара 569В, который продуцирует этот белок в составе холерного токсина, показал, что сравниваемые штаммы не отличались друг от друга по этому свойству. Изучена также стабильность наследования плазмиды pIEM3 в клетках сконструированного штамма геноварианта. Показано, что стабильность наследования плазмиды pIEM3 составляет 85%.

Таким образом, на основе нетоксигенного варианта штамма геноварианта Р18899-Д впервые получен штамм Р18899-Д(pIEM3), активно продуцирующий иммунную В-субъединицу холерного токсина.

Этот штамм может быть использован в качестве продуцента В-субъединицы холерного токсина для изготовления иммунодиагностических препаратов, а также холерных химических вакцин.

Литература

1. Журавлева Е.А., Смирнова Н.И. Использование транспозонов для изучения генетической организации *Vibrio cholerae* не O1 с помощью Tn5-Mob// Мол. генет., микробиол. и вирусол.-1991.-№5.- С.15 - 19.
2. Смирнова Н.И., Крепостнова И.М., Ливанова Л.Ф., Заднова С.П., Еремин С.А., Ильина Т.С.Авирулентный штамм *Vibrio cholerae* – продуцент В-субъединицы холерного токсина: получение и молекулярно-генетический анализ// Мол. генет., микробиол. и вирусол. - 2007. - №4. - С.7 - 13.
3. Шагинян И.А., Маракуша Б.И. Модификация метода пассивного иммунного гемолиза на плотной среде для выявления продукции термолabile энтеротоксинов штаммами холерных вибрионов и кишечной палочки // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 1983. - №2. - С. 92 - 96.
4. Янишевский Н.В., Гинцбург А.Л., Вертиев Ю.В. и др. Конструирование рекомбинантных плазмид, кодирующих биосинтез В-субъединицы холерного токсина// Мол. генет., микробиол. и вирусол.-1987.-1987.-№4. –С.26-32.
5. Kumar P., Jain M., Goel A.K. et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India // J. Med. Microbiol. - 2009. - Vol. 58. - P. 234-238.
6. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // Trends Microbiol. – 2010. - Vol. 18. – P. 46-54.
7. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh // J.Clin. Microbiol. - 2006. – Vol. 44. – P. 4211 – 4213.
8. Sing D.V., Matte M. H., Matte G.R., et al. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolation // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67 (2). - P. 910 - 921.
9. Svennerholm A.M., Wiklund G. Rapid GM₁-enzyme-linked immunosorbent assay with visual reading for identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin //J.Clin.Microbiol.-1983.-Vol.17.–P. 262 – 270.

ИЗУЧЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ СТРУКТУРНЫХ И РЕГУЛЯТОРНЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ОТ-ПЦР У АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА, ВЫДЕЛЕННЫХ В РОССИИ В 1942-1943 ГГ.

Н.Б. Челдышова, А.А. Крицкий, И.В. Тучков

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», г. Саратов

Последняя вспышка холеры, вызванной *V. cholerae* классического биовара, наблюдалась в России в 1942-1943 гг. и отличалась нехарактерным для азиатской холеры течением заболевания (большим количеством легких клинических форм, вибрионосительства) и эпидемическим процессом (незначительным распространением инфекции, преимущественно контактно-бытовым путем) [1]. Проведенные нами исследования показали, что указанные особенности вспышки были связаны с фенотипическим своеобразием вызвавших её штаммов, выражавшемся в ауксотрофности, практически полном отсутствии продукции растворимой гемагглютинин/протеазы (ha/p от haemagglutinin/protease) на фоне высокой вирулентности и повышенной продукции холерного токсина (СТ - от cholera toxin) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (TCP - от toxin coregulated pilus) [2]. В результате полногеномного секвенирования одного из атипичных штаммов (М-29) было установлено наличие у него ряда мутаций в регуляторных генах *groS* и *hapR* [3]. Указанные гены отвечают за подавление через вирулентный каскад (*aphA-tcpPH-toxT*) экспрессии СТ и TCP при достижении высокой клеточной плотности [4,5,7]. Одна из мутаций в гене *groS* приводила к образованию стоп кодона в первой трети кодируемой последовательности. Мутация в гене *hapR* при трансляции вела к замене аминокислоты аргинина (Arg18) на гистидин (His18) в ДНК-связывающем домене белка *HapR*, что, возможно, препятствовало полноценному связыванию данного белка с промоторной областью гена *aphA*. Наличие мутации в гене *hapR* было подтверждено фрагментарным секвенированием у всех штаммов данной группы, кроме штамма М-9. Фрагментарное секвенирование гена *groS* не проводилось. Для проверки предположения о влиянии указанных мутаций на повышение продукции СТ и TCP было решено провести изучение экспрессии генов СТ и TCP, а также ряда регуляторных генов у всех штаммов, выделенных в России в 1942-1943 гг.

Цель работы состояла в установлении причин повышенной продукции атипичными штаммами холерного токсина и токсин

корегулируемых пилей адгезии.

В работе было использовано 13 штаммов, выделенных на территории Поволжья и Башкортостана в 1942-1943 гг., и 1 типичный штамм *V. cholerae* классического биовара, выделенный в 1969 г. в Пакистане. Для культивирования бактерий применяли бульон LB (рН 7,2). Определение экспрессии структурных (*ctxA*, *tcrA* и *gcsA*) и регуляторных генов (*toxR*, *toxT*, *tcrP*, *tcrH*) проводили с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). Для обратной транскрипции использовали комплект реагентов «Реверта» (InterLabServis, Russia). ПЦР осуществляли на приборе Rotor-Gene Q 5 plex (QiagenInc, GMBH, Germany). Сравнительный анализ экспрессии генов у атипичных штаммов проводился с таковыми у типичного штамма *V. cholerae* J-89 классического биовара. Оценка экспрессии велась методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [6]. В качестве референсного гена был использован ген домашнего хозяйства – *gcsA*. Статистический анализ корреляции проводился с помощью коэффициента корреляции Фишера.

Наиболее значительное увеличение экспрессии (от 13,5 до 1075,7 раз, в среднем в 166 раз) у всех атипичных штаммов по сравнению с таковым у типичного штамма J-89 наблюдалось у гена *tcrH*. В то же время, штаммы, у которых экспрессия гена *ctxA* была в 2 и более раз выше, чем у штамма J-89, помимо увеличения экспрессии гена *tcrH* характеризовались повышением экспрессии и остальных регуляторных генов. Так, экспрессия гена *toxR* была выше у атипичных штаммов в 1,5-5,5 раз, гена *toxT* – в 5,8-12,2 раза, гена *tcrP* – в 3,4-30,4 раз.

Установлена статистически значимая корреляция между экспрессией гена *ctxA*, ответственного за синтез А-субъединицы холерного токсина, и регуляторных генов *toxR*, *toxT*, *tcrP* и *tcrH*, входящих в единый регуляторный каскад, позитивно регулирующий экспрессию генов СТ и ТСР.

Наиболее высокая экспрессия всех исследуемых структурных и регуляторных генов наблюдалась у штамма М-29, чья продукция СТ, по данным РПИГ и GM1 Elisa, была максимальной. Экспрессия гена *ctxA* у данного штамма была в 5 раз выше, чем у типичного штамма J-89, а гена *tcrA* – в 325,2 раз. Экспрессия регуляторных генов *toxR*, *toxT*, *tcrP* и *tcrH* также была повышена в 5,5; 7,8; 30,4 и 1075,7 раз соответственно.

Учитывая установленные нами ранее данные о наличии мутаций в генах *hapR* и *groS*, оказывающих негативное влияние на вирулентный каскад (*aphA-tcrPH-toxT*), мы полагаем, что повышение экспрессии генов СТ и регуляторных генов непосредственно связано с отсутствием тормозного влияния белков *HapR* и *RpoS*.

Экспрессия гена *tcrA*, ответственного за синтез основной субъединицы ТСР, была увеличена в 5-325 раз у всех штаммов, выделенных в 1942-1943 гг., в том числе и у штамма М-9, выделенного из

воды в г. Астрахани, несмотря на то, что, по данным самоагглютинации и иммуноблоттинга, продукция ТСР у него отсутствовала. В то же время нам не удалось установить статистически значимую корреляцию между повышением экспрессии гена, ответственного за синтез основной субъединицы ТСР, и регуляторными генами.

Таким образом, проведенные нами исследования подтверждают высказанное предположение о том, что увеличение экспрессии гена *ctxA* могло быть связано с мутациями в регуляторных генах *hapR* и *rpoS*. Отсутствие корреляции между экспрессией гена *tcpA* и регуляторных генов *toxR*, *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, вероятно, свидетельствует о наличии влияния на экспрессию данного гена не только указанных регуляторных генов, но и других неизвестных пока факторов.

Литература

1. Савостин Д.Г. К анализу эпидемиологических закономерностей при холере: Дис.... канд. мед. наук. – Саратов, 1946. – 352 с.
2. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Кутырев В.В. Молекулярно-генетические особенности штаммов *Vibrio cholerae classica*, вызвавших эпидемию азиатской холеры в России в 1942 г. // Молекул. генетика. – 2001. – №4 – С.12-16.
3. Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Черкасов А.В., Смирнова Н.И. Биоинформационный анализ полногеномной последовательности атипичного штамма *Vibrio cholerae* классического биовара М-29. Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2014 г. – Вып. 27 - С.87-89.
4. Jobling M.G., Holmes R.K. Characterization of *hapR*, a positive regulator of *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi luxR* gene. // Mol. Microbiol. – 1997. – Vol.26, №5. – P. 1023-1034.
5. Kovacicova G., Skorupski K. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators AphA, AphB, and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae tcpPH* promoter. // Mol. Microbiol. – 2001. – Vol.41, №2 – P. 393–407.
6. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. // Methods – 2001. – 25 – P. 402–408.
7. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. // J. Bacteriol. – 1998. – Vol. 180, №4 – P. 773–784

ИЗУЧЕНИЕ МЕЖГЕННОЙ ОБЛАСТИ *zot*– *ctxAB* (P_{ctxAB}) У ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

Е.И. Подопригора, И.В. Савельева, А.Д. Ковалев, В.Н. Савельев,
А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ставрополь

Функционально значимой у токсигенных холерных вибрионов является генетическая структура промоторной области на участке *zot* – *ctxAB*. С промоторной областью оперона *ctxAB* (P_{ctxAB}), содержащей tandemные гептаповторы 5'- TTTTGAT - 3', связывают регуляцию и интенсивность экспрессии биосинтеза холерного энтеротоксина (через регуляторный белок *ToxR*) [5,1, 3,2,7,8].

С учетом сказанного, с помощью полимеразной цепной реакции проведен скрининг фрагментов ДНК генов межгеновой области *zot* – *ctxAB*., входящей в структуру филаментозных фагов СТХ классических холерных вибрионов, типичных токсигенных и измененных (гибридных) вариантов холерного вибриона биовара Эль Тор.

Материалы и методы.

В работе использованы штаммы холерного вибриона классического биовара (№№ 3Д, 33Д, 569В), типичного токсигенного биовара Эль Тор (№№ 484Ст и 480Ст) и генетически измененных (гибридных) вариантов биовара ЭльТор (штаммы №№ 8Д, 10Д, 12Д, 13Д, 157Д, 1045Д, 1114Д), выделенные от больных холерой. Штаммы холерных вибрионов получены из лаборатории «Коллекция культур патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора и хранились в 0,4% агаре Хоттингера под вазелиновым маслом при температуре 20-25⁰С. Для культивирования холерных вибрионов использовали 1% пептонную воду, агар Хоттингера pH7,8-8,0.

При анализе структуры генов промоторной области *zot* – *ctxAB* применили разработанную Мироновой Л.В. и др. [7] систему праймеров *tbr F*, *tbr R* (таблица 1), фланкирующих участки ДНК в изучаемом межгеном пространстве (нуклеотидные позиции 1568033 – 1568432 хромосомы I штамма *V. cholerae eltor* № 16961– NC002505), содержащей *ToxR*- связывающие гептаповторы (TTTTGAT). Амплификацию осуществляли в реакционной смеси стандартного` состава. Результаты ПЦР учитывали методом электрофореза в 2% агарозном геле с помощью

гель документирующей системы BioRad.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованные в работе.

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров '5 — 3'	Размер ампликона	Ссылка
tbr	tbrF ААТСТGCCCGАТАТААСТТАТС tbrR ТТАСААGGАТАСGСТТАСAGTG	400	Миронова Л.В. идр. 2012 [3]

Секвенирование гена *tbr*, фланкирующего межгенную область *zot – ctxAB*, проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с набором реактивов BigDye Terminator v3.1 в соответствии с методическими рекомендациями производителя. Исходные данные анализировали в программе Sequencing Analysis v5.4. При сопоставлении последовательностей были использованы референс штаммы *V.cholerae* N 16961 биовара Эль Тор и классического биовара *V.cholerae* N 569В, депонированные в базе данных GenBank.

Результаты и обсуждение.

Показано, что размер наработанного в ПЦР продукта с праймерами к гену *tbr* у всех взятых в опыт штаммов холерных вибрионов, независимо от их биовара, типичности, принадлежности к генотипу, составил 400 п.н.

Секвенирование межгенной области *zot – ctxAB* двух типичных штаммов биовара эльтор (№№ 480 Ст и 484 Ст), трех штаммов классического биовара (№№ 569В, 3Д, 33Д) и семи генетически измененных вариантов биовара эльтор (№№ 8Д, 10Д, 12Д, 13Д, 157Д, 1045Д, 1114Д) имели различное число ToxR-связывающих гептаповторов. Так, P_{ctxAB} штамма 569В классического биовара Inaba содержал 8 тандемных гептаповторов и 1 одиночно расположенный, а штаммы 3Д и 33Д классического биовара Ogawa – 4 гептаповтора и 1 одиночно расположенный:

штамм № 569В, Inaba > (5' --> 3' complementary sequence) - 343 nucleotides:

cgtcccaacagagctgtttgcatcgagctaccgctacaaggtgctaccgttaccggatttcaatcactttgtggtgttc
gatacctttgcagcgcgaagcgctgtgggtagaagtgaaacggggttaccgataaaaacaga
aaatgataaaaaaggactaaatagtata**ttttgatttttgatttttgattttgattttgattttg**
attttgatttcaataatacaaatattttacttatttaattg**ttttgat**caattattttctgttaaacaaagggagcatt
atatggtaaag ataatattgtgtttttattctatcatgcatga;

штаммы №№3Д, 33Д, Ogawa > (5' --> 3' complementary sequence) – 308 nucleotides:

cgtcccaacagagctgtttgcatcgagctaccgctacaaggtgctaccgttaccggatttcaatcactttgtt
gttcgatacctttgcagcgcgaagcgctgtgggtagaagtgaaacggggttaccgataaaaacagaaaa
aaaaaaggactaaatagtata**ttttgattttgattttgattttgat**ttcaataatacaaatattttacttatta

ttg**ttttgat**caattatTTTTctgttaaacaaggagcattatatggtaaagataatattgtgtttttatttctatc

Два штамма типичного холерного вибриона биовара Эль Тор (№№ 480Ст и 484Ст, Ogawa) и все семь генетически измененные (гибридные) варианты биовара Эль Тор, Ogawa (№№ 8Д, 10Д, 12Д, 13Д, 157Д, 1045Д, 1114) содержали по 4 тандемных гептаповторов и по одному одиночно расположенному):

> (5' --> 3' complementary sequence) **317** nucleotides:
cgtccaacagagctgtttgcatcgagctaccgctacaaggtgctaccgttaccggatttcaatcactttgtg
gtgttcgatatttgcagcgcaagcgctgtgggtagaagtgaaaggggttaccgataaaaacagaaa
atgataaaaaggactaaatagtata**ttttgatttttgatttttgattttgat**tcaataaacaatttttactt
atttaatt**ttttgat**caattatTTTTctgttaaacaaggagcattatatggtaaagataatattg
tgttttttatttctatc atgcatttc.

Положение и число тандемно и одиночно расположенных гептаповторов 5' – ТТТТГАТ – 3' в межгенном пространстве *zot* – *ctxAB* различных штаммов холерного вибриона представлено в таблице 2.

Полученные нами данные о копийности тандемных гептаповторов в промоторной области оперона *ctxAB* типичных токсигенных и гибридных вариантов биовара Эль Тор (по 4 копии) совпадают с данными других исследователей [1,6,4,2] Три штамма классического холерного вибриона (№№ 3Д, 33Д, 230Д), выделенные в Дагестане в 1994 году, наряду с гибридными вариантами биовара Эль Тор, имели также 4 гептаповтора. Учитывая образование гибридных вариантов биовара Эль Тор вследствие горизонтального переноса генов от классического холерного вибриона, циркулирующего в конкретном эндемичном очаге с определенным набором копий гептаповторов в P_{ctxAB} , можно предположить поликлональное их происхождение. При этом каждый вновь появившийся жизнеспособный клон гибридного варианта биовара Эль Тор будет содержать в P_{ctxAB} то количество копий гептаповторов, которое имел исходный классический биовар.

Следует отметить, что как в наших, так и в исследованиях Halder K. at al., [7], в P_{ctxAB} у всех изучаемых штаммов типичного токсигенного или генетически измененного холерного вибриона биовара Эль Тор и классического биовара обнаруживались в строго определенной позиции (между –35 и –10 областями), наряду с тандемными, одиночные копии 5' - ТТТТГАТ- 3'*, роль которых в доступной литературе не освещена. Можно лишь предположить о несомненном участии этого абсолютно консервативного одиночного гептаповтора в экспрессии СТ у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1.

Таблица 2. Положение и число тандемно и одиночно расположенных гептаповторов 5' – TTTTGAT – 3' в межгенном пространстве *zot* – *ctxAB* различных штаммов холерного вибриона.

Биовар, №№ штаммов	Положение			Размер	Число гептаповторов
Классический, 569Б	168-224	259-266	267-343	343	4 тандемно
	TTTTGAT	TTTTGAT	–		1 моно
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
Эль Тор типичный токсигенный №№ 480,484	168- 203	238 – 245	246-322	322	4 тандемно
	TTTTGAT	TTTTGAT	–		1 моно
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
Классический, №№ 3Д, 33Д, 230Д	168- 203	238 – 245	246-322	322	4 тандемно
	TTTTGAT	TTTTGAT	–		1 моно
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
Эль Тор, генетически измененный гибридный, №№, 8Д, 10Д, 12Д, 13Д, 157Д, 1045Д,	168- 203	238 – 245	246-322	322	4 тандемно
	TTTTGAT	TTTTGAT	–		1 моно
	TTTTGAT				
	TTTTGAT				
	1114Д				TTTTGAT

Литература

1. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор // Пробл. особо опас. инф. – Саратов, 2012. – Вып. 1 (111). – С. 57-61.

2. Кутырев В.В., Смирнова Н.И. Основные направления молекулярно-биологических изменений геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор в современный период седьмой пандемии холеры // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов- на- Дону, 2013. – Вып. № 26. – С. 108-110.

3. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я. и др. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae eltor*, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2012. – №2. – С. 13-20.

4. Монахова Е.В., Писанов Р.В. Токсины холерных вибрионов. // Мол. генетика, микробиол. вирусол. – 2005. – № 1. – С. 7- 18.

5. Смирнова, Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.П., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. //Молек. генетика, микробиол. и вирусол.– 2011. – № 3. – С. 11-17.

6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю. и др. Геноварианты возбудителя холеры Эль Тор: получение, молекулярно-генетический и протеомный анализ. // Мол. генетика, микробиол. и вирусол.– 2014. – № 1. – С. 21- 31.

7. Halder K., Das B., Nair G.B., Bhadra R.K. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain //J. Microbiology– 2010.– Vol. 156.–P. 99-107.

8. Miller B., Mecalanos J.J. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR*. //Proc. Natl. Acad. Sci. USA.– 1984 – Vol. 81.-P.3471-3475..

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ БЕЛКИ (MOONLIGHTING PROTEINS) ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ: АЛЬФА-ЕНОЛАЗА

Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова, А.С. Водопьянов, Л.В. Романова
ФКУЗ Ростовский-на Дону-противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Более 25 лет тому назад в биологию было введено понятие мульти/полифункциональных белков (moonlighting proteins) после того, как удалось выяснить, что нейрорлейкин по своей структуре на 90% гомологичен фосфогексоизомеразе (3), а структурный белок хрусталика глаза идентичен α -енолазе, участвующей в метаболизме глюкозы [12]. С общих позиций, мультифункциональность определяется способностью белка выполнять несколько не связанных друг с другом функций/активностей и нейтрализация одной из них не отражается на состоянии другой. Полифункциональность позволяет клетке быстро отвечать на изменения окружающей среды через использование альтернативных подходов для координации нескольких активностей и формирования комплексности из существующих белков без увеличения размеров генома [4]. Многие из них участвуют в реализации вирулентности у бактерий, при этом большим вниманием пользуется α -енолаза (К.Ф.4.2.1.11-2-фосфо-Д-глицерат гидролиаза) -широко

распространенный в природе фермент, катализирующий обратимое превращение 2-фосфо-Д-глицерата. Фермент жизненно важен для клетки. Прямая реакция является центральной в гликолитическом пути превращения углеводов у бактерий и высших, тогда как обратная наблюдается при глюконеогенезе. В дополнение к своему прямому участию в метаболизме, α -енолаза вовлечена в некоторые биологические и патофизиологические процессы в роли белка теплового шока и модулятора транскрипции генов, в развитие инфекционных заболеваний и аутоиммунность [9, 10]. Несмотря на свою основную локализацию в цитоплазме, фермент идентифицирован на поверхности нейронных, раковых и некоторых гемопоэтических клеток, а также на поверхности ряда бактерий, где он связывает плазминоген, способствуя его превращению в плазмин [7,8]. Соединение плазминогена с α -енолазой осуществляется через его лизин-связывающие крендельные (krinkle) домены, что ведет к изменению конформации молекулы плазминогена и последующему повышению его чувствительности к активации. Помимо отдельных остатков лизина в составе α -енолаз обнаружены последовательности из девяти аминокислотных остатков, участвующих во взаимодействии α -енолазы с плазминогеном [2,8]. Плазмин – трипсиноподобная сериновая протеаза, активация которой на поверхности бактерий под действием тканевых или микробных активаторов плазминогена ведет к неконтролируемому протеолизу и усилению миграции бактерий через поврежденные тканевые барьеры хозяина [2,7]. У холерного вибриона активность α -енолазы описана недавно [1]: удалось показать существование у *Vibrio cholerae* системы активации плазминогена человека в условиях *in vitro*, включающую, как минимум, температурозависимую α -енолазу и мембранный белок OmpT.

Выполненный поиск показал, что информация о α -енолазе *V. cholerae* O1 biovar El Tor str. N 16961 содержится в GenBank под № AAF 95589. Кодированный ее ген VC 2447 находится на первой (главной) хромосоме, обеспечивая образование продукта с молекулярной массой 45,7 кДа. Он состоит из 433 аминокислотных остатка, среди которых 33 или 7,6% приходится на лизин и лишь один - на цистеин. Последнее указывает на отсутствие в составе молекулы SH-групп и дисульфидных связей, что должно сопровождаться нечувствительностью фермента к блокаторам SH-групп и неучастием дисульфидных связей в формировании его вторичной и третичной структур. Небезынтересно, что у фермента из млекопитающих содержится 6 остатков цистеина. α -Енолаза – гликопротеин с тремя сайтами гликозилирования на N-половине молекулы. По данным Gooley A. и Williams K.[6], сам Asn в мотиве N – X – S/T не гликозилируется у всех секретруемых, поверхностно расположенных белков, а в случаях, когда X представлен пролином (P), то гликозилирование маловероятно. В этой связи вероятность

гликозилирования α -енолазы у Asn-18 по сравнению с Asn-103 и Asn-138 из-за близости пролина невелика. Дополнительно в составе молекулы удалось идентифицировать последовательность ${}_{252}\text{FYDAEKKEY}_{260}$, аналогичную плазминоген-связывающему участку *Aeromonas hydrophila* [11], что свидетельствует о принципиальной возможности α -енолазы *V. cholerae* взаимодействовать с плазминогеном.

По нашим данным, фермент из холерного вибриона проявил неожиданную идентичность на 88,9% (сходство 93%) своей аминокислотной последовательности с α -енолазой из чумного микроба (мол. вес - 46,7 кДа, 431 аминокислотный остаток, цистеина – 1, лизина - 33), являющегося модельным при изучении активации плазминогена.

Близость с ферментом из *Francisella tularensis* была меньшей и составила по идентичности 55,8% и 66% - по сходству (мол. вес -49,4 кДа, 456 аминокислотных остатков, цистеина -3, лизина - 30). Наряду с С-концевыми лизинами (К), участвующими в связывании плазминогена, у всех обнаруживался плазминоген-связывающий мотив с двумя остатками лизина (за исключением *L. mexicana*) в центральной части молекулы (рисунок).

<i>Aeromonas hydrophila:</i>	${}_{252}\text{FYDAEKKEY}_{260}$
<i>Streptococcus pneumoniae:</i>	${}_{248}\text{FYDKERKVVY}_{256}$
<i>Vibrio cholerae:</i>	${}_{252}\text{FYDAEKKEY}_{260}$
<i>Leishmania mexicana:</i>	${}_{249}\text{AYDAERKMY}_{256}$
<i>Yersinia pestis:</i>	${}_{252}\text{FYKDGKYVL}_{260}$
<i>Francisella tularensis:</i>	${}_{250}\text{FYKDGKYEL}_{258}$

Рисунок. Плазминоген-связывающие мотивы в структуре α -енолаз *A. hydrophila* и *L. mexicana* [11], *S. pneumonia* [5], а также *V. cholerae*, *Y. pestis* и *F. tularensis* (наши данные).

Активность фермента четко выявлялась как у целых клеток вибрионов O1 и O139 серогрупп (9,2-32,5 мкг ФЭП/10⁹ м.к.), так и в цитоплазме (65 мкг/мг), а также во фракции наружных мембран (129-231 мкг/мг белка), полученных в результате дифференциального центрифугирования при 105000 g.

Условия выращивания (среды, температура) и индивидуальные особенности штаммов вибрионов влияли на уровень активности α -енолазы: клетки, выращенные на агаре Мартена при 28°C, согласно критерию знаков с вероятностью 95-97,5% обладали более высокой активностью по сравнению с 37°C.

Таким образом, у *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп обнаружена активность α -енолазы, которая наряду с другими структурными элементами клетки (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа,

нейраминидаза, жгутики, фимбрии, и т.д.) может играть существенную роль в биологии возбудителя.

Литература

1. Мишанькин, Б.Н. Система активации плазминогена у *Vibrio cholerae*. / Б.Н.Мишанькин, О.В.Дуванова, Е.С. Шипко, Л.В. Романова, А.С. Водопьянов, А.К. Ерибемян, М.В. Шишияну, Л.К. Лысова, С.О. Водопьянов // Ж. микробиол. – 2013. - № 5. – С. 14 – 20.
2. Bergmann, S. The nine residues plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration./Bergmann S., Rohde M., Preissner T.K., Hammerschmidt S. // *Thromb. Haemost.* – 2005. - V.95. - P.304 – 311.
3. Chaput, M. The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase./ M. Chaput, V. Claes, D. Portetelle, I. Cludts, A. Cravadoz, A. Burny, H. Graes, A. Tartar// *Nature.* – 1988. – V.332. – P. 454 – 455.
4. Cheng, X.-Y. A global characterization and identification of multifunctional enzymes. / X-Y Cheng, W-Y Huang, S-C Wu, H-L Zhang, H Wang et al.// *PLoS ONE.* - 2012. – V. 7, N6: e38979.doi 10.1371/
5. Ehinger, S. Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites./S. Ehinger, W.D. Schubert, S. Bergmann, S. Hammerschmidt, D.W. Heinz // *J. Mol. Biol.* – 2004. – Vol. 343. – P. 997 – 1005.
6. Gooley, A. How to find, identify and quantitate the sugars on proteins./ A. Gooley, K. Williams // *Nature.* – 1997. - Vol. 385.- N 6616. – P.557 – 559.
7. Lahteenmaki, K. Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion./Lahteenmaki K., Edelman S., Korhonen T.K. // *Trends Microbiol.* - 2005. - V. 13. – P. 79 – 85.
8. Miles, L.A. Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cell : identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. / Miles L.A., Dahlberg C.M., Plescia J., Felez J., Kato K., Plow E.F.// *Biochemistry.* – 1991. - Vol.30. - N 6. – P. 1682 – 1691.
9. Pancholi, V. Alpha-enolase, a novel strong plasmin(ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci./ Pancholi V., Fischetti V. // *J.Biol.Chem.* – 1998. - V. 273.- N 23. - P. 14503 – 14515.
10. Panchol ,V. Multifunctional alpha- enolase: its role in diseases. / Pancholi V. // *Cell Mol. Life Sci.* - 2001. - V. 58. - P. 902-920.
11. Sha, J. Surface-expressed enolase contributes to the pathogenesis of clinical isolate SSU of *Aeromonas hydrophila*./ Sha J., Erova T.E., Alyea R.A., Wang., Olano J.P., Pancholi V., Chopra A.K. // *J. Bacteriol.* – 2009. - V. 191. - N 9. - P. 3095 -3107.

12. Wistow, G.J. Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein./ G.J Wistow, T. Leitman, L.A. Williams, S.O.Stapel, W.W. de Jong, J.Horwintz, J. Piatigorsky.// J. Cell. Biol. – 1988. – V.107. – P. 2729 – 2736.

ИММУНОЛОГИЯ

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ СВОЙСТВА НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

А.Л. Галичева, Н.Д. Омельченко, А.В. Филиппенко, Н.И. Пасюкова,
И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова, Л.В. Романова,
Е.С. Шипко, И.А. Беспалова, Е.П. Дорошенко

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Важным направлением деятельности исследователей всего мира на современном этапе является повышение эффективности и качества препаратов, выпускаемых для специфической профилактики холеры и способных инициировать у привитых формирование иммунитета против заражения всеми известными эпидемически опасными штаммами возбудителя этого заболевания [3]. Очевидно, что в состав эффективной молекулярной вакцины должно входить как можно больше протективных антигенов, локализованных в наружных мембранах (НМ) возбудителя [2], поскольку при холере именно они ответственны за формирование антибактериального иммунитета [1].

Цель исследования: Изучение иммуногенных и протективных свойств наружных мембран холерного вибриона на модели экспериментальных животных.

Для получения препарата наружных мембран клетки 18-часовых агаровых (агар Мартена, рН 7,6) культур штамма *Vibrio cholerae El Tor* 18950 (ctx⁻, tcp⁻, OmpT⁺, OmpU⁻, OmpW⁻) после смыва физиологическим раствором с 0,01% мертиолата и 1,5-часовой инкубации при комнатной температуре осаждали центрифугированием на холоду при 6000 об/мин и разрушали с помощью УЗ-дезинтегратора модели Bandelin SONOPULS HD 3200 или механическим растиранием с песком. Лизаты центрифугировали при 105000g 1 час при 4° С. Надосадочную жидкость отбрасывали, а осадок солюбилизировали с помощью физиологического раствора с 1 % тритона X-100 (Serva) при комнатной температуре в течение ночи с последующим концентрированием в 2-4 раза ультрафильтрацией в системе Amicon (камера 10 РА, мембрана РМ 30).

Полученными НМ двукратно (с интервалом в неделю) иммунизировали внутрибрюшинно и подкожно белых мышей в дозах 2,5, 5, 10 мкг. Двум группам взрослых кроликов двукратно, с интервалом в

неделю, вводили в область пахового лимфоузла по 350 и 700 мкг препарата. Через 21 день иммунизированных (опытных) мышей заражали внутрибрюшинно агаризованной вирулентной культурой *V. cholerae* 569В в дозе 100 LD₅₀. Для этого агар Нобля (Difco) растворяли в дистиллированной воде, кипятили в течение 30 минут на водяной бане при постоянном помешивании и после охлаждения до 45° С соединяли со взвесью культуры *V. cholerae* 569 В, выращенной при температуре 37° С в течение 18 часов, в соотношении 1:1 до конечной концентрации агара 0,2 %. Учитывали количество выживших и павших в течение 3 суток после заражения животных. Гибель 100% контрольных (интактных) мышей подтверждала наличие генерализованной инфекции.

Иммунизированных взрослых кроликов на 21 сутки постиммунизационного периода заражали 1 млрд. взвесью вирулентного штамма возбудителя холеры в перевязанную петлю тонкого кишечника. Потеря жидкости и электролитов из тканей в просвет кишечника (холерогенный эффект) и сопутствующие гистологические изменения (отек более глубоко лежащих тканей, кровоизлияния и некрозы покровного эпителия ворсин - энтеропатогенный эффект) являются у этой экспериментальной модели такими же, как и при заболевании человека [4]. Об иммуногенности препарата судили по отсутствию энтеропатогенного и холерогенного эффектов в опытных изолированных петлях экспериментальных кроликов.

Оценку протективности полученных НМ проводили на протяжении 5 месяцев (срок наблюдения), заражая иммунизированных взрослых кроликов в изолированную петлю тонкого кишечника вирулентной культурой возбудителя холеры ежемесячно в течение срока наблюдения. Фиксировали наличие/отсутствие холерогенного и энтеропатогенного эффектов.

Результаты проведенных исследований показали, что степень иммуногенности зависит от способа аппликации и дозы вводимого антигена. Выявлено, что после внутрибрюшинной иммунизации дозой 2,5 мкг выживало 30% белых мышей, при иммунизирующей дозе 5 мкг – 60%, 10 мкг – 80% животных. Подкожная иммунизация оказалась менее эффективной: иммунизирующая доза 10 мкг обеспечивала выживаемость 75% животных, дозы 2,5 и 5 мкг предотвратили развитие генерализованной холерной инфекции у 25% белых мышей (табл.).

Оценивая иммуногенность препарата НМ на модели взрослых кроликов следует отметить, что 350 мкг препарата не защитили животных от развития инфекционного процесса в изолированной петле тонкого кишечника, в то время как двукратная иммунизация более высокой дозой (700 мкг) предотвращала развитие как холерогенного ($K < 1,0$), так и энтеропатогенного эффектов (отсутствовали отек слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияния и некрозы покровного эпителия

ворсин). Следует отметить что защитный эффект препарата сохранялся до конца срока наблюдения (5 месяцев).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о перспективности использования наружных мембран для совершенствования специфической профилактики этого заболевания.

Таблица. Действие наружных мембран *V. cholerae El Tor* 18950 в тесте активной защиты мышей при разных способах иммунизации.

Доза (в мкг)	Иммунизированные внутрибрюшинно		Иммунизированные подкожно	
	Количество зараженных животных	Количество выживших животных	Количество зараженных животных	Количество выживших животных
2,5	20	6	16	4
5,0	20	12	16	4
10,0	20	16	16	12
20,0	20	16	16	12
Контроль	10	10	10	10
ImD50 (в мкг)	5,01		5,96	

Литература

1. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П. и др. Перспективы совершенствования холерных химических вакцин //Журн. микробиол. - 1998. - № 4. - С. 91-96.
2. Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Колесник Р.С. и др. Клеточные мембраны холерного вибриона как основа высокоиммуногенного вакцинного препарата против холеры //Бюллетень ВСЦН СО РАМН. - 2004. - Т.2, №1. - С.127-132.
3. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Щуковская Т.Н. и др. Специфическая профилактика холеры в современных условиях //Пробл. особо опас. инф.- 2011. – Вып. 107.- С. – 5-12.
4. Burrows W., Sack R.B. Animal models of cholera //Cholera/Ed. D. Barua, W. Burrows/. - Philadelphia, 1974. - Ch.9. - P. 189-205.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСТАТОЧНОГО ФОРМАЛЬДЕГИДА В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

О.В. Громова, А.В. Гаева, В.И. Павлова, М.Н. Киреев, О.Д. Клокова, О.А.
Волох, О.А. Лобовикова

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб», г. Саратов*

Холерная химическая вакцина, разработанная в РосНИПЧИ «Микроб» и лицензированная на территории России, состоит из холерогена-анатоксина и О-антигенов холерного вибриона сероваров Инаба и Огава [1]. Для характеристики качества и методов контроля иммунобиологических лекарственных препаратов, вводимых людям, на современном уровне необходимо проводить тщательное изучение их физико-химической структуры и наличия примесей. Детоксикация холерного токсина в процессе производства осуществляется воздействием формалина, поэтому в вакцине, наряду со связанным формальдегидом, существует остаточный свободный формальдегид. Допускается содержание остаточного формальдегида в готовом продукте – таблетке не более 0,2%. Точное определение свободного формальдегида в вакцине является актуальной задачей, так как от этого зависят качество вакцины и эффективность производства. Определение содержания формальдегида в вакцине в настоящее время проводят в соответствии с МУК 4.1/4.2.588-96 методом, основанном на колориметрическом определении в препарате хиноидного красителя при взаимодействии фуксинсернистого реактива с остаточным формальдегидом [2]. Недостатком этого метода определения формальдегида является трудоемкость, длительная пробоподготовка, кроме того, точности анализа мешает окраска вакцины. В связи с изложенным, разработка высокочувствительных эффективных методов определения формальдегида является актуальной задачей.

Целью данной работы явилось изучение возможности определения остаточного формальдегида в вакцине методом газовой хроматографии с использованием портативного газового хроматографа ФГХ-1 с фотоионизационным детектором.

Материалом для исследования служили таблетки производственных серий оральной химической вакцины. Известно количественное определение формальдегида в жидкости методом газовой хроматографии [3]. Нами был проведен анализ паровой фазы раствора готовой формы холерной вакцины на универсальной колонке газового хроматографа.

Первым этапом работы был анализ калибровочных образцов с содержанием формальдегида от 20 мкг/мл до 100 мкг/мл. По полученным значениям был построен график зависимости концентрации формальдегида в газовой фазе от его концентрации в жидкой фазе при $22\pm 3^\circ\text{C}$. Для определения количества формальдегида в анализируемых пробах проводили не менее 3 измерений. Для каждого образца определили среднюю высоту пика, соответствующего концентрации формальдегида в газовой фазе. По калибровочному графику определили значение концентрации формальдегида в жидкой фазе исследуемого образца.

Таблица. Определение остаточного формальдегида в производственных сериях холерной химической вакцины методом газовой хроматографии.

Наименование образца	Высота пика, мВ	Содержание формальдегида, %
Холерная вакцина, серия 1	230 ± 10	$0,02\pm 0,05$
Холерная вакцина, серия 2	236 ± 10	$0,02\pm 0,05$
Холерная вакцина, серия 3	240 ± 15	$0,025\pm 0,05$

Результаты исследований, представленные в таблице, соответствуют результатам определения остаточного формальдегида колориметрическим методом, применяемым в настоящее время в соответствии с нормативной документацией на вакцину холерную химическую (0,02-0,023%). Таким образом, данный метод является возможной альтернативой другим способам определения остаточного формальдегида в препаратах вакцины, так как его характеризует экспрессность, отсутствие этапа специальной пробоподготовки, возможность автоматизации при обработке результатов.

Литература

1. Кутырев В.В., Щуковская Т.Н. Холерные вакцины // В кн.: Вакцины и вакцинация: национальное руководство – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. - С. 431-445.
2. «Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям»: Методические указания МУК 4.1/4.2.588-96 – М.: Информационно-издательский центр Минздрава России, 1998. – 128 с.
3. Перцовский А.Л., Кремко Л.М. Газохроматографическое определение микроколичеств формальдегида в водных вытяжках и модельных средах, имитирующих пищевые продукты //Журнал аналит. химии. - 1985. - Т. 40. - № 6. - С. 1115-1117.

ДИАГНОСТИКА

МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К ИММУНОРЕАКТИВНЫМ АНТИГЕНАМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ EL TOR И O139

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, О.Ф. Кретенчук, О.С. Бурша,
И.В. Архангельская, М.Э. Яговкин

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

На сегодняшний день практические лаборатории имеют в своем распоряжении необходимый набор диагностических препаратов для идентификации возбудителя холеры, однако увеличение номенклатуры, совершенствование, улучшение качества, стандартизация диагностикумов, по-прежнему, остается актуальной задачей. Помимо создания собственно диагностических систем, существенную роль в разработке новых диагностических средств играет идентификация антигенов или их фрагментов, специфичных исключительно для *V. cholerae*. Гибридная технология позволяет получать панели моноклональных антител к различным эпитопам диагностически значимых антигенов холерных вибрионов. Так как основные иммунореактивные компоненты бактериальной клетки расположены на внешней мембране (фосфолипиды, липополисахариды, липопротеины и интегральные белки), целью настоящего исследования явилось получение и характеристика МКА к поверхностным антигенам холерных вибрионов O1 и O139. Для гибридизации по методу Fazekas de St. et al [1] проводили иммунизацию беспородных мышей по выбранной нами схеме цельными клетками убитых кипячением холерных вибрионов. Используемый в качестве иммуногена штамм *V. cholerae* 13020 обеспечивал достаточную антигенную стимуляцию иммунной системы биопродукторов, поскольку вызывал выработку специфических сывороточных антител в высоком титре, который составлял в непрямом варианте ТИФА 1:160000. В двух параллельно проведенных экспериментах эффективность гибридизации составила 20%, а специфическая эффективность – 100% (процент антителопродуцирующих гибридов от общего их количества). Было выведено 8 гибридов, которые показали при длительном культивировании стабильную антителопродукцию и хорошие ростовые свойства. Данные гибридомы клонировали, затем подвергли препаративному накоплению в культуральной среде. Моноклональные антитела из культуральных

жидкостей осаждали сульфатом аммония [2, 3, 4]. Изучение специфической активности полученных иммуноглобулинов проводили на наборе штаммов холерных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов в непрямом ИФА, по результатам которого наибольший интерес представляли МКА гибридом Н2F6 и А5D8. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Взаимодействие в ИФА моноклональных антител с холерными вибрионами *El Tor* и *O139*.

№ п/п	Штаммы <i>V. cholerae</i> (обеззараженные кипячением)	МКА (положительная реакция в ИФА)	
		Н2F6	А5D8
1	<i>V.cholerae El Tor ctx⁺ tcp⁺</i>	8/8*	8/8
2	<i>V.cholerae El Tor ctx⁻ tcp⁺</i>	8/8	8/8
3	<i>V.cholerae El Tor ctx⁻ tcp⁻</i>	8/0	8/8
4	<i>V.cholerae O139 ctx⁺ tcp⁺</i>	5/5	5/5
5	<i>V.cholerae O139 ctx⁻ tcp⁻</i>	6/0	6/6
6	<i>E. coli</i>	3/0	3/0
7	<i>V.cholerae не O1/не O139</i>	10/0	10/0
8	<i>Aeromonas spp.</i>	4/0	4/0
9	<i>Salmonella spp.</i>	2/0	2/0

Примечание: « * » - отношение числа исследованных штаммов к числу штаммов, взаимодействующих с МКА.

Как видно, МКА гибридомы Н2F6 специфически взаимодействуют со штаммами *V.cholerae El Tor* и *O139*, имеющими ген *tcp*. В отношении МКА гибридомы А5D8 зарегистрирована положительная реакция со штаммами *V. cholerae El Tor*, *O139* независимо от наличия в клетках гена *tcp*. Для подтверждения выявленной специфичности МКА Н2F6, мы планируем их испытание на большей выборке музейных штаммов холерных вибрионов *O1* и *O139*. Это позволит нам оценить диагностическую значимость полученных МКА и возможность применения их в прямом ИФА (предварительно получив пероксидазные конъюгаты) для оценки эпидемического потенциала конкретного штамма. Строгая специфичность МКА в отношении холерных вибрионов *El Tor*, *O139* серогрупп подтверждается отрицательной реакцией в ИФА с представителями близкородственных и гетерологичных микроорганизмов.

Для выяснения природы и локализации эпитопов, к которым направлены полученные МКА, был проведен иммуноблоттинг клеточных лизатов штаммов *V. cholerae El Tor* 13020 ($ctx^+ tcp^+$) и 19435 ($ctx^- tcp^-$) с новыми МКА (рисунок 1).

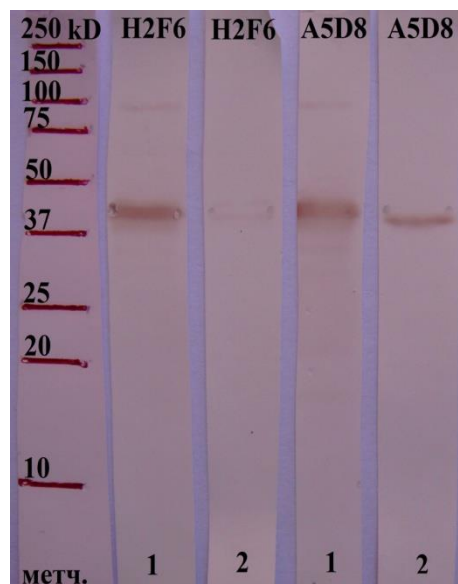


Рисунок 1. Иммуноблот МКА с бактериальными лизатами: 1- *V. cholerae El Tor* 13020 ($ctx^+ tcp^+$), 2 - *V. cholerae El Tor* 19435 ($ctx^- tcp^-$).

На представленной блотограмме видно, что МКА гибридомы H2F6 взаимодействовали с tcp^+ штаммом, образуя интенсивную полосу, локализованную на уровне маркерных белков 38-42 кДа; у tcp^- штамма аналогичная полоса не выявлена. Общие для tcp^+ и tcp^- холерных штаммов эпитопы выявляли МКА гибридомы A5D8 в районе маркерных белков 38-42 кД. После проведения электрофореза и переноса белков из геля на НЦМ, последняя была окрашена красителем Ронсеау S, и в результате у обоих штаммов визуализировалась интенсивная белковая полоса на уровне 38-42 кДа. В связи с этим мы заключили, что полученные нами МКА специфически взаимодействуют с определенными эпитопами белковой природы. Так как МКА гибридомы H2F6 взаимодействуют с tcp^+ штаммами холерных вибрионов, мы предположили, что выявленные на блотограмме белковые детерминанты – это белок токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТКПА). Однако, по данным литературы [5] молекулярная масса этого белка 20,5 кДа, тогда как различия между холерными штаммами tcp^+ и tcp^- наблюдаются в отношении белков 38-42 кДа. Отечественными и зарубежными авторами [6, 7, 8, 9] установлено, что в районе указанных молекулярных масс на электрофореграмме клеточных лизатов холерных вибрионов находятся белки наружных мембран - OmpT и OmpU, соответственно с молекулярной массой 40 и 38 кДа. Установлено также, что ТКПА и OmpU являются важными

протективными антигенами, формирующими антиколонирующий иммунитет, что предотвращает инфекционный процесс на его первой стадии - колонизации. Известен способ выделения белков токсин-корегулируемых пилей адгезии (ТКПА) и OmpU холерного вибриона, при котором не происходит разрушения клеток. Материал, содержащий белки ТКПА и OmpU, расположенные на поверхности бактериальных клеток, выделяют из предварительно подготовленной бактериальной массы орбитальным вращением, с последующим высокоскоростным центрифугированием и избирательной экстракцией этаноламином; затем проводят диализ и получают белковый комплекс, представляющий собой очищенный препарат, содержащий 70 % белков ТКПА и OmpU [10]. Авторы доказывают присутствие белков ТКПА и OmpU в полученных препаратах методом гель-электрофореза (на электрофореграмме показан штамм-продуцент протективных антигенов и полученный из него белковый комплекс, в котором визуализируются две белковые полосы - пили адгезии (20,5 кД) и белок OmpU (38 кДа). Скорее всего белки ТКПА и мембранный порин OmpU тесно связаны пространственно, так как экстрагируются в комплексе. Для получения большей информации необходимо иметь набор штаммов *V. cholerae O1* и *V. cholerae O139*, охарактеризованных по генам *tcp*, *OmpT* и *OmpU*, которые будут проверены в ИФА и иммуноблоттинге с новыми МКА. Тот факт, что данные белки, наряду с холерным токсином и токсин-корегулируемыми пиллями адгезии, координировано регулируются белком ToxR, говорит об их важной роли в вирулентности [11]. В связи с этим актуальным остается дальнейшее изучение специфической направленности новых МКА с целью определения их диагностической значимости.

Литература

1. Fazekas de St., Groth S. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. // J. Immunol. Meth. – 1980. – Vol. 35. – P. 1-21.
2. Antibodies: Methods. In 2 books. Book 1 M.: Mir\$, 1991 – 287 p.
3. Immunological methods. – M.: Meditsina. – 1987. – 472 p.
4. Reik, L.M., Maines, S.L. A simple non-chromatographic purification procedure for monoclonal antibodies. // J. Immunol. Meth. – 1987. – Vol. 100. – P. 123.
5. Herrington D.A., Hall R.H., Losonsky G. et al. Toxin, toxin-coregulated pili, and the *toxR* regulon are essential for *Vibrio cholerae* pathogenesis in humans. // J. Exp. Med. – 1988. – Vol.168, №4. – P. 1482-1492.
6. Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я. и др. Полипептидный профиль наружных мембран вирулентных и авирулентных штаммов *Vibrio cholerae O1* и *O139* серогрупп / Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. - 2007. - № 3(55) Приложение. - С. 52-56.
7. Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В.,

Ерибекян А.К. Плазминоген активирующая способность холерного вибриона и участие мембранного белка OmpT в этом процессе. // Защита населения и среда обитания. – 2012. – № 4(229). – С. 17–9.

8. Kelley J.T., Parker Ch.D. Identification and preliminary characterization of *Vibrio cholerae* outer membrane proteins. *J. of Bacteriology*. Feb. 1981; 1018-1024.

9. Chakrabarti S.R., Chaudhuri K., Sen K., Das J. Porins of *Vibrio cholerae*: Purification and Characterization of OmpU. // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178, №2. – P. 524-530.

10. Еремин С. А., Авдеева Н. Г., Волох О. А., Самохвалова Ю. И., Смирнова Н. И., Заднова С. П. Способ выделения белков токсин-корегулируемых пилей адгезии и OmpU холерного вибриона классического биовара. Патент РФ № 2324740; 2006.

11. Заднова С.П. Функциональная роль ToxR-регулируемых белков *Vibrio cholerae*. // Пробл. особо опас. инф. – 2004. – № 1(87). – С. 9-13.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НОВОЙ СЕЛЕКТИВНО-ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ СРЕДЫ СЭДХ-М ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ИЗ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД

О.С. Чемисова, Г.Д. Харабаджахан, О.А. Рыковская, А.Б. Мазрухо,
И.К. Савельева, М.М. Сагакянц

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Наблюдаемое в последние годы значительное увеличение доли морепродуктов в пищевом рационе российских граждан с новой остротой поставило проблему пищевых токсикоинфекций или гастроэнтеритов, вызванных галофильными паразитическими вибрионами. Опасным напоминанием об этой проблеме стали вспышки и спорадические случаи заболевания среди жителей российского Дальнего востока в 2009-2012 гг.[1]. Поэтому ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, как ведущий по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы», продолжает плановые научные исследования по мониторингу и изучению паразитических вибрионов, выделенных в приморских регионах страны [2]. Активно изучаются генетические

аспекты специфичности и вирулентности возбудителя. В то же время методическая составляющая бактериологического метода выделения параземолитических вибрионов остаётся в формулировках МУК 4.2.1793-03 [3] более, чем 10-летней давности без учета новейших разработок.

Данными Методическими указаниями предусмотрено использование при выделении возбудителя сред накопления, щелочного агар и элективных сред, из которых ни один препарат не зарегистрирован для данного конкретного назначения. Так, пептонная вода, щелочной агар, среда TCBS содержат стандартные для *V.cholerae* концентрации хлорида натрия. Зарегистрированные в стране специальные селективные среды зарубежных фирм малодоступны и в этом документе не оговорены.

В Методических указаниях по выделению возбудителя из пищевых (рыбных) продуктов [4] для этих целей рекомендуется пептонная вода и щелочной агар с повышенным содержанием натрия хлорида, дифференциально - диагностическая среда ДДА на основе питательного агара с повышенной дозой натрия хлорида (7%) в составе питательной основы, повышенной дозы натрия хлорида с добавлением сахарозы, бромтимолового синего, пенициллина, препарата «Прогресс» и калия теллурида. Эти среды также не имеют регистрационных свидетельств.

В последние годы ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проводит масштабные исследования по определению эпидемиологической значимости судовых балластных вод, как возможных источников холерных и галофильных вибрионов. Однако, выделение возбудителей из данного объекта затруднено в связи с обильным обсеменением проб сапрофитной микрофлорой. Применение для этой цели разработанной в институте и планируемой к регистрации среды СЭДХ-М ограничено отсутствием в её составе требуемой для галофилов концентрации хлористого натрия.

Целью настоящего исследования явилось изучение возможности использования для выделения *V. parahaemolyticus* селективной питательной среды СЭДХ-М с повышенной концентрацией натрия хлорида (30 г/л).

Посев на среду СЭДХ-М и щелочной агар производили по стандартной методике с предварительным накоплением в 1% пептонной воде. В результате проведенных исследований было установлено, что использование селективной среды в значительной степени облегчает выделение параземолитических вибрионов и делает возможным получение положительных находок даже из проб, дающих сплошной пророст контаминантов на щелочном агаре. Выделенные на новой среде более 30-ти штаммов *V. parahaemolyticus* были охарактеризованы традиционными таксономическим тестам, ПЦР-детекцией и использованием MALDI-TOF-спектрометрии. Все выделенные из балластных вод штаммы – авирулентные [5].

Можно констатировать, что использование новой селективной среды СЭДХ-М в варианте с повышенным содержанием натрия хлорида является эффективным направлением совершенствования санитарной охраны территории Российской Федерации, а сам препарат перспективен для пополнения арсенала современных диагностических препаратов контроля патогенных для человека вибрионов.

Литература

1. Монахова Е.В. Парагемолитические вибрионы в России и в Мире: молекулярные механизмы формирования высококовирулентных клонов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. –С.179-186
2. Подойницына О.А. Генотипическая характеристика штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств: Автореф. дис. . . . канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2013.- 22 с.
3. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания МУК 4.2.1793-03.
4. Методические указания по контролю в рыбных продуктах парагемолитических вибрионов – возбудителей пищевых токсикоинфекций: Методические указания МУК 4.2.1848-02.
5. Рыковская О. А., Смоликова Л.М., Чемисова О.С. и др. Биологические свойства парагемолитических вибрионов, выделенных при мониторинге в Причерноморском и Приморском регионах// Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии - Ростов н/Д, 2013. –Вып.26. С.173-176.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ

РАБОТА ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2014 – 2015 ГГ.

С.В. Титова, В.Д. Кругликов, И.А. Щипелева, Е.И. Марковская
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

На базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, в соответствии с планом работы Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (48.00), осуществляет свою работу Проблемная комиссия 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы», являющаяся научно-методическим органом Координационного совета.

5 июня 2014 г. было проведено заседание проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы».

В работе приняли участие 23 члена проблемной комиссии, специалисты ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора; ФКУЗ «Противочумный центр», противочумных станций Роспотребнадзора, ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии», ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Территориальное управление Роспотребнадзора по Ростовской области, ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области.

На заседании Проблемной комиссии были заслушаны научные доклады о мониторинге холеры на территории Российской Федерации, о санитарной охране территории от заноса и распространения холеры, об эпидемиологическом надзоре за холерой на территории РФ и перспективах его совершенствования, об изучении холерных вибрионов не O1 / не O139 серогрупп – возбудителей острых кишечных инфекций в Ростовской области, о INDEL и VNTR типировании штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов окружающей среды на территории РФ; о месте

MALDI-TOF масс спектрометрии в схеме лабораторной диагностики холеры, о новых препаратах на основе моноклональных антител для лабораторной диагностики холеры, о влиянии антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов.

Научные исследования противочумных институтов и других учреждений Роспотребнадзора по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» в 2014 г. были представлены 30 темами, из которых выполнение 7 тем было начато с 2014г. Выполнение 7 тем в 2014 г. завершилось. Основные результаты проведенных исследований в 2014 г. были представлены следующими документами:

- Практическое руководство «Лабораторная диагностика особо опасных инфекционных болезней»/ под ред. академика РАМН Г.Г. Онищенко, академика РАМН В.В. Кутырева. - М.: ЗАО «Шико», 2013. - 560 с.- ISBN 978-5-900758-68-8;

- Руководство к практическим занятиям по лабораторной диагностике холеры. - М.: Горячая линия – Телеком, 2012. – 90 с.: ил.- ISBN 978-5-9912-0276-3;

- Проект МУ «Использование методов полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (рибопринтинг, электрофорез в пульсирующем поле) для идентификации возбудителей I – II групп патогенности» (раздел «PFGE-типирование *Y. pestis* и *V. cholerae*»).

Был создан унифицированный электронный каталог коллекции геномных портретов 10 штаммов *V. cholerae* O1.

Зарегистрированы наборы реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РИФ «ИГ – *V. cholerae* O1 / O139 – РИФ» и «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РА «ИГ – *V. cholerae* O1/O139-РА».

Разработаны иммуноферментные тест-системы на основе видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп и детекции специфических противохолерных антител.

Получен патент: «Способ определения липолитической активности в субклеточных фракциях бактерий».

Подана заявка на изобретение: «Способ дифференциации токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления».

Получено 3 свидетельства на регистрацию баз данных: «Белковые профили масс-спектров представителей вида *V. cholerae* для программы MALDI Biotyper», «Холерный вибрион ctxB-SNP», «Парагемолитические

вибрионы России и сопредельных государств: ПЦР генотипы».

Депонированы в ГКПБ «Микроб» и ФБУН «ГНЦ ПМБ» 19 штаммов *V. cholerae*.

Депонированы в GenBank: полногеномные последовательности трех штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы; нуклеотидные последовательности острова пандемичности VSP-II5; нуклеотидные последовательности генома штамма *V. cholerae* El Tor И-1263 – полученные в результате секвенирования, предназначенные для проведения сравнительного филогенетического анализа; нуклеотидные последовательности штамма *L. acidophilus* VKM В 2020-D – антагониста *V. cholerae*.

Продолжено формирование проблемно-ориентированных баз данных «Холера Эль-Тор. Мир», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия», «Холерные вибрионы. Россия» и «Холера и патогенные для человека вибрионы» для информационного обеспечения научных исследований, оценки состояния, тенденций в динамике заболеваемости холерой и прогноза.

Издан аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы».

В Коллекции бактериофагов патогенных бактерий ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора депонирован штамм фага Phagum parahaemolyticus (19166).

На базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора функционирует центр патогенных вибрионов, коллекция которых включает более 9000 штаммов. Проводится работа в рамках задач референс-центра по мониторингу холеры на территории России.

Ведется мониторинг судовых балластных вод в портах РО (Таганрог, Азов, Ростов). Отработаны методики отбора и составлен алгоритм профилактических (противоэпидемических мероприятий) в случае выявления токсичных штаммов.

Предложена методика INDEL-типирования вибрионов, проведен анализ *in silico*. Составлены и зарегистрированы базы данных потенциальных генетических мишеней молекулярного типирования.

Осуществлялась подготовка кадров по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой на курсах профессиональной переподготовки для врачей, биологов и лаборантов учреждений Роспотребнадзора и ЛПО.

В 2015 г. продолжается работа по выполнению 26 тем. С целью повышения эффективности, практической значимости, оптимизации сроков выполнения НИР и комплексности исследований вся тематика по проблеме «Холера...» была пересмотрена. Среди перспективных направлений дальнейших исследований были отмечены следующие:

– совершенствование эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации: разработка алгоритмов районирования территорий

Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры с выработкой новых критериев дифференциации территорий, учитывающих результаты мониторинговых исследований и рекомендации учреждений Роспотребнадзора;

- создание географической информационной системы «Холера Эль Тор. Распространение по странам мира» (с ретроспекцией по 1915 г.) в рамках мониторинга холеры на глобальном и региональном уровнях;

- проведение углубленных молекулярно-генетических исследований и генетической паспортизации эпидемически значимых штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации с использованием высокоразрешающих методов генетического типирования – анализа вариабельных тандемных повторов (VNTR), внедрение результатов виртуального INDEL – типирования вибрионов на коллекции штаммов выделенных на территории РФ, анализа дифференцирующих геномных регионов (DFR), мультилокусного сиквенс-типирования (MLST), PFGE-типирования;

- полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей генов, аминокислотных последовательностей и их продуктов;

- исследование механизмов экспрессии факторов патогенности и персистенции возбудителя холеры, клонирование их генетических детерминат, создание эффективных продуцентов целевых рекомбинантных продуктов для исследования их биологической активности и использования в разработке нового поколения средств специфической профилактики и иммунодиагностики возбудителя холеры;

- протеомные исследования штаммов возбудителя холеры с использованием технологий двумерного электрофореза, высокоэффективной жидкостной хроматографии и других современных аналитических методов;

- дальнейшее внедрение ускоренных автоматизированных методов идентификации и хемотипирования штаммов холерного вибриона на основе технологий сравнительного анализа масс-спектральных характеристик микробных клеток (MALDI-TOF), разработка нормативно-методической базы, регламентирующей применение данной технологии в диагностических исследованиях ПБА I-II групп патогенности и обеспечивающей необходимый уровень биологической безопасности;

- совершенствование диагностики холеры и других патогенных для человека вибрионов, включая разработку тест систем для детекции факторов патогенности; разработка алгоритма молекулярного типирования *V. cholerae* при проведении оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа и изучении филогенетической истории возбудителя;

- внедрение разработок, полученных в результате мониторинга

судовых балластных вод в морских портах РФ;

- исследование изменчивости и эволюции геномов возбудителя холеры и других патогенных для человека вибрионов на основе данных полногеномного секвенирования, мультилокусного анализа генов эпидемической значимости, устойчивости к антимикробным соединениям, адаптации к факторам внешней среды;

- изучение экологических условий, способствующих сохранению возбудителя в объектах окружающей среды. Выяснение причин и условий обнаружения (контаминации и циркуляции) холерного вибриона в поверхностных водоемах;

- создание на сайте Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института рубрики для онлайн-консультаций с целью оказания практической и консультативно-методической помощи по вопросам, связанным с лабораторной диагностикой холеры, для специалистов Роспотребнадзора и Министерства Здравоохранения.

Решением Проблемной комиссии противочумным учреждениям Роспотребнадзора было рекомендовано:

- руководствоваться в работе положениями и указаниями, изложенными в резолюции Совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой, проведенного 4-5 июня 2014 года в г. Ростове-на-Дону на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора;

- считать приоритетным направление по совершенствованию и отработке схем взаимодействия учреждений Роспотребнадзора Российской Федерации с заинтересованными службами и ведомствами по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения;

- интенсифицировать проведение фундаментальных и прикладных научных исследований в области борьбы с холерой; оптимизировать нормативно-методическую базу за счет внедрения современных высокоинформативных диагностических технологий с учетом научных достижений и международных стандартов;

- продолжить работу по внедрению в работу лабораторий MALDI-TOF масс-спектрометрии, секвенирования 16S рДНК.

- осуществлять взаимодействие со странами СНГ, ШОС и другими международными организациями в указанной области;

- совершенствовать стратегию и тактику по предупреждению и ответным мерам на чрезвычайные ситуации санитарно-эпидемиологического характера;

- оптимизировать системы быстрого реагирования на чрезвычайные ситуации, в том числе с использованием мобильных формирований – специализированных противоэпидемических бригад.

Решением Проблемной комиссии было утверждено планирование

внедрения результатов НИР противочумных институтов в практику в 2015 г.:

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора:

- Подготовить к утверждению на федеральном уровне:
- МР «Отбор и микробиологическое исследование балластных вод морских (речных) судов, выполняющие рейсы в морские порты неблагополучных по холере стран»;
- МР «Расчет стандартных значений экономического ущерба, наносимого одним случаем холеры (больной холерой, вибриононоситель), с учетом комплекса противохолерных мероприятий»;
- МР «Расчет мощности и потребности в кадрах лабораторий при формировании лабораторной базы в очаге холеры»;
- МР «Определение эпидемического потенциала административной территории (на уровне муниципальных образований) при холере».
- Переработать «Инструкцию по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного, туляремийного и холерного микробов» (Документ, утвержденный ГУКИ МЗ СССР. Москва. 1982);
- Зарегистрировать базу данных «Холерные вибрионы не O1 / не O139 серогрупп Ростовской области»;
- Создать аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы» (за 2014 год).

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора:

- Оформить патенты на:
 - «Способ одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления»;
 - «Способ дифференциации токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления»;
 - «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу»;
 - «Способ получения энтеросорбента на основе хитозана для избирательной сорбции холерного энтеротоксина»;
- Создать тест-систему для определения антител к антигенам холерного вибриона и холерного токсину методом ИФА.

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный

институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора:

- Депонировать в GenBank 40 нуклеотидных последовательностей «housekeeping» генов (dnaE, pgm, cat, chi) штаммов холерного вибриона;

- Депонировать в GenBank полной нуклеотидной последовательности генома штамма *V. cholerae* El Tor И-1471;

- Зарегистрировать базу данных «*V. cholerae* Сибирь и Дальний Восток – генотип».

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательским противочумный институт» Роспотребнадзора:

- Депонировать в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ГКПМКК «Оболенск» коллекции штаммов *V. cholerae* O1.

ФГУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора:

- Разработать и зарегистрировать иммунохроматографические тест-системы для выявления O1 и O139 антигена холерных вибрионов в клиническом материале.

В 2015 г. в соответствии с Планом основных организационных мероприятий Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Приказом Руководителя Роспотребнадзора А.Ю. Поповой № 246 от 27.03.2015г. заседание ПК 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» состоится 4 июня в г. Ростов-на-Дону на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. В работе примут участие специалисты противочумных институтов, станций и противочумного центра Роспотребнадзора, а также специалисты ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии», ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора, Научного центра экспертизы средств медицинского применения, Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, ФБУЗ ЦГиЭ в Ростовской области. На заседании будут обсуждены результаты и перспективы дальнейших исследований по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы», направленных на обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой.

**АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР
ЗАВЕРШАЕМЫХ В 2015 ГОДУ НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО
ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ
ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА**

И.А. Щипелева, С.В. Титова, Л.П. Алексеева, В.Д. Кругликов,
Е.И. Марковская, Р.Н. Иванова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В 2015 г. во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора по проблеме «Холера» завершается выполнение 7 НИР.

По направлению 48.04.01 «Экология вибрионов, эпидемиология холеры и эпиднадзор» завершается 2 темы:

– «Мониторинг судовых балластных вод международного морского транспорта в бассейне Азовского моря» (2011-2015). Целью исследования явилось изучение роли балластных вод международного морского транспорта в возможности заноса и распространения холерных и других патогенных для человека вибрионов на территории Ростовской области. В ходе исследования изучены международные транспортные связи Ростовской области. Установлено, что порты Средиземного и Черного морей могут быть «реципиентами» балласта судов, прибывших из стран, неблагополучных по холере, и «донорами» для судов, следующих в Азовское море. Впервые проведена оценка балластных систем теплоходов различных проектов по их эпидемиологической опасности. Описаны и апробированы различные способы отбора проб балластной воды на основании изучения балластных систем теплоходов. Получен патент на изобретение «Способ отбора проб из балластных емкостей судов «река-море» и устройство для его реализации», разработаны Методические рекомендации «Отбор и микробиологическое исследование проб балластных вод морских (речных) судов, выполняющих международные рейсы». Проведен мониторинг мест балластных операций в Азовском море и Таганрогском заливе с оценкой эпидемиологической опасности. Изучение гидрометеорологических особенностей Азовского моря и Таганрогского залива позволило сделать вывод, что правило D-1 Конвенции в бассейне Азовского моря невыполнимо. Приемлемым является способ D-2 (стандарт качества). Впервые на территории Российской Федерации проведены исследования на наличие возбудителей холеры проб балластных вод, отобранных на судах смешанного «река-море» плавания. На основании результатов проведенного микробиологического, в т.ч. генетического анализа, штаммов *Vibrio*

cholerae non O1/ non O139, изолированных в прибрежной зоне Таганрогского залива и выделенных из судовых балластных вод, доказан заносной характер последних, что свидетельствует о выявлении нового объекта эпиднадзора при холере в РФ. Применение масс-спектрометрии повысило эффективность исследований и достоверность полученных результатов; выявило широкий спектр разнообразной вибриофлоры, присутствующей в балластной воде. Обнаружение вибрионов в водяном балласте свидетельствует о том, что суда, заходящие в порты, могут изменять вибриопейзаж акватории портов, что будет способствовать развитию неблагоприятной эпидемиологической ситуации. Впервые разработан План санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий при выделении возбудителей холеры из балластных вод, который будет способствовать совершенствованию эпидемиологического надзора за холерой в РФ, в части, касающейся контроля и управления судовыми балластными водами в международных морских портах России. Впервые оценена возможность выполнения Стандарта качества балластных вод Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками и обеспечено выполнение Постановления Правительства Российской Федерации № 256 от 28.03.2012г. «О присоединении Российской Федерации к Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года». Материалы проведенных исследований использованы при составлении и реализации Решения Комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и ведению социально-гигиенического мониторинга Администрации города Таганрога в 2011-2013 гг. На основании проведенных исследований специалистами Управления Роспотребнадзора по Ростовской области внесены дополнения в «План организационных мероприятий по санитарной охране Ростовской области от завоза и распространения холеры на 2012 г.».

– «Создание ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации 1989-2014 гг.» (2011-2015). Задачей исследования явилось создание базы данных и пополнение ее новыми свойствами штаммов холерных вибрионов. В ходе исследования было проанализировано распространение с 1989 по 2014гг. на территории РФ в объектах окружающей среды холерных вибрионов O1, O139 серогрупп и PO-варианта. Изучены фено- и генотипы штаммов холерных вибрионов, с 2011 года штаммы *V. cholerae* O1, O139 и PO-варианта были исследованы с помощью ПЦР с использованием специфических праймеров для детекции 43 нуклеотидных последовательностей генов, связанных с патогенностью. Дальнейшее пополнение ГИС данными о биологических свойствах выделенных штаммов из водных экосистем на территории РФ позволит проводить своевременное прогнозирование эпидемической обстановки и определять

направленность и объем профилактических мероприятий на каждой конкретной административной территории в зависимости от оценки эпидемической опасности культур. Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных Геоинформационная система «Холера 1989 - 2014».

По направлению 48.04.02 «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов» завершаются 4 темы:

– «Изучение изменчивости свойств патогенных для человека вибрионов при трансдукции» (2011-2015). Целью исследования явилось проведение трансдукции антибиотикорезистентности, лизогении фагочувствительным штаммом *V. cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii* и изучение изменчивости свойств штаммов-реципиентов. В ходе выполнения НИР впервые осуществлена общая трансдукция у патогенных для человека вибрионов: *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii* маркеров стрептомицин-ампициллин-полимиксин резистентности и лизогении. Охарактеризованы свойства трансдуктантов антибиотикозависимого мутанта реципиента *V. cholerae* O1 (ctx⁻tcp⁺) после приобретения профага. Структура ДНК трансдуктантов фагов в ПЦР отличалась индивидуальной картиной амплификации. Впервые охарактеризованы по биологическим свойствам бактериофаги *V. parahaemolyticus* «пандемического» клона серотипа O3:K6. Антибиотикорезистентные лизогенные трансдуктанты различных представителей патогенных вибрионов используются в качестве штаммов-доноров в прикладных научных исследованиях. Получены и депонированы вирулентные бактериофаги, пригодные для идентификации фагоустойчивых трансдуктантов параземолитических вибрионов. Составлен 4 выпуск «Каталога бактериофагов и тест-штаммов патогенных вибрионов». Получено свидетельство о регистрации базы данных «Коллекция бактериофагов и тест-штаммов патогенных для человека вибрионов». Получен патент на изобретение «Способ обнаружения микроорганизма вида *Vibrio parahaemolyticus*». Данный метод внедрён в лабораторную практику ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора. Результаты фаговых методов идентификации музейных и свежeweыделенных штаммов холерных и параземолитических вибрионов используются для паспортизации штаммов этих видов вибрионов, хранящихся в Музее живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. В коллекции бактериофагов III-IV групп патогенности ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора депонированы 4 бактериофага.

– «Формирование коллекции патогенных для человека вибрионов» (2011-2015). Для проведения фундаментальных и прикладных

научных исследований сформирована коллекция галофильных вибрионов, выделенных на территории России и стран ближнего и дальнего зарубежья в период с 1973 по 2013 гг. Штаммы *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* охарактеризованы по широкому набору фено- и генотипических признаков. На большой коллекции штаммов галофильных вибрионов оценена специфичность праймеров, используемых для дифференциальной диагностики видов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*. При этом установлено, что из рекомендуемых в качестве видоспецифичных праймеров для детекции генов *tlh*, *gyrB*, *toxR*, *Vpfla*, *vppC* и *varC*, только *vppC* и *varC* оказались строго специфичны по отношению к соответствующим видам вибрионов. Впервые проведена межвидовая и внутривидовая дифференциация коллекции штаммов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. Определены масс-пики специфичные для вида и O3:K6 серовара *V. parahaemolyticus*. Разработан комплексный метод оценки вирулентности парагемолитических вибрионов, включающий определение гемолитической активности в тесте Канагава, уреазной на среде Кристенсена и ПЦР-детекцию генов *tdh* и *trh*. Определена формула вирулентных парагемолитических вибрионов. Проведен анализ антибиотикорезистентности на основе антибиотикограмм коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды. Оценена возможность использования модели культуры тканей в выявлении экспрессии гена термостабильного прямого гемолизина. Охарактеризована коллекция уреазопозитивных штаммов *V. parahaemolyticus*, представленная tdh^-trh^+ и tdh^+trh^+ группами вибрионов. Показано, что TRH *in vitro* продуцируют отдельные представители только первой группы. Усовершенствована схема лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами и комплексной оценки вирулентности парагемолитических вибрионов. Коллекционная деятельность обеспечена базами данных: «Парагемолитические вибрионы России и сопредельных государств: ПЦР-генотипы» и «Фено- и генотипическая характеристика штаммов алгинолитических вибрионов»; каталогом патогенных для человека вибрионов; инструкцией по лиофильному высушиванию микроорганизмов. Разработан и направлен для утверждения проект методических указаний «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами». Депонированы авторские штаммы *V. parahaemolyticus* КМ 228 (293), КМ 215 (P-16199).

– «Природная и экспериментальная устойчивость к антибактериальным препаратам патогенных для человека холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, этиотропная терапия инфекции»

(2011-2015). Цель исследования – анализ профилей антибиотикорезистентности у выделенных от людей штаммов *V. cholerae* non O1/non O139; оценка возможности расширения спектра и степени устойчивости штаммов к антибактериальным препаратам без утраты вирулентности; выбор средств этиотропной терапии инфекции. В результате проведенных исследований впервые: 1) проведен анализ встречаемости маркеров антибиотикорезистентности и их сочетаний на основе антибиотикограмм 226 штаммов холерного вибриона не O1 / не O139 серогрупп, выделенных от людей в период с 1968 по 2014гг.; 2) доказан индуцибельный характер устойчивости к тетрациклинам, левомицетину, ампициллину, что является одной из причин вариабельности спектра и степени резистентности у *V. cholerae* non O1/non O139; 3) представлены данные о характере антибиотикорезистентности, о высокой частоте появления Rif^r и Nal^r мутантов у этих штаммов; 4) доказана возможность экспрессии R-плазмид различных групп несовместимости в антибиотикочувствительном штамме 16150 и его Rif^r, Nal^r мутантах. Установлена целесообразность использования Критериев оценки чувствительности / устойчивости, предложенных для штаммов *V. cholerae* O1 и O139 (МУК 4.2.2495-09), применительно к холерным вибрионам не O1 / не O139 серогрупп. Определены наиболее эффективные антибактериальные препараты для лечения инфекций, вызванных холерными вибрионами не O1/не O139 с учетом внутрикишечной локализации возбудителя и при системных формах инфекционного процесса. Создана база данных «Антибиотикорезистентность клинических штаммов холерных вибрионов», предназначенная для хранения и анализа собранного материала, позволяющая оперативно получать для практической работы нужную информацию по антибиотикочувствительности *V. cholerae*.

– «Влияние стрессорных воздействий на свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов в организме человека и в объектах окружающей среды» (2012-2015). Целью исследования послужила оценка экспрессии свойств, обуславливающих персистентный потенциал и патогенность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных от больных, вибрионосителей и объектов окружающей среды, в условиях стресса. Впервые изучено влияние монострессоров и их комбинированного действия на уровень токсинопродукции, продукции экзополисахарида, агглютинабельность, фаголизабельность и ряд свойств, характеризующих персистентный потенциал возбудителя холеры. При изучении факторов, оказывающих стрессорное действие на холерные вибрионы в объектах окружающей среды (низкая температура, снижение парциального давления кислорода) установлено, что атоксигенные и, особенно, потенциально эпидемически значимые штаммы холерных вибрионов обладают бóльшим

персистентным потенциалом по сравнению с токсигенными. В условиях, имитирующих макроорганизм, активно реагируют на стресс токсигенные и потенциально эпидемически значимые холерные вибрионы. Стрессорное воздействие в виде низкой температуры, гипоксии, низкого и высокого рН, желчи оказывают выраженное влияние на фенотип холерных вибрионов, заключающийся, прежде всего, в модификации уровня токсинопродукции, биопленкообразования, изменения поверхностных структур, приводящих к снижению и утрате агглютинабельности и фаголизательности. Подобраны методические приемы для изучения влияния стрессорных факторов. Разработан новый способ оценки адгезивных свойств холерных вибрионов на клеточной культуре Nu Tu-80. Разработан новый способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций холерных вибрионов. На данные способы оформлены патенты. В Государственной коллекции патогенных бактерий депонирован штамм, который может быть использован в качестве тест-штамма, обладающего высокими показателями при определении антикомплементарной и антилактоферриновой активностей.

По направлению 48.04.04 «Разработка современных медико-иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами» завершается 1 тема, выполненная совместно Ростовским-на-Дону и Волгоградским противочумными институтами:

– «Совершенствование серологической диагностики холеры» (2011-2015). Целью исследования было конструирование антигенных полимерных O1 и O139 холерных диагностикумов сухих и эритроцитарных препаратов. В ходе выполнения НИР были сконструированы отсутствующие в настоящее время в практике антигенные диагностические препараты на полимерных носителях с использованием как тотальных клеточных лизатов холерного вибриона, так и серовароспецифического липополисахарида для выявления противохолерных антител в сыворотках больных и подозрительных на заболевание холерой людей. Сконструированные препараты пополнят арсенал средств серологической диагностики холеры новым препаратом, отличающимся высокой чувствительностью и специфичностью, простотой и скоростью постановки реакции и учета результатов в процессе серодиагностики холеры у людей. Оформлены и утверждены нормативные документы, включая технические условия и проект инструкций по применению. Подготовлен пакет документов для регистрации антигенных полимерных O1 и O139 холерных препаратов.

По результатам завершаемых в институте в 2015 г. в научных разработках по проблеме «Холера» созданы ГИС, каталоги штаммов и бактериофагов, осуществлено депонирование штаммов патогенных бактерий и бактериофагов, зарегистрировано 5 патентов, 4 базы данных,

разработан и направлен для утверждения проект методических указаний, разработано 5 методических рекомендаций, подготовлены документы для регистрации диагностических препаратов, опубликовано 126 научных работ, из них 33 в журналах, рекомендованных ВАК.

**ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОЙ
ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ КООРДИНАЦИОННОГО
НАУЧНОГО СОВЕТА ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ
КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА
ВИБРИОНЫ» В 2015 ГОДУ**

Е.И. Марковская, И.А. Щипелева, С.В. Титова, В.Д. Кругликов,
Л.П. Алексеева

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Научно-исследовательская деятельность по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» осуществляется сотрудниками всех противочумных институтов Роспотребнадзора, с реализацией научных разработок в рамках запланированной научной тематики.

Основными задачами практического выхода являются:

1. Создание и совершенствование нормативных документов, регламентирующих эпидемиологический надзор и лабораторную диагностику холеры на основании научных исследований, новых разработанных методик диагностических препаратов, результатов мониторинга.

2. Создание, формирование и пополнение проблемно-ориентированных баз данных для использования в практике эпидемиологического надзора и научных исследований.

3. Разработка новых тест-систем, методических подходов, диагностических препаратов и питательных сред.

4. Развитие методов генетического оперативного и ретроспективного диагностического процесса, молекулярного типирования для целей биоинформационного анализа, депонирование нуклеотидных последовательностей в международной базе данных, конструирование комплексных гено- и иммунодиагностических тест-систем; депонирование штаммов и коллекций штаммов, имеющих в составе геномов оригинальные генетические детерминанты для целей типирования.

В ходе выполнения научной тематики в 2015 году получены следующие результаты.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Получили государственную регистрацию в Росздравнадзоре наборы реагентов:

- «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцентные сухие для серологической идентификации *V.cholerae* O1 и O139 методом РИФ».

- «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцентные сухие для серологической идентификации *V.cholerae* O1 и O139 методом РА.

Документы находятся на рассмотрении в Федеральной службе Роспотребнадзора:

- Методические указания «Отбор и микробиологическое исследование балластных вод морских (речных) судов, выполняющих рейсы в морские порты неблагополучных по холере стран»;

- Методические рекомендации «Расчёт стандартных значений экономического ущерба, наносимого одним случаем холеры (больной холерой, вибриононоситель), с учётом комплекса противохолерных мероприятий»;

Состоялся очередной выпуск аннотированного библиографического указателя «Холера и патогенные для человека вибрионы» за 2014 год».

Созданы и зарегистрированы в Роспатенте базы данных «Холерные вибрионы не O1/ не O139 серогрупп, вызывающие заболевания людей на территории Ростовской области»;

Одобрены Учёным советом, утверждены директором и направлены в учреждения Минздрава и Роспотребнадзора Методические рекомендации «Этиотропная терапия холеры и других инфекций, вызванных холерными вибрионами».

Подготовлены для обсуждения на заседании Учёного совета:

- Методические рекомендации «ПЦР-идентификация патогенных для человека галофильных вибрионов»;

- Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного, туляремийного и холерного микробов.

Осуществлено депонирование в Gen Bank: полногеномного сиквенса ДНК штамма *Vibrio cholerae* 81; нуклеотидных последовательностей генов *cef* *Vibrio cholerae* разных серогрупп и аминокислотных последовательностей их продуктов.

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Оформлены две заявки на изобретения:

- Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциация по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции;
- Способ получения энтеросорбента для направленной сорбции холерного токсина.

На стадии экспертизы патент на способ дифференциации токсигенных и генетически изменённых штаммов *V.cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом методом мультиплексной ПЦР и тест-система для его осуществления.

Одобрены Учёным советом и утверждены директором Методические рекомендации «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциация по эпидемическому потенциалу».

- Методические рекомендации «Определение функциональной активности специфического противохолерного энтеросорбента» подготовлены для обсуждения на заседании Учёного совета.

- Депонированы полногеномные нуклеотидные последовательности шести штаммов возбудителя холеры в Gen Bank.

- Депонированы нуклеотидные последовательности острова пандемичности VSP-II пяти типичных и генетически изменённых штаммов холерного вибриона в Gen Bank.

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

- База данных «Географическая информационная система «*Vibrio cholerae* O1 и O139. Иркутск»;

- База данных «*V.cholerae* Сибирь и Дальний Восток – амплификационный профиль_MLVA-генотип».

- Учебно-методическое пособие по лабораторной диагностике холеры. Издание второе: переработанное и дополненное.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом института и утверждены директором:

- Способ детекции липолитической активности в субклеточных фракциях холерного вибриона;

- Алгоритм создания геоинформационной системы обнаружения возбудителей опасных инфекционных болезней (на примере г. Иркутск);

- Алгоритм анализа результатов мультилокусного сиквенс-типирования *Vibrio cholerae*.

В Gen Bank депонированы: 40 нуклеотидных последовательностей «housekeeping» генов (*dnaE*, *pqm*, *cat*, *chi*) штаммов холерного вибриона; а

также нуклеотидная последовательность генома штамма *V.cholerae* El Tor И-1471.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

- Подготовлен к депонированию в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов: набор штаммов *Vibrio cholerae* O1 *El Tor* с различными генотипами интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R 391.

ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт.

- Подготовлен для обсуждения на заседании Учёного совета проект Нормативной документации (Инструкция по применению, ТУ, пусковой регламент) на ПЦР-тест систему «Гены *Vibrio cholerae* ctxB – rstR – rstC РЭФ».

Проблемы, связанные с возможными эпидосложнениями по холере остаются актуальными. Государственное задание по запланированной тематике строго выполняется. Создаются новые диагностические препараты, питательные среды для культивирования холерного вибриона. Активно ведётся эпидемиологический мониторинг, проводятся мероприятия по санитарной охране территории Российской Федерации, разрабатываются нормативно-правовые документы.

Вся работа проводится в тесном взаимодействии с органами и учреждениями Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения.

**ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НАУЧНЫХ
ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ
ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»**

Э.А. Москвитина, Т.В. Ковалева, Г.Б. Анисимова, И.А. Андрусенко,
Ю.И. Арутюнов, Л.Г. Худобец-Шереминская

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Наука и здравоохранение, относящиеся к числу ресурсобразующих информационных отраслей, призваны стать не только областью, но и, в силу присущих им свойств, – катализатором процессов информатизации общества. Важной тенденцией в развитии информационной индустрии в России является процесс создания банков и баз данных со специализацией по отдельным областям научных знаний и комплексным проблемам. Базы данных, содержащие научную информацию, стали одним из инструментов теоретических и экспериментальных исследований. Необходимо отметить, что обращение к услугам специализированных реферативных и фактографических баз данных занимает все больший удельный вес при спросе на информацию, они играют важную роль в получении качественно новых научных знаний.

Мировая медицинская литература сегодня доступна из зарубежных информационных библиотек Medline, PubMed (США), Excerpta Medica (Нидерланды) и других, а также из отечественных баз данных «Биология» (ВИНИТИ РАН), «Российская медицина» при Государственной Центральной научно-медицинской библиотеке в 1988 г., Российского отделения Кокрановского сотрудничества. При этом следует констатировать, что имеется большое число других источников информации, получаемых из баз данных через поисковые системы: HighWire Press - подразделение Библиотеки Стэнфордского Университета; PubMed Central (PMC) - созданный и поддерживаемый NCBI цифровой архив биомедицинских публикаций; The Cochrane Library - основной продукт деятельности Кокрановского сотрудничества; Российская Государственная Библиотека. Специализированные и проблемно ориентированные базы данных имеют значение, прежде всего, как источники информации по определенным направлениям исследований.

В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора функционирует информационно-библиографическая база данных «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» («ХОЛЕРА. ИНФОРМ»). Назначение базы данных (БД) - накопление, хранение, поиск и выдача информации с целью обеспечения научных исследований по рассматриваемой проблеме. База данных в настоящее время имеет глубину ретроспективы 28 лет - 1987-2014 гг. Общее число рефератов в базе данных - 12591, в том числе по холере и холерным вибрионам O1 и O139 - 10956 по холерным вибрионам не O1/не O139 – 535 и патогенным вибрионам других видов – 1100.

Основная цель создания базы данных - формирование указателя, содержащего обзор публикаций за год в автоматизированном режиме, а также предоставление научным сотрудникам возможности познакомиться в режиме on-line с публикациями по интересующей их тематике. Для этого проводится регулярный обзор источников литературы и занесение информации на хранение в автоматизированную информационную

систему (АИС). Реализация АИС с 2012 г. выполнена на платформе СУБД Access 2007.

Все источники, заносимые в БД, проходят предварительную подготовку, которая заключается в следующем. По каждому источнику определяются рубрика основная, дополнительные (а, v n) и направление исследований: Общие вопросы; Эпидемиология; Борьба и профилактика; Микробиология; Биохимия; Молекулярная биология и генетика; Холерный токсин и другие токсины *V. cholerae*; Лабораторная диагностика; Патогенез; Клиника и лечение; Иммунология. Вакцины; Биологическая безопасность и биотерроризм; формируется реферат на русском языке, включая публикации на английском; подбираются ключевые слова из словаря ключевых слов, при необходимости словарь пополняется. Рефераты заносятся на хранение в БД и могут быть просмотрены списком (рис.1)

КЕУ	год	Номер	Рубр	Rub	Доп	Автор
v	14	054	04			Zhang Y., Zhao Y., Ding K., Wang X., Chwen X., Liu Y., Chen Y.
a	14	011	04		.06.	Zhou H., Zhao X., Wu R., Cui Z., Diao B., Li J., Wang D., Kan B., Liang W.
a	14	096	04		.06.	Zielke R.A., Simmons R.S., Park B.R., Nonogaki M., Emerson S., Sikora A.E.
a	14	070	08			Абдрашитова А.С., Осина Н.А., Бугоркова Т.В., Куклев В.Е., Шульгина И.В., Лоф
<p>Population structural analysis of O1 El Tor <i>Vibrio cholerae</i> isolated in China among the seventh cholera pandemic on the basis multilocus sequence typing and virulence gene profiles // Infect. Genet. Evol. 2014; Jan 18. ПОПУЛЯЦИОННЫЙ СТРУКТУРНЫЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ <i>Vibrio cholerae</i> O1 ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ В КИТАЕ ВО ВРЕМЯ СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ ХОЛЕРЫ НА БАЗЕ МУЛЬТИЛОКУСНОГО ТИПИРОВАНИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ ВИРУЛЕНТНОСТИ</p> <p>Штаммы <i>V. cholerae</i> серогруппы O1 чаще всего являются причиной эпидемической и пандемической холеры. В исследовании провели мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) 160 штаммов серогруппы O1 (в том числе 42 токсигенных и 118 нетоксигенных штаммов), а затем у 60 из протестированных штаммов определяли профили генов вирулентности/приспособляемости в 16 локусах. Было выявлено 84 типа последовательности (ST), относящихся к 14</p>						

Рисунок 1. Фрагмент базы данных «ХОЛЕРА. ИНФОРМ».

или выбраны: по запросам: по виду инфекции, по рубрике (основной и дополнительным), по году издания, автору, ключевым словам (рис.2).

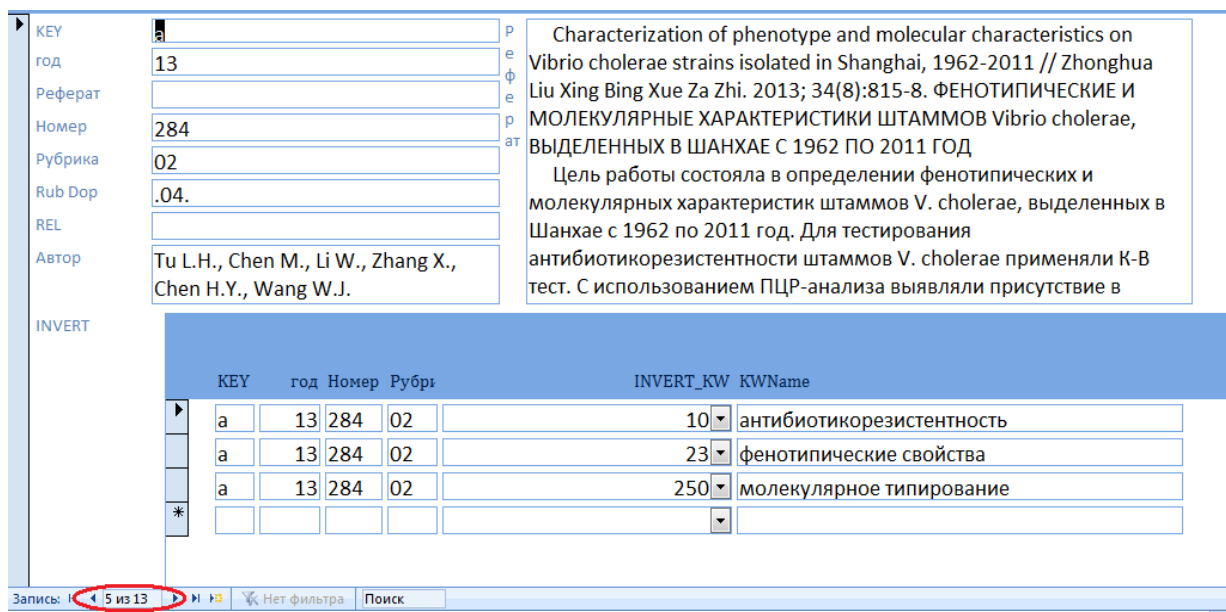


Рисунок 2 Запрос по ключевым словам. Фрагмент из базы данных «ХОЛЕРА. ИНФОРМ».

Следует отметить, что при создании БД использовались основные принципы, отвечающие их идентификационным показателям. К ним относятся полнота, достоверность, идентичность и актуальность данных. Полнота - это показатель, отражающий отношение объема базы данных к общему числу существующих документов по данной тематике за соответствующий период. В базу данных «ХОЛЕРА. ИНФОРМ» введена вся доступная, то есть поступающая в Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт информация, в том числе полученная из базы данных «Medline», «PubMed» и из on-line журналов. Информация БД постоянно пополняется также за счет ретроспективных источников, в ней заложена достоверная и идентичная информация, то есть соответствующая первоисточнику.

На основе использования сведений, заложенных в информационно-библиографическую базу данных «ХОЛЕРА ИНФОРМ», осуществляется: ретроспективный поиск, получение и выдача информации по запросам в пакетном режиме или режиме теледоступа; выдача распечатки результатов поиска информации в базе данных; оперативное обеспечение поиска в базе данных по индивидуальным запросам научных сотрудников; ежегодное формирование аннотированного библиографических указателя «Холера и патогенные для человека вибрионы».

Аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы» (далее - Указатель) формируется в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте с 1989 г. Указатель является ежегодной формой внедрения плановой научно-исследовательской работы «Информационное обеспечение научных исследований по проблеме «Холера и патогенные для человека

вибрионы».

Архитектура Указателя определяется по рубрикам: **а** – холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп; **п** – вибрионы не O1/не O139 серогрупп; **в** – другие патогенные вибрионы. Каждая из рубрик формируется по 12 вышеуказанным направлениям исследований.

Сведения, представленные в данной работе, отражают в качестве примера объем информационных данных за 2013 и 2014 гг. Сводные данные об объеме Указателей приведены в табл.

Таблица. Данные о количестве рефератов в аннотированных библиографических указателях «Холера и патогенные для человека вибрионы» за 2013 и 2014 гг.

Рубрика	2013 г.			2014 г.		
	Число рефератов из					
	отечественных источников	зарубежных источников	Всего	отечественных источников	зарубежных источников	Всего
а	127	174	301	170	172	343
п	17	14	31	13	6	19
в	18	57	75	22	36	58
Итого	162	245	407	205	214	420

Указатели включают рефераты монографий, материалов Международных, Российских научных конференций, съездов и конгрессов, руководств, методических документов, авторефератов диссертационных работ, статей периодических изданий, материалов совещаний специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой.

В 2013 г. библиографический указатель был составлен на основе 14 периодических журналов в основном из перечня ВАК, из 19 других отечественных источников литературы, а также из 57 зарубежных изданий, содержащих сведения по рассматриваемой проблеме, в 2014 г., соответственно, из 14 и 28 отечественных и из 98 зарубежных источников.

Сведения, заложенные в базу данных, используются как информационно-аналитические при написании обзорных статей, отчетов по завершённым научно-исследовательским работам, диссертаций, монографий и других материалов.

РЕФЕРАТЫ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ОТЧЕТОВ ПО НИР

СОЗДАНИЕ ГИС «РАСПРОСТРАНЕНИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ 1989-2014 ГГ.»

В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова,
И.В. Архангельская, О.А. Подойницина, Н.Б. Непомнящая, О.С. Чемисова,
С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина,
Л.Д. Македонова, Н.Е. Гаевская, С.В. Часовских, И.Т. Аверьянова,
Н.В. Дроботковская, М.О. Коломыйченко

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Цель и задачи исследования: разработка ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации 1989-2014 гг.».

Новизна исследований: совершенствование ретроспективного и оперативного анализа результатов мониторинговых исследований по РФ.

Полученные результаты: создана и зарегистрирована база данных «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации 1989-2014 гг.», которая включает в себя 962 штамма, выделенных на территории Российской Федерации. Изучены фено- и генотипы штаммов холерных вибрионов, с 2011 года проведено расширенное ПЦР - типирование штаммов *V. cholerae* O1, O139 и PO - вариант.

Практическая значимость: проведение своевременного прогнозирования эпидемической обстановки.

Форма внедрения: получено Свидетельство о государственной регистрации № 2014621055 базы данных «Геоинформационная система «Холера 1989 - 2014». Зарегистрировано в Реестре баз данных 28 июля 2014 г., опубликовано 10 научных работ.

Возможная область применения: эпидемиологический надзор за холерой.

МОНИТОРИНГ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД МЕЖДУНАРОДНОГО МОРСКОГО ТРАНСПОРТА В БАССЕЙНЕ АЗОВСКОГО МОРЯ

С.Ю. Водяницкая, О.В. Лях, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская,
О.С. Чемисова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Цель и задачи исследования: изучение возможности заноса патогенных для человека вибрионов балластными водами судов, прибывающих в порты Ростовской области из-за рубежа.

Новизна исследований: Впервые оценена возможность выполнения Стандарта качества балластных вод Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками и обеспечено выполнение Постановления Правительства РФ № 256 от 28.03.2012 г. Впервые в балластных водах обнаружены редкие виды непатогенных вибрионов *V. brasiliensis*, *V. rotiferianus*, *V. ponticus*, отсутствующие в Руководстве по систематике бактерий Берджи, 2005 г.

Полученные результаты: Изучены транспортные связи Ростовской области с зарубежными странами. Установлено, что порты Средиземного и Черного морей могут быть «реципиентами» балласта судов, прибывших из стран, неблагополучных по холере и «донорами» для судов, следующих в Азовское море. На основании результатов микробиологического, генетического и протеомного анализа штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных из балластных вод, доказан их заносной характер, что свидетельствует о выявлении нового объекта эпиднадзора в РФ. Разработан План противоэпидемических (профилактических) мероприятий на случай выделения возбудителей холеры из балластных вод.

Практическая значимость: Результаты проведенных исследований способствовали своевременному принятию управленческих решений при осуществлении эпиднадзора за холерой в Ростовской области.

Форма внедрения: Патент № 2537010 «Способ отбора проб из балластных емкостей судов «река-море» и устройство для его реализации» от 27.06.2013г.; Методические рекомендации «Отбор и микробиологическое исследование проб балластных вод морских (речных) судов, выполняющих международные рейсы». Опубликовано 43 научные работы.

Возможная область применения: Проведенный микробиологический мониторинг будет способствовать совершенствованию эпиднадзора за холерой в международных морских портах РФ.

ВЛИЯНИЕ СТРЕССОРНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ НА СВОЙСТВА, ОБУСЛОВЛИВАЮЩИЕ ПЕРСИСТЕНЦИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОРГАНИЗМЕ ЧЕЛОВЕКА И В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

И.Я. Черепахина, Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, Л.П. Алексеева,
О.Ф. Кретенчук, В.В. Евдокимова, В.А. Коршенко, О.П. Фецайлова,
О.И. Помухина, В.В. Балахнова, Е.В. Кушнарера

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Цель и задачи исследования: Оценка экспрессии свойств, обуславливающих персистентный потенциал и патогенность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в условиях стресса.

Новизна исследований: Впервые изучено влияние стрессоров на уровень токсинопродукции, экзополисахарида, агглютинабельность и ряд свойств, характеризующих персистентный потенциал возбудителя холеры в организме человека и в объектах окружающей среды. Получены новые данные о влиянии стресса на основные патогенетические свойства и свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов в различных экологических нишах.

Полученные результаты: Показано влияние низкой температуры, гипоксии, кислого и щелочного рН, желчи на токсинопродукцию, формирование биопленок, агглютинабельность, персистентные свойства. Практическая значимость: Подобраны методические подходы к изучению влияния стресса на основные свойства холерных вибрионов.

Форма внедрения: Методические рекомендации, депонированный штамм, два патента. Опубликовано 7 научных работ.

Возможная область применения: Полученные результаты, патенты, депонированный штамм могут быть использованы специалистами-микробиологами, изучающими вопросы микробного стресса у бактерий и особенности персистирования возбудителей инфекционных заболеваний в организме млекопитающих и в объектах окружающей среды.

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ

О.С. Чемисова, Л.М. Смоликова, О.А. Рыковская, Е.В. Монахова,
Е.М. Санамянц, О.А. Подойницына, Н.Б. Непомнящая, Р.Р. Даликова,
М.М. Сагакянц

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Цель и задачи исследования: Расширенная характеристика фено- и генотипических свойств коллекционных штаммов патогенных для человека вибрионов. Совершенствование методов их идентификации и дифференциации.

Новизна исследований: Сравнительная оценка эффективности методов дифференциации патогенных вибрионов показала, что биохимические тесты не являются достаточно точным методом для дифференциации видов, для подтверждения видовой принадлежности необходимо использовать дополнительные методы идентификации – ПЦР-анализ с видоспецифичными праймерами и метод MALDI-TOF масс-спектрометрии. Сравнительный анализ чувствительности/устойчивости к антибактериальным препаратам пандемичных и предпандемичных парагемолитических вибрионов свидетельствует о нарастании числа «пандемичных» штаммов парагемолитических вибрионов с множественной устойчивости к антибактериальным препаратам и о расширении у них спектра антибиотикоустойчивости.

Полученные результаты: Оценена специфичность праймеров *vrrC* и *varC*, используемых для дифференциальной диагностики видов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*. Впервые проведена внутривидовая дифференциация штаммов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus* с использованием метода MALDI-TOF масс-спектрометрии. Определена формула вирулентных парагемолитических вибрионов. Проведен анализ антибиотикорезистентности *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды с 1973 по 2013 год. Охарактеризована коллекция уреазопозитивных штаммов *V. parahaemolyticus*, представленная tdh^-trh^+ и tdh^+trh^+ группами вибрионов.

Практическая значимость: Сформирована коллекция галофильных вибрионов, выделенных на территории России и стран ближнего и дальнего зарубежья в период с 1973 по 2013 год для проведения фундаментальных и прикладных научных исследований. Усовершенствована схема лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека

вибрионами и комплексной оценки вирулентности парагемолитических вибрионов.

Форма внедрения: Каталог и базы данных патогенных для человека вибрионов. Проект методических указаний «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами». Методические рекомендации по комплексной оценке вирулентности парагемолитических вибрионов. Депонированы штаммы *V. parahaemolyticus* КМ 228 (293), КМ 215 (Р-16199). Инструкция по лиофильному высушиванию ПБА. Опубликовано 22 научные работы.

Возможная область применения: для использования в микробиологических лабораториях и научно-исследовательской работе.

ИЗУЧЕНИЕ ИЗМЕНЧИВОСТИ СВОЙСТВ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ ПРИ ТРАНСДУКЦИИ

Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Н.Е. Гаевская, Г.В. Качкина,
Л.В. Романова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Цель и задачи исследования: проведение трансдукции антибиотикорезистентности, лизогении фагочувствительным штаммом *Vibrio cholerae* O1, *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii* и изучение изменчивости свойств штаммов-реципиентов.

Новизна исследований: впервые осуществлена общая трансдукция у *V. parahaemolyticus*, *V. metschnikovii*, мутанта *V. cholerae* O1 маркеров стрептомицин-ампициллин-полимиксин резистентности и лизогении.

Полученные результаты: Получено 184 трансдуктанта холерных и 291 трансдуктант парагемолитических вибрионов, 162 трансдуктанта вибрионов Мечникова. Установлено сохранение признаков резистентности к антибиотикам у трансдуктантов в течение 1, 3 и 12 месяцев при наличии иммунитета к фагу и продукции частиц. В ПЦР получены амплификаты с индивидуальной картиной распределения у трансдуцирующих фагов.

Практическая значимость: трансдуктанты патогенных вибрионов используются в качестве штаммов-доноров в прикладных научных исследованиях. Вирулентные бактериофаги пригодны для идентификации фагоустойчивых трансдуктантов парагемолитических вибрионов.

Форма внедрения: получен патент № 2531236, зарегистрирована база

данных (№ 2010620549), защищена канд. диссертация, опубликовано 25 научных работ.

Возможная область применения: для использования в микробиологических лабораториях и научно-исследовательской работе.

ПРИРОДНАЯ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/НЕ O139 СЕРОГРУПП, ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ

Л.М. Веркина, Н.А. Селянская

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Цель и задачи: анализ профилей антибиотикорезистентности у выделенных от людей штаммов *Vibrio cholerae* non O1/ non O139; оценка возможности расширения спектра и степени устойчивости штаммов к антибактериальным препаратам (АБ) без утраты вирулентности; выбор средств этиотропной терапии инфекции.

Новизна исследований: впервые проведен анализ встречаемости маркеров антибиотикорезистентности и их сочетаний у *V. cholerae* non O1/ non O139, выделенных от людей в 1968-2014 гг.; доказан индуцибельный трансмиссивный характер устойчивости к ряду АБ; доказана возможность экспрессии R-плазмид различных групп несовместимости (inc C, J, S) в клетках *V. cholerae* non O1/ non O139.

Полученные результаты: полирезистентность изученных штаммов возросла с 14-19% в 1968 гг. до 60% в 2005-2014 гг. Мутанты, устойчивые к рифампицину и хинолонам, R⁺-транс-конъюганты *V. cholerae* non O1/ non O139 16150, сохраняют энтеропатогенные свойства. Показана неэффективность применения β-лактамов и фторхинолонов при инфекции у белых мышей, вызванной антибиотикорезистентными штаммами *V. cholerae* non O1/ non O139, при сохранении к ним чувствительности *in vitro*.

Практическая значимость: определены наиболее эффективные антибактериальные препараты для лечения инфекций, вызванных холерными вибрионами не O1 / не O139.

Форма внедрения: методические рекомендации; база данных. В учреждения Минздрава России и Роспотребнадзора отправлены письма с

предложениями рассмотреть полученные данные для включения в документы и схемы лечения людей; подготовлены письма для врачей инфекционных отделений больниц. Опубликовано 16 научных работ.

Возможная область применения: МР «Этиотропная терапия холеры и других инфекций, вызванных холерными вибрионами» могут быть полезны работникам противочумных учреждений, педиатрам и инфекционистам при выборе эффективных схем антибактериальной терапии больных инфекциями, вызванными холерными вибрионами не O1/не O139 серогрупп; база данных «Антибиотикорезистентность клинических штаммов холерных вибрионов» может быть использована для выбора стратегии и тактики профилактических мероприятий при проведении эпиднадзора за холерой; информация, заложенная в базу, будет полезна в научно-исследовательской работе при выборе штаммов холерных вибрионов для изучения генов антибиотикорезистентности.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Л.В. Ларионова¹, Д.И. Симакова¹, Е.Ю. Люкшина¹, А.Н. Наркевич¹,
А.П. Кочеткова¹, И.В. Навицкая², В.Г. Пушкарь², М.Я. Кулаков²

¹ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

²ФКУЗ Волгоградский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Волгоград

Цель и задачи исследования: Конструирование антигенных полимерных O1 и O139 холерных диагностикумов и эритроцитарных препаратов для совершенствования комплексной серодиагностики холеры. Подбор штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп для получения клеточных лизатов и ЛПС, получение кроличьих противохолерных поликлональных сывороток, синтез полимерных сферических носителей, конструирование на основе клеточных лизатов и ЛПС полимерных антигенных диагностикумов и эритроцитарных препаратов, определение их чувствительности и специфичности.

Новизна исследований: Впервые разработаны отечественные иммунобиологические высокочувствительные, специфичные препараты на полимерных носителях (для РАО) на основе клеточных лизатов и ЛПС для выявления антител к *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в сыворотках крови

больных и переболевших, вибрионосителей.

Полученные результаты: На основе тотальных клеточных лизатов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп сконструированы полимерные антигенные диагностикумы. Чувствительность 1:1280 – 1:5120. Диагностикумы не давали реакции с сыворотками к другим возбудителям кишечных инфекций, но отмечены перекрестные реакции с сыворотками к O1 и O139 серогруппам. Получены эритроцитарные диагностические препараты на основе клеточных лизатов, проведены сравнительные исследования полимерных и эритроцитарных препаратов. Показана сходная чувствительность препаратов, при этом специфичность полимерных препаратов была выше. Проведены комиссионные испытания полимерных диагностикумов на основе клеточных лизатов, оформлена научно-техническая документация, инструкции по применению. Проведено исследование штаммов *V. cholerae* по содержанию ЛПС и выбраны штаммы-продуценты. Выделен ЛПС O1 серогруппы *V. cholerae*, на его основе получен полимерный антигенный диагностикум, высокочувствительный и специфичный, не дающий реакции с гетерологичными сыворотками, с сыворотками к *V. cholerae* O139 серогруппы. Оформлена НТД на полимерный диагностикум на основе ЛПС O1 серогруппы холерного вибриона, инструкция по применению, проведены межлабораторные комиссионные испытания.

Практическая значимость: Сконструированные препараты пополняют арсенал отечественных средств серологической диагностики холеры. Полимерные диагностикумы в реакции агломерации объемной отличаются высокой чувствительностью и специфичностью, скоростью постановки, учета результатов, простотой, доступностью, возможностью использования в полевых условиях при массовых обследованиях.

Форма внедрения: НД, включая ТУ и проект инструкций по применению, оформлен и согласован с ФБУЗ ГЦГЭ ФМБА пакет документов для регистрации полимерных диагностикумов. Опубликовано 5 научных работ.

Возможная область применения: лабораторное исследование экспериментальных холерных сывороток в научных учреждениях и бактериологических лабораториях, исследование сывороток больных и подозрительных на заболевание холерой при массовом скрининге в очагах вспышки холерной инфекции.

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И УЧЕБНЫХ ПОСОБИЙ

УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

А.Ю. Попова, И.В. Брагина, Е.Б. Ежлова, Ю.В. Демина, Н.В. Шеенков,
С.В. Балахонов, Л.Я. Урбанович, В.С. Ганин, Л.В. Миронова,
Т.Ю. Загоскина, О.А. Носкова, Е.С. Куликалова, Е.А. Басов,
М.В. Афанасьев, Л.Е. Токарева, Т.С. Тайкова, Т.М. Долгова

*Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и
благополучия человека*

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

Учебно-методическое пособие предназначено для использования при профессиональной переподготовке врачей-бактериологов (биологов), эпидемиологов и лаборантов по основным и дополнительным профессиональным образовательным программам (свыше 500 ч.), на циклах повышения квалификации по профилю программ профессиональной переподготовки по опасным инфекционным болезням (144 ч., 72 ч.), при подготовке специалистов по программам послевузовского образования (аспирантура по специальности 03.02.02 «микробиология», 14.02.02 «эпидемиология»), для практической работы специалистов, занимающихся диагностикой холеры. Учебный материал рассчитан на 68 ч и распределен на 16 практических занятий. В приложении приведены рецепты основных питательных сред, методы изучения биологических свойств вибрионов, в т.ч. методы экспресс- и ускоренной индикации и идентификации.

Учебно-методическое пособие по лабораторной диагностике холеры. Издание второе: переработанное и дополненное – Типография Принт Лайн. Иркутск, 2014. – 96 с.: ил.

КАТАЛОГ КОЛЛЕКЦИИ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ (ВЫПУСК 6)

О. С. Чемисова, Л. М. Смоликова, О. А. Рыковская, Е. М. Санамянц,
Р. Р. Даликова, М. М. Сагакянц, Л. И. Денисенко, Е. В. Монахова,
Н.Б. Непомнящая, А. В. Картамышева

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Коллекция патогенных для человека вибрионов создана на базе Музея живых культур ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора в целях централизованного изучения, хранения и выдачи штаммов. На базе музея живых культур функционирует Центр патогенных для человека вибрионов, созданный в 1989 году. В коллекции представлены вибрионы, выделенные на территории России и стран ближнего и дальнего зарубежья. В последние годы в связи с изменениями, происшедшими в таксономии вибрионов, в музее осуществлена номенклатурная ревизия коллекционных штаммов на основе традиционных и современных молекулярно-генетических методов. Видовая принадлежность культур подтверждена с помощью ПЦР-анализа с использованием видоспецифических праймеров, а также с привлечением метода масс-спектрометрии MALDI-TOF.

Коллекция включает следующие штаммы: типовые, эталонные, генетически маркированные, представители очагов инфекций, охарактеризованные по признакам связанным с проявлением вирулентности, авторских коллекций, а также штаммы для прикладных целей. Коллекции для прикладных целей предназначены для фаготипирования, вибриоцинотипирования, серотипирования, контроля питательных сред и диагностических препаратов. Коллекционные штаммы охарактеризованы по большому набору фено- и генотипических признаков.

Одним из важнейших аспектов коллекционной деятельности, связанной с пополнением, хранением, изучением микроорганизмов, является составление каталогов поддерживаемых штаммов. Так в рамках нашей коллекции существует периодически обновляемый каталог штаммов патогенных для человека вибрионов. В 2014 году директором Ростовского-на-Дону противочумного института был утвержден шестой выпуск каталога патогенных для человека вибрионов.

Данный каталог включает 507 штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, 60 - *Vibrio cholerae* classical, 52 штамма *Vibrio cholerae* O139, 99 штаммов

Vibrio cholerae nonO1/ non O139, 56 штаммов *Vibrio cholerae* RO, 91 штамм *V. parahaemolyticus*, 48 - *V. alginolyticus*, 36 штаммов *V. fluvialis*, 8 - *V. furnisii*, 10 - *V. metschnikovii*, 6 - *V. mimicus*, 8 - *V. harvey*, 19 штаммов *V. vulnificus*. Дополнительно каталог содержит 193 штамма для прикладных целей.

В каталоге указаны следующие данные о штаммах:

- порядковый номер штамма в разделе каталога, регистрационный номер штамма по МЖК РостНИПЧИ, особое название штамма;
- место, источник и дата выделения;
- серогруппа, биовар и серотип (антигенный подтип);
- учреждение, предоставившее штамм и дата поступления в МЖК.

Культуры всех коллекционных штаммов лиофилизированы и хранятся при температуре +2 - +4⁰С.

Каталог одобрен Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт (протокол №13 от 09.12.2014 г.) и утверждён директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОТБОР И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОБ БАЛЛАСТНЫХ ВОД МОРСКИХ (РЕЧНЫХ) СУДОВ, ВЫПОЛНЯЮЩИХ МЕЖДУНАРОДНЫЕ РЕЙСЫ»

С.Ю. Водяницкая, О.В. Лях, Ю.В. Рыжков, В.Д. Кругликов,
И.С. Шестиалтынова, И.В. Архангельская, М.И. Ежова

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Разработанные методические рекомендации создают условия для использования единообразных, гармонизированных с требованиями Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими 2004 года требованиями, простых, правомерных процедур отбора и исследования проб балластных вод на соответствие требованиям по их безопасности и качеству.

Методические рекомендации предназначены для специалистов органов и учреждений Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации, осуществляющих санитарно-карантинный контроль в пунктах

пропуска морского (речного) транспорта и осуществляющих эпидемиологический надзор по безопасности морских (речных) судов, выполняющих рейсы в морские порты неблагополучных по холере стран для проведения санитарно-эпидемиологической оценки балластной воды, сбрасываемой в акватории портов, а также для специалистов противочумных учреждений, занимающихся вопросами диагностики *V. cholerae*.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 7 от 21.05.2013 г.) и утверждены директором института. В настоящий момент методические рекомендации находятся на стадии оформления в Роспотребнадзоре (отправлены 15.12.2014 г.).

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЭЛЕКТРОМАГНИТНОГО
ИЗЛУЧЕНИЯ СВЕРХВЫСОКОЙ ЧАСТОТЫ ДЛЯ
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ ОБЪЕКТОВ, ИНФИЦИРОВАННЫХ
ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ»**

С. В. Титова, Л. М. Веркина, Е.А. Березняк, А.В. Тришина, И.Р. Симонова,
Н. В. Павлович, М. В. Цимбалистова, Н. К. Тынкевич, Н. С. Ерёменко,
С. Н. Головин

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В методических рекомендациях регламентировано использование электромагнитного излучения сверхвысокой частоты (СВЧ) для обеззараживания биотических и абиотических отходов инфицированных вирулентной чумой, туляремией, холерой, бруцеллёзом, легионеллёзом в местах их первичного образования в микробиологических лабораториях и в отделах экспериментально-биологических моделей. Установлены мощность и время воздействия СВЧ на отходы микробиологической лаборатории, включая посеы с возбудителями ООИ на стеклянные и пласти-ковые чашки Петри, пробирки, флаконы, ампулированные суспензии бактерий, вскрытые ампулы. Отходы микробиологической лаборатории включали стеклянные и пластиковые чашки Петри, пробирки, флаконы с посевами возбудителей ООИ, ампулированные суспензии

бактерий, вскрытые ампулы. Определены режимы работы СВЧ-установки при утилизации биопробных животных и подстилочного материала после экспериментальной работы (заражения биомоделей) возбудителями ООИ.

Настоящие рекомендации могут быть использованы учреждениями, перечисленными в СанПиН 2.1.7.2790-10 "Санитарно-эпидемиологические требования к обращению с медицинскими отходами", а также научно-исследовательскими учреждениями, деятельность которых связана с необходимостью обеззараживания медицинских отходов класса В (чрезвычайно эпидемиологически опасные отходы), инфицированных возбудителями ООИ, в т.ч. в местах их первичного образования в микробиологических лабораториях и вивариях.

Одобрены Учёным советом (протокол № 15 «18» декабря 2014 г.), утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЭТИОТРОПНАЯ ТЕРАПИЯ ХОЛЕРЫ И ДРУГИХ ИНФЕКЦИЙ, ВЫЗВАННЫХ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ»

Н.А. Селянская, Л.М. Веркина

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В методических рекомендациях приведены характеристики и схемы применения антибактериальных препаратов для этиотропной терапии инфекций, вызванных штаммами холерных вибрионов. В основу предлагаемых ориентировочных схем терапии положены экспериментальные данные о действии антибактериальных препаратов на холерные вибрионы в опытах *in vitro* и *in vivo*, клинических наблюдений, а также данные литературы.

Методические рекомендации предназначены для специалистов противочумных учреждений, работающих с возбудителем холеры и патогенными для человека вибрионами, а также врачей-инфекционистов и педиатров, занимающихся вопросами лечения больных острыми кишечными инфекциями.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол №2 от 24.03.2015 г.) и утверждены директором института.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«МЕТОДИКИ СОЗДАНИЯ УСЛОВИЙ СТРЕССА ДЛЯ ХОЛЕРНЫХ
ВИБРИОНОВ ПРИ ИЗУЧЕНИИ ПЕРСИСТЕНТНОГО
ПОТЕНЦИАЛА ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ»**

Ю.В. Сизова, В.А. Коршенко, О.С. Бурлакова, В.В. Балахнова,
О.П. Фецайлова, О.И. Помухина, И.Я. Черепихина, А.В. Гавринева
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В последние годы возрос интерес исследователей к изучению стресса у микроорганизмов, обусловленного действием различных стрессоров, поскольку стресс является биологической функцией адаптации микроорганизмов, в том числе холерных вибрионов, к неблагоприятным факторам окружающей среды. Смена экологических ниш в процессе жизнедеятельности холерных вибрионов делает вопрос адаптации особенно актуальным.

В Методических рекомендациях предлагаются методики для изучения влияния различных видов стресса на свойства, обуславливающие персистентный потенциал холерных вибрионов в различных условиях существования возбудителя.

В качестве стрессоров используется кислая реакция среды (имитация желудочного сока), гипоксия, желчь, комбинация этих факторов (имитация содержимого кишечника), высокие и низкие температуры, субпороговые концентрации дезинфектантов и антибиотиков, оказывающие стрессорное действие на популяцию холерных вибрионов *in vivo* и *in vitro*.

Предлагаемые методики могут быть использованы специалистами научно-исследовательских учреждений, занимающихся вопросами изучения свойств, характеризующих персистентный потенциал холерных вибрионов и других микроорганизмов в условиях стресса.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 12 от 4.12.2014г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«АЛГОРИТМ СОЗДАНИЯ ГЕОИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ
ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ
ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ (НА ПРИМЕРЕ
Г. ИРКУТСКА)»

Е.С. Куликалова, Л.В.Миронова, Л.Я. Урбанович, Н.В. Яковчиц
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск

Алгоритм создания геоинформационной системы пространственного распространения возбудителей опасных инфекционных болезней (на примере выделения *Vibrio cholerae* в г. Иркутске) включает этапы по подготовке базы данных к инсталляции в ArcGIS, созданию документа ArcMAP на платформе ArcGIS, встраиванию атрибутивных данных точек выделения возбудителей из объектов внешней среды в топографическую основу.

Методические рекомендации предназначены для специалистов учреждений Роспотребнадзора, проводящих эпидемиологический анализ по особо опасным инфекциям.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол № 6 от 30.07.2014 г.), утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«СПОСОБ ДЕТЕКЦИИ ЛИПОЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В
СУБКЛЕТОЧНЫХ ФРАКЦИЯХ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА»

С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, В.Б. Николаев, Л.Я. Урбанович,
Т.Ю. Загоскина

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск

В методических рекомендациях приводится описание способа детекции липолитической активности в субклеточных фракциях холерного вибриона, который осуществляется в диффузионном тесте в агарозе с использованием в качестве субстрата неионных детергентов по образованию ореолов.

Методические рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений, занимающихся изучением возбудителей ООИ.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (протокол № 4 от 30.07.2014 г.) и утверждены директором института.

АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ В 2014 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА»

Агафонов Дмитрий Алексеевич

Молекулярно-генетические и фенотипические особенности геновариантов возбудителя холеры Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации

диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 –
микробиология

Впервые на основе изучения структуры острова пандемичности VSP-II определена распространенность геновариантов с высоким эпидемическим потенциалом среди штаммов возбудителя холеры Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации. Предложен способ дифференциации геновариантов с разным эпидемическим потенциалом на основе выявления различий в структуре их острова пандемичности VSP-II методом мультилокусной ПЦР. Получены новые данные об изменении структуры острова патогенности VPI-1 геновариантов, изолированных в последние два десятилетия текущей пандемии холеры. Установлено, что появление мутаций (однонуклеотидные замены и вставка) в кодирующем и регулирующем регионах гена *tcpA* из VPI-1, как правило, сопровождается возникновением делеции в острове пандемичности VSP-II. Впервые с помощью генетического моделирования получены экспериментальные доказательства возникновения геновариантов при переносе участка ДНК с геном *ctxB1* *V. cholerae* классического биовара в клетки типичного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор в процессе конъюгации. Впервые проведен сравнительный протеомный анализ сконструированных изогенных штаммов, различающихся между собой типом профага CTXφ. Получены новые сведения о том, что внедрение в хромосому типичного штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор генома профага CTX^{Class}φ классического типа приводит к изменению экспрессии ряда генов жизнеобеспечения.

РАЗРАБОТАННЫЕ ПРОГРАММЫ И БАЗЫ ДАННЫХ

БАЗА ДАННЫХ ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ИНФОРМАЦИОННАЯ СИСТЕМА «*VIBRIO CHOLERAЕ* O1 И O139. ИРКУТСК»

Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, Л.В.Миронова, С.В. Балахонов,
Н.В. Яковчиц

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

Географическая информационная система (ГИС) содержит информацию о штаммах холерного вибриона O1 и O139 серогрупп, выделенных на территории Иркутска с 1973 по 2012 гг., с атрибутивными данными точек выделения *Vibrio cholerae* из объектов внешней среды на топографической основе г. Иркутска. ГИС с применением аналитических приемов позволит установить закономерности территориального распространения возбудителей опасных инфекций, изучить периоды их обнаружения. Использованные СУБД: Microsoft Office Access, Microsoft Office Exsel, ArcGIS-ESRI.

ГИС может быть использована в качестве информационного обеспечения для проведения разностороннего эпидемиологического анализа и принятия управленческих решений в области санитарно-эпидемиологического благополучия.

Внесена в Реестр баз данных, выдано свидетельство о государственной регистрации, регистрационный № 2015620466 от 10.03.2015 г.

БАЗА ДАННЫХ
«ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
КОЛЛЕКЦИОННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO ALGINOLYTICUS*»

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, Л.М. Смоликова,
Е.В. Монахова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

Электронная база данных включает в себя 125 штаммов вида *Vibrio alginolyticus*, охарактеризованных по основным таксономическим признакам. Генотипическая характеристика представлена сведениями о генах, позволяющих определить видовую принадлежность (*tlh*, *gyrB*, *flaVp*, *tosRS*, *vppC*, *varC*) и ассоциированных с патогенностью (*tdh*, *trh*, *ure*, T3SS2 α , T3SS2 β). Содержит паспортные данные штаммов (особое название, инвентарный номер, источник, место выделения, дата выделения и поступления в музей). Эта база позволяет быстро находить штаммы по заданным признакам, выявлять группы наиболее сходных между собой штаммов. Кроме того, имеется возможность ее пополнения за счет включения новых охарактеризованных представителей вида *Vibrio alginolyticus*.

Внесена в Реестр баз данных, выдано свидетельство о государственной регистрации, регистрационный № 2014621362 от 24.09.2014 г.

SEQANALYZER — ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ
ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ*

А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов, И.П. Олейников, К.В.
Кулешов, А.В. Керманов, К.В. Олейникова

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

SeqAnalyzer позволяет проводить анализ данных полногеномного

секвенирования штаммов холерного вибриона. В основе метода лежит поиск заранее определенных референсных генов среди набора контигов, что позволяет определять вид, серогруппу, биовар анализируемого штамма, а также ряд мобильных генетических элементов и островков. Важной особенностью является возможность определения кратности переменных тандемных повторов, что имеет существенное значение для эпидемиологического анализа.

Отличительные особенности программы SeqAnalyzer:

Низкие требования к оборудованию – для работы требуется обычный «офисный» компьютер или ноутбук с 1 Гб оперативной памяти

Высокая скорость работы – на анализ данных одного генома (около 10 Мб) требуется 3-4 минуты

Простота управления – программа разработана по принципу «одной кнопки» — никаких дополнительных настроек или специальных знаний не требуется

Программа рассчитана на работу с набором контигов, что не требует проведения предварительной сборки генома

Простота оценки результатов – данные анализа данных полногеномного секвенирования представляют собой интуитивно понятный текстовый файл на русском языке.

SeqAnalyzer доступен для скачивания на сайте Ростовского противочумного института по адресу <http://antiplague.ru/seqanalyzer> в виде полной версии (предназначена для компьютеров с операционной системой Windows XP, 7, 8 без установленной виртуальной машины JAVA) и только лишь исполняемый файл (для компьютеров с установленной виртуальной машиной JAVA). Помимо этого для загрузки доступны методические рекомендации по использованию программы SeqAnalyzer.

**ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И
СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ
ДАННЫХ (БД)**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

**Способ определения активации плазминогена у бактерий в
условиях *in vitro*.**

Патент № 2514662 от 5.03.2014 г.

Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Романова Л.В.

**Способ получения диагностического фага для идентификации
Vibrio parahaemolyticus.**

Патент № 2531236 от 21.08.2014 г.

Кудрякова Т.А. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д., Качкина Г.В.

**Способ отбора проб из балластных емкостей судов «река-море» и
устройство для его реализации.**

Патент №25377010 от 30.10.2014 г.

Лях О.В., Водяницкая С.Ю.

**Способ оценки местного гуморального противохолерного
иммунитета *in vitro* на модели экспериментальных животных. Патент
№2536707 от 28.10.2014 г.**

Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Телесманич Н.Р., Беспалова И.А.,
Киселева А.К.

**Способ молекулярно-генетического типирования *Vibrio cholerae*
O1 и O139 серогрупп.**

Заявка № 2014118295 от 6.05.2014 г.

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н.

**Способ моделирования образования биопленок холерных
вibriонов в условиях эксперимента и устройство для его
осуществления.**

Заявка № 2014121905 от 29.05.2014 г.

Титова С.В., Кушнарева Е.В.

**Способ оценки адгезированных свойств холерных вибрионов
Vibrio cholerae EL TOR и *Vibrio cholerae* O139 на клеточной культуре
HU TU-80.**

Заявка № 2014149782 от 9.12.2014 г.

Татаренко О.А., Коршенко В.А., Титова С.В., Алексеева Л.П., Черепихина И.Я.

Способ определения полиамина кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогруппы.

Заявка № 2014153496 от 26.12.2014 г.

Писанов Р.В., Сизова Ю.В., Черепихина И.Я., Бурлакова О.С.

Способ дифференциации токсигенных и атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы по ингибирующей активности.

Заявка № 201511557 от 30.03.2015 г.

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Титова С.В.

База данных «Геоинформационная система «Холера 1989-2014 г.»

Свидетельство № 2014621055 от 28.07.2014 г.

Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н.

База данных «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области»

Свидетельство № 2015620331 от 19.02.2015 г.

Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Зубкова Д.А., Ежова М.И.

База данных «Фено - и генотипическая характеристика коллекционных штаммов *Vibrio alginolyticus*».

Свидетельство № 2014621362 от 24.09.2014 г.

Рыковская О.А., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Смоликова Л.М., Монахова Е.В.

Получены регистрационные удостоверения на медицинские изделия

«Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РИФ «Иг –*Vibrio cholerae* O1/O139 –РИФ» - № РЗН 2014/2142, от 16 декабря 2014г.

«Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *Vibrio cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РА «Иг –*Vibrio cholerae* O1/O139 –РА» - № РЗН 2015/2336, от 26 января 2015г.

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ НУКЛЕОТИДНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В МЕЖДУНАРОДНОЙ БАЗЕ ДАННЫХ GENBANK

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В GenBank депонирована полногеномная последовательность ДНК штамма *Vibrio cholerae* 81 (P-19613) под номером JROP00000000/SAMN02911891.

Авторы: Ежова М.И., Писанов Р.В., Керманов А.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Титова С.В.

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности профагов СТХ, RS1 и RTX-кластера этого же штамма под номерами KM352500 (СТХ), KM401563 (СТХ+RTX), KM816583 (RS1), аминокислотные последовательности продуктов входящих в их состав генов – AIZ 03612-AIZ03321, AJL46615- AJL46631, AJF37104- AJF37107

Авторы: Писанов Р.В., Монахова Е.В., Ежова М.И.

Депонирована в GenBank нуклеотидная последовательность VSP-II этого же штамма под номером KM660639, аминокислотные последовательности продуктов входящих в его состав генов – AJE59566-AJE59576.

Авторы: Писанов Р.В., Монахова Е.В. и сотрудники РосНИПЧИ«Микроб» Черкасов А.В., Краснов Я.М.

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности генов *cef*, детерминирующих синтез цитотонического токсина, 16 штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных от больных в Ростовской области, под номерами KM456182-KM456194, KM522859, KM588826-KM588827, аминокислотные последовательности их продуктов – AIZ08952-AIZ08964, AJA06056, AJA31761-AJA31762

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В.

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности генов *cef*, детерминирующих синтез цитотонического токсина, 11 штаммов холерных вибрионов O1 и 4 штаммов не O1/не O139 серогрупп, выделенных в России и бывших республиках СССР, под номерами KM456178-KM456181, KM522860-KM522866, KM588824-KM588825, KR029082-KR029083, аминокислотные последовательности их продуктов – AIZ08948-AIZ08951, AJA06057-AJA06063, AJA31759-AJA31760,

AJ31762.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В.

*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт
«Микроб» Роспотребнадзора, г. Саратов*

В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность полного генома высоковирулентного штамма геноварианта O1 серогруппы Эль Тор биовара *V. cholerae* Л-3226, изолированного в Москве в 2010 году, (код доступа в GenBank JDX01000000).

Авторы: Смирнова Н.И., Черкасов А.В., Краснов Я.М., Агафонов Д.А. Кутырев В.В.

В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность полного генома вирулентного штамма *V. cholerae* М-29 O1 серогруппы: классического биовара, выделенного на территории России в 1942 году, (код доступа в GenBank – JFGR00000000).

Авторы: Челдышова Н.Б., Черкасов А.В., Краснов Я.М., Крицкий А.А., Смирнова Н.И.

Депонирована нуклеотидная последовательность полного генома типичного штамма *V. cholerae* 5/66 O1 серогруппы Эль Тор биовара, изолированного в Пакистане в 1966 году, (код доступа в GenBank - JREO00000000).

Авторы: Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Черкасов А.В., Смирнова Н.И.

Депонирована нуклеотидная последовательность полного генома предпандемического штамма *V. cholerae* МАК676 O1 серогруппы Эль Тор биовара, изолированного в 1937 году на о. Целебес, (код доступа в GenBank - JRBO00000000).

Авторы: Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Черкасов А.В., Смирнова Н.И.

В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность полного генома предпандемического штамма *V. cholerae* МАК97 O1 серогруппы Эль Тор биовара, изолированного в 1937 году на о. Целебес, (код доступа в Gen-Bank JZCB00000000).

Авторы: Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Смирнова Н.И.

В GenBank депонирована нуклеотидная последовательность полного генома высоковирулентного штамма геноварианта O1 серогруппы Эль Тор

биовара *V. cholerae* M-1293, выделенного в Дагестане в 1994 году, (код доступа в GenBank - JFFW00000000).

Авторы: Черкасов А.В., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности острова пандемичности VSP-II 5 типичных и генетически измененных токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор - M818, L3226, P18899, M1293, P17644, изолированных на территории России в разные годы текущей пандемии холеры, (номера доступа в GenBank – KJ626219, KJ626220, KJ626221, KJ626222, KJ626223).

Авторы: Черкасов А.В., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск*

Нуклеотидные последовательности генов *dnaE*, *pgm*, *cat*, *chi*, детерминирующих биосинтез α -субъединицы ДНК-полимеразы III, фосфоглюкомутазы, каталазы и хитиназы, размещены в GenBank под регистрационными номерами: KF476604-14, KF498628-31, KF500058-65, KF540041-46, KP863719-29.

Депонированные нуклеотидные последовательности генов (*dnaE*, *pgm*, *cat*, *chi*) предназначены для проведения филогенетического анализа, межлабораторного сопоставления MLST-профилей штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, биоваров и серогрупп, анализа глобального распространения отдельных клонов *V. cholerae*.

Авторы: Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В.

В GenBank депонирована полногеномная последовательность штамма штамма *V. cholerae El Tor* O1 серогруппы И-1471.

Депонированная нуклеотидная последовательность может использоваться для проведения углубленного исследования структурной организации отдельных локусов генома и сравнительного филогенетического анализа.

Нуклеотидной последовательности присвоен регистрационный номер JWIК00000000.1

Авторы: Миронова Л.В., Басов Е.А., Синьков В.В. Афанасьев М.В., Балахонов С.В., Богун А.Г., Шемякин И.Г., Кисличкина А.А., Мухина Т.Н.

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАННЫХ ШТАММАХ И БАКТЕРИОФАГАХ

Phagum parahaemolyticus 109M депонирован в Коллекцию фагов патогенных бактерий ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Присвоен номер ФК-108 (109M). Предназначен для фаготипирования параземолитических вибрионов.

Авторы: Кудрякова Т.А., Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д., Качкина Г.В.

**СОСТАВ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ
«ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» (48.04)**

№ п/п	Ф. И.О.	Учёная степень и звание	Место работы и должность
Бюро Проблемной комиссии			
1	Титова Светлана Викторовна (председатель)	к.м.н.	Ростовский НИПЧИ Директор института
2	Кругликов Владимир Дмитриевич (зам. председателя)	д.м.н.	Ростовский НИПЧИ зам. директора по противоэпидемической работе - зав. лабораторией микробиологии холеры
3	Москвитина Эльза Афанасьевна (зам. председателя)	д.м.н., профессор	Ростовский НИПЧИ зав. лабораторией эпидемиологии ООИ
4	Марковская Елена Ивановна (секретарь)	к.м.н.	Ростовский НИПЧИ с. н. с. научного отдела
Члены Проблемной комиссии			
5	Айдинов Геннадий Владимирович	д.м.н., профессор	Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области главный врач
6	Алексеева Людмила Павловна	д.б.н., профессор	Ростовский НИПЧИ зав. лабораторией гибридом
7	Викторов Дмитрий Викторович	д.б.н., доцент	Волгоградский НИПЧИ зам. директора по научной работе
8	Водопьянов Сергей Олегович	д.м.н.	Ростовский НИПЧИ зав. лабораторией биохимии микробов
9	Гальцева Галина Васильевна	д.м.н., с.н.с.	Причерноморская ПЧС врач-эпидемиолог
10	Заднова Светлана Петровна	д.м.н.	РосНИПЧИ «Микроб» вед.н.с. лаборатории патогенных вибрионов
11	Иванова Светлана Михайловна		Противочумный центр, Москва зам. директора
12	Карнаухов Игорь Геннадьевич	к.м.н., с.н.с.	РосНИПЧИ «Микроб» зав. лабораторией санитарной охраны и ЧС
13	Кудрякова Татьяна Александровна	д.м.н.	Ростовский НИПЧИ вед. н.с. лаборатории бактериофагов
14	Мазрухо Алексей Борисович	к.м.н.	Ростовский НИПЧИ зав. лабораторией питательных сред
15	Малеев Виктор Васильевич	академик РАН д.м.н., профессор	ЦНИИЭ зам. директора по научно-клинической работе
16	Миронова Лилия Валерьевна	к.м.н.	Иркутский НИПЧИ зав. лабораторией холеры
17	Монахова Елена Владимировна	д.б.н.	Ростовский НИПЧИ вед. н. с., руководитель группы

			молекулярной биологии патогенных для человека вибрионов
18	Осина Наталья Александровна	к.б.н.	РосНИПЧИ «Микроб» зав. лабораторией молекулярной диагностики
19	Писанов Руслан Вячеславович	к.б.н.	Ростовский НИПЧИ с. н. с., руководитель группы геномики и протеомики
20	Савельев Вилорий Николаевич	д.м.н., с.н.с	Ставропольский НИПЧИ зав. лабораторией холеры
21	Саяпина Лидия Васильевна	д.м.н., с.н.с.	Научный центр экспертизы средств медицинского применения зав. лабораторией контроля препаратов против чумы и др. ООИ
22	Смирнова Нина Ивановна	д.б.н., профессор	РосНИПЧИ «Микроб» зав. отделом микробиологии и лабораторией патогенных вибрионов
23	Смоликова Лариса Михайловна	к.м.н.	Ростовский НИПЧИ с. н. с. МЖК
24	Соловьев Михаил Юрьевич	к.м.н.	Территориальное управление Роспотребнадзора по Ростовской области, руководитель
25	Урбанович Людмила Яковлевна	д.м.н., с.н.с	Иркутский НИПЧИ с.н.с. лаборатории холеры
26	Храмов Михаил Владимирович	к.м.н., с.н.с.	ГНЦ ПМБ зам. директора по качеству и развитию
27	Черепихина Ирина Яковлевна	д.м.н., с.н.с	Ростовский НИПЧИ зав. отделом профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов
28	Щипелева Ирина Александровна	к.б.н.	Ростовский НИПЧИ Зав. научным отделом - ученый секретарь