Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека

Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного знамени
научно-исследовательский противочумный институт»

Холера
и патогенные для человека вибрионы

сборник статей Проблемной комиссии (48.04)
Координационного научного совета
по санитарно-эпидемиологической
охране территории Российской Федерации

Выпуск № 29

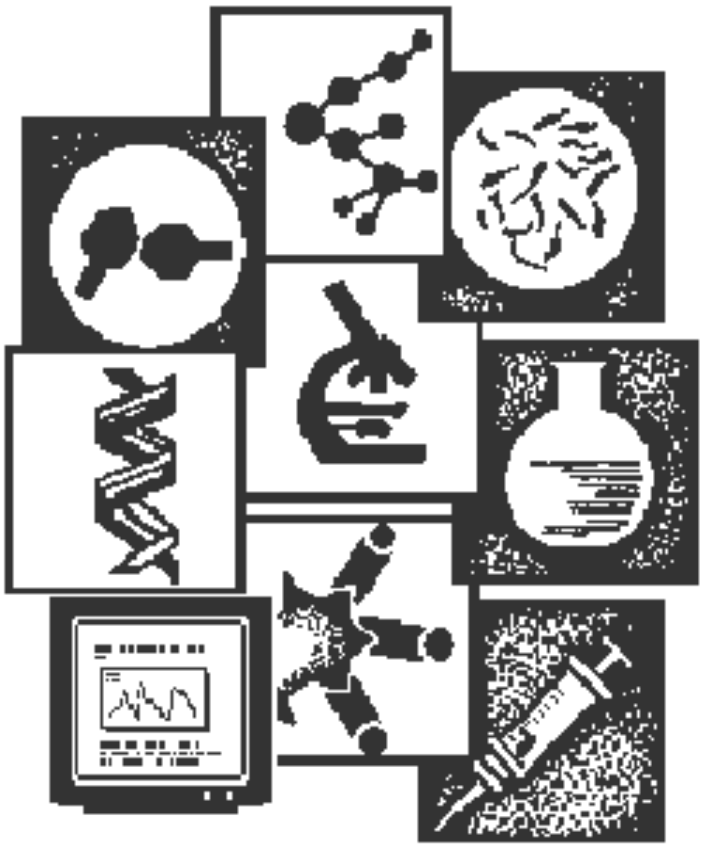
Ростов-на-Дону

2016 г.

ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

СБОРНИК СТАТЕЙ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ (48.04)



ВЫПУСК № 29

РОСТОВ-НА-ДОНУ
2016 г.

УДК: 616.932:579.843.1:579.61:614.4.

ББК: 51.9

Редакционная коллегия: Титова С.В. (ответственный редактор), Чемисова О.С., Алексеева Л.П., Марковская Е.И., (ответственный секретарь), Щипелева И.А., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Водопьянов С.О., Монахова Е.В., Черепахина И.Я., Веркина Л.М., Часовских С.В.

Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей Проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону: Мини Тайп, 2016, Вып.29 с. 256.

ISBN 978-5-98615-240-0

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.

ISBN 978-5-98615-240-0

© ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ 13

С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, А.В. Самородова, И.В. Архангельская, С.О. Водопьянов, Л.М. Веркина

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ ЗА ПЕРИОД 2006 - 2015 ГГ. 13

С.В. Титова[1], В.Д. Кругликов[1], Э.А. Москвитина[1], Д.А. Левченко[1], И.В. Архангельская[1], М.И. Ежова[1], А.Б. Мазрухо [1], А.В. Самородова[1], Н.Л. Пичурина[1], М.Ю. Соловьёв[2], Е.В. Ковалёв[2], С.А. Ненадская[2], Н.В. Леоненко[2], С.С. Слись[2], А.В. Конченко[2], Ю.В. Рыжков[2]

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА КАК РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ 25

Э.А. Москвитина, С.В. Титова, В.Д. Кругликов

ХОЛЕРА И ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, 2016 ГОД 29

М.Ю. Соловьёв[1], Е.В. Ковалёв[1], С.С. Слись[1], С.А. Ненадская[1], А.В. Конченко[1], Н.В. Леоненко[1], С.В. Титова[2], Э.А. Москвитина[2], В.Д. Кругликов[2], А.В. Самородова[2], Н.Л. Пичурина[2]

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УПРАВЛЕНИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА ХОЛЕРОЙ В 2015 ГОДУ 34

С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, Л.Я. Урбанович, С.К. Миткеева, А.С. Гладких, С.И. Феранчук

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ В 2015 Г.: РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА 37

С.М. Иванова[1], Г.В. Титов[1], В.В. Иванников[1], В.Е. Безсмертный[1], С.В. Титова[2], В.Д. Кругликов[2], Э.А. Москвитина[2], Е.В. Монахова[2], Д.А. Левченко[2],Н.Б. Непомнящая[2], А.С. Водопьянов[2], С.О. Водопьянов[2], И.В. Архангельская[2], Н.Е. Гаевская[2]

ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2015 ГОДУ 41

М.Ю. Соловьёв, Е.В. Ковалёв, С.А. Ненадская, Ю.В. Рыжков, С.С. Слись, Н.В. Леоненко, Г.А. Мирошниченко, Л.В. Лемешева, В.Ф. Карташов

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ МЕРОПРИЯТИЙ УПРАВЛЕНИЕМ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА ХОЛЕРОЙ И ДРУГИМИ ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В СЕЗОН 2015 ГОДА 45

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

ЭПИДМОНИТОРИНГ ХОЛЕРЫ КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ЧАСТЬ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УПРАВЛЕНИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ..... 51

С.В. Титова, Л.М. Веркина, А.В. Тришина, Е.А. Березняк, О.А. Рыковская, С.Н. Головин

НОВЫЙ СПОСОБ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДОЕМОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ..... 56

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ В ДОНЕЦКОЙ ОБЛАСТИ В 1971 ГОДУ, ВЫЗВАННОЙ АТОКСИГЕННЫМИ ШТАММАМИ *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR..... 58

Д.А. Левченко, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, Н.Б. Непомнящая, А.С. Водопьянов

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ С 1990 ПО 2015 ГГ. 61

С.В. Титова, Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Л.А. Егиазарян, Л.К. Лысова, И.В. Архангельская

РОЛЬ БИОПЛЕНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В СОХРАНЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ 65

С.В. Титова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая, Л.М. Веркина, Л.К. Лысова

СПОСОБНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, К БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЮ КАК ОДИН ИЗ ПУТЕЙ СОХРАНЕНИЯ РЕЗЕРВУАРА ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ..... 68

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

СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ *VIBRIO CHOLERAE* В БИОПЛЕНКАХ..... 72

А.А. Крицкий, Н.Б. Челдышова, Н.А. Плеханов, С.П. Заднова

ИЗУЧЕНИЕ КОНКУРЕНТНОЙ СПОСОБНОСТИ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ..... 75

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

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *VIBRIO CHOLERAE* NON O1/NON O139..... 78

А.В. Тришина, Е.А. Березняк, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева, А.Ю. Березняк

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ..... 81

П.В. Журавлёв[1], В.В. Алешня[1], О.П. Панасовец[1], К.В. Евдокимова[1], Г.В. Айдинов[2], М.М. Швагер[2], А.А. Глухов[3], Б.Х. Джансейидов[4], Г.А. Мартынов[4], Е.И. Деревякина[4]

МОНИТОРИНГ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ НИЖНЕГО ДОНА (2011–2015 ГГ.) 85

С.Ю. Водяницкая, Л.В. Судьина, В.В. Баташев, Н.В. Павлович

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ВОДЯНОГО БАЛЛАСТА..... 89

Е.С. Куликалова[1], Л.Я. Урбанович[1], Г.И. Кобанова[2], Л.В. Миронова[1], С.В. Балахонов[1]

БИОИНДИКАЦИЯ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. ИРКУТСКА ДЛЯ ЭКОЛОГО-ФЛОРИСТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕСТ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИБРИОНА ЭЛЬ ТОР 93

МИКРОБИОЛОГИЯ 97

С.В. Титова, Л.М. Веркина, Н.И. Пасюкова, Н.Д. Омельченко, Л.К. Лысова, А.В. Филиппенко, И.А. Иванова

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНФЕКЦИОЗНОСТИ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, РАЗЛИЧНЫХ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ 97

С.В. Титова, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, С.Н. Головин

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *VIBRIO CHOLERAE* 101

Н.Е. Гаевская, С.В. Титова, Л.К. Лысова, С.Н. Головин, А.О. Кочеткова

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ЭЛЬ ТОР В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ ШТАММАМИ-ХОЗЯЕВАМИ 105

Е.А. Березняк, А.В. Тришина, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева, Л.А. Егиазарян, М.В. Полеева

ОЦЕНКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ 109

С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович

КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА..... 113

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА..... 116

С.В. Титова, Е.В. Монахова

***CTXAB*$^{-}$ *TCPA*$^{+}$ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAE* КАК РЕЦИПИЕНТЫ ФАГА СТХФ И ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ 116**

А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников, В.Д. Кругликов, С.В. Титова

АНАЛИЗ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА 121

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.В. Архангельская, И.П. Олейников, С.В. Титова

ICE-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ 125

А.С. Водопьянов[1], Н.Н. Пидченко[2], С.О. Водопьянов[1], И.П. Олейников[1], С.В. Титова[1], С.Н. Тихонов[2]

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА О1, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 1992-2012 ГОДАХ 128

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

СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ И БЕЛКОВ CHOLIX-ТОКСИНА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ О1/НЕ О139 СЕРОГРУПП..... 131

Р.В. Писанов, Д.И. Симакова

РОЛЬ МАЛЫХ РНК В КОНТРОЛЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕАЛИЗАЦИЮ ПАТОГЕННОСТИ *VIBRIO CHOLERAE* 136

Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, Г.В. Демидова, Н.Б. Непомнящая, Е.А. Меньшикова

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ГЕМОЛИЗИНА *VIBRIO CHOLERAE* В *ESCHERICHIA COLI* ПОД КОНТРОЛЕМ T5 ПРОМОТОРА..... 140

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

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И

БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ У ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, УТРАТИВШИХ ПРОФАГ СТХФ 143

И.Б. Захарова, М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, Я.А. Лопастейская, А.А. Замарин

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ШТАММАХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ 146

В.Н. Савельев, А.Н. Куличенко, И.В. Савельева, Б.В. Бабенышев, О.В. Васильева, Л.В. Гусева, Е.И. Подопригора

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТИПИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAE O1* В СВЯЗИ С ГЛОБАЛЬНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ (ГИБРИДНЫХ) ВАРИАНТОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР 149

О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, О.А. Рыковская, С.О. Водопьянов, Е.Н. Голенищева, И.П. Олейников

INDEL-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*..... 153

Е.В. Монахова, Г.В. Демидова, О.А. Подойницына, Н.Б. Непомнящая, Р.В. Писанов

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ ЛИПАЗЫ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* 156

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Е.Н. Голенищева

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIOALGINOLYTICUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН..... 159

ИММУНОЛОГИЯ 164

И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, И.А. Беспалова, А.В. Филиппенко

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ..... 164

И.А. Беспалова, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, А.В. Филиппенко

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *VIBRIO CHOLERAE*, ВЫДЕЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ..... 169

О.В. Громова, Ю.А. Алешина, Л.Ф. Ливанова, О.С. Дуракова, А.Ю. Ульянов, Н.И. Белякова, К.И. Холматов, О.А. Волох, М.В. Антонычева

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ 173

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ..... 177

Н.Е. Гаевская, А.О. Кочеткова, С.Н. Головин

ХОЛЕРНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ 177

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, М.Э. Яговкин

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *TCP*$^+$ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 И О139 СЕРОГРУПП..... 180

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, Г.Г. Шубин, М.Э. Яговкин

ХРАНЕНИЕ И ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ 183

О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин, С.В. Титова, Л.К. Лысова, Л.А. Корнеева

ДЕЙСТВИЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА..... 185

Д.И. Симакова, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, А.П. Кочеткова, Е.Ю. Люкшина, Л.К. Лысова

РАЗРАБОТКА И КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА НА ОСНОВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ АНТИТЕЛ 187

О.В. Громова, М.Н. Киреев, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, А.Ю. Ульянов, О.А. Волох

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ОЧИСТКИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА 190

А.В. Комиссаров, М.В. Овчинникова, С.А. Бадарин, Д.Н. Бибиков, Н.В. Синицына, Н.И. Костылева, И.А. Плотников

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА ХОЛЕРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК..... 193

И.В. Савельева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, В.Н. Савельев, Д.С. Агапитов

ОПТИМИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА *VIBRIO CHOLERAE O1* В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАГНОИММУНОСОРБЕНТОВ 196

Е.Ю. Баранихина, Т.А. Кульшань, Н.И. Смирнова

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* О1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР С РАЗЛИЧНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР 199

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, М.В. Полеева, Е.М. Санамянц

ПОИСК ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ПРЯМОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH) *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*..... 202

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ..... 206

С.В. Титова, И.А. Щипелева, Л.П. Алексеева, Е.И. Марковская

РЕЗУЛЬТАТ ПЕРЕСМОТРА НАУЧНОЙ ТЕМАТИКИ, ВЫПОЛНЯЕМОЙ УЧРЕЖДЕНИЯМИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА В РАМКАХ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ 48.04 «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» 206

С.В. Титова, Л.П. Алексеева, Е.И. Марковская, И.А. Щипелева

РЕШЕНИЕ ВОПРОСОВ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО ХОЛЕРЕ И ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РАМКАХ ТЕМАТИЧЕСКОЙ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ 213

И.А. Щипелева, Е.И. Марковская, С.В. Титова, Л.П. Алексеева

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ», ВЫПОЛНЯЕМЫХ В РОСТОВСКОМ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОМ ИНСТИТУТЕ В 2016 ГОДУ 217

РЕФЕРАТЫ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ОТЧЕТОВ ПО НИР 228

Э.А. Москвитина, Ю.И. Арутюнов, Т.В. Ковалёва, И.Т. Андрусенко, Л.Г. Худобец-Шереминская, Г.Б. Анисимова

ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» 228

Л.П. Алексеева, В.Д. Кругликов, В.В. Евдокимова, О.Ф. Кретенчук, И.В. Архангельская, М.Э. Яговкин

СОЗДАНИЕ ВИДО- И СЕРОВАРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1, О139 СЕРОГРУПП В РЕАКЦИИ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА..... 229

О.С. Чемисова, О.А. Рыковская, И.А. Чайка, С.О. Чайка, Е.М. Санамянц, М.В. Полеева, М.М. Сагакянц

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ МАСС-СПЕКТРОВ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА *VIBRIO CHOLERAE* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДАННЫХ..... 230

И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА..... 231

С.В. Балахонов[1], Л.В. Миронова[1], Е.С. Куликалова[1], Л.Я. Урбанович[1], Е.А. Басов[1], В.С. Ганин[1], Е.Ю. Марков[1], М.В. Афанасьев[1], В.Б. Николаев[1], Ж.Ю. Хунхеева[1], Э.Г. Гольдапель[1], А.С. Пономарева[1], С.К. Миткеева[1], Н.В. Яковчиц[1], А.В. Корнева[1], С.Н. Козлов[1], Ю.О. Попова[1], С.Ю. Соловьев[1], Е.Г. Токмакова[1], Т.Т. Шкаруба[1], А.С. Мачнев[2], А.Б. Мошкин[2], В.А. Агапов[2], А.В. Алленов[3], В.П. Борзов[3],

В.Н. Краснощеков[3], А.С. Ким[3], Т.В. Хоменко[3], Н.С. Солодкая[3], Т.В. Громова[4], Ю.С. Мусатов[4], Л.Г. Гриднева[4], Л.И. Иванов[4], Н.М. Пуховская[4], А.Г. Ковальский[4]

ЭКОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЯВЛЕНИЙ СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ.... 232

И.Б. Захарова[1], Л.М. Веркина[2], М.В. Подшивалова[1], Н.А. Селянская[2], Н.Н. Тетерятникова[1], Я.А. Лопастейская[1], Ю.А. Кузютина[1], А.А. Замарин[1]

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ШТАММОВ V*IBRIO CHOLERAE* С МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К АНТИБИОТИКАМ 234

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ, ИНСТРУКТИВНЫХ И ДРУГИХ ДОКУМЕНТОВ 236

Е.Б. Ежлова[1], Ю.В. Дёмина[1], Н.Д. Пакскина[1], Э.А. Москвитина[2], А.В. Самородова[2], В.Д. Кругликов[2], С.В. Титова[2], Е.Г. Тюленева[2], Г.Б. Анисимова[2], В.В. Кутырев[3], С.А. Щербакова[3], В.П. Топорков[3], И.Г. Карнаухов[3], Е.В. Куклев[3], О.В. Кедрова[3], Н.И. Смирнова[3], Л.В. Миронова[4], А.К. Носков[4], М.В. Чеснокова[4], Л.Я. Урбанович[4], С.В. Балахонов[4], В.Е. Безсмертный[5], С.М. Иванова[5], Ю.М. Федоров[5], П.В. Журавлёв[6], В.В. Алешня[6], А.А. Каськов[7], М.Ю. Соловьёв[8], Е.В. Ковалёв[8], С.А. Ненадская[8], Ю.В. Рыжков[8]

ПОРЯДОК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АДМИНИСТРАТИВНОЙ ТЕРРИТОРИИ ДЛЯ РАЙОНИРОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ТИПАМ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ХОЛЕРЫ (МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)..... 236

С.В. Титова, В.Д. Кругликов, И.Я. Черепахина, Э.А. Москвитина, О.С. Бурлакова, О.С. Чемисова, Ю.В. Сизова, В.В. Балахнова, В.А. Коршенко

ПРОГРАММА КУРСОВ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ И БИОЛОГОВ «ОСОБО ОПАСНЫЕ ИНФЕКЦИИ» 237

А.В. Миронова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Е.М. Курбатова, Е.А. Меньшикова, О.В. Маркина, Р.В. Писанов

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*» 238

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

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ»..... 239

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

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

ВИРУЛЕНТНОСТИ V*IBRIO CHOLERAE* МЕТОДОМ ДВУХСТАДИЙНОЙ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ» 240

Т.А. Полунина, С.П. Заднова, Я.М. Краснов

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРИМЕНЕНИЕ 2D - ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «БЕЛКОВЫХ ПОРТРЕТОВ» ФРАКЦИЙ ЭКЗОПРОТЕИНОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ» 240

Е.В. Растунцева, Е.В. Сазанова

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОДГОТОВКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ ПО ТЕМЕ «МИКРОБИОЛОГИЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ» 241

Е.В. Растунцева, Е.В. Сазанова

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ-ИМИТАТОРОВ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ В РАМКАХ УЧЕБНОГО МОДУЛЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ»..... 242

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

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ»..... 242

А.В. Комиссаров, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Д.Н. Бибиков, Н.В. Синицина, Н.И. Костылева, Ю.А. Алешина, О.Д. Клокова, А.К. Никифоров

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ V*IBRIO CHOLERAE*» 243

Л.В. Миронова, С.В. Балахонов

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «АЛГОРИТМ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЯ (MLST)»..... 243

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ..... 245

Л.В. Ларионова, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина, И.В. Архангельская, А.П. Кочеткова, Л.К. Лысова

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ДИАГНОСТИКУМ ХОЛЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ ЛПС-О1 ПОЛИМЕРНЫЙ СУХОЙ ДЛЯ РАО» «ХОЛПАГ ЛПС-О1»ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ АНТИТЕЛ..... 245

АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» В 2015 – 2016 ГГ. 246

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА ДЛЯ ИНТРАИНТЕСТИНАЛЬНОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ЭКЗОТОКСИНА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА 246

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ 246

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ОБУСЛОВИВШИХ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ ЭЛЬ ТОР НА КАВКАЗЕ В ПЕРИОД СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ 247

ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И СВИДЕТЕЛЬСТВА ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ 249

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ 252

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ ЗА ПЕРИОД 2006 - 2015 ГГ.

С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, А.В. Самородова, И.В. Архангельская, С.О. Водопьянов, Л.М. Веркина

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

Во ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (Референс-центре по мониторингу холеры) оценка эпидемиологической обстановки по холере на глобальном и других территориальных уровнях с использованием информационных технологий - проблемно-ориентированных баз данных и ГИС - осуществляется ежегодно, в том числе в оперативном порядке. Еженедельно информация о холере в мире представляется на сайте института и передается в Роспотребнадзор.

Холера в мире. По официальным данным ВОЗ с 2006 г. по 2015 г. (неуточненные данные ВОЗ) в мире зарегистрировано 2408256 больных холерой в 115 странах Азии, Африки, Америки, Европы и Австралии с Океанией с максимальными показателями заболеваемости до $9{,}758_{0/0000}$ в 2011 г. Установлена тенденция снижения заболеваемости холерой в 2015 г. по прямолинейной, степенной и полиномиальной линиям глобальных трендов при среднем ежегодном темпе снижения –10,225 % (относительно 2006 г.) (рис. 1).

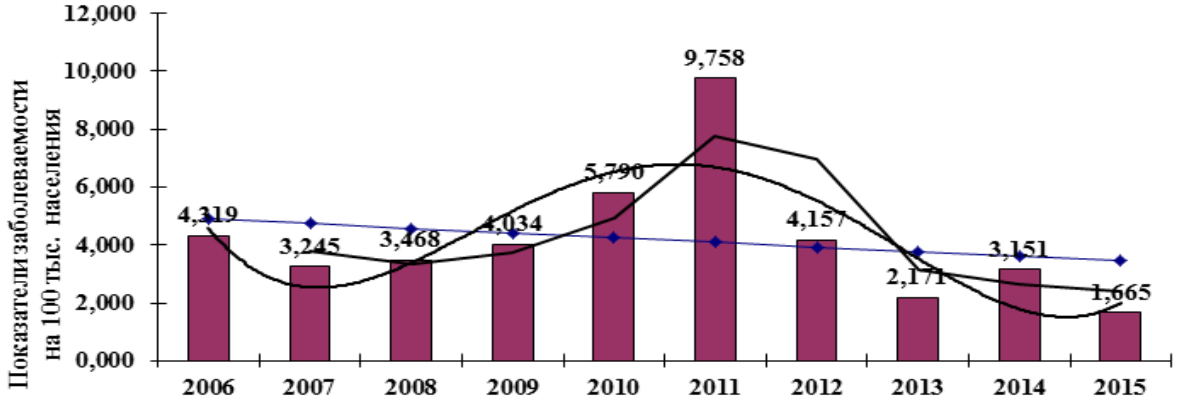


Рисунок 1. Динамика заболеваемости холерой в мире. 2006-2015 гг.

Рост в динамике заболеваемости холерой в мире в 2009-2011 гг., впервые за период седьмой пандемии, был обусловлен вовлечением в эпидемический процесс стран Северной Америки, Гаити, Доминиканской Республики, Кубы и других. С 18.10.2010 г. по 28.04.2016 г. зарегистрировано 777919 случаев холеры, летальных исходов – 9304.

В структуре мировой заболеваемости наибольшая доля больных холерой приходится на Африканский континент – 58,827 %, на Американском континенте она составила – 36,112 %, в Азии – 5,058 %, Европе – 0,003 %. В 2016 г., по состоянию на 03.06.16 г., в мире зарегистрировано 43386 больных холерой в 14 странах мира. При этом большая часть случаев холеры приходится на страны Африканского континента и Карибского Бассейна (рис.2).

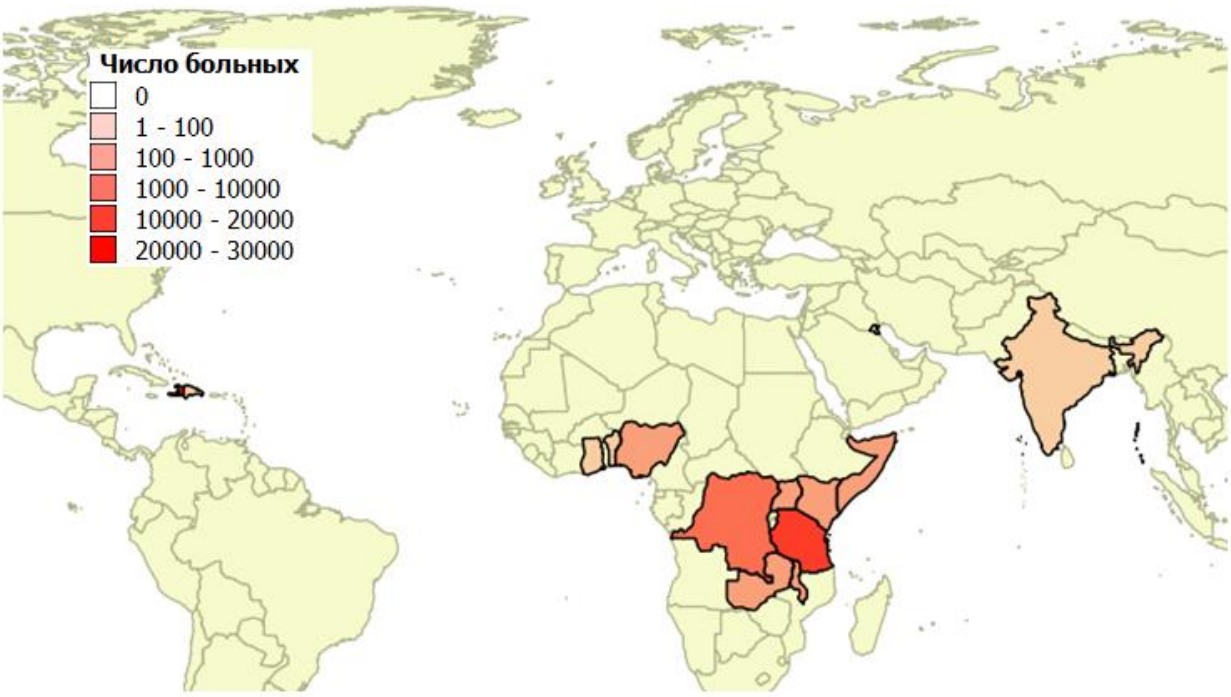


Рисунок 2. ГИС «Холера» - Число больных холерой в мире по состоянию на 06.05.16 г.

При эпидемиологическом анализе сезонности (по месяцам) заболеваемости холерой в мире в 2015 г. выявлено, что показатели заболеваемости в январе-марте ($0{,}221_{0/0000}$, $0{,}159_{0/0000}$, $0{,}168_{0/0000}$) превышали среднемесячный уровень, значение которого равнялось $0{,}136_{0/0000}$, с сезонными подъемами в январе – 0,221, мае – $0{,}228_{0/0000}$ и октябре – $0{,}199_{0/0000}$ (рис. 3). Это было связано с продолжением эпидемий и вспышек, имевших место в декабре 2014 г. в странах Карибского бассейна (Гаити, Доминиканская Республика) и на Африканском континенте (Кот-д'Ивуар, Нигерия, Мозамбик), и эпидемическими проявлениями холеры с января

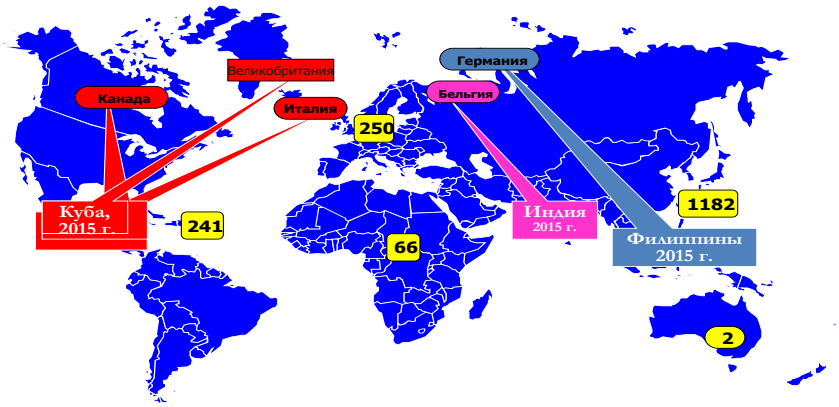
2015 г. в странах Азии (Индия) и Африки (Гана, Нигер, Того, Демократическая Республика Конго (ДРК)). В 2016 г. с января по май эпидемические проявления холеры имели место в 16 странах различных континентов.

Рисунок 3. Заболеваемость холерой в мире по месяцам 2015 г.

Активизация эпидемического процесса по холере в странах Азии и Африки была обусловлена одним из основных социальных факторов риска – меж- и внутригосударственной миграцией населения. Среди социальных условий, влияющих на ход эпидемического процесса на различных территориальных уровнях, продолжали оставаться значимыми проблемы, связанные с переполненными лагерями для перемещённых гражданских лиц из местного населения (Южный Судан, Танзания и др.). В Гаити в лагерях и лачугах, приспособленных для местного населения, оставшегося без крова, до настоящего времени находятся более 60800 местных жителей. В «Докладе Генерального секретаря о Миссии Организации Объединенных Наций по стабилизации в Гаити» отмечено, что «Гуманитарная ситуация на Гаити существенно ухудшилась в отчетный период (с 04.03.2015 г. по 31.08.2015 г.). Потребности Национального плана искоренения холеры удовлетворены на 13 процентов». Эпидемиологическая обстановка в мире на различных континентах была обусловлена также такими социальными факторами риска, как низкий уровень санитарии в странах Африки: Мозамбике, Зимбабве, ДРК, Танзании, Нигерии и др., а также в странах Карибского бассейна (Гаити); контаминация *Vibrio cholerae* O1 источников водоснабжения в Гаити; аварии в системе водоснабжения и, как следствие, контаминация питьевой воды *V. cholerae* O1 в Азии, в Индии; недостаток квалифицированной медицинской помощи, самолечение в странах Африки (Нигерии, Демократической республике Конго и других) и в Гаити, что обуславливает летальность в этих странах. Активизации эпидемического процесса в 2015 г. способствовали также природные условия, связанные с сезонами дождей, наводнениями, в том числе обусловленными феноменом Эль-Ниньо, и, как следствие, нарушение социальной инфраструктуры населенных мест, вынужденное проживание в лагерях**,** широкое

географическое распространение инфекции на свободные от холеры территории.

Заносы холеры. С 2006 г. по 2015 г. в мире отмечен 1741 импортированный случай холеры с наибольшим числом межгосударственных заносов в Азии – 1182 (67,89 %); межконтинентальных и межгосударственных заносов на Американском континенте – 241 (13,84 %); в Европе – 250 (14,36 %); в Африке – 66 (3,79 %) и Австралии с Океанией – 2 (0,11 %) (рис. 4). Имевшие место в 2015 г. межгосударственные заносы холеры в Африке – из Нигерии в Камерун и Танзанию, межгосударственные и межконтинентальные – из Кубы в Канаду (январь), Великобританию и Италию (июль), из Индии в Бельгию (август), из Филиппин в Германию (декабрь) остаются основными эпидемиологическими рисками в распространении холеры на глобальном уровне.



Желтая маркировка – импортированные случаи холеры по континентам мира с 2006 по 2015г., другая маркировка – заносы из Кубы, Индии и Филиппин в страны Европы 2015 г.

Рисунок 4. Заносы холеры в мире. 2006-2015 гг.

Эндемичные по холере страны. С учетом понятия «эндемичности», данному ВОЗ (2010), установлено формирование эндемичных очагов за анализируемый период в Индии, Пакистане, Непале, Бангладеш, а также на 25 административных территориях 12 стран Африки: в *Восточном*(Зимбабве, Кении, Замбии, Сомали, Танзании, Уганде, Мозамбике); в *Западном* (Нигерия и Гана) и в *Центральном регионах* (Демократическая Республика Конго, Камерун и Ангола); в регионе Карибского бассейна, в Гаити и Доминиканской Республике (рис. 5).

Рисунок 5. ГИС «Холера. Мир» - Страны мира с эндемичными по холере административными территориями.

Возбудитель холеры. Эпидемии и вспышки в последнее десятилетие вызваны *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, сероваров Огава и Инаба, продуцирующими холерный токсин классического типа и содержащими аллели гена B-субъединицы CTctxB1 или ctxB7. Генетически измененные варианты холерного вибриона характеризуются повышенной продукцией холерного токсина, высоким эпидемическим потенциалом за счет адаптации вибрионов в объектах окружающей среды, множественной устойчивостью к антибактериальным препаратам хромосомного и плазмидного происхождения**.** Вспышки или заносные случаи холеры, обусловленные генетически изменёнными штаммами холерных вибрионов Эль Тор, имели место в странах Азии (Индия, Бангладеш, Непал, Таиланд, Шри-Ланка, Малайзия, Филиппины, Вьетнам, Китай, Гонконг, Япония, Кувейт, Иран, Узбекистан и др.); Африки (Алжир, Гвинея, Замбия, Марокко, Мозамбик и др.); Америки (Гаити, Доминиканская Республика, Куба, Мартиника, Багамские острова, Пуэрто-Рико, Мексика, Венесуэла, Чили, США, Канада) и Европы (Румыния, Украина, Россия, Великобритания, Германия, Испания, Нидерланды).

Холера, обусловленная V. cholerae O139 серогруппы, холера Бенгал. С 1992 г. по 2015 г. зарегистрировано более 135000 больных холерой с выделением из клинического материала холерных вибрионов O139 серогруппы в 26 странах, в том числе в 18 странах Южной, Юго-Восточной, Восточной и Центральной Азии, где имели место эпидемии и крупные вспышки. При слежении за динамикой заболеваемости холерой Бенгал нами установлена тенденция снижения заболеваемости (по всем линиям тренда относительно эмпирической динамики заболеваемости). В последнее десятилетие по данным ВОЗ и другим документированным источникам информации, холера Бенгал имела место в Китае (2003-2005, 2007-2009, 2014 гг.), на Филиппинах (2014 г.).

Страны СНГ. С 2006 по 2015 г., по официальным данным ВОЗ, холера отмечена в Казахстане в 2008 г. (2009 г.), на Украине в 2007 г. и в

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 вибриононосителя с выделением из клинического материала *V. cholerae* El Tor серовара Огава, *ctxAB*$^{+}$*tcpA*$^{+}$. Заносы холеры на фоне изоляции в указанных и других странах СНГ атоксигенных гемолизположительных холерных вибрионов О1 из поверхностных водоёмов и других объектов окружающей среды позволяют в целом оценить эпидемиологическую обстановку как неустойчивую.

Россия. Наличие более 200 международных пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации, различные виды и объемы миграции населения определяют существование угрозы заноса холеры всеми видами международного транспорта. Подтверждением этому являются заносы с выделением от больных холерных вибрионов О1 биовара Эль Тор серовара Огава с генами *ctxA*$^{+}$*tcpA*$^{+}$ в Мурманскую область (2006 г.) и в Москву (2010, 2012, 2014 гг.) из Индии. *При мониторинге объектов окружающей среды* (2006-2015 гг.) выделено 676 штаммов *V. cholerae* О1 *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{-}$, *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ и *V. cholerae* О139 *ctxA*$^{-}$ и *tcpA*$^{-}$ в 30 субъектах Российской Федерации из поверхностных водоёмов и два штамма *V. cholerae* О1 биовара Эль Тор *ctxA*$^{+}$*tcpA*$^{+}$ (Ростовская область, 2011, 2014 гг.) (рис. 6).

Рисунок 6. Данные о штаммах, выделенных из объектов окружающей среды в России. 2006-2015 гг.

Из воды поверхностных водоёмов было изолировано 32 штамма *V. cholerae* О1 *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ в Ростовской области (2007 г. и 2015 г.), в Республике Калмыкия (2007, 2011-2015 гг.), в Алтайском (2011 г.) и Хабаровском (2013 г.) краях. Такие штаммы холерных вибрионов не обладают эпидемическим потенциалом, но могут вызывать единичные случаи заболеваний и локальные вспышки (Ростовская область, 2005 г., Республика Калмыкия, 2011 г.). Двенадцать штаммов *V. cholerae* О139 *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{-}$ были изолированы в Москве (2006, 2008 гг.), Иркутской (2006 г.) и Челябинской (2010, 2012 гг.) областях. При этом на территориях I типа по эпидемическим проявлениям холеры - 79 (3,0 %) штаммов *V. cholerae* О1, II типа – 385 (88,3 %), III типа

подтипа А – 119 (6,8 %), III типа подтипа Б – 69 (1,9 %) (рис. 8). Штаммы *V. cholerae* O1 *ctxA*$^{+}$ и *tcpA*$^{+}$ были выделены на территориях I типа, *V. cholerae* O139 – на территориях III типа подтипа А. Сезон обнаружения – с мая (Ростовская область, 2006 г.) по сентябрь (Краснодарский край, 2015 г.) (рис. 7).

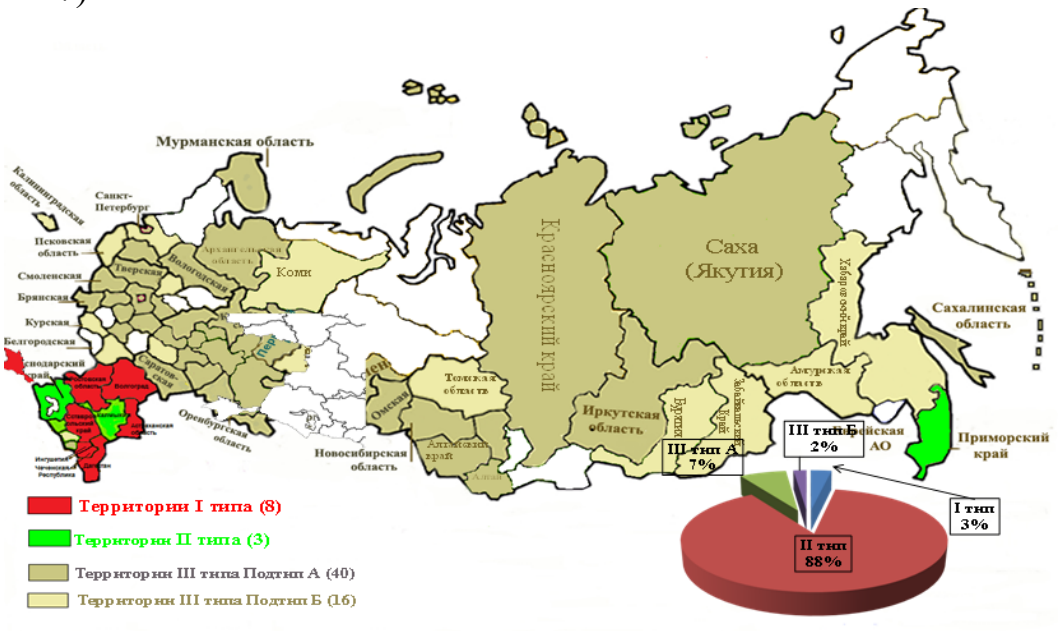


Рисунок 7.Удельный вес выделенных холерных вибрионов O1 серогруппы в субъектах Российской Федерации, различных по типам эпидемических проявлений холеры. 2006-2015 гг.

В 2015г. из поверхностных водоемов изолировано 127 штаммов *V. cholerae* O1, в том числе *V. cholerae* O1 *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{-}$ (121) *и V. cholerae* O1 *ctxA*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ (6). Все штаммы идентифицированы по основным таксономическим признакам как *V. cholerae* O1 El Tor серовара Огава – 12 и серовара Инаба – 115, атоксигенные, гемолизположительные. Данные о выделении холерных вибрионов O1 из поверхностных водоемов в субъектах России приведены на рис.8.

Рисунок 8. ГИС «Холера» - Данные о выделении холерных вибрионов О1 из поверхностных водоемов в России в 2015 г.

В связи с выделением атоксигенных штаммов холерных вибрионов в Краснодарском крае, г. Сочи, Хостинском районе из р. Агура в стационарных (с 29.07.15 г.) и дополнительных (с 02.08.15 г.) точках по 27.09.2015 г. сделано предположение об имевшей место контаминации холерными вибрионами в 2015 г. подземного горизонта минеральной сульфидной воды с последующим поступлением последней в р. Агура. Имевшие место ливни в начале июля 2015 г. в городе Сочи могли явиться пусковым механизмом нарушения санитарно-экологических условий в районе р. Агура с попаданием сточных вод и контаминацией сульфидных вод подземного горизонта**.**

Проведено полногеномное секвенирование 13 атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA*$^-$*tcpA*$^-$, выделенных: из р. Агура в 1975 г. (штамм № 9339), 1980-1981 гг. (№ 11739 и № 12026), 2007 г. (№ 18984), 2015 г. (№ 434) (Краснодарский край, г. Сочи, Хостинский район), от больных диареей в 2004 г. (№ 18748) (Краснодарский край, г. Сочи), в 1999 г. (№ 17920) (Краснодарский край, Адлер) и из других водных объектов в г. Ростове-на-Дону в 2008, 2010 и 2013 гг. (№№ 19051, 19178 и 19430); в Астраханской области в 2012 г. (№ 19308), в Республике Калмыкия в 2014 г. (№ 9673) и в Псковской области в 2014 г. (№ 19758). Для установления филогенетических связей взятых в исследование штаммов было проведено их SNP-типирование с помощью авторского программного обеспечения GeneExpert 2.0, разработанного в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (рис.9).

Рисунок 9. Дендрограмма, построенная на основе анализа данных полногеномного секвенирования 13 штаммов *V. cholerae O1 ctxA*$^-$*, tcpA*$^-$.

Установлено, что штаммы, выделенные из реки Агура в 1975-1981 гг. и в 2007 г., как и штаммы от больных (1999 г. и 2004 г.), составили отдельный кластер вместе с штаммами из г. Ростова-на-Дону, Псковской области в отличие от штамма *V. cholerae* O1 № 434, который оказался наиболее генетически близок к штаммам, выделенным в Астраханской области (2012 г.) и в Республике Калмыкия (2014 г.). Сравнительный анализ данных по ПЦР и VNTR показал идентичность полученных результатов. Полногеномные последовательности штаммов зарегистрированы в «Базе данных генетических последовательностей», http://genomes.antiplague.ru.

Представляет интерес тот факт, что штамм 434 был одним из 98 идентичных (по результатам ПЦР-типирования) штаммов, выделенных в Сочи в 2015 г. Отличительной чертой данной группы явилось наличие гена cholix-токсина 1 типа (chxA1), который отсутствовал у изученных штаммов, выделенных в этом регионе ранее. Ген chxA встречается у *V.cholerae* O1 довольно редко, поэтому в данном случае может считаться генетическим маркером клона, способного к выживанию и размножению в указанный период. Возможно, такое необычное распространение представителей одного и того же клона было отчасти или полностью обусловлено именно экспрессией chxA, поскольку cholix-токсин относят к факторам колонизации, способствующим персистенции холерных вибрионов в ассоциации с водными организмами. Идентичный по нуклеотидной последовательности ген chxA был также выявлен у штамма из Астраханской области (2012 г.), который, как отмечено выше, сходен с 434 и по структуре других участков генома. Ежегодное выделение атоксигенных холерных вибрионов указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными

вибрионами О1/О139 серогрупп водных объектов и их устранения.

Во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт с 2006 по 2015 г., в том числе включая работу в рамках Референс-центра по мониторингу холеры с 2008 г., было идентифицировано 584 штамма холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды на территории России (рис. 10). Все штаммы холерных вибрионов были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. Из них к сероваруОгава принадлежал 301 штамм, к серовару Инаба - 268, к серовару Гикошима - 1, к О139 - 7, к РО - 7. С генетической характеристикой $ctx^{-}tcp^{+}$ было выделено 34 штамма, $ctx^{+}tcp^{+}$ - 2. Отмечено нарастание фагорезистентности к коммерческому диагностическому фагу Эль-Тор.

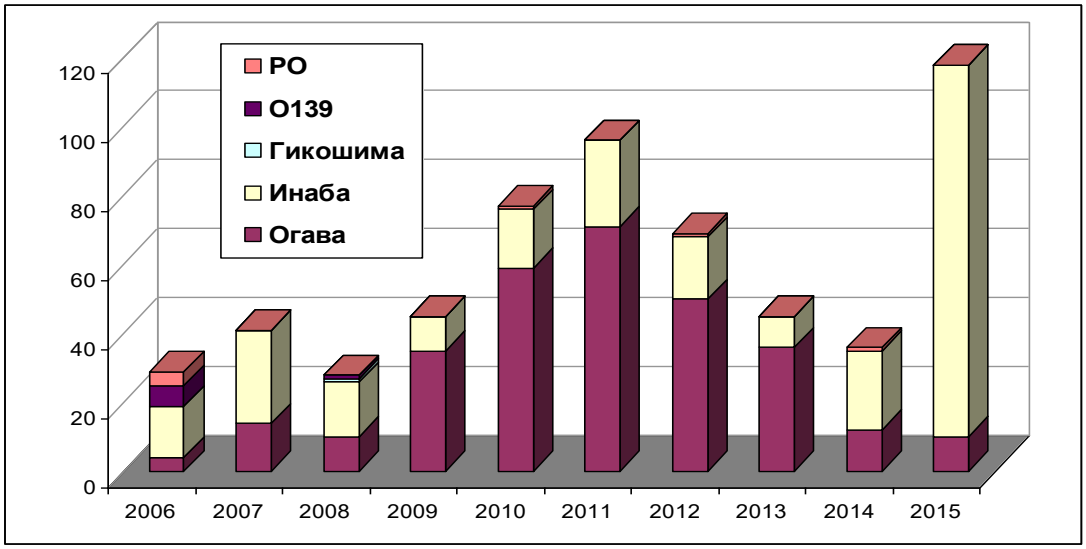


Рисунок 10. Данные о штаммах, идентифицированных в Референс-центре по мониторингу холеры. 2006-2015 гг.

Молекулярно-биологические исследования. С 1993 по настоящее время проводится VNTR-анализ штаммов холерных вибрионов, выделенных в мире, в том числе и России. Типирование проводили по 5 локусам вариабельных тандемных повторов VcA, VcB, VcC, VcD и VcG. При этом 312 апиллированых (tcpA-) штаммов распределились между 142 генотипами и 17 кластерами, обозначенными буквами латинского алфавита от «А» до «R», в то время как 241 $tcpA^{+}$ штамм *V. cholerae* распределился между 80 генотипами, вошедшими в 17 кластеров, обозначенных буквами латинского алфавита от «А» до «R». При этом для ряда регионов характерна чёткая клональность выделяемых штаммов. Так, все атоксигенные штаммы, выделенные из реки Агура (Краснодарский край) в 2015 г., имели генотип «К2». Штаммы, выделенные во время эпидемических осложнений в Ростовской области в 2005 г., принадлежали к кластеру «М». Атоксигенные штаммы (13), выделенные в 2012 г. в Тюменской области, принадлежали к кластеру «Р». Аналогичная ситуация

наблюдается и с ctxAB$^+$ штаммами – практически все холерные вибрионы, выделенные во время эпидемических осложнений в г. Мариуполь (Украина) в 2011 г., принадлежали к кластеру «I». Для удобства анализа распределения VNTR-генотипов разработана онлайн ГИС, расположенная на сайте Ростовского-на-Дону противочумного института и доступная для сотрудников учреждений Роспотребнадзора по адресу gis.antiplague.ru.

С 2012 года проводится расширенное ПЦР-генотипирование в оперативном и ретроспективном формате по наличию значимых генов. По результатам генотипирования 159 штаммов, выделенных на различных территориях РФ с 2006 по 2015г., было установлено, что штаммы распределены между 50 генотипами, сгруппированными в 10 кластеров. Данные внесены в ГИС «Холера фено- и генотип», доступную для сотрудников учреждений Роспотребнадзора на ГИС-портале Ростовского-на-Дону противочумного института.

Чувствительность/устойчивость к антибиотикам. С началом применения антибиотиков увеличивается число выделяемых штаммов возбудителя с маркерами резистентности к широко применяемым для экстренной профилактики и лечения холеры препаратам (тетрациклинам, хлорамфениколу, фуразолидону, триметоприму/сульфаметоксазолу, аминогликозидам, беталактамам). Рост степени устойчивости к антибактериальным препаратам у холерных вибрионов, выделенных от больных холерой и вибриононосителей при завозах холеры, продемонстрирован на рисунке 11.

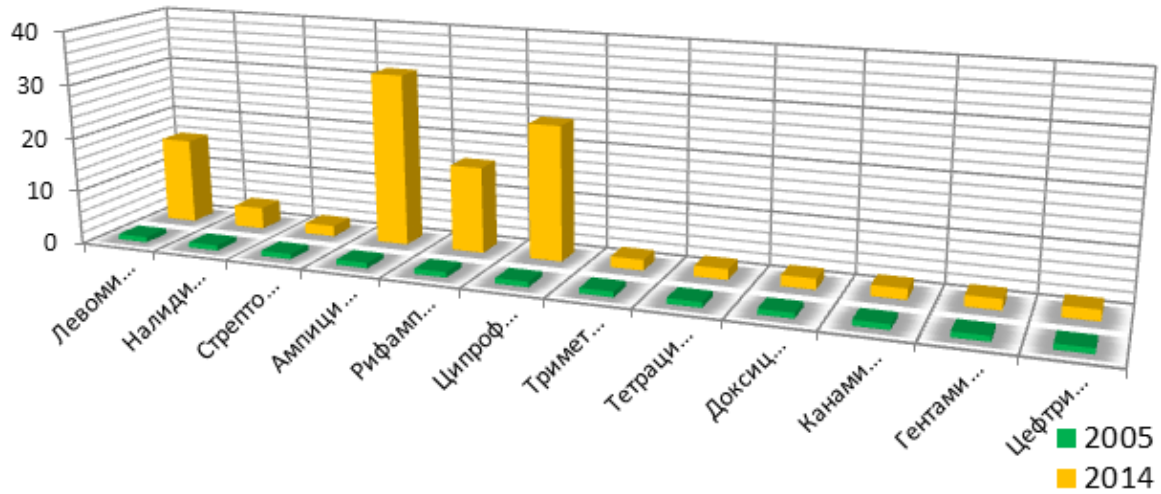


Рисунок 11. Сравнительная оценка уровня антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* El Tor O1, выделенных от больных холерой в России в 2005- 2014 гг.

Показатели МПК переведены в условные единицы, что позволило выявить и сравнить уровни роста резистентности к 12 антибиотикам за указанный период (2005-2015 гг.).

Проанализированы антибиотикограммы 42 штаммов *V. cholerae* El

Tor, выделенных от больных при вспышке в 2005 г. в г. Каменске-Шахтинском (Ростовская область), и завозного происхождения (2006, 2010, 2012, 2014 гг.). Штаммы, изолированные от больных в Ростовской и Тверской областях в 2005 г., несли от 8 до 10 r-детерминант устойчивости. Начиная с 2006г., все штаммы обладали устойчивостью к налидиксовой кислоте и повышенными значениями МПК к фторхинолонам. По данным секвенирования, в ряде штаммов выявлено наличие SXT элемента, который несёт гены устойчивости к четырём антибиотикам (сульфаметаксозол/триметоприму, фуразолидону, стрептомицину), что послужило основанием для внесения предложений по корректировке схемы экстренной профилактики, предусмотренной действующими СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», с определением антибактериальных препаратов резерва.

При анализе распределения типов ICE элемента у токсигеных штаммов, выделенных в России и сопредельной территории в последние десятилетия и ранее (табл.), установлено, что все крупные эпидемические вспышки были вызваны штаммами с одним типом ICE элемента.

Таблица. Типы ICE элемента у O1 $ctx^{+}tcpA^{+}$ штаммов *V. cholerae* O1, выделенных в различных регионах.

№	Регион, дата выделения	Число штаммов	Тип ICE элемента и количество штаммов
1	Дагестан, 1993	10	Moz-10
2	Дагестан, 1994	45	Moz-43; Ind-2
3	Крым, 1994	2	Moz-2
4	Дагестан, 1998	7	Moz-7
5	Казань, 2001	6	Ind-6
6	Крым, 2010	3	Moz-3
7	Мариуполь, 2011	10	Ind-10
8	Штаммы, выдел.в РФ в 2005-2014	6	Ind-6

Единственное исключение - эпидемия в Дагестане 1994 г., когда была отмечена циркуляция токсигенных культур с двумя типами ICE элемента. Это может свидетельствовать о наличии двух независимых заносов инфекции, что согласуется с мнением о сложном характере эпидемического процесса в Дагестане в период 1994 г. с многочисленными заносами инфекции. Отмечена тенденция смены возбудителя: так, если ранние заносы в 1993-1998 гг. были обусловлены штаммами с ICE элементом «мозамбикского» типа, то начиная с 2001 г. в нашей стране выделяют только штаммы с ICE элементом «индийского» типа. Эта тенденция может свидетельствовать о большем эпидемическом потенциале штаммов с ICE элементом «индийского типа». На основании приведённых данных можно сделать выводы, что ICE элемент является информативным

генетическим маркером токсигенных штаммов *V. cholerae*, а для молекулярного типирования ICE элемента достаточно определения двух основных типов. Кроме того, отсутствие ICE элемента у атоксигенных штаммов V. cholerae, выделенных в России, позволит использовать выявление ICE элемента как признак, характерный для «заносных» штаммов.

Таким образом, аналитические данные ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Референс-центра по мониторингу холеры в России свидетельствуют, что эпидемиологическая обстановка по холере в мире продолжает оставаться неблагополучной. Это обусловлено регистрацией инфекции, в том числе заносного происхождения, на всех континентах, существованием эндемичных очагов в странах Азии, Африки и Карибского бассейна, выделением во время эпидемий, вспышек и заносами генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, устойчивых к различным антибиотикам. Это указывает на необходимость реализации действующих правовых, распорядительных и нормативных документов по эпидемиологическому надзору за холерой, лабораторной диагностике холеры для обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

ДЕЯТЕЛЬНОСТЬ РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА КАК РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

С.В. Титова[1], В.Д. Кругликов[1], Э.А. Москвитина[1], Д.А. Левченко[1], И.В. Архангельская[1], М.И. Ежова[1], А.Б. Мазрухо [1], А.В. Самородова[1], Н.Л. Пичурина[1], М.Ю. Соловьёв[2], Е.В. Ковалёв[2], С.А. Ненадская[2], Н.В. Леоненко[2], С.С. Слись[2], А.В. Конченко[2], Ю.В. Рыжков[2]

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

[2] *Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области, г. Ростов-на-Дону*

На территории Российской Федерации в 2015 г.:

- больных холерой зарегистрировано не было;
- из воды поверхностных водоемов (в шести субъектах) учреждениями Роспотребнадзора изолировано 127 атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor.

В ходе реализации задач референс-центра по мониторингу холеры в

2015 году было идентифицировано 118 атоксигенных культур холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. Культуры, поступившие на подтверждение, были выделены на территории следующих областей:

1. Ростовская область – 3 штамма (г. Ростов-на-Дону, река Дон – 2 штамма и река Темерник – 1);

2. Республика Калмыкия – 8 штаммов (пруд села Вознесеновка; город Элиста, пруды Заячий и Колонский, р. Элистинка);

3. Челябинская область – 1 штамм (Красноармейский район, оз. Курочкино);

4. Забайкальский край - 7 штаммов (г. Чита, р. Чита, р. Ингода; Борзинский район, р. Борзянка).

5. Иркутская область – 1 штамм (г. Иркутск, залив Чертугеевский Иркутского водохранилища, зона неорганизованного рекреационного водопользования).

6. Краснодарский край – 98 штаммов (г. Сочи, р. Агура, Черное море).

Полученные штаммы были идентифицированы как *Vibrio cholerae* O1 El Tor, атоксигенные (в ПЦР не содержали гена *ctxA*). Следует отметить, что в 2015 г. из поверхностных водоёмов Республики Калмыкия и Ростовской области было изолировано шесть штаммов *V. cholerae* O1, идентифицированных, как штаммы, лишённые гена холерного токсина *ctxA*, но содержащие ген структурной единицы токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* в составе острова патогенности VPI. Эти штаммы не представляют эпидемической значимости, однако могут вызывать спорадические случаи и локальные вспышки диарейных заболеваний за счёт экспрессии генов других факторов патогенности. Полученные данные по результатам фено- и генотипических характеристик выделенных штаммов холерных вибрионов внесены в базу данных ГИС «Холера 1989-2015». Все 118 штаммов холерных вибрионов О1, поступивших на идентификацию в Референс-центр, были изучены с использованием мультилокусного VNTR–типирования по пяти локусам VcA, VcB, VcC, VcD, VcG.

В результате проводимого мониторинга поверхностных водоемов и сточных вод г. Ростова-на-Дону на наличие холерных вибрионов по восьми стационарным точкам, закрепленным за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, с 05.05.2015 г. по 28.09.2015 г. было исследовано 154 пробы речной воды и 16 проб стоков. Выделен один атоксигенный штамм *V. cholerae El Tor Ogawa* № 90 *ctx*$^-$*tcp*$^-$ в стационарной точке № 1 (Правый берег р. Дон, Державинский спуск, место сброса аварийных стоков) и 77 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139. При участии в эпидемиологическом расследовании по факту

выделения атоксигенной культуры в 2015 г. исследовано 16 проб воды и иловых отложений с отрицательными результатами. Кроме того, в результате исследования 39 проб воды Таганрогского залива Азовского моря изолировано 14 штаммов *V.cholerae* non O1/non O139.

По согласованию с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области в мероприятия мониторинга точек отбора проб воды, закрепленных за институтом, была включена динамическая оценка их санитарного состояния, включая и прилегающие территории. Мониторинг санитарного состояния проводили весь эпидсезон.

Так, обследование, проведённое в период выделения атоксигенного штамма, выявило ухудшение санитарного состояния территории в сравнении с наблюдениями, сделанными вначале эпидсезона: наличие несанкционированных точек сброса бытового и строительного мусора, действующего выгребного туалета и мест ночёвки асоциальных лиц без определённого места жительства в непосредственной близости к точке отбора проб воды. Информация по результатам мониторинга с дополнением результатов эпидемиологического расследования по факту выделения атоксигенной культуры была передана в Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, что способствовало принятию соответствующих управленческих решений.

В 2015 г. в России от больных с диагнозом «ОКИ» изолировано 7 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 серогрупп (2 – Республика Крым, 1 – Республика Калмыкия, 4 – Ростовская область), установлена их серологическая принадлежность.

В плане оказания практической помощи учреждениям Роспотребнадзора и МЗ Ростовской области, выполняющим лабораторные исследования на холеру, проведена проверка качества питательных сред и реактивов для лабораторной диагностики холеры для 10 лабораторий ЛПО и семи филиалов ФБУЗ ЦГиЭ в Ростовской области. Всего было проверено 66 серий жидких и твёрдых питательных сред, из них семь серий основного раствора пептона и одна серия щелочного агара потребовали дополнительной варки, и к началу эпидсезона все лаборатории имели годные серии питательных сред для выявления холерных вибрионов.

Совместно с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области осуществлена оценка готовности бактериологических лабораторий ЛПО к проведению лабораторной диагностики холеры, в том числе к расширенному объёму в случае эпидемических осложнений (проверено две лаборатории), Проведена оценка противоэпидемической готовности госпитальной базы специальных лечебно-профилактических учреждений Ростовской области к проведению мероприятий в случае заноса и распространения холеры (проверено 14 ЛПО).

Сотрудники института приняли участие в проведении четырёх семинаров-совещаний: «Современное выявление инфекционных

заболеваний, в том числе требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории», «Первичные противоэпидемические мероприятия при выявлении больного с подозрением на опасные и другие инфекционные болезни, регламентированные ММСП (2005 г.)» для врачей-инфекционистов, госпитальных эпидемиологов и других специалистов учреждений Роспотребнадзора и Минздрава в гг. Ростов-на-Дону (МБУЗ ЦГБ), Шахты (МБУЗ «Городская поликлиника №1»), Волгодонск (МБУЗ «Городская поликлиника№1», МБУЗ БСМП), Сальск (МБУЗ ЦРБ), нацелившие специалистов лечебного звена на повышенную готовность к обеспечению соответствующих мероприятий.

По результатам оценки противоэпидемической готовности бактериологических лабораторий и госпитальных баз к проведению мероприятий в случае заноса и распространения холеры и других опасных инфекционных болезней составлены аналитические справки, в которых даны рекомендации по расчёту мощности лабораторий, организации посменной работы, а для лечебных организаций даны предложения по оптимальным вариантам перепланировки санитарных пропускников для поступления и выписки больных.

В плане информационного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой оперативно пополняются базы данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире»», «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ. России», «Холерные вибрионы. Россия». Осуществлены оценка эпидемиологической ситуации по холере в мире и прогноз на 2016 г. с использованием указанных баз данных. Материалы опубликованы в первом номере журнала «Проблемы особо опасных инфекций», а также использованы для информации Роспотребнадзора «Об эпидемиологической обстановке по холере в 2015 году и прогнозе заболеваемости на 2016 год».

Сведения о состоянии заболеваемости холерой в мире, выделении холерных вибрионов на территории Российской Федерации еженедельно передаются в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека в виде донесений и информационных сообщений. Для ознакомления широкого круга специалистов о заболеваемости холерой в мире данные в виде еженедельных сводок публикуются на сайте института http://antiplague.ru.

Использование информационных технологий является инструментом при оперативной работе эпидемиолога в осуществлении эпидемиологического надзора за холерой на различных территориальных уровнях.

Таким образом, на территории Российской Федерации в 2015 г. на фоне эпидемического благополучия по холере отмечена контаминация нетоксигенными холерными вибрионами О1 поверхностных водоёмов в

ряде субъектов, что свидетельствовало о неустойчивой эпидемиологической обстановке в стране и соответствовало прогнозу, составленному Референс-центром по мониторингу холеры.

ХОЛЕРА И ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ: СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ, 2016 ГОД

Э.А. Москвитина, С.В. Титова, В.Д. Кругликов

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

В соответствии с «Международной статистической классификацией болезней и проблем, связанных со здоровьем» (МКБ-10), холера кодируется: А00 холера; А00.0 - холера, вызванная холерным вибрионом О1, биовар cholerae, классическая холера; А00.1 - холера, вызванная холерным вибрионом О1, биовар Эль Тор, холера Эль-Тор; А00.9 - холера неуточнённая.

Возбудителями холеры являются эпидемически значимые, содержащие гены холерного токсина (*ctx* AB^+) и токсинкорегулируемых пилей ($tcpA^+$) холерные вибрионы О1 серогруппы, биоваров *V. cholerae* classical и *V. cholerae* Эль Тор, а также *V. cholerae* О139 серогруппы [1].

Небывалая по масштабам эпидемия в Гаити, начавшаяся в октябре 2010 г. и продолжающаяся по настоящее время (зарегистрировано 785553 больных холерой и 9352 умерших на 30 июня 2016 г.), обусловлена генетически изменённым вариантом *V. cholerae* Эль Тор, продуцирующим токсин холерного вибриона классического биовара, с более тяжелым клиническим течением и высокими показателями летальности. Chin Ch-Sh. et al. (2011) при секвенировании геномных ДНК штаммов *V. cholerae* El Tor биовара О1 серогруппы Н1 и Н2 (Гаити, 2010 г.), С6 (Перу, 1991 г.), М4 (Бангладеш, 2008 г.), N5 (Бангладеш, 1971 г.) и сравнении их с эталонными последовательностями геномов штаммов N16961 (Бангладеш, 1971 г.), GIRS-101 (Бангладеш, 2002 г.) и MJ-1236 (Бангдадеш, 1994 г.) установлено, что штаммы *V. cholerae* О1 El Tor Н1 и Н2 (Гаити, 2010 г.) близкородственны штаммам из Бангладеш 2002 г. (GIRS-101) и 2008 г. (М4). Эпидемия в Гаити обусловлена матлабским восточноазиатским вариантом *V. cholerae* О1 Эль Тор.

Ранее было установлено наличие в геноме матлабских вариантов (Бангладеш) классического профага *CTXφ*, а также острова патогенности *VPI-1* с генами патогенности *tcpA*, а также *rstR* и *ctxB*. У других матлабских вариантов обнаружено присутствие на малой хромосоме

тандемных повторов двух копий классического профага *CTXφ*. В геноме этих вариантов штаммов присутствуют специфичные для *V. cholerae* El Tor острова пандемичности *VSP*-1 и *VSP-2*, обеспечивающие высокий уровень адаптации к условиям окружающей среды, его пандемический потенциал, а наличие гена *ctxB* холерного токсина способно вызывать более тяжёлое клиническое течение с высокими показателями летальности [3, 4]. Анализ антибиотикограмм штаммов *V. cholerae* O1 El Tor серовара Огава, содержащих ctxB классического биовара, из Индии (штат Орисса) показал множественную устойчивость к антибиотикам (ципрофлоксацину, норфлоксацину, котримоксазолу, налидиксовой кислоте, неомицину и фуразолидону), подтверждённую также присутствием генов резистентности в геноме (5, 6).

К настоящему времени установлено, что вспышки или заносные случаи холеры, обусловленные изменёнными в геноме вариантами *V. cholerae* El Tor, имели место с 1991 г. в странах Азии: *Индии, Бангладеш, Таиланде, Шри-Ланке, Малайзии, Вьетнаме, Китае, Гонконге, Японии, Кувейте, Непале, Узбекистане и др.;* Африки: *Алжире, Гвинее, Замбии, Марокко, Мозамбике и др.;* Америки: *Гаити, Доминиканской Республике, Кубе, Мексике, Венесуэле, США* и др.; Европы: *Румынии* (1991 г.), Великобритании, Испании, Германии (2015 г.), на *Украине* (1991, 2011гг.). Имеются сообщения зарубежных исследователей о выделении от больных генетически изменённых вариантов *V. cholerae* O139 серогруппы с наличием субъединицы ctxB классического холерного вибриона [7].

В России отмечены вспышки (Республика Дагестан, 1993, 1994, 1996, 1998 гг.), Приморский край (1999 г.), Республика Татарстан (2001 г.) и единичные завозы холеры в Башкортостан (2004 г.), в Мурманскую область (2006 г.), в Москву (2010, 2012, 2014 гг.) из Индии; в Тверскую область, Москву (2005 г.) – из Таджикистана с выделением от больных генетически изменённых вариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Необходимо обратить внимание на публикации, в которых сообщено о выделении *V. cholerae* O1 classical сероваров Гикошима (n=10) и Огава (n=1) в Непале в 2008 г. из сточной воды канализационной системы в долине Катманду [8]. Кроме того, при изучении штаммов *V. cholerae*, выделенных во время вспышки холеры в Иране в 2012 г., определена принадлежность одного из 11 штаммов к классическому биовару [9].

По данным ВОЗ [10], штаммы *V. cholerae* O139 серогруппы, появившиеся в Бенгальском заливе в 1992 г., до настоящего времени имеют распространение в основном в странах Юго-Восточной Азии. В 2014 г. Филиппины информировали ВОЗ о крупной вспышке (4547 случаев холеры), обусловленной *V. cholerae* O139 и O1 серогрупп. В Китае в этом же году было зарегистрировано 24 подтверждённых случая холеры, 17 из которых были вызваны *V. cholerae* O139 серогруппы, а семь – *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, серовара Огава.

В соответствии с СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», выделенные из поверхностных водоёмов и других объектов окружающей среды холерные вибрионы О1 и О139 серогрупп, не содержащие генов холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей *(ctxAB$^-$tcpA$^-$)* или содержащие ген *tcpA* при отсутствии гена *ctxAB,* атоксигенные (авирулентные) штаммы могут вызывать единичные заболевания холерой (вибриононосительство) и вспышки. Вспышки с выделением от больных и вибриононосителей атоксигенных (авирулентных) штаммов холерных вибрионов Эль Тор О1 серогруппы были зарегистрированы в 1971 г. (Украина, Донецкая область), в 2005 г. (Россия, Ростовская область, 2005 г.), а также единичные случаи (Приморский край, 1999 г. - завоз из Китая; Челябинск, Астраханская область, 2000 г.; Краснодарский край, 2004 г.; Республика Калмыкия, 2002, 2011 гг.) [11, 12, 13, 14]. Холера, вызванная *V.* cholerae ctxAB$^-$*tcpA*$^-$ и *V. cholerae ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$, не склонна к эпидемическому распространению.

О диареях, обусловленных атоксигенными холерными вибрионами О1, имеются сообщения M. Picheletal. (2003), Li B. et al. (2014), Mahmud J. et al. (2014) и др. В 2016 г. опубликована информация на сайте http://www.promedmail.org, AProMED-mailpost, Pan American Health Organization/WHO о подтверждении заболевания холерой в Эквадоре, вызванного атоксигенным штаммом *V. cholerae* О1, биовара Эль Тор, серовара Огава. На Украине, в Мелитополе, выявлено двое больных холерой с выделением авирулентных штаммов (http://www.dsesu.gov.ua). При мониторинге за контаминацией холерными вибрионами поверхностных водоёмов в России (2006-2015 гг.) было изолировано из поверхностных водоёмов 676 атоксигенных штаммов *V. cholerae* О1 и *V. cholerae* О139 в 30 субъектах РФ и два токсигенных штамма *V. cholerae* О1 биовара Эль Тор генетически изменённых, содержащих субъединицу В классического холерного вибриона. При секвенировании установлена идентичность указанных штаммов и штаммов из Индии [18].

За период с 1996 по 2015 г. в России (Забайкальский край, 2010 г.; Краснодарский край, 2007 г.; Приморский край, 1997, 1998, 2000, 2003, 2016 гг.; Хабаровский край, 2006 г.; Республика Дагестан, 1998 г.; Республика Калмыкия, 1999, 2012 гг.; Амурская область, 2003 г.; Иркутская область, 2000-2001, 2006 гг.; Московская область, 2014 г.; Ленинградская область, 1999 г.; Новосибирская область, 1998, 2002, 2006 гг.; Ростовская область, 1999, 2006 гг.; Рязанская область, 1998, 2006 гг.) из поверхностных водоёмов, используемых для организованного и неорганизованного рекреационного водопользования, в местах сброса сточных вод, было выделено 33 штамма *V.* cholerae RO-вариантов, атипичных по антигенному составу (по агглютинабельности). Случаев диареи с выделением от больных или вибриононосителей RO-вариантов R-фенотипа холерных вибрионов

(способных агглютинироваться только RO-холерной сывороткой) не зарегистрировано. Штаммы *V. cholerae* с таким фенотипом атоксигенные (ctxA$^-$) и не содержат ген токсин корегулируемых пилей адгезии (tcpA$^-$). Штаммы *V.* cholerae RO-варианты с SR-фенотипом были выделены из объектов окружающей среды и от людей. Они характеризовались способностью вступать в реакцию агглютинации с иммуноглобулинами всех холерных сывороток, включая RO, были гемолизнегативны, содержали гены ctxA и tcpA [19].

Таким образом, в соответствии с действующими в России СП 3.1.1.2521-09, холера может быть обусловлена различными по эпидемической значимости штаммами *V. cholerae* Эль Тор, *V. cholerae* O139, а также *V. cholerae* classical.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Санитарно-эпидемиологические правила. «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». СП 3.1.1.2521-09.
2. Chin Ch-Sh., Sorenson J., Harris J.B. et al. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain. N. Engl. J. 2011; 364:33-42.
3. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A, Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of Vibrio cholerae O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40 (N9):3296-9.
4. Safa A., Bhyian N.A., Nusrin S, Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T. et al. Genetic characteristics of Matlab variants of Vibrio cholerae O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. J. Med. Microbiol. 2006; 55 (Pt 11):1563-9.
5. Pal B.B. Pal B.B., Khuntia H.K., Samal S.K., Kar S.K., Patnaik B. Epidemics of severe cholera caused by El Tor Vibrio cholerae O1 Ogawa possessing the ctxB gene of the classical biotype in Orissa, India. Int. J. Infect. Dis. 2009; 14 (5):384-9.
6. Goel A.K., Jain M., Kumar P., Jiang S.C. Molecular characterization of Vibrio cholerae outbreak strains with altered El Tor biotype from southern India. World J. Microbiol. Biotechnol. 2010; 26 (2):281-7.
7. Fazil M.H, Bhanumathi R., Pandey H.P., Singh D.V. Characterization of Vibrio cholerae O139 belonging to multiple ribotypes and isolated from diarrhoeal patients in Kerala, southern India. Infect Genet Evol. 2011; 11(2):454-9.
8. Rai K.R., Rai S.K., Bhatt D.R., Kurokuwa M., Ono K., Magar D.T. Study of medically important Vibrios in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. Coll. J.* 2012; 14(3):212-5.
9. Bakhshi B., Boustanshenas M., Mahmoudi-Aznaveh A. Emergence of Vibrio cholerae O1 classical biovar in 2012 in Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58(2):145-9.

10. Cholera, 2014. *Wkly Epidem. Rec*. 2015; 90(40):517–29.

11. Актуальные проблемы холеры. Под ред. В.И. Покровского, Г.Г. Онищенко. М.: ГОУВУНМЦМЗРФ, 2000. 384 с.

12. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщ. 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в Южно-Сахалинске. Журн. микробиол. 2000; 5:31-35.

13. Москвитина Э.А., Ломов Ю.М., Подосинникова Л.С., Федоров Ю.М., Водопьянов С.О., Монахова Е.В. Некоторые актуальные вопросы холеры в современный период. Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2006. – вып. 19 .– С.12-16.

14. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С. Ю., Прометной В. И., Монахова Е. В., Водопьянов С. Ю., Дудина Н. А. Холера, обусловленная Vibrio cholerae O1 ctxAB^{-}tcpA+. Журн. микробиол. 2007, 1: 23-29.

15. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martín F., Ibarra C., Binsztein N. Genetic diversity of Vibrio cholerae O1 in Argentina and emergence of a new variant. J. Clin. Microbiol. 2003; 41(1): 124-134.

16. Li B., Tan H., Wang D., Ke B., Chen J., He D., Liu M., Ke C., Zhang Y. Etiologic characteristics of Vibrio cholerae in Guangdong province in 2009-2013. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2014; 35(7): 825-831.

17. Mahmud J., Rashed S.M., Islam T., Islam S., Watanabe H., Cravioto A., Alam M. Type three secretion system in non-toxigenic Vibrio cholerae O1, Mexico. J. Med. Microbiol. 2014; 63(Pt 12): 1760-1762.

18. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. Проблемы ООИ. 2016; 1:20-27.

19. Черепахина И.Я. Антигенная изменчивость холерных вибрионов, выделенных в период седьмой пандемии холеры. Автореферат дисс. на соискание уч. степени д.м.н. - Ростов-на-Дону,2000. – 43 с.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ УПРАВЛЕНИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА ХОЛЕРОЙ В 2015 ГОДУ

М.Ю. Соловьёв[1], Е.В. Ковалёв[1], С.С. Слись[1], С.А. Ненадская[1], А.В. Конченко[1], Н.В. Леоненко[1], С.В. Титова[2], Э.А. Москвитина[2], В.Д. Кругликов[2], А.В. Самородова[2], Н.Л. Пичурина[2]

[1]*Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области, г. Ростов-на-Дону*;
[2] *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону*

В условиях современных эпидемиологических рисков и биологических угроз взаимодействие структур, обеспечивающих санитарно-эпидемиологическое благополучие населения по особо опасным инфекционным болезням, является крайне важным. Деятельность Управления Роспотребнадзора по Ростовской области (далее по тексту - Управление) по разделу эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями направлена на выполнение задач по обеспечению устойчивой эпидемической ситуации в Ростовской области, в рамках межведомственного взаимодействия учреждений Роспотребнадзора - ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» (далее – ФБУЗ ЦГиЭ в РО), его филиалов, Северо-Кавказского территориального отдела Управления Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту, ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора, научно-исследовательских институтов ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (далее – ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора), ФБУН «РостовНИИ микробиологии и паразитологии», министерства здравоохранения Ростовской области, ГОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет», а также других учреждений и организаций.

Управлением осуществляется взаимодействие с ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора в рамках соглашения от 15 мая 2015 года «О взаимодействии и координации деятельности ФКУЗ Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека - Референс-центра по мониторингу холеры - с Управлением и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» по обеспечению санитарно-

эпидемиологического благополучия населения по холере.

Ростовская область относится к первому типу территорий по эпидемическим проявлениям холеры. Работа проводится в соответствии с «Комплексным планом противохолерных мероприятий на территории Ростовской области на период 2013–2017 гг.» (утвержденный 22.02.2013 г. Руководителем Управления), согласованным с ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, который ежегодно корректируется.

ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора осуществляет молекулярно-генетические исследования и идентификацию возбудителей холеры из окружающей среды и от людей, оказание практической помощи при проведении диагностических лабораторных исследований по эпидпоказаниям, оказание консультативно-методической и практической помощи лечебно-профилактическим организациям (далее – ЛПО) при развертывании спецгоспитальной базы и бактериологических лабораторий и оценку их готовности к эпидсезону.

В канун эпидсезона 2015 г. специалистами Управления проведена оценка готовности лабораторной и госпитальной базы ЛПО, в том числе, совместно с ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, 22 учреждений с оценкой их готовности к развёртыванию в случае возникновения осложнений эпидемической ситуации по холере, по вопросам соблюдения биологической безопасности работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности. В ходе оценки установлено, что оперативные планы, схемы оповещения, функциональные обязанности медработников, памятки по особо опасным инфекциям, укладки для забора материала от больных с подозрением на особо опасные инфекции имеются в ЛПО городов и районов и соответствуют нормативным документам; инфекционные отделения укомплектованы защитной одеждой, снабжены запасом дезинфекционных средств для проведения мероприятий при возникновении единичных случаев особо опасных инфекций. Руководителям Управлений здравоохранением муниципальных образований и главным врачам ЛПО даны рекомендации по доукомплектованию штата врачами-инфекционистами, определены мероприятия и сроки пополнения в требуемом количестве средствами этиотропной и патогенетической терапии, дезинфекционными средствами и др.

В рамках Государственного заказа Управлением организуется мониторинг циркуляции холерных вибрионов из 166 стационарных точек в зонах санитарной охраны водных объектов, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового назначения, в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод, местах организованного и неорганизованного рекреационного водопользования, а также из водоемов, берущих начало из сопредельных с Российской Федерацией территорий. Перечень стационарных точек отбора проб воды открытых водоёмов для

исследования на наличие вибриофлоры регулярно один раз в год утверждается Главным государственным санитарным врачом по Ростовской области (Руководителем Управления) и согласовывается с директором ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора. Директор ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора является членом областной и городской комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при Правительстве Ростовской области и Администрации города Ростова-на-Дону.

Специалисты ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора осуществляют отбор и исследование на холеру проб воды открытых водоёмов из точек, закреплённых за институтом.

В рамках взаимодействия осуществлялся отбор и исследование проб воды поверхностных водоёмов в связи с выделением атоксигенных (токсигенных) штаммов холерных вибрионов в 2011-2015 гг.

Все специалисты ЛПО со средним медицинским образованием проходят обучение на семинарах, на очно-заочных циклах, проводимых совместно со специалистами ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора на базе ФБУЗ ЦГиЭ в РО.

Управлением совместно с ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, МЗ РО и ГБОУ ВПО Ростовским государственным медицинским университетом проведены областные и кустовые семинары-совещания (04.03.2015, 11.03.2015 и 18.03.2015) со специалистами территориальных отделов Управления, филиалов ФБУЗ ЦГиЭ в РО и медицинскими работниками ЛПО (в том числе ССП) по вопросам: «Профилактика инфекционных заболеваний и «сигнальные признаки» особо опасных болезней и другие актуальные инфекции, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории».

Научно-практическое сотрудничество осуществляется в рамках договоров: «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации», «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоёмов города Ростова-на-Дону» и организация и проведение ежегодного заседания Проблемной комиссии 48.04. «Холера и патогенные для человека вибрионы».

Таким образом, в Ростовской области создана система эпидемиологического надзора за холерой, позволяющая в рамках взаимодействия эффективно реализовывать приоритетные направления в условиях современных эпидемиологических рисков и биологических угроз и проводить мероприятия по санитарной охране территории.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ В 2015 Г.: РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, Л.Я. Урбанович, С.К. Миткеева, А.С. Гладких, С.И. Феранчук

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

В последние годы эпидемиологическая обстановка по холере в мире претерпела существенные изменения, что обусловлено как нарастанием мировых транспортных потоков (в т.ч. с неблагополучными по холере странами), так и изменением биологических свойств возбудителя в сторону повышения патогенного потенциала. Ежегодно, наряду с эпидемическими осложнениями на эндемичных территориях, регистрируются межгосударственные и трансконтинентальные заносы инфекции [3]. На Американском континенте в настоящее время продолжается эпидемия на о. Гаити, где с момента начала осложнений в 2010 г. зарегистрировано свыше 700 тыс. случаев заболевания с 9 тыс. летальных исходов [8-13]. С 2012 г. в этом регионе наблюдается снижение интенсивности эпидпроцесса и в 2015 г. на островах Гаити и Куба зарегистрировано 36654 случаев холеры [7]. Число зарегистрированных на Африканском континенте случаев характеризуется тенденцией к снижению, однако доля выявленных здесь заболевших в общей структуре мировой заболеваемости холерой возрастает. Крупные вспышки в 2015 г. зарегистрированы в Нигерии, Мозамбике, Демократической Республике Конго, Южном Судане [4]. В текущем году по состоянию на 22 апреля в 23 провинциях Танзании выявлено 24108 случаев заболевания холерой [6].

С 2014 г. наблюдается увеличение числа заболевших холерой в странах Азии [4, 9]. Неблагополучная обстановка по холере складывается в Индии, Непале, Иране, Афганистане, Пакистане, на Филиппинах [4, 5]. В 2015 г. крупная вспышка холеры с регистрацией 2810 больных протекала в Ираке [3, 4]. Несмотря на нестабильную в отношении холеры обстановку в странах Азиатского региона, с которыми установлены торгово-экономические и туристические связи, в Сибири и на Дальнем Востоке эпидосложнения были зарегистрированы лишь в конце прошлого столетия [2] и оказались обусловлены генетически изменёнными вариантами вибриона Эль Тор [1].

В рамках эпидемиологического надзора за холерой в 2015 г. в субъектах Сибири и Дальнего Востока на наличие возбудителя холеры обследовано 10895 человек (10302 – больные ОКИ, 27 – умершие от

острой кишечной инфекции и 566 – обследованные на вибриононосительство) с отрицательными во всех случаях результатами бактериологического анализа.

При мониторинговых исследованиях поверхностных водоёмов Сибири и Дальнего Востока в 2015 г. отобрано 17678 проб, из них воды – 16333, ила – 1339, гидробионтов – 6. На территории, относящейся ко II типу по эпидемическим проявлениям холеры (Приморский край), исследовано 2789 проб (15,8 %). В субъектах III типа А и Б подтипов исследовано 53,5 % (9454 пробы) и 26,7 % (4722 пробы) соответственно. В регионах III типа подтипа В исследовано 4 % (713 пробы) от общего количества отобранных проб.

В результате исследований изолировано восемь штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы и 1091 *V.*cholerae не O1/O139 серогрупп. Один штамм *V.cholerae El Tor* O1 изолирован из воды Чертугеевского залива Иркутского водохранилища в г. Иркутске и семь – из воды и ила рек Чита, Борзя, Ингода и оз. Кенон в Забайкальском крае. Что касается *V.*cholerae не O1/O139, то значительная их часть (90,1 % – 992 штамма) выделена в субъектах, относящихся к III типу, А, Б подтипам по эпидемическим проявлениям холеры и 8 % (88 штаммов) – на территории II типа.

По микробиологическим свойствам все изолированные штаммы *V. cholerae O1 El Tor* характеризуются типичными культурально-морфологическими, биохимическими свойствами, агглютинируются холерной диагностической O1 и сероваростпецифической Инаба сыворотками, чувствительны к фагу Эль Тор и к цельному или начальным разведениям классического фага, резистентны к ряду антибактериальных препаратов тетрациклинового ряда, аминогликозидам, производным нитрофуранов.

Молекулярно-генетический анализ штаммов *V. cholerae El Tor* O1 показал отсутствие у них генов холерного токсина *ctxAB* и токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* при наличии гена-регулятора *toxR* и видоспецифического гена *hlyA*. В геноме всех штаммов установлено присутствие дополнительных детерминант патогенности, в т.ч. генов цитотоксического комплекса (MARTX) (*rtxA, rtxC*), гемагглютининпротеазы (*hapA*) и персистенции холерного вибриона (*mshA, mshQ, vpsR*). По комплексу фрагментов «островов пандемичности» *tnp0183, pro0490* штаммы расценены как негативные, за исключением изолированного в г. Иркутске *V. cholerae O1* (*tnp0183*$^{+}$*pro490*$^{-}$).

При MLVA- и PFGE-типировании изолированных в 2015 г. *V. cholerae El Tor* установлены как уникальные, так и сходные или идентичные по структуре аллельные профили и пульс-электротипы. Выделенный в г. Иркутске штамм характеризуется уникальным MLVA-генотипом (VcA12VcB0VcC11VcD6VcG2) и PFGE-профилем. При проведении эпидрасследования по факту обнаружения вибриона Эль Тор в

зоне неорганизованного рекреационного водопользования Иркутского водохранилища выявлены несанкционированные стоки на рельеф с дальнейшим формированием канала, впадающего в водохранилище. При расширении точек отбора проб и увеличении кратности исследования холерный вибрион из проб воды Чертугеевского залива выделен не был. Однократное обнаружение вибриона Эль Тор, данные молекулярно-эпидемиологического анализа позволяют предположить его заносное происхождение.

В соответствии с результатами типирования изолированных в Забайкальском крае штаммов, четыре из них (выделенные на территории из оз. Кенон и р. Чита) характеризуются идентичными VNTR-генотипами (VcA16VcB0VcC11VcD3VcG2), совпадающими с генотипами штаммов, выделенных на данной территории ранее (2009-2014 г.). Две культуры *V. cholerae El Tor* из р. Борзя имеют аллельный профиль VcA4VcB0VcC11VcD3VcG2, сходный с таковым у изолятов 2012-2013 гг. из р. Борзя. Эти данные свидетельствуют о возможно длительном пребывании вибрионов в объектах окружающей среды края и микроэволюционных преобразованиях в процессе их персистенции в экологических нишах.

Используемое для ускоренной идентификации микроорганизмов MALDI-ToF масс-спектрометрическое профилирование по спектру константных белков во всех случаях подтвердило результаты бактериологической идентификации изолированных штаммов *V. cholerae El Tor*: полученные значения индекса «maxscore» от 2,437 до 2,603 свидетельствуют о достоверной идентификации культур до вида.

В качестве другого прикладного аспекта применения MALDI-ToF масс-спектрометрии рассматривается анализ продуктов реакции минисеквенирования, использующейся для исследования точечных однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs) в геноме различных микроорганизмов. Разработанный нами метод оперативного выявления генетически изменённых вибрионов Эль Тор (характеризующихся наличием SNPs в гене субъединицы В холерного токсина) на платформе MALDI-ToFMS показал высокую эффективность как при исследовании контрольных штаммов, так и при анализе SNP в данном гене у изолятов периода эпиодсложнений на различных этапах седьмой пандемии в Сибири и на Дальнем Востоке.

Филогеографическое исследование путей заноса возбудителя холеры на территорию Сибири и Дальнего Востока показало, что изолированные в 1990-е гг. в заносных очагах и при ассоциированных с заносом вспышках холеры штаммы *V. cholerae El Tor* входят в клады второй и третьей волн глобального распространения инфекции. Сопоставление результатов анализа с эпидемиологическими данными свидетельствует о прямом или опосредованном (через вторичные очаги) импорте возбудителя в регион с

эндемичных территорий Южной Азии.

Таким образом, результаты анализа эпидемиологической обстановки по холере в Сибири и на Дальнем Востоке, проведенного на основании оценки ситуации в мире, с учетом особенностей проявлений на курируемой территории, свидетельствуют о высоком риске завоза инфекции из-за рубежа с возможным накоплением возбудителя в поверхностных водоёмах, что требует совершенствования мониторинговых исследований с внедрением современных технологий в лабораторную диагностику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae eltor* при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке // Журн. микробиол. - 2011. - №5 - С. 12-18
2. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Маслов Д.В. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Владивостоке // Журн. микробиол. – 2000. - № 5. – С. 26-31
3. Опасные инфекционные болезни за рубежом. Периодическая информация. – 2015-106. - № 12-1. – с. 2
4. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и в России в 2006 – 2015 гг., прогноз на 2016 г. // Пробл. особо опас. инф.- 2016 – Вып.1. – стр. 20-27.
5. Cholera, diarrhea & dysentery update 2016 (15): Africa, Asia, 2016 [Internet]. 09 Apr 2016 [cited 09 Apr 2016]. Archive number: 20160409.4148945. Available from: http://www.promedmail.org.
6. Cholera, diarrhea & dysentery update 2016 (18): Africa, 2016 [Internet]. 22 Apr 2016 [cited 22 Apr 2016]. Archive number: 20160425.4182547. Available from: http://www.promedmail.org.
7. Cholera, diarrhea & dysentery update 2016 (09): Africa, Asia, Americas, 2016 [Internet]. 14 Mar 2016 Archive number: 20160314.4089721. Available from: http://www.promedmail.org.
8. 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
9. Weekly epidemiological record – 2015. - Vol. 90, № 40 - P.517-544.
10. Weekly epidemiological record – 2014. - Vol. 89, № 31 - P.345-356.
11. Weekly epidemiological record – 2013. - Vol. 88, № 31-32 - P.321-336.
12. Weekly epidemiological record – 2012. - Vol. 87, № 31-32 - P.289-304.
13. Weekly epidemiological record – 2011. - Vol. 86, № 31 - P.325-340.

ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2015 ГОДУ

С.М. Иванова[1], Г.В. Титов[1], В.В. Иванников[1], В.Е. Безсмертный[1], С.В. Титова[2], В.Д. Кругликов[2], Э.А. Москвитина[2], Е.В. Монахова[2], Д.А. Левченко[2],Н.Б. Непомнящая[2], А.С. Водопьянов[2], С.О. Водопьянов[2], И.В. Архангельская[2], Н.Е. Гаевская[2]

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

В течение 2015 года на территории шести субъектов Российской Федерации из поверхностных водоемов изолировано 127 гемолизположительных нетоксигенных штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы биовара Эль Тор сероваров Огава и Инаба:

- Республика Калмыкия – 8 штаммов (г. Элиста – река Элистинка, пруды Заячий и Колонский; село Вознесеновка – пруд);
- Забайкальский край – 7 штаммов (г. Чита – реки Чита и Ингода, озеро Кенон; г. Борзя – река Борзянка);
- Краснодарский край – 107 штаммов (г. Сочи – река Агура, минеральный источник, Чёрное море);
- Иркутская область – 1 штамм (г. Иркутск – Чертугеевский залив Иркутского водохранилища);
- Ростовская область – 3 штамма (г. Ростов-на-Дону – реки Дон и Темерник);
- Челябинская область – 1 штамм (Красноармейский район, г. Копейск, пос. Старокамышинск – озеро Курочкино).

В лабораториях противочумных учреждений Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в субъектах» Роспотребнадзора изолировано 112 (88,2 %) и 15 (11,8 %) штаммов соответственно.

Определяющими общую характеристику холерных вибрионов явились штаммы, изолированные в Краснодарском крае, г. Сочи, Хостинском районе из реки Агура в августе-сентябре 2015 года (107 из 127 или 84,3 % от изолированных на территории Российской Федерации). Данная ситуация предположительно связана с контаминацией подземного горизонта минеральной сульфидной воды с последующим поступлением последней в р. Агура. Имевшие место ливни в начале июля в г. Сочи могли явиться пусковым механизмом нарушения санитарно-экологических условий в районе р. Агура.

Все культуры изолированы из проб воды (126) и иловых отложений

(1) поверхностных водоёмов. Из проб речной воды изолировано 112 штаммов (88,2 %), прудовой и озёрной – 6 (4,7 %), морской – 7 (5,5 %), минерального источника – 2 штамма (1,6 %). Наибольшая частота изоляции холерных вибрионов О1 Эль Тор отмечена в августе – 70,1 % и сентябре – 22,8 %. В июне и июле изолировано 3,9 % и 3,2 % штаммов соответственно. Первые штаммы были выделены в Ростовской области – в пробах от 3 июня, последний штамм – в Краснодарском крае в пробе от 25 сентября.

Все штаммы, как при выделении, так и при последующей идентификации в Референс-центре по мониторингу холеры, агглютинировались до титра или ½ титра О1 холерной диагностической сывороткой и одной из серовароспецифических сывороток. В числе изученных штаммов серовар Огава составил 7,9 % (10 штаммов), Инаба – 92,1 % (117). При этом выделение холерных вибрионов серовара Огава регистрировалось на территории двух (Республика Калмыкия и Ростовская обл.), а Инаба – на территории пяти субъектов.

Все штаммы протестированы в ПЦР, не содержали гена ctxA и большинство гена tcpA (за исключением трёх, выделенных в Республике Калмыкия), а также лизировали эритроциты барана в пробе Грейга, как при выделении, так и при последующем изучении в Ростовском-на-Дону противочумном институте.

Доля атипичных по биологическим свойствам культур составила 94,5 % (в 2014 г. – 73,7 %). Типичными по основным тестам при выделении или при последующей идентификации были штаммы, изолированные в Республике Калмыкия (3), Забайкальском крае (2) и Ростовской области (2).

Выделение атипичных культур регистрировалось на протяжении всего периода и отмечено в водоёмах всех видов, показатель изменчивости для сероваров Огава и Инаба составил соответственно 50,0 и 98,3 %.

Среди атипичных (120) фоновыми были культуры, в различной степени резистентные к диагностическому фагу Эль Тор – 100% (по результатам окончательного исследования в Ростовском-на-Дону НИПЧИ). 1 культура (0,8 %) была атипична по протеолитической активности, 2 (1,7 %) – по продукции ацетоина. В результате на долю изменённых по комплексу признаков пришлось 2,5 %. В отношении к общему числу выделенных культур (127) эти показатели составили соответственно 94,5 – 0,8 – 1,6 – 2,4 %.

По результатам типирования фагами Дрожевкиной-Арутюнова в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте принадлежность к фаговару определена для семи штаммов: Республика Калмыкия – пруд Колонский (4 фаготип), пруд Заячий (15 и 17 фаготип), река Элистинка (13 фаготип), пруд села Вознесеновка (13 фаготип); Забайкальский край – река Борзянка (15), река Чита(19). При тестировании

штаммов, изолированных в Краснодарском крае, Ростовской и Челябинской областях, фаготип не был определен.

Атоксигенные штаммы холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированные в 2015 г., были изучены с помощью ПЦР–генотипирования с использованием подобранного оптимального набора, состоящего из 14 генов **(**rstA, tcpA, int, nan H, vce, rtxC, acd-rtxA, acd-vgrG1, pbd- vgrG3, vasK, vcsN2, vspD, mshA, stn/sto), по разработанной экспериментальной программе, предназначенной для определения наличия/отсутствия детерминант дополнительных токсинов и их комбинаций при генотипировании. Был проведен анализ сходства и различия атоксигенных штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы, в том числе изолированных в 2015 г. Это позволило разделить 207 штаммов, изолированных на территории Российской Федерации с 1991по 2015 г., на 64 генотипа (A1-A9, B1-B6, C1-C9, D1-D4, I1, F1-F10, E1, G1-G12, J1-J3, H1-H3, F11-F15).

Штаммы 2015 г., выделенные в Ростовской области, относились к генотипам A1, A2, G-1; выделенные в Республике Калмыкия – к J2, J3, G9, B3; в Ростовской области – к G1; в Краснодарском крае – к F14 и F-11. Это дало возможность выделить штаммы с разными генотипами среди одинаковых по фенотипическим признакам.

При изучении чувствительности культур холерных вибрионов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом не зарегистрировано устойчивых к ципрофлоксацину, хлорамфениколу, таривиду, офлоксацину, таривиду, налидиксовой кислоте, минимальная резистентность отмечена к цефотаксиму, цефтриаксону,тетрациклину, максимальная – к фуразолидону, доксициклину, канамицину, триметоприму/сульфаметоксазолу.

Случаев инфицирования людей возбудителем холеры в Российской Федерации в 2015 году не зарегистрировано.

Таблица 1. Характеристика культур холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Российской Федерации в 2015 году

№ п/п	Административная территория	Источник выделения	Всего изучено культур	В том числе по ТЕСТАМ ИДЕНТИФИКАЦИИ*														В том числе АТИПИЧНЫХ*							
				О1 СЕРОВАР				О139	ГЕМОЛИЗ*		ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ							ВСЕГО**	по СЕРОВАРАМ**			по ТЕСТАМ**			
											ПЦР				Комплексным етод										
											ctx		tcp												
				Огава	Инаба	R-вариант	Гикошима		-	+	+	-	+	-	изучено	лизис фагами			Огава	Инаба	R-вариант	фаг эльтор	агглютинация О1 сыворотк.	желатина	Фогес-Проскауэр
																ctx+	ctx-								
1.	Республика Калмыкия	вода	8	7	1	-	-	-	-	8	-	8	3	5	-	-	-	5	4	1	-	5	-	-	-
2.	Забайкальский край	вода	6	-	6	-	-	-	-	6	-	6	-	6	-	-	-	5	-	5	-	5	-	-	-
		ил	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3.	Краснодарский край	вода	107	-	107	-	-	-	-	107	-	107	-	107	-	-	-	107(1)	-	107(1)	-	107(1)	-	-	1(1)
4.	Иркутская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	1(1)	-	1(1)	-	1(1)	-	1(1)	-
5.	Ростовская обл.	вода	3	3		-	-	-	-	3	-	3	-	3	1	-	1	1	1	-	-	1	-	-	-
6.	Челябинская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1(1)	-	1(1)	-	1(1)	-	-	1(1)
ИТОГО по Российской Федерации		Всего	127	10	117	-	-	-	-	127	-	127	3	124	2	-	1	120(3)	5	115(3)	-	120(3)	-	1(1)	2(2)
		% 2015 г.		7,9	92,1	-	-	-	-	100,0	-	100,0	2,4	97,6	1,6	-	1	94,5	50,0	98,3	-	94,5	-	0,8	1,6
		% 2014 г.		63,2	34,2	2,6	-	-	2,6	97,4	2,6	97,4	2,6	97,4	100,0	-	-	73,7	95,8	30,8	2,6	71,1	2,6	2,6	0
Отношение 2015 г. / 2014 г.				-8р.	+2р.													+1,3р.	-1,9р.	+3,2р.		+1,3р.			

Примечание: * – данные по результатам изучения в НИПЧИ;
** – в скобках в сочетании с другими признаками

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ МЕРОПРИЯТИЙ УПРАВЛЕНИЕМ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА ХОЛЕРОЙ И ДРУГИМИ ОСОБО ОПАСНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В СЕЗОН 2015 ГОДА

М.Ю. Соловьёв, Е.В. Ковалёв, С.А. Ненадская, Ю.В. Рыжков, С.С. Слись, Н.В. Леоненко, Г.А. Мирошниченко, Л.В. Лемешева, В.Ф. Карташов

Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области, г. Ростов-на-Дону

Управление Роспотребнадзора по Ростовской области (далее - Управление) осуществляет эпидемиологический надзор за холерой, а также организует и проводит комплекс профилактических и противоэпидемических мероприятий с целью предупреждения заноса и распространения холеры на территории области в соответствии с Международными медико-санитарными правилами (2005 г.); постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 18 апреля 2011 г. № 32 «О противоэпидемических мерах и профилактике холеры в Российской Федерации»; программными мероприятиями «По обеспечению санитарной охраны территории и предупреждению особо опасных инфекций среди населения Ростовской области», утвержденными Заместителем Губернатора Ростовской области; комплексными планами мероприятий «По предупреждению заноса и распространения холеры в городах и районах», утвержденными постановлениями руководителей муниципальных образований; санитарно-эпидемиологическими правилами СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» и другими нормативно-методическими документами.

Ежегодно корректируется Комплексный план противохолерных мероприятий на территории Ростовской области на период 2013–2017 гг. (утвержденный 22.02.2013 г. Главным государственным санитарным врачом по Ростовской области), с уточнением и утверждением состава, структуры и функций городских и районных медицинских штабов на случай выявления особо опасных инфекционных заболеваний, а также оперативные планы проведения противоэпидемических мероприятий при выделении из объектов окружающей среды токсигенных холерных вибрионов О1 или О139 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 профилактических и противоэпидемических мероприятий по холере и другим особо опасным и природно-очаговым инфекциям ежегодно заслушиваются на заседаниях комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при Правительстве Ростовской области, в том числе в 2015 году - «О мероприятиях по санитарной охране территорий от заноса и распространения инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории» (протокол № 2 от 15.04.2015 г.); аналогичные комиссии проводятся во всех административных территориях области.

За период 1996-2015 гг. случаев заболевания холерой или вибриононосительства на территории Ростовской области не зарегистрировано. Последний случай заболевания холерой, вызванный токсигенным штаммом холерного вибриона, был зарегистрирован в 1995 г. в городе Ростове-на-Дону.

Ростовская область относится к территории первого типа по эпидемическим проявлениям холеры. Мероприятия проводятся комплексно всеми службами и референс-центром по холере – ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (далее – ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора).

Ежегодно Управлением с мая по сентябрь организуется (в рамках Государственного заказа) мониторинг воды открытых водоёмов за циркуляцией холерных вибрионов в зонах санитарной охраны водных объектов из 153 основных и 13 дополнительных точек, силами ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РО» (далее – ФБУЗ ЦГиЭ в РО), а также из определённых 6 точек ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора, 4 - ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция», 5 - СЭО СКВО. Дополнительно определено 13 точек для отбора проб воды из Азовского моря, акватории, граничащей с Украиной, также в районе трёх детских оздоровительных лагерей реки Калитва.

ФБУЗ ЦГиЭ в РО при проведении лабораторных исследований на вибриофлору проб воды, отобранных из поверхностных водоёмов, с 05.05.2015 по 28.09.2015 г. отобрано 3613 проб (7226 исследований), из которых в 616 выявлены Vibrio cholerae non O1, non O139 I и II гр. Хейберга, или 17,0 %.

Кроме того, 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 РостНИПЧИ Роспотребнадзора и идентифицированы как атоксигенные штаммы Vibrio cholerae O1 eltor Ogawa - из стационарных точек № 3 (г. Ростов-на-Дону, река Темерник, мост Текучёва) и № 4 (г. Ростов-на-Дону, река Дон, у железнодорожного моста) - дата забора – 01.06.2015.

Лабораторией ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора выделена атоксигенная культура из стационарной точки № 1 (г. Ростов-на-Дону, река Дон, правый берег, у Державинского спуска, место сброса аварийных стоков) Vibrio cholerae O1 eltor Ogawa № 90 (дата забора – 20.07.2015).

Управлением принимались меры оперативного реагирования по поиску источников контаминации водоёмов согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации».

Управлением совместно с МЗ РО, ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора и ГБОУ ВПО Ростовским государственным медицинским университетом проведены ежегодные плановые областные и кустовые семинары-совещания со специалистами территориальных отделов Управления, филиалов ФБУЗ ЦГиЭ в РО и медицинскими работниками ЛПО (в том числе ССП) по вопросам: «Профилактика инфекционных заболеваний и «сигнальные признаки» особо опасных болезней и другие актуальные инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории».

Управление регулярно направляет информацию в Департамент инвестиций и предпринимательства Ростовской области, а также доводит до сведения фирм и агентств, занимающихся туроператорской или турагентской деятельностью, информацию 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 2015 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.

За 2015 год прошли медицинское освидетельствование 30894 иностранных гражданина. По официальным статистическим данным за 2015 год зарегистрирован 101 случай инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих (за 2014 год - 48), в том числе ВИЧ-инфекцией – 24 (25), туберкулезом – 27 (9), инфекциями, передающимися преимущественно половым путём – 50 (14).

По данным статистической формы учёта заболеваемости среди граждан, прибывших в Российскую Федерацию в связи с гуманитарной ситуацией на Украине (введена с июля месяца 2014 года), за 2015 год зарегистрировано 57 случаев инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих, в том числе ВИЧ-инфекция

– 19, туберкулез – 35, сифилис - 3. Медицинское освидетельствование прошли 20084 гражданина Украины.

Подготовлено и направлено в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 120 проектов решений о нежелательности пребывания иностранных граждан или лиц без гражданства на территории РФ. Роспотребнадзором принято 67 решений о нежелательности пребывания (проживания) иностранного гражданина или лица без гражданства на территории РФ.

По данным УФ МС России по Ростовской области за 2015 год покинули территорию Российской Федерации 22 иностранных гражданина, у которых выявлены опасные инфекционные заболевания (ВИЧ-инфекция, туберкулез и сифилис). За 2015 года мигранты из Ростовской области не депортировались.

Сведения о количестве иностранных граждан и лиц без гражданства, прошедших медицинское освидетельствование, ежемесячно направляются в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Совместно с МЗ РО организовано лечение иностранных граждан и лиц без гражданства (10 чел.), также граждан, прибывших в Российскую Федерацию в связи с гуманитарной ситуацией на Украине (34 чел.), у которых выявлены инфекции, передающиеся преимущественно половым путём, туберкулез и другие инфекционные заболевания.

На базе ФБУЗ ЦГиЭ в РО за 2015 год прошли гигиеническое обучение 369 иностранных граждан, в т. ч. 203 человека, занятых в организациях торговли и общественного питания, 18 работников бытового обслуживания населения, 102 сотрудника, занимающихся воспитанием и обучением детей, 7 медработников, 32 разнорабочих, 3 бухгалтера, 4 специалиста.

Санитарная охрана территории Российской Федерации, как компонент защиты Государственной границы, является частью системы обеспечения безопасности Российской Федерации. Она направлена на предупреждение заноса и распространения на территории нашей страны инфекционных заболеваний, представляющих опасность для населения, а также на предотвращение ввоза на территорию Российской Федерации и реализации на территории РФ товаров, химических, биологических и радиоактивных веществ, отходов и иных грузов, представляющих опасность для человека.

Ключевым элементом в системе санитарной охраны территории служит санитарно-карантинный контроль (далее СКК).

На территории Ростовской области находится 15 пунктов пропуска через государственную границу. В 13 из них (в 3 морских, 2 воздушных и 8 автомобильных) СКК осуществляет Управление Роспотребнадзора по Ростовской области и в 2 - территориальный отдел Управления

Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту.

Контрольные показатели в 2015 году выглядят следующим образом: в пунктах пропуска в соответствии с рисками для санитарно-эпидемиологического благополучия населения проведён санитарно-карантинный контроль 35937 транспортных средств; по факту выявленных нарушений при санитарно-карантинном контроле транспортных средств составлено 375 протоколов об административных правонарушениях; на наличие инфекционных заболеваний досмотрено 1027212 лиц, выявлено 560 чел. больных или подозрительных на инфекционное заболевание (в том числе среди организованных и неорганизованных групп детей, следовавших в оздоровительные детские лагеря РФ из приграничных субъектов Украины); в отношении таможенных органов осуществлен санитарно-карантинный контроль и оценка 436 партий грузов и товаров; в соответствии с Международными медико-санитарными правилами в 2015 году выдано 424 свидетельства об освобождении судна от санитарного контроля и 22 свидетельства о прохождении судном санитарного контроля.

В 2015 году, как и ранее, работа по разделу «Санитарная охрана территории» строилась в соответствии с разработанной системой управления рисками с целью установления возможности, тяжести вероятного события в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения и определения адекватности применения тех или иных медико-санитарных мер для их ликвидации или минимизации.

В период совершения паломничества Управлением в 2015 году был усилен санитарно-карантинный контроль по выявлению лиц, следующих в Саудовскую Аравию транзитными или трансферными авиарейсами. С целью создания настороженности у экипажей авиакомпаний: «Арабские авиалинии», «Турецкие авиалинии», «Чешские авиалинии» и др., на которых не исключалась возможность прибытия на территорию Ростовской области трансферными рейсами паломников, через представителей этих авиакомпаний проводились инструктажи бортпроводников по сигнальным симптомам проявления и профилактике инфекционных заболеваний, в т.ч. по короновирусной инфекции и лихорадке Эбола. Всего проведено 59 таких инструктажей, которыми было охвачено 358 человек. За период проведения хаджа по выявлению паломников досмотрено 66 воздушных судов и 7032 пассажиров.

С целью формирования настороженности в отношении лихорадки Эбола у служащих ГКО (таможня и погранслужба), работников аэропорта (служба авиационной безопасности и пассажирских перевозок), экипажей ВС и представительств авиакомпаний обучено 5295 должностных лиц.

В пунктах пропуска водного, воздушного и автомобильного транспорта обучением по сигнальным признакам проявления опасных инфекционных болезней и профилактики заболеваний охвачено 2998 служащих государственных контрольных органов.

В период с февраля по июнь 2015 года в 3 пунктах пропуска водного, 8 автомобильного и 2 авиационного транспорта двумя циклами проведено 25 учений по локализации и ликвидации очага, подозрительного на заболевание опасной инфекционной болезнью (лихорадка Эбола, Ближневосточный респираторный синдром, холера), с вводом условного больного на водном судне, пассажирском автобусе и пассажирском воздушном судне. Основные цели проведения учений – дальнейшая отработка взаимодействия с государственными контрольными органами (КПП погранвойск, таможенных постов), администрациями ПП, судовладельцами, территориальной сетью здравоохранения, головным и территориальными подразделениями ФБУЗ, нарабатывание алгоритма проведения первичных противоэпидемических мероприятий в пунктах пропуска.

В связи с массовым прибытием организованных и неорганизованных групп детей из приграничных областей юга Украины в июле - сентябре на отдых в субъекты Российской Федерации, в пунктах пропуска автомобильного транспорта на российско-украинской границе многократно возросла нагрузка на специалистов СКП. Управлением проведено усиление за счёт других СКП как специалистами, так и приборами дистанционного измерения температуры кожных покровов. При контроле 620 организованных групп обследовано 18145 детей и сопровождающих, при этом выявлено тепловизорным оборудованием 387 лиц с симптомами, не исключающими инфекционное заболевание, а 34 человека были возвращены на территорию приграничных областей Украины по причине наличия инфекционного (паразитарного) или другого заболевания, при котором может произойти обострение соматического заболевания (микроспория, чесотка, педикулёз, психоневрология). Все выявленные больные с симптомами, не исключающими проявления инфекционного заболевания, также были обследованы медицинскими работниками в составе специальных медицинских бригад территориальной сети здравоохранения и МЧС.

В рамках приграничного взаимодействия осуществлялся ежемесячный обмен информацией по инфекционной заболеваемости и результатам санитарно-карантинного контроля с Донецкой и Луганской областными санэпидстанциями.

В связи с объявлением Всемирной организацией здравоохранения чрезвычайной ситуации по лихорадке Зика, представляющей угрозу общественному здравоохранению, первоочередной задачей Роспотребнадзора по данному направлению являются меры по недопущению завоза лихорадки Зика на территории Российской Федерации. В декабре 2015 года были приняты дополнительные меры по усилению санитарно-карантинного контроля в части активного выявления лиц, прибывших из эндемичных регионов, проработаны вопросы по

дезинсекционной обработке морских и воздушных судов

Специалисты Управления по заданию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека также оказывали практическую помощь по организации санитарно-карантинной службы странам, вступившим в Евразийский экономический союз, путём командирования специалистов в Армению и Киргизию и проведения обучения специалистов, осуществляющих санитарно-карантинный контроль.

В связи с вышеизложенным, предупреждение появления и распространения инфекционных заболеваний, требующих проведения комплекса мероприятий по санитарной охране территории, является одним из приоритетных направлений в деятельности Управления и важным звеном в обеспечении эпидемиологической безопасности населения Ростовской области.

ЭПИДМОНИТОРИНГ ХОЛЕРЫ КАК СОСТАВЛЯЮЩАЯ ЧАСТЬ ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УПРАВЛЕНИЯ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

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

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

По данным Всемирной организации здравоохранения (далее ВОЗ) и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (далее Роспотребнадзор) седьмая пандемия холеры в настоящее время не характерна для резервационного становления возбудителя инфекции, то есть перехода из предрезервационной фазы в фазу резервации. В последние годы отчётливо отмечается тенденция передвижения большого количества населения с одного континента на другой, и, как следствие, настоящая пандемия холеры характеризуется интенсивным и широкомасштабным распространением в Африке, Азии, Америке с межгосударственным и межконтинентальным заносом инфекции в Европу, где разлитой эпидемический процесс во времени и пространстве обусловлен генетически изменёнными вариантами *Vibrio cholerae El Tor*[1, 2].

Деятельность ФБУЗ «ЦГиЭ в РО» (далее Центр) и его филиалов по профилактике особо опасных болезней, к которым, безусловно, относится холера, направлена на проведение эпидемиологического мониторинга

объектов окружающей среды на вибриофлору, обеспечивая деятельность управления Роспотребнадзора по Ростовской области (далее управление) по реализации задач по полному комплексу неотложных мер профилактики холеры [2].

Для реализации поставленных задач ежегодно лабораторией особо опасных инфекций Центра и бактериологическими лабораториями филиалов Центра в эпидсезон по холере (с мая по сентябрь) проводятся исследования воды поверхностных водоёмов в санитарно-защитных зонах водозаборов для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, в местах сброса сточных вод, организованного рекреационного водопользования, а также исследования клинического материала от больных ОКИ и других контингентов, подлежащих обследованию на холеру в соответствии с требованиями СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» [5].

Ростовская область относится к первому типу территорий по

эпидемическим проявлениям холеры, в связи с чем проведение мероприятий по эпидемиологическому надзору за холерой осуществляется комплексно всеми органами и организациями Роспотребнадзора [2, 4].

Управлением и специалистами Центра откорректирован комплексный план противохолерных мероприятий на территории Ростовской области на период 2013–2017 гг., состав, 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 О1 или О139 серогрупп и проведения первичных противоэпидемических мероприятий при выявлении больного (трупа) с подозрением на холеру на территории области.

С целью оперативного принятия решений о профилактических и противоэпидемических мероприятиях (управленческие решения) при выявлении больных с подозрением на ООИ, в том числе холеру, определён порядок предоставления экстренных извещений и оповещения личного состава специалистов Центра и филиалов, в рабочее и нерабочее время, утверждённый главным врачом Центра и главными врачами филиалов Центра. Разработаны оперативные планы формирования лабораторных баз, произведены расчёты производственных мощностей лабораторий. Все лаборатории имеют укладки для отбора проб из объектов окружающей среды на холеру с необходимым оборудованием и диагностическими препаратами в количестве ежемесячного неснижаемого запаса [2].

В период с 2005 г. по 2015 г. в рамках осуществления эпидмониторинга за холерой лабораториями Центра и его филиалов произведено исследований более чем 33780 проб, из которых 4866 (14,4 %) положительные, обнаружены холерные вибрионы не О1/не О139 серогрупп. Количество исследованных проб варьировало в разные годы от 4628 в 2005 году до 3613 в 2015 г., при этом удельный вес положительных находок составлял от 11,1 % в 2005 г. до максимальных 22 % в 2006 г., а в 2015 г. составил всего16,6 % [1].

Стоит отметить, что за последние три года с 2013 по 2015 г. отбор проб воды из открытых водоёмов проводился на 35 территориях области во всех филиалах и в 18 из них были положительные результаты: выявлены 673 штамма *Vibrio cholerae* non O1/non O139 (18,6 %). На все точки отбора имеются и регулярно заполняются паспорта - 166. За последние три года на территориях шести филиалов (в городах Волгодонске, Шахтах, Миллерово, а также в Орловском, Цимлянском и Шолоховском районах), где проводились исследования проб воды открытых водоёмов, не было зафиксировано положительных результатов по форме 30. К примеру, в 2013 году таких филиалов было четыре: в городах Волгодонск, Шахты, в Цимлянском и Шолоховском районах.

Результаты: все отрицательные [1].

Это свидетельствует о том, что воды поверхностных водоёмов в санитарно- защитных зонах водозаборных установок питьевого и хозяйственно- бытового водоснабжения, в местах организованного рекреационного водопользования реки Дон, Цимлянского водохранилища (верховье р. Дон), других рек водного бассейна области отвечают требованиям по бактериологическому и вирусологическому загрязнению и не оказывают влияния на циркуляцию холерных вибрионов в районах нижнего течения реки Дон и воды Таганрогского залива, где отмечаются наибольшие положительные находки *Vibrio cholerae* non O1/non O139. Стоит отметить, что в первые две недели мая и последние две недели сентября за последние годы эпиднаблюдений ни в одной из 166 стационарных точек мониторинга холеры не были выделены холерные вибрионы. Наибольшее количество положительных находок приходится на июнь-август месяцы (более 90%).

При проведении лабораторного мониторинга холеры в эпидсезон 2015 года общая сумма затрат на исследования как Центра, так и его филиалов составила более 3,5 млн. рублей. Вместе с тем руководством Роспотребнадзора ставится вопрос об эффективном расходовании бюджетных средств по выполнению государственных функций в установленной сфере деятельности и о риск-ориентированной модели работы [6].

В рамках взаимодействия органов и учреждений Роспотребнадзора Центр принимал участие в проведении тактико-специальных учений (ТСУ) по темам: «Организация работы СПЭБ по взаимодействию с органами и учреждениями Роспотребнадзора Ростовской области по ликвидации медико-санитарных последствий чрезвычайной ситуации природного характера» и «Организация работы СПЭБ по взаимодействию с органами и учреждениями Роспотребнадзора Ростовской области по санитарной охране территории в случае выявления больного с подозрением на холеру». С целью обеспечения готовности противоэпидемических формирований, предназначенных для проведения противоэпидемических мероприятий на случай выявления больных опасными инфекциями, в том числе холерой, нами в пунктах пропуска транспортных средств через государственную границу РФ (портах, аэропортах, автомобильных переходах) в городах Ростове-на-Дону, Таганроге, Каменск-Шахтинском, Миллерово проводилась ревизия противоэпидемического имущества и хозяйственного инвентаря для сотрудников, привлекаемых для работы в пунктах пропуска через государственную границу, в соответствии с Приказом Роспотребнадзора от 27.08.2012 г. № 871 «О типовых требованиях к оснащению и оборудованию санитарно–карантинных пунктов и учреждений, обеспечивающих деятельность санитарно–карантинного контроля в пунктах пропуска через Государственную

границу РФ».

В течение 2015 года Центр и его филиалы приняли участие в проведении учений на водных судах, воздушном судне, на пассажирском автобусе по локализации очага холеры, требующего проведения мероприятий по санитарной охране территории по поручениям управления. В ходе учений отрабатывались вопросы взаимодействия служб Управления, Центра, администраций пунктов пропуска через государственную границу РФ, КПП погранвойск, таможенных постов (пограничной и таможенной служб), ЛПО, ГБУ РО «Дезинфекционная станция»; эффективности схем оповещения; полноты комплектации эпиддезгруппы укладками и средствами защиты; полноты и своевременности проведения противоэпидемических и дезинфекционных мероприятий; технологии госпитализации больного и изоляции контактных лиц, а также другие вопросы, связанные с санитарной охраной территории Российской Федерации.

Одним из направлений работы Центра по вопросам профилактики холеры является методическая и санитарно-просветительская работа. Так, специалисты Центра и его филиалов приняли участие в областных и кустовых семинарах-совещаниях по вопросам: «Профилактика инфекционных заболеваний и «сигнальные признаки» особо опасных болезней и других актуальных инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории», с врачами-инфекционистами, терапевтами скорой медицинской помощи.

Таким образом, деятельность Центра направлена на проведение мониторинга циркуляции вибрионов в окружающей среде, эпидемиологическую диагностику ситуации по холере и развёртывание полного комплекса лабораторной диагностики, а также на проведение противоэпидемических мероприятий, направленных на санитарную охрану территории области, включая осложнения, которые могут возникнуть на сопредельных территориях, и своевременное оказание медицинской помощи пострадавшим (заболевшим).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

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

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 2015год /М.Ю. Соловьёв, Е.В. Ковалёв, С.А. Ненадская и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии Координац. Научн. Совета по сан.-

эпидемиол. охран территории РФ. - Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. - С. 45-49.

3. Данные о выделении холерных вибрионов при эпидемиологическом надзоре, изолированных из поверхностных вод рек Дон и Темерник в 2013 году /Ю.Г. Киреев, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпиднадзора за холерой. - Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27.-С. 51-53.

4. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2013 году / В.Е. Безсмертный и др. М., 2014. - С. 1-5.

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

6. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека / Мониторинг по заболеваемости холерой в мире. М., 2015.

НОВЫЙ СПОСОБ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДОЕМОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРИСУТСТВИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

С.В. Титова, Л.М. Веркина, А.В. Тришина, Е.А. Березняк, О.А. Рыковская, С.Н. Головин

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

Мониторинговые исследования на холеру в период эпидемических сезонов ежегодно (май - октябрь) осуществляют в соответствии с общепринятыми методическими указаниями [1], производя заборы проб воды в поверхностных естественных водоёмах (моря, реки, озёра, пруды) вручную. Воду отбирают один раз в неделю в литровые ёмкости (батометры). Последние собирают со всех определённых стационарных точек в тару для перемещения патогенного материала и доставляют в лабораторию для последующего бактериологического исследования жидкостей на присутствие холерных вибрионов. Технология отбора представляет собой рутинный, громоздкий и трудоёмкий процесс. В связи с этим возникает необходимость в разработке новых эффективных методов

отбора вод поверхностных водоёмов.

В последние годы холерные вибрионы были обнаружены в скоплениях биоплёнок в морской и речной воде стран Азии и Латинской Америки [2, 3, 4, 5]. Установлено, что важным способом выживания в окружающей среде *Vibrio cholerae* является формирование биоплёнок, которые могут располагаться на поверхности биотических и абиотических объектов [6]. Кроме того, биоплёнки обеспечивают селективное преимущество патогенным вибрионам, повышая их способность к распространению в различных природных условиях [7]. В связи с этим важно на этапе забора проб получить биоплёнку для её дальнейшего исследования.

С целью оптимизации микробиологического мониторинга поверхностных водоёмов нами был апробирован новый метод отбора проб, основанный на способности холерных вибрионов к адгезии на стекле и биоплёнкообразованию [8].

Пробы воды отбирают с помощью устройства, которое представляет собой полую стеклянную трубку, подвешенную на леске к поплавку. Эту стеклянную «ловушку» опускают в водоём, через определённое время извлекают, помещают в питательную среду и проводят микробиологические исследования. Важно подчеркнуть, что время нахождения устройства в воде выбирается произвольно и зависит от целей исследования. Пребывание в воде в течение недели позволяет увеличить объём исследуемой воды. С целью оперативного определения наиболее опасных мест в зонах водных объектов, используемых для водопотребления и водопользования, «ловушки» размещают на сутки.

В ходе полевых испытаний устройства отбор проб воды из стационарных точек проводили одновременно по классической методике и с помощью «ловушек». Извлечённые из воды «ловушки» помещали в 10 мл 1% пептонной воды, которая является одновременно и селективным фактором по отношению к аутохтонной микрофлоре и способствует накоплению вибрионов, по сути являясь I пептоном. Далее исследования проводили по МУ 3.1.1.2232-07.

Результаты апробации нового метода показали, что при бактериологическом исследовании проб количество микроорганизмов, представителей аутохтонной микробиоты водоёмов, накопленное в «ловушках», сопоставимо с КОЕ в пробах воды, отобранных рутинным способом.

В отношении холерных вибрионов наблюдалась другая тенденция. Если в пробах из воды, исследуемых по общепринятой методике, обнаруживалось 20-35% вибрионов от общего числа оксидазоположительной микрофлоры, то в «ловушках» микроорганизмы рода *Vibrio* накапливались до 50-70%. Этот феномен делает возможным исследование большего количества изолятов и повышает вероятность

выделения эпидемически опасных вибрионов.

Таким образом, разработанный новый метод отбора проб заслуживает внимания и дальнейших исследований с целью внедрения его в практику эпидемиологического надзора за холерой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры. Методические указания. МУ 3.1.1.2232-07.

2. Alam M., Sultana M., Nair G.B. et al. Toxigenic Vibrio cholerae in the aquatic environment of Mathbaria, Bangladesh // Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72 (4):2849–55.

3. Binsztein N., Costagliola M., Pitchel M. et al. Viable but nonculturable Vibrio cholerae O1 in the aquatic environment of Argentina // Appl. Environ. Microbiol. 2004; 70 (12):74816.

4. Davey M.E., O'Toole G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2000; 64(4):847-67.

5. Hall-Stoodley L., Stoodley P. Biofilm formation and dispersal and the transmission of human pathogens // Trends Microbiol. 2005; 13 (1):7-10.

6. Zettler E.R., Mincer T.J., and Amaral-Zettler L.A. Life in the “plastisphere”: microbial communities on plastic marine debris // Environ. Sci. Technol. 2013; 47(13):7137-46.

7. Lutz C., Erken M., Noorian P., Susand Sh., McDougaid D. Enviromental reservoirs and mechanisms of persistensce of Vibrio cholerae // Front Microbiol. 2013; 4:375.

8. ТитоваС.В., КушнарёваЕ.В. Использование нового метода изучения динамики образования биоплёнок холерными вибрионами в условиях, приближённых к естественным. Известия вузов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2014; 5:73-7.

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ В ДОНЕЦКОЙ ОБЛАСТИ В 1971 ГОДУ, ВЫЗВАННОЙ АТОКСИГЕННЫМИ ШТАММАМИ *VIBRIO CHOLERAE* EL TOR

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина

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

В настоящее время продолжает дискутироваться вопрос об

адекватном объёме проводимых профилактических и противоэпидемических мероприятий при возникновении заболеваний, вызванных атоксигенными (ctx-) холерными вибрионами и проявляющихся в виде спорадических случаев или вспышек. Одна из таких вспышек имела место в Донецкой области (УССР) летом 1971 года. В период вспышки, длившейся с конца июля до середины августа, в общей сложности было зарегистрировано 14 больных и 282 вибриоиосителя, от которых выделено около 300 культур *Vibrio cholerae* El Tor серовара Огава [1, 2]. Вспышка имела пищевую природу и, вероятно, была вызвана контаминацией молочных продуктов [1, 2]. В ликвидации вспышки принимали участие специалисты СПЭБ Ростовского-на-Дону противочумного института.

Примерно в это же время (в августе 1971 г.) в г. Ростове-на-Дону регистрировались единичные случаи заболевания, также вызванные атоксигенными штаммами холерных вибрионов того же серовара Огава. Вопрос о взаимосвязи вспышки в г. Донецке (УССР) и спорадических заболеваний в г. Ростове остался неизученным, поскольку регламентированные в тот период методы для идентификации холерных вибрионов не позволили детально охарактеризовать выделенные культуры по генотипу. Анализ свойств выделенных культур не выявил существенных различий между штаммами различного происхождения. Все штаммы были типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, агглютинировались до титра или ½ титра О1 холерной диагностической сывороткой и сывороткой Огава. При оценке чувствительности к холерным диагностическим бактериофагам только два штамма (г. Ростов-на-Дону) оказались резистентны к фагу Эль Тор. Все культуры вызывали гемолиз эритроцитов барана в пробе Грейга.

Цель данной работы заключалась в сравнительном молекулярно-биологическом изучении атоксигенных культур, выделенных в ходе эпидемической вспышки в г. Донецке (УССР) летом 1971 года, и штаммов «спорадического происхождения», изолированных в этот же период в городе Ростове-на-Дону.

В последние годы для решения вопросов о природе штаммов вибрионов с успехом использован один из приёмов молекулярно-генетического исследования – VNTR-типирование [3].

В работе использовано 19 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (11 штаммов были выделены в г. Донецке (УССР), а 8 культур изолированы в г. Ростове-на-Дону). VNTR-типирование по локусам VcA, VcI, VcD, VcG и построение дендрограмм на наличие генов холерного токсина, токсин-корегулируемых пилей адгезии и островка патогенности VcB проводили, как описано ранее [3].

Из 19 изученных 18 культур были лишены генов холерного токсина,

токсин-корегулируемых пилей и островка патогенности VcB. Один штамм 4313, выделенный из сточной воды, имел все три исследуемых признака. Все 19 изученных штаммов холерных вибрионов были успешно протипированы по четырем VNTR-локусам. Полученный результат представлен в виде дендрограммы (рисунок 1).

Токсигенный, пилированный штамм 4313,выделенный в г. Ростове-на-Дону из сточной воды, содержал островок патогенности VcB и чётко дискриминировался от всех изученных атоксигенных культур.

Из 11 штаммов, выделенных в г. Донецке, 10 имели идентичный VNTR-генотип по изученным локусам, что доказывало клональную природу вспышки.

Каждый из атоксигенных штаммов, изолированных в г. Ростове-на-Дону, имел чётко дискриминируемый уникальный VNTR-генотип, что, на наш взгляд, доказывает спорадический характер заболевания. В эту же «спорадическую» группу попал один из «донецких» штаммов 4490.

Полученные данные позволяют сделать вывод, что на фоне циркуляции атоксигенных штаммов с уникальными VNTR-генотипами, вызывающими спорадические заболевания, в г. Донецке (УССР) летом 1971 года имела место вспышка, вызванная одним клоном вибрионов.

На наш взгляд, этот «эпидемический» клон должен быть подвергнут углублённому молекулярно-биологическому изучению для установления причины столь высокого патогенного потенциала.

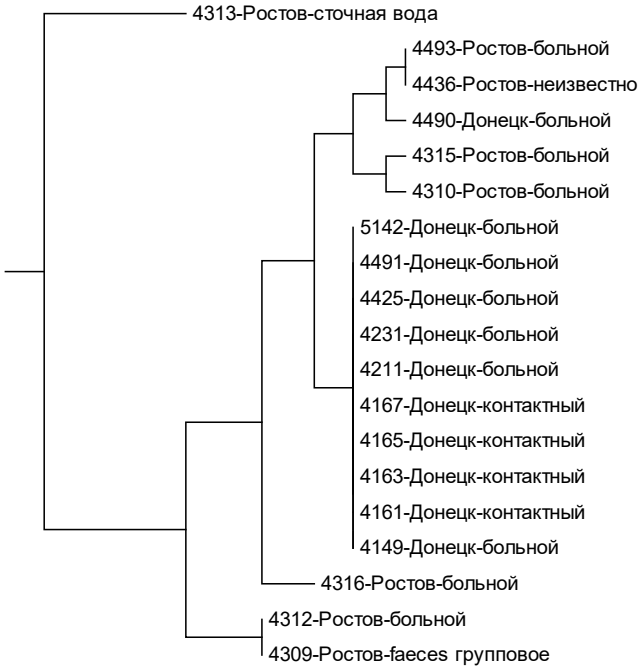


Рисунок 1. Дендрограмма VNTR-генотипов штаммов холерных вибрионов, выделенных при спорадических случаях заболевания в г. Ростове-на-Дону и в ходе вспышки в г. Донецке (УССР) летом 1971 года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеенко В.В. Холера в Украине (история и современность). - Кировоград: Центр.- Укр. изд-во, 2007.- 171 с.

2. Москвитина Э.А. Оценка эпидемиологической роли лиц, перенесших холерную инфекцию: Дис… канд. мед.наук. - Ростов-на-Дону, 1974. – 206 с.

3. Мишанькин Б.Н. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов Vibrio cholerae O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры / Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов, Л.В. Романова, С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, М.Б. Мишанькин, И.Я. Черепахина, О.В. Дуванова, М.В. Шишияну // Мол. генетика, микробиол. и вирусология. 2004; 4:28-33.

АНАЛИЗ ПРОСТРАНСТВЕННОЙ И ВРЕМЕННОЙ ДИНАМИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОДАРСКОГО КРАЯ С 1990 ПО 2015 ГГ.

Д.А. Левченко, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, Н.Б. Непомнящая, А.С. Водопьянов

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

Способность выживать и размножаться в различных условиях внешней среды является одним из важных свойств *Vibrio cholerae* Эль Тор, поэтому ежегодное проведение мониторинговых исследований проб из объектов окружающей среды на холеру являются важнейшей составляющей эпидемиологического надзора для предупреждения водного пути распространения инфекции [1, 2].

Результаты мониторинга за холерными вибрионами на территории Российской Федерации представлены в авторской пополняемой геоинформационной системе (ГИС) «Холера 1989-2014 гг.», которая была зарегистрирована в 2014 году и интегрирована в Гео-информационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора [3]. ГИС пополняется как новыми данными о выделенных штаммах на территории Российской Федерации по итогам идентификации 2015 года, так и данными о наличии/отсутствии 39 генов ранее выделенных, но не изученных штаммов [4, 5].

Цель настоящего исследования заключалась в анализе динамики выделения, фено- и генотипических свойств штаммов холерных вибрионов O1, выделенных из объектов окружающей среды на территории

Краснодарского края с 1990 по 2015 г.

Наибольшее количество культур *V. cholerae* O1 El Tor было изолировано на территории Краснодарского края (2015 год) из реки Агура – 107 штаммов, поэтому объектами исследования данной работы явились штаммы, выделенные на указанной территории (в работе использовано 98 штаммов, поступивших во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора).

С 1990 по 2015 г. на территории Краснодарского края было выделено 113 атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 (таблица 1). Все изолированные культуры *V. cholerae* были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам, из них к серовару Огава принадлежало 8 штаммов (7,1 % от общего количества), к серовару Инаба - 105 (92,9 %).

Таблица 1. Количественная характеристика штаммов *V. cholerae O1 El Tor*, выделенных на территории Краснодарского края в 1990-2015 гг.

Год выделения	Кол-во выделенных штаммов	Наименование водоемов
1990	1(0,88%)	Вода пляжа санатория Сочи
1991	1(0,88%)	Вода пляжа санатория им. Кирова
1993	1(0,88%)	Р. Агура
1996	3(2,65%)	Р. Бзугу; вода пляжа санатория Сочи; вода пляжа санатория им. Фрунзе
1999	1(0,88%)	Р. Агура
2001	2(1,77%)	Р. Мацеста; вода Ейского лимана
2002	1(0,88%)	Р. Ея
2007	4(3,53%)	Р. Агура
2013	1(0,88%)	Лиман на Суджукской косе
2015	98(86,72%)	Р. Агура
Всего	113	

На протяжении 25 лет на территории Краснодарского края из реки Агура выделялись штаммы в 1993, 1999, 2007 и 2015 гг. (рисунок).

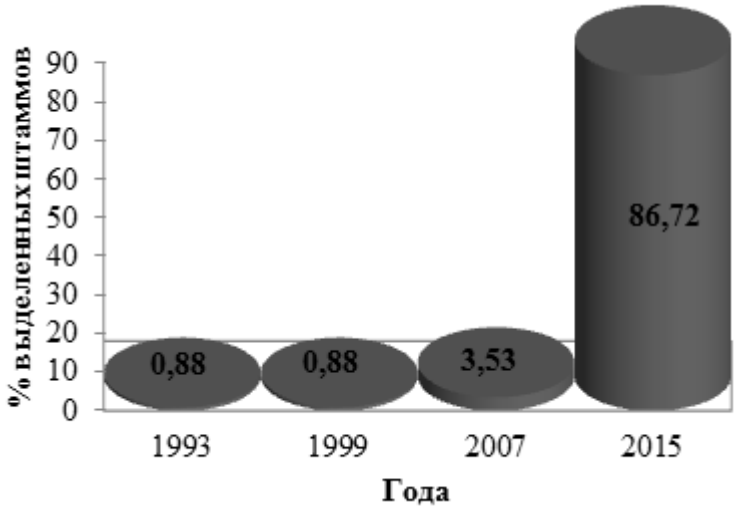


Рисунок. Динамика выделения штаммов холерных вибрионов О1 Эль Тор из реки Агура с 1990 г. по 2015 г.

Используемая ГИС включает информацию о культурально-морфологических, биохимических и серологических свойствах 1040 штаммов, из них 304 имеют данные расширенного ПЦР-генотипирования (выборка с 1991 по 2015 год). По данным анализа расширенного ПЦР-генотипирования культуры *V. cholerae,* выделенные на территории Краснодарского края в 2015 году из р. Агура, относились к одному и тому же генотипу (F14) (таблица 1). На территории Российской Федерации с исследуемым генотипом (F14) было изучено 111 штаммов (Краснодарский край – 98 штаммов в 2015 г., Астраханская область – 1 штамм в 2012 г., Республика Калмыкия – 11 штаммов в 2012 и 1 штамм в 2013 г.).

Установлено, что штаммы с генотипом F14 не содержали генов профагов CTX и RS1 (ctxAB, cep, orfU, zot, ace, rstR, rstC, rstA, rstB), а также генов острова патогенности VPI (tcpA, toxT), генов T3SS (vcsN2, vcsC2, vcsV2, vspD), slt1, stn/sto, tdh, trh, wbf, но содержали гены острова патогенности VPI-2 (int, nanH), а также гены attRS, rtxC, rtxA, hcp, cef, toxR, hapA, гены T6SS (vasA, vasF, vasK, vgrG3), tolQRA, wbe.

Были выявлены на территориях Астраханской области (2012 г. – 2 штамма), Забайкальского края (2012 г. – 3 штамма), Республики Татарстан (2012 г. – 1 штамм), Челябинской области (2012 г. – 1 штамм), а также Приморского края (2014 г. – 1 штамм) штаммы *V. cholerae,* сходные с генотипом F13, которые отличались наличием гена цитотоксического кластера RTX (rtxA – 5'-концевой участок гена высокомолекулярного цитотоксина; последовательность, кодирующая его ACD-домен, продукт которого вызывает деполимеризацию и ковалентное связывание актина в клетках кишечника) (таблица 2).

Таблица 2. Распределение генотипов холерных вибрионов О1 серогруппы потерритории РФ (1991-2015 гг.)

Астраханская обл.	2012	F14	G7	F13				
Забайкальский кр.	2012	F13						
Респ. Калмыкия	2012	A3	F1	F14	F2	F3	F5	F7
Респ. Татарстан	2012	F13						
Челябинская обл.	2012	F13						
Приморский кр.	2014	D2	F13					
Краснодарский кр.	2015	F14						

Такую смену генотипа (утрата/приобретение генов персистенции) можно объяснить необходимостью популяции холерных вибрионов О1 приспосабливаться к условиям окружающей среды, но нельзя исключать возможность их завозного происхождения.

С помощью ГИС наглядно проанализирована пространственная и временная динамика выделения штаммов холерных вибрионов на территории Краснодарского края. Полученные данные позволяют нам ориентировочно предполагать, что атоксигенные культуры *V. cholerae* могут переживать в поверхностных водоёмах в течение одного года, а также возможна смена генотипа в результате делеции. Кроме того, нельзя исключить возможность завозного происхождения с эндемичных по холере территорий (больными, вибрионосителями) на территорию Краснодарского края.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016г. // Пробл. особо опасных инф. - 2016. - №1. - С. 20-27.

2. Заднова С.П., Кульшань Т.А., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и штаммов геновариантов Vibrio cholerae биовара эль тор in vitro и in vivo // Пробл. особо опасных инф. - 2015. - № 4.- С. 65-69.

3. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система. Холера 1989-2014. - 2014.

4. Зубкова Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Применение современных информационных технологий для эпидемиологического анализа распространения возбудителей особо опасных инфекций // Актуал. пробл.

диагностики инф. забол. (микробиол., биотехнол., эпидемиол., паразитол.): Сб. науч.-практ. работ. межрегион. науч.-практ. конф. - Ростов-на-Дону, 2015. - С. 56-59.

5. Зубкова Д.А., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Непомнящая Н.Б. Использование новой ГИС для ретроспективного и оперативного анализа свойств холерных вибрионов О1, выделенных из объектов окружающей среды на территории России // Холера и патоген. для чел-ка вибрионы. Матер. совещ. спец-ов Роспотребнадзора. 2014. - №27. - С. 47-50.

РОЛЬ БИОПЛЕНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В СОХРАНЕНИИ ВОЗБУДИТЕЛЯ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ

С.В. Титова, Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Л.А. Егиазарян, Л.К. Лысова, И.В. Архангельская

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

Исследования последних лет показали, что *Vibrio cholerae* существуют в природных экосистемах не только в виде свободно плавающих планктонных клеток, но и в виде высокоорганизованных и прикрепленных к субстратам биоплёнок. Для совершенствования комплекса профилактических мероприятий при эпидемиологическом надзоре за холерой необходимо изучение роли факторов окружающей среды и биоплёнкообразования в распространении и сохранении холерных вибрионов.

В связи с этим целью настоящего исследования было сравнительное изучение в эксперименте способности к выживанию клеток холерных вибрионов, находящихся в планктонном состоянии и в виде биоплёнок, в зависимости от состава водной среды, температуры и наличия гена холерного токсина (ctx).

В работе использовали штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, полученные из МЖК ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: токсигенные человеческого и водного происхождения и атоксигенные водного происхождения.

Биоплёнки холерных вибрионов получали на пластиковых пластинках во флаконах с водопроводной автоклавированной водой, контаминированных взвесью 10^4/мл клеток холерных вибрионов, способом, описанным ранее [1]. Сформировавшиеся биоплёнки переносили в экспериментальные среды, содержащие автоклавированную

водопроводную воду (контроль), минеральную воду (из минерального источника Мацеста), а также смеси (в разведении 1:1) минеральной воды с водой Черного моря и минеральной воды с водой реки Агура. pH всех используемых субстратов находился в пределах 6,5-7,0. Экспериментальное моделирование проводили при температуре 10 и 25°С. Концентрацию холерных вибрионов оценивали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ/мл) в высевах планктонной культуры и в отпечатках биоплёнок в пересчёте на десятичный логарифм. Учёт проводили один раз в 7 дней в течение 1,5 месяцев.

При температуре 25°С холерные вибрионы в планктонном состоянии независимо от наличия гена холерного токсина во всех пробах сохраняли жизнеспособность в течение всего срока наблюдения. При этом значения Log КОЕ/мл составляли 5-6. Этот показатель при данной температуре в отношении биоплёнок изученных штаммов колебался в диапазоне 5-7.

При культивировании в минеральной воде при температуре 10°С *V.cholerae* перестали высеваться к концу эксперимента. При этом в контрольных пробах к четвёртым суткам концентрация токсигенных штаммов вибрионов снизилась до единичных клеток, а атоксигенный штамм перестал высеваться через 25 суток. В смеси речной воды с минеральной через полтора месяца наблюдали сохранение лишь единичных клеток атоксигенного штамма и отсутствие микробных клеток токсигенных штаммов. Возможно, это связано с переходом при низкой температуре части популяции возбудителя в некультивируемое состояние [2].

При температуре 10°С значения Log КОЕ/мл токсигенных штаммов *V. cholerae* в составе биоплёнки в смеси воды минерального источника с водой Черного моря составляли 5-7. В контроле, а также при использовании в качестве субстратов минеральной воды и смеси минеральной воды с речной, эти показатели колебались от 4 до 7. Значения Log КОЕ/мл атоксигенного штамма в биоплёнках составляли 5-7 в течение всего срока наблюдения во всех экспериментальных пробах, включая контроль. По данным литературы при низких температурах, являющихся стрессовыми факторами для вибрионов, увеличивается их способность к биоплёнкообразованию. При этом штаммы, выделенные из объектов окружающей среды, обладают более выраженным биоплёнкообразованием по сравнению с вибрионами, изолированными из клинического материала, независимо от их эпидемиологической значимости [2]. Установлено также, что атоксигенные *V. cholerae* лучше адаптируются к стрессовым воздействиям и могут длительно выживать в окружающей среде, как в теплое, так и холодное время года, за счёт образования биоплёнки и реализации персистентной активности [3-5].

Заключение. Проведённое исследование показало, что при температуре 25°С холерные вибрионы независимо от наличия гена

холерного токсина и состава среды способны сохраняться как в планктонном состоянии, так и в составе биоплёнок в течение полутора месяцев (срок наблюдения). При низких температурах (10^{o} С) токсигенные штаммы в планктонной форме перестали высеваться, тогда как атоксигенные сохранялись в виде единичных клеток. Холерные вибрионы в биоплёнках на протяжении всего срока наблюдения выживали при температуре 10^{o}С независимо от токсигенности и состава среды культивирования.

Таким образом, биоплёнки играют важную роль в сохранении холерных вибрионов в окружающей среде при низкой температуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Титова С.В. Экспериментальное изучение формирования холерными вибрионами биоплёнок на абиотических поверхностях в разных условиях культивирования / С.В. Титова, Е.В. Кушнарёва // ЗНиСО. 2015; 3(264):31-4.
2. Куликалова Е.С. Биоплёнка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде / Е.С Куликалова, Л.Я. Урбанович, С.Г. Саппо, Л.В. Миронова, Е.Ю. Марков, В.В. Мальник, В.М. Корзун, С.К. Миткеева, С.В. Балахонов // Журнал микробиологии. 2015; (1):3-11.
3. Кульшань Т.А. Оценка функциональных особенностей и стрессоустойчивости изогенных токсигенных и нетоксигенных штаммов Vibrio cholerae биовара Эль Тор / Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Н.Б. Челдышова, Н.И. Смирнова // Журнал микробиологии. 2015; (3):11-7.
4. Сизова Ю.В. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов в биоплёночных сообществах / Ю.В. Сизова, И.Я. Черепахина, В.В Балахнова, О.С. Бурлакова, Е.В. Сизова, О.И. Помухина, О.П. Фецайлова // Проблемы ООИ. 2012; 3(113):54-7.
5. Сизова Ю.В. Роль температуры поверхностных водоёмов в персистенции и биоплёнкообразовании холерных вибрионов различной эпидемиологической значимости / Ю.В. Сизова, И.Я. Черепахина, О.С. Бурлакова // Современные проблемы науки и образования. 2015; №5.

СПОСОБНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, К БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЮ КАК ОДИН ИЗ ПУТЕЙ СОХРАНЕНИЯ РЕЗЕРВУАРА ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ

С.В. Титова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая, Л.М. Веркина, Л.К. Лысова

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

Холерные вибрионы способны вести два разных «образа жизни» – в организме человека и в водных объектах окружающей среды, где они находятся как в свободноживущем («планктонном») состоянии, так и в ассоциации с биотическими (простейшие, ракообразные, насекомые, рыбы, птицы) и абиотическими (твёрдые субстраты естественного и искусственного происхождения) объектами, в т.ч. в форме биоплёнок [6, 9]. Популяции, присутствующие на тех или иных территориях, характеризуются крайней генотипической неоднородностью, однако благодаря способности к обмену генетической информацией их принято считать резервуарами генов, которые могут передаваться горизонтально, что приводит к формированию новых, в том числе и высоковирулентных клонов [4, 8]. В Российской Федерации (РФ) периодически регистрируются спорадические завозные случаи холеры, единичные и групповые диарейные заболевания, вызванные нетоксигенными *Vibrio cholerae* O1 и non O1/non O139, а из водных объектов окружающей среды штаммы различных серогрупп выделяются постоянно [1, 5]. Поэтому для оценки потенциальных рисков необходимо знание совокупного набора генов, присутствующих в геномах штаммов, циркулирующих в РФ, а также, в связи возможностью новых заносов, на пограничных территориях.

Расширенные исследования геномов большого числа штаммов разных серогрупп, выделенных с 1987 по 2015 г. от людей и из источников окружающей среды на территории РФ и некоторых бывших республик СССР [7], с помощью ПЦР и полногеномного секвенирования показали, что, несмотря на их гетерогенность, совокупные наборы детерминант факторов патогенности и персистенции в популяциях, обнаруженных в разных регионах, относительно стабильны. Различия касаются не столько самого наличия генов, сколько их аллельного состава.

Наибольший интерес представляют эпидемические штаммы, несущие гены *ctxAB* (в составе профага CTX) и *tcpA* (в составе острова патогенности VPI), хотя их вряд ли можно считать популяцией в связи с заносным происхождением и довольно редкой встречаемостью. Занявшие на сегодня доминирующую позицию генетически изменённые штаммы

могут содержать разные аллели названных генов, и многие были выявлены у холерных вибрионов, выделенных в РФ [3, 4, 7]. У геновариантов *ctxB* типа Эль Тор (*ctxB3*) замещён *ctxB* классического типа *ctxB1* либо *ctxB7*, впервые обнаруженным у штаммов, вызвавших эпидемию на Гаити (2010), которые также содержат так называемый гаитянский аллель *tcpA* (*tcpA*^{Haiti}), отличающийся от «канонического» *tcpA* типа Эль Тор *(tcpA*^{ET}*)* наличием однонуклеотидной замены (SNP) в позиции 266. С помощью Blast-анализа в полногеномных сиквенсах штаммов, выделенных в РФ от больных и из окружающей среды с 1994 по 2014 г., нами были идентифицированы аллели *ctxB* и *tcpA*, распределившиеся следующим образом: 1) *ctxB3* и *tcpA*^{ET} – 1 штамм из внешней среды (Ростов н/Д, 2000); 2) *ctxB1* и *tcpA*^{ET} – 5 клинических (Дагестан, 1994) и 4 из внешней среды (Ростов н/Д, 2001, 2003); 3) *ctxB1* и *tcpA*^{Haiti} – 2 клинических (Тверь, 2005; Мурманск, 2006) и 2 из внешней среды (Ростовская обл., 2011, 2014); 4) *ctxB7* и *tcpA*^{Haiti} – 6 клинических (Москва, завозы из Индии, 2010, 2012, 2014). До настоящего времени такие высоковирулентные штаммы (близкие гаитянским) не обнаруживались во внешней среде РФ, однако риск их попадания в водоёмы в будущем достаточно высок. Кроме того, в геноме клинического штамма не O1/не O139 серогруппы (Узбекистан, 1987) был выявлен профаг CTX, полностью идентичный таковому одного из штаммов O37 серогруппы, вызвавших крупную вспышку в Судане в 1968 г., содержащий ранее не описанный аллель *ctxB9* и целый ряд SNP в других генах [3].

Нетоксигенные штаммы *V.cholerae* разных серогрупп представлены намного большим числом генотипов, чем токсигенные. Они могут содержать профаги pre-CTX с разными аллелями генов RS2-элемента *rstR*, коровой области *cep, ace, zot*; остров патогенности VPI с разными аллелями *tcpA*, полные либо неполные остров VPI-2, кластеры RTX, гены систем секреции третьего и шестого типов (T3SS и T6SS). Ген cholix-токсина (*chxA*) был обнаружен в геномах *V. cholerae* O1, выделенных из речной воды в Краснодарском крае, и не O1, выделенных в Ростовской области, Калмыкии и Узбекистане. Сравнительный AlignX-анализ показал наличие множества аллелей этого гена, относящихся к типам I, II и III. Ген фактора патогенности/персистенции Cef (CHOcellelongationfactor), который считался достаточно консервативным, у нехолерогенных штаммов оказался крайне вариабельным: в группе из 40 штаммов разных серогрупп, выделенных в России, Украине, Молдове, Азербайджане, Узбекистане, было выявлено 16 аллелей, в том числе уникальных [2]. Ген сериновой протеазы (диареегенного фактора) был также представлен несколькими аллелями. Интактный ген белка наружной мембраны *ompU* присутствовал у всех изученных холерогенных и нескольких нехолерогенных штаммов, у большинства же последних он содержал протяжённые делеции [1]. Даже такие видоспецифичные маркеры, как гены гемагглютинин/протеазы *hapA*, коллагеназы VC1650, белка наружной

мембраны *ompW*, глобального регулятора *toxR,* содержали единичные и множественные, идентичные и неидентичные SNP либо делеции нуклеотидов. Следует отметить, что идентичные либо обладающие высоким уровнем сходства аллели были выявлены у ряда штаммов, не связанных общностью происхождения.

Приведённые данные свидетельствуют о том, что штаммы холерных вибрионов, выделяемые в РФ и на прилегающих территориях, так же, как и циркулирующие в других регионах мира, могут рассматриваться как резервуар генов факторов патогенности и персистенции. Несмотря на то, что климатические факторы большинства регионов РФ неблагоприятны для укоренения холерных вибрионов, они могут сохраняться в объектах окружающей среды в течение более или менее длительных периодов времени. Например, в 2001 г. в Ростове н/Д из сточных вод был выделен *ctxB1*/*tcpA*^{ET}штамм, а спустя 2 недели 2 полностью идентичных ему штамма были обнаружены на той же территории в воде двух разных водоёмов. Аналогичная ситуация наблюдалась в 2007 году с 4 полностью идентичными штаммами, содержащими профаг pre-CTX и остров VPI: первый был выделен из камеры городских очистных сооружений, второй – на следующий день из р. Темерник, а ещё два – спустя 2 недели из разных участков р. Дон. В 2015 г. в Сочи из речной воды на протяжении 3 месяцев было выделено 98 практически идентичных штаммов. Существование подходящих для *V. cholerae* экологических ниш косвенно подтверждается и постоянным выделением нетоксигенных штаммов в процессе мониторинга из естественных водоёмов и сточных вод [5]. Вместе с тем природные популяции в условиях умеренного климата представляют собой скорее динамичные, чем постоянные сообщества, в которых на смену одним штаммам приходят другие, занесённые извне либо сформировавшиеся в результате генетической рекомбинации. Мы допускаем, что до того, как какой-либо штамм будет элиминирован, он вполне может успеть передать другим определённые аллели генов, что приведёт к образованию геновариантов с повышенным эпидемическим, патогенетическим либо персистентным потенциалом. Генетический обмен может происходить в организме человека при условии одновременного заражения двумя и более штаммами, однако вероятность такого события невелика. На наш взгляд, наиболее подходящей нишей для такого обмена может служить биоплёнка, в составе которой клетки вибрионов обретают способность к трансформации и генетическому обмену [6, 9]. Переход в биоплёночную форму способствует и длительному существованию холерных вибрионов в водоёмах. Как было установлено, в условиях эксперимента штаммы, выделенные на территории РФ, в т.ч. геновариванты, в той или иной мере способны к биоплёнкообразованию [6]. Из более 100 изученных по этому признаку культур разных серогрупп исключение составлял единственный водный штамм, анализ генома

которого (являющийся предметом дальнейших исследований), возможно, позволит установить причину нарушения процесса формирования биоплёнки, однако, судя по такой статистике, подобные штаммы встречаются редко.

Изложенное указывает на актуальность исследований структуры генов холерных вибрионов, циркулирующих в РФ, фенотипических особенностей их продуктов и способности к выживанию в объектах окружающей среды как в планктонной, так и в биоплёночной форме.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенных в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С. 25-27.
2. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В. Структура и изменчивость генов и белков Cef (CHOcellelongationfactor)холерных вибрионов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. проблемной комиссии. – Ростов н/Д, 2015. – С. 139-143.
3. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В. Особенности структуры профага CTX, интегрированного в геном штамма *Vibrio cholerae* non O1/non O139 // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. проблемной комиссии. – Ростов н/Д, 2015. – С. 129-134.
4. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома изменённых вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор, изолированных на территории России в современный период // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2011. – №3. – С. 11-18.
5. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El-Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №2. – С. 39-41.
6. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Экспериментальное изучение формирования холерными вибрионами биоплёнок на абиотических поверхностях в разных условиях культивирования // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С. 31-34.
7. Титова С.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – №5. – С. 45-47.
8. Khouadja S., Suffredini E., Baccouche B., Croci L., Bakhrouf A. Occurrence of virulence genes among *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* strains from treated waste waters // Environ. Monit. Assess.

2014; 186(10):6935-45.

9. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae* // Frontiers in Microbiol. – 2013. – Vol.4. – Art. 375.

СПОСОБ ИЗУЧЕНИЯ МЕЖВИДОВОЙ КОНКУРЕНЦИИ *VIBRIO CHOLERAE* В БИОПЛЕНКАХ

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

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

Сегодня известно, что большинство бактерий существуют в природе не в виде свободноплавающих клеток (планктонная форма), а в виде специфически организованных биоплёнок. Такая форма существования предоставляет бактериям массу преимуществ - повышенную устойчивость к воздействию неблагоприятных факторов физической, химической и биологической природы, воздействию ультрафиолетового излучения, дегидратации, антибиотикам. Поэтому способность эпидемически опасных холерных вибрионов образовывать биоплёнку привлекает внимание исследователей [1]. Процесс формирования биоплёнки в природе никогда не протекает в виде монокультуры, токсигенные штаммы, как минимум, конкурируют как с атоксигенными вибрионами, так и с представителями других видов, присутствующими в объектах внешней среды.

Ранее нами на модели анализа уникальных INDEL-маркеров описана гетерогенность токсигенных штаммов холерного вибриона по способности планктонной и адгезированной форм вибрионов конкурировать с атоксигенным штаммом. Мы предполагаем, что способность токсигенных штаммов вибрионов противостоять внутривидовой конкуренции может иметь большое биологическое значение. При этом, на наш взгляд, наибольшую опасность при попадании в водоёмы представляют штаммы «резистентного» фенотипа, способные противостоять ингибирующей активности атоксигенных штаммов [2].

Однако анализ с помощью INDEL-маркеров не позволяет изучать конкуренцию токсигенных эпидемически опасных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов, обитающих в водоёмах.

Цель данного исследования - разработка способа изучения межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биоплёнках.

В работе использовали типичные штаммы *V. cholerae* 19191, 17821,

16302, 5879, 18331 и 19613. В качестве гетерологичных культур использовали два клинических штамма *E. coli* с фенотипом Lac+ и Lac-.

Из 18-часовых агаровых культур изучаемых штаммов холерного вибриона и кишечной палочки готовили 1-млрд взвеси. Культуры вибрионов и кишечной палочки в соответствующем разведении (10^4КОЕ/мл) объединяли в изучаемые пары в соотношении 2:1, контрольные пробы содержали только один из исследуемых штаммов в той же концентрации. Количество микробных клеток подтверждали путем подсчёта КОЕ на пластинках агара Мартена. Формирование биоплёнки проводили в 30 мл стерильной водопроводной воды, при комнатной температуре, в качестве твёрдого субстрата использовали пластинки (0,5 х 1,5 см) из пищевого пластика. Через один час инкубации стерильно извлекали пластиковые пластины, трижды промывали стерильной водой от неадгезированных вибрионов и помещали в свежую порцию стерильной водопроводной воды для продолжения инкубации.

Для постановки ПЦР после окончания инкубации пластиковые пластины трижды промывали стерильной водопроводной водой, высушивали на листе фильтровальной бумаги и помещали в пробирку типа Эппендорф ёмкостью 1,5 мл, содержащую 1,0 мл деионизированной воды. Обеззараживание пробы и выделение ДНК проводили немедленно после образца путём температурного лизиса, прогревая пробирки при 99^{o}С в течение 30 минут.

Для количественного обнаружения токсигенных штаммов вибрионов использовали ПЦР в реальном времени. Использовали описанную систему - праймеры и зонд [3]. Олигонуклеотидный зонд, меченный по концам флюорофором HEX и гасителем BHQ1, был синтезирован НПФ фирмой «Евроген» (Москва). Амплификацию в формате реального времени ставили в амплификаторе ДТ-лайт (НПФ «ДНК-технология», Москва). В качестве стандарта использовали 1-млрд взвесь штамма 19191 в соответствующем разведении.

В первой серии экспериментов устанавливали достоверность методики количественного определения вибрионов в составе биоплёнки. Для этого образцы пластиковых пластин, содержащих биоплёнку токсигенного штамма вибрионов в виде монокультуры, параллельно анализировали двумя способами – с помощью ПЦР и подсчётом КОЕ на пластинках агара Мартена. Предварительно для десорбции и дезинтеграции биоплёнки на изолированные бактериальные клетки пластиковые пластины обрабатывали в гомогенизаторе «Cenco».

Результаты определения количества токсигенных вибрионов в составе биоплёнки, полученные с помощью ПЦР и путём традиционного высева на плотную питательную среду, совпали, что свидетельствовало о достоверности разработанного метода оценки числа токсигенных вибрионов.

В следующей серии экспериментов мы приступили к оценке межвидовой конкуренции между токсигенными холерными вибрионами и клиническими штаммами *E. coli* Lac+ и *E. coli* Lac-.

Полученные результаты свидетельствовали, что практически все изученные токсигенные штаммы в условиях межвидовой конкуренции со штаммами кишечной палочки обладали способностью формировать биоплёнку в течение 16 суток (срок наблюдения). Концентрация токсигенных вибрионов зависела от срока инкубации и штамма, но в среднем после пересчёта составляла от 10^4до 10^5 бактериальных клеток токсигенных вибрионов на $см^2$ пластиковой пластины. Полученные данные свидетельствуют о том, что токсигенные вибрионы способны формировать устойчивую биоплёнку на пищевом пластике даже в условиях межвидовой конкуренции. Учитывая возрастающую степень загрязнения окружающей среды пластиковыми отходами, приводящую к появлению новой экологической ниши, обозначаемой как пластисфера [4], способность токсигенных штаммов формировать биоплёнку может влиять на сохранение этих патогенов в объектах внешней среды.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholerapathogenesis. // PLOS Neglected Tropical Diseases DOI:10.1371 / journal. pntd.0004330 February 4, 2016.

2. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Лысова Л.К., Титова С.В. Анализ внутривидовой конкуренции штаммов *Vibrio cholerae* с помощью INDEL-маркеров // Здоровье населения и среда обитания. 2016; (4):35-8.

3. Huang J., Zhu Y., Wen H., Zhang J., Huang S., Niu J., Li Q. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of Vibrio cholerae O1 and O139 strains and determination of their toxigenic potential. Appl. Environ. Microbiology. 2009; 75(22):6981–85.

4. Титова С.В., Веркина Л.М., Лысова Л.К. Потенциальная возможность заражения водных объектов биоплёнками холерного вибриона // Известия ВУЗов Сев.-Кав. Региона. Естественные науки. 2016, № 1. - С.80-83.

ИЗУЧЕНИЕ КОНКУРЕНТНОЙ СПОСОБНОСТИ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР В МОДЕЛЬНЫХ ЭКСПЕРИМЕНТАХ

А.А. Крицкий, Н.Б. Челдышова, Н.А. Плеханов, С.П. Заднова

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

В настоящее время возбудителями холеры являются токсигенные штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, содержащие в профаге вирулентности CTXφ классический аллель гена *ctxB* (или *ctxB1*) и отличающиеся от типичных Эль Тор вибрионов повышенной вирулентностью [6]. Геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор получили глобальное распространение в мире, вытеснив типичные штаммы, и с 1993 года являлись причиной всех вспышек и спорадических случаев холеры, зарегистрированных в Российской Федерации [1, 3, 4]. Геноварианты, также, как и типичные штаммы Эль Тор вибрионов, способны выживать и размножаться как в организме человека, так и во внешней среде [4, 5] и в последние годы (2005, 2011, 2014) обнаруживаются при мониторинговых исследованиях в воде открытых водоёмов на разных территориях России [2]. При этом, несмотря на активно проводимый молекулярно-генетический анализ, вопросы экологии штаммов геновариантов изучены недостаточно. В связи с вышеизложенным цель нашего исследования состояла в проведении экспериментов по изучению выживаемости токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в автоклавированной речной воде и организме лабораторных животных в сравнении с типичными штаммами.

Исследование проводилось на 24 типичных и 22 генетически изменённых штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор, которые были выделены от больных, носителей и внешней среды в 1970-2012 гг.

На первом этапе нашей работы для определения способности типичных штаммов и геновариантов к выживанию во внешней среде мы поместили анализируемые штаммы в автоклавируемую речную воду и инкубировали в течение 76 дней. При этом нами была замечена следующая особенность. Если популяция типичных штаммов Эль Тор биовара уже с 7 дня начинала планомерно и неуклонно уменьшаться, то количество микробных клеток геновариантов возрастало (на 14 сутки) или незначительно снижалось (с 14 по 21 сутки) (см. рис. 1). В результате этого количество микробных клеток у штаммов геновариантов вплоть до 21 дня превышало количество типичных штаммов в 1,8-3,0 раза.

Далее была изучена способность к выживанию у типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор при совместном культивировании в автоклавированной речной воде. Предварительно для

дифференциации штаммов были получены клоны, резистентные к определённому антибиотику: спектиномицину, канамицину или рифампицину.

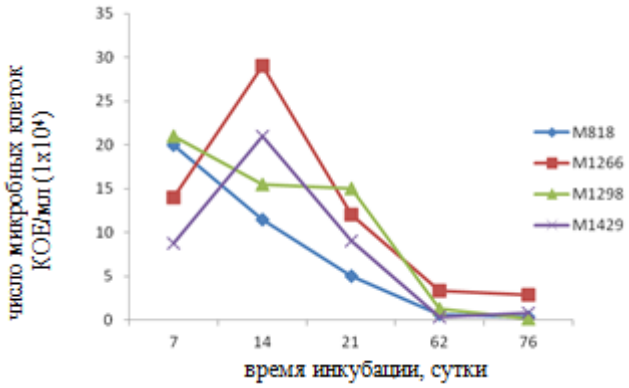
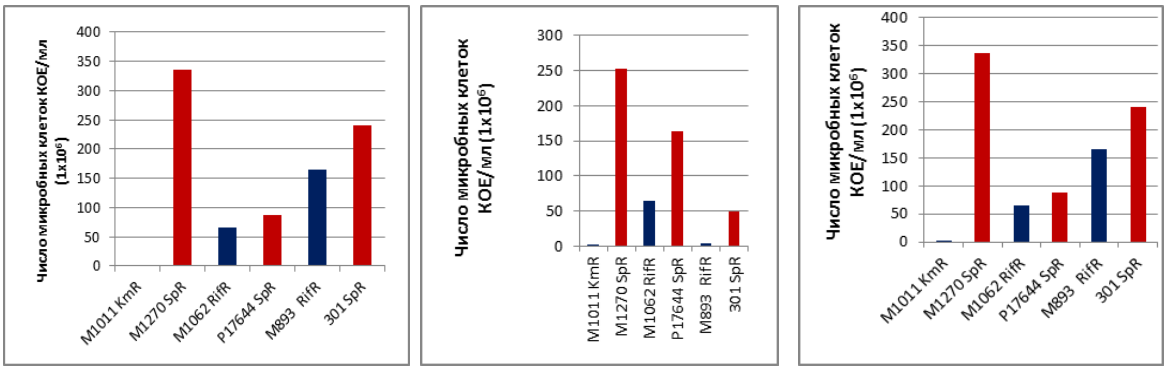


Рисунок 1. Динамика выживаемости некоторых типичных штаммов и геновариантов *V.cholerae* биовара Эль Тор в речной воде (приведены средние данные трёх экспериментов). М818 – типичный штамм; М1266, М1298, М1429 – геноварианты.

В результате установлено, что уже на 20 сутки количество микробных клеток штаммов геновариантов превышало число клеток типичных штаммов в 2,5-38,8 раз (рис. 2 А). Таким образом, геноварианты при совместном культивировании в речной воде оказались более конкурентоспособными, чем типичные штаммы.



А **Б** **В**

Рисунок 2. Результаты конкурентной пробы в речной воде (А) и организме биомоделей (содержимое кишечника – Б, стенка тонкого кишечника – В). Синие столбики – типичные штаммы, красные столбики – штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Следующим этапом работы явилась постановка конкурентной пробы в организме биомоделей (в лигированных петлях тонкой кишки взрослых кроликов). В результате было установлено, что как при высеве кишечного содержимого, так и гомогената кишечной стенки количество клеток штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в трёх изучаемых

парах превышало число клеток типичных штаммов в 1,25-84,0 раза (рис. 2 Б и В).

Таким образом, в результате проведённых исследований установлено, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор способны не только длительное время выживать в речной воде, но и размножаться в ней, что создает реальную угрозу попадания их в организм человека и развития заболевания. При совместном культивировании типичных и генетически изменённых штаммов в речной воде и организме биопробных животных геноварианты оказываются более конкурентоспособными, чем типичные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, что указывает на их адаптивные преимущества. Одной из причин селективного преимущества геновариантов в природных популяциях, возможно, является их более высокий уровень адаптации к окружающей среде в результате изменения метаболической активности клеток.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С., Половинкина В.С., Куликалова Е.С., Афанасьев М.В. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae eltor,* изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2012; 2:13-21.
2. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванова С.М., Анисимова Г.Б. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 гг., прогноз на 2015 г. Пробл. особо опасных инф. 2015;1:18-25.
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. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2011; 3:11-8.
4. Faruque S.M., Nair G.B. *Vibrio cholerae*: Genomics and Molecular Biology. Caister Academic Press. 2008.
5. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanism of persistence of *Vibrio cholerae.* Front Microbiol. 2013; 4:1-15.
6. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol.2006; 44(11):4211–3.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАЗНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ *VIBRIO CHOLERAE* NON O1/NON O139

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

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

Холерные вибрионы не О1/не О139 серогрупп выделяются гораздо чаще из пресноводных и солёных водоемов, чем от людей, в том числе и в периоды вспышек в конкретных регионах. В то же время, являясь естественными обитателями водных объектов и соответственно приспособленные к условиям окружающей среды, многие водные штаммы сохраняют способность к реализации патогенетического потенциала [4, 5]. На юге России острые кишечные инфекции, вызванные холерными вибрионами не О1/не О139 серогрупп, регистрируются практически ежегодно [1, 3]. Ранее нами на примере Ростовской области была показана крайняя генотипическая изменчивость популяции клинических штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенных в разные годы, и установлено, что вирулентность клинических штаммов в отсутствие генов холерного токсина (*ctxAB*) может быть связана с экспрессией детерминант других факторов патогенности [1]. Целью настоящего исследования было сравнение биологических свойств *V. cholerae* non O1/non O139 – представителей водной популяции и клинических культур.

Для изучения из музея живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института были получены 191 штамм *V. cholerae* non O1/non O139, изолированный от больных в Республике Калмыкия и Ростовской области с 1968 по 2015 г., и 42 штамма, выделенных из объектов окружающей среды (4 из рыб, 38 из морской воды). Все культуры были типичны по культурально-морфологическим и биохимическими свойствам. При серотипировании с помощью набора сывороток к 80 серогруппам, полученных в Ростовском противочумном институте, серогрупповую принадлежность удалось установить у 67,8 % штаммов, выявлены вибрионы 42 серогрупп, причем штаммы О2, О5, О8, О34, О39, О47 серогрупп циркулировали на обеих территориях (таблица). Разнообразие выявленных серогрупп и немногочисленность представителей каждой из них (от 2 до 10) не позволяет говорить о доминировании какой-либо из них, что соответствует мировым литературным данным. Вместе с тем, в настоящее время отмечены незначительные изменения среди клинических штаммов в Ростовской области. Так, в нынешнем столетии были выявлены представители пяти ранее не встречавшихся на данной территории серогрупп, а число типируемых штаммов снизилось, возможно, в том числе за счёт появления

новых серогрупп.

Таблица. Серогруппы штаммов *V. cholerae* non O1/non O139

Происхождение штаммов	Больные Ростовская область 1968-2000 гг.	Больные Ростовская область 2000-2015 гг.	Больные Республика Калмыкия 2000-2015 гг.	Объекты окружающей среды 2011-2012 гг.
Число шт./из них типируемых	97/75 (77,3%)	34/20 (58,8%)	60/41 (68,3%)	42/22 (52,3%)
Серогруппа (число штаммов)	O2 (9), O4(2), O5(10), O6(7), O8 (3), O13(4), O16 (1), O17(2), O24(3), O34 (2), O35(1), O37(1), O39 (2), O45(1), O46(1), O47(8), O49(2), O50(5), O51(6), O52(3), O53(1), O54(1), н/т(22)	O2(3), O5(1), O6(1), O8(1), O17(1), O27(1), O34(1), O39 (5), O47(1), O51(1), O59(1), O81(2), O82(1), н/т (14)	O2(2), O3(2), O4(1), O5(4), O6(1), O8(3), O16(1), O19(3), O34(2), O39(2), O47(1), O49(1), O50(3), O57(1), O58(4), O60(2), O62(1), O72(1), O76(1), O78(2), O80(2), O82(1), н/т(19)	O2(4), O5(3), O24(8), O32(1), O44(1), O48(1), O51(1), O67(1), O71(1), O76(1), н/т(20)

При ПЦР-генотипировании установлено, что все штаммы независимо от происхождения содержали набор генов, необходимый для жизнеобеспечения: гены гемагглютинин/протеазы, протеазы PrtV, коллагеназы, цитотонического фактора Cef, белка наружной мембраны OmpW, *tol*- и *vps*-кластеров, регуляторных генов *toxR*, *hapR*, транслоконов T6SS. Установлено отсутствие в геноме всех штаммов, циркулирующих на территориях Республики Калмыкия и Ростовской области, генов профагов CTX (с генами *ctxAB*), pre-CTX и RS1, термостабильного, шигаподобного токсинов и прямого термостабильного (TDH) и родственного ему гемолизина (TRH) *V. parahaemolyticus*.

Кроме уже описанных двух *tcpA*-позитивных штаммов, имеющих гены острова патогенности VPI (*tcpA, tagA, mop* и *acfB*), больше таких культур обнаружено не было, хотя часть штаммов имела от одного до трех названных генов. Сайт специфической интеграции *attRS* присутствовал у 76 клинических и 7 водных культур. Наиболее вариабельны были острова патогенности VPI-2 и RTX-кластера, которые содержали делеции в разных участках. Ген cholix-токсина (*chxA*I типа) – блокатора белкового синтеза - обнаружен только у культур, изолированных от людей (17 из Ростовской области и 7 из Республики Калмыкия), что может свидетельствовать о его причастности к патогенезу.

У части штаммов выявлены отдельные гены островов пандемичности VSP-I и II (tnp0185, deo175, VC0185, pVSP-II, pro0490, pro0496, VC502) в различных сочетаниях, что говорит о родственных связях *V. cholerae* non O1/non O139 с *V. cholerae* O1, которые ежегодно выделяются из водных объектов окружающей среды на обеих территориях

[2]. Следует отметить, что «водные» культуры чаще содержали в своем геноме ген *mshA*, чем клинические (18 и 4 соответственно).

Штаммы, сходные по генотипу, иногда имели различное происхождение. Так, в один кластер попали клинические штаммы из п. Яшкуль (2000 г.), г. Ростова-на-Дону (1974 г.) и из морской воды (Азовское море, с. Петрушино, 2012). Таким образом, выявленные различия между штаммами не позволили установить чётких связей между генотипами и пребыванием вибрионов в разных экологических нишах. В тоже время штаммы с минимальным набором генов патогенности изолированы как из объектов окружающей среды, так и от больных, что свидетельствует о возможности реализации патогенетического потенциала за счёт генов, которые есть у всех культур, а значит о необходимости мониторинговых исследований водных объектов и более пристального внимания к этой группе вибрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 3. – С. 25-27.

2. Зубкова Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б., Титова С.В. Информационный анализ выделения культур холерных вибрионов из водных экосистем на территории Российской Федерации с 1989 по 2014 г. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. проблемной комиссии. – Ростов н/Д, 2015. – № 28. – С. 34-37.

3. Ерошенко Г.А., Куклева Л.М., Шавина Н.Ю., Кутырев В.В. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов не О1/не О139 серогруппы, выделенных от больных в г. Астрахани в 1976-2003 гг. // Пробл. особо опасных инф. – 2006. – № 2 (92). – С. 41-44.

4. Sen M., Hajra T.K., Browmick P., Naskar P., Bag P.K. Evaluation of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) glycohydrolase activity among the strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 // Curr. Res. Microbiol. Biotechnol. 2013; 1(2):46-9.

5. Sharma C., Thungapathra M., Ghosh A., Mukhopadhyay A.K., Basu A., Mitra R., Basu I., Bhattacharya S.K., Shimada T., Ramamurthy T., Takeda T., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B. Molecular analysis of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India // J. Clin. Microbiol. 1998; 36:756-63.

МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ

А.В. Тришина, Е.А. Березняк, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева, А.Ю. Березняк

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

В настоящее время эпидемиологическая обстановка по ряду инфекционных заболеваний в мире продолжает оставаться неустойчивой, способствующей возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Повсеместное распространение резистентности к антимикробным препаратам (АМП) среди бактерий делает возможным передачу лекарственной устойчивости чувствительным условно-патогенным и патогенным микроорганизмам.

Результаты исследований, проведённых в Российской Федерации в последние годы, показали, что к ведущим возбудителям заболеваний относятся *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumanii* [1, 2, 3]. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* являются наиболее частыми возбудителями нозокомиальных инфекций. В рамках многоцентрового эпидемиологического исследования, проведённого в России в 2011-2012 гг., энтеробактерии составили в общей сложности 33,7 % всех выделенных бактериальных возбудителей [4].

Одной из важных проблем современной медицины является неуклонный рост числа инфекционных заболеваний, вызванных резистентными штаммами микроорганизмов, и снижение эффективности АМП, используемых для их лечения. Заболевания, вызываемые полирезистентными бактериями, признаны глобальной проблемой, существующей во всех странах.

Водоёмы являются идеальным источником бактерий, несущих гены устойчивости к антибиотикам. Дисперсия этих бактерий в водной среде способствует взаимодействию с коренной микробиотой, создаёт новые сценарии для эволюции антибиотикорезистентности, что затрудняет прогнозы относительно риска появления и распространения новых антибиотикорезистентных штаммов. Таким образом, необходимы знания по экологической структуре водоёмов с географической привязкой, данные по антибиотикорезистентности микрофлоры, которые являются фундаментальными для прогнозирования возникновения новых штаммов, вызывающих беспокойство у клиницистов. Программы мониторинга дают важную информацию о развитии бактериальных механизмов

резистентности в различных географических регионах [5].

Материалы и методы. Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь 2014 -2015 гг. в водоёмах города: река Дон – правый берег; приток реки Мертвый Донец; река Дон ниже впадения р. Темерник.

Чувствительность к антимикробным препаратам определяли методом серийных разведений в агаре Мюллера-Хинтона, используя для энтеробактерий препараты первого ряда: гентамицин, доксициклин, ампициллин, цефтриаксон, налидиксовую кислоту, ципрофлоксацин, левомицетин, нитрофурантоин, ко-тримоксазол. Для неферментирующих бактерий: азтреонам, меропенем, цефтриаксон, гентамицин, доксициклин, левомицетин, нитрофурантоин, ко-тримоксазол, ципрофлоксацин. Величину МПК (минимальная подавляющая концентрация) антибиотиков в отношении порядка *Enterobacteriales* оценивали по таблицам для энтеробактерий, а для порядка *Pseudomonadales* - по таблицам для неферментирующих микроорганизмов. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «MicrosoftOfficeExcel».

Результаты. В 2014-2015 гг. проанализировано 433 штамма условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, относящихся к порядкам *Enterobacteriales* и *Pseudomonadales*, определено 19 родов, идентифицирован 61 вид микроорганизмов, принадлежащих к этим порядкам.

В 2014 г. изучены185 штаммов (рисунок 1), относящихся к 16 родам, определено 32 вида микроорганизмов: род *Acinetobacter* составил 24,9 %, *Escherichia* - 22,7 %, *Citrobacter* - 5,4 %, *Enterobacter* - 14,1 %, *Klebsiella* - 10,8 %, *Salmonella* - 5,9 %, *Pseudomonas* - 4,9 %, *Pantoea* - 4,9 %, *Proteus* - 1,6 %, *Kluyvera* - 1,1 %, *Providencia* – 1,1 %, *Yersinia* - 1,1 %, *Morganella* - 0,9 %, *Raoultella* - 0,95 %, *Rahnella* - 0,5 %, *Serratia* - 0,5 %.

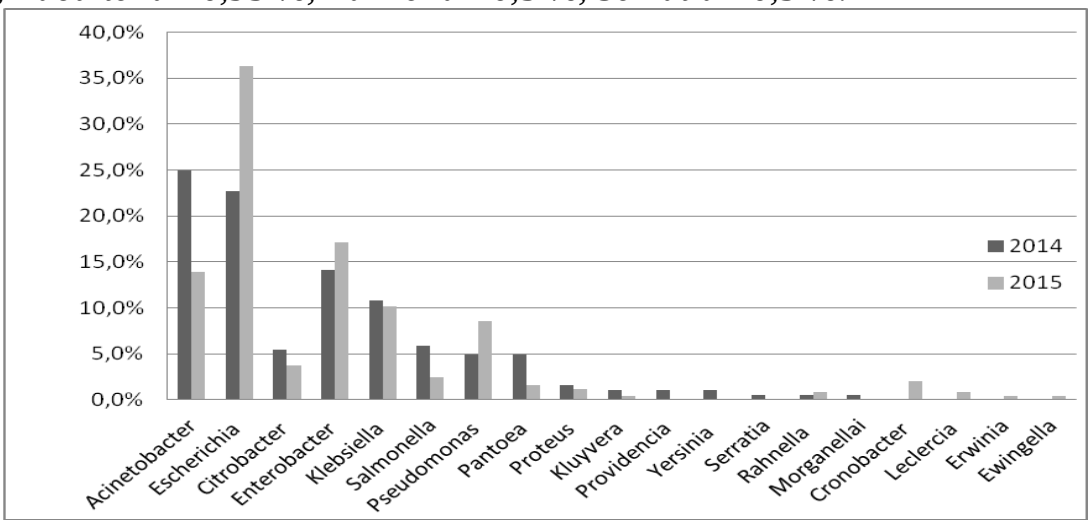


Рисунок 1. Спектр выделенных условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в 2014-2015 гг.

В 2015 году с мая по сентябрь были исследованы 248 штаммов условно-патогенных и патогенных микроорганизмов, выделенных из водных объектов. Идентифицированы представители 15 родов, 46 различных видов микроорганизмов. Порядок *Enterobacteriales* представлен семейством *Enterobacteriaceae* (13 родов) и два рода из порядка *Pseudomonadales*. Род *Escherichia* составил 36,3 %, *Enterobacter* - 17,1 %, *Acinetobacter* - 13,9 %, *Klebsiella* - 10,2 %, *Pseudomonas* - 8,6 %, *Citrobacter* - 3,7 %, *Salmonella* - 2,4 %, *Cronobacter* - 2,0 %, *Pantoea* - 1,6 %, *Proteus* - 1,2 %, *Rahnella* - 0,8 %, *Leclercia* - 0,8 %, *Erwinia* - 0,4 %, *Ewingella* - 0,4 %, *Kluyvera* - 0,4 % (рисунок 1).

Микробиологический мониторинг патогенных и условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) направлен на выявление штаммов, устойчивых к клинически значимым классам АМП.

Проведённые исследования показали высокую встречаемость штаммов УПМ, чувствительных к ципрофлоксацину, цефтриаксону, левомицетину, гентамицину в 2014 - 2015 гг. На протяжении всего периода наблюдений регистрировалась высокая доля штаммов УПМ, резистентных к ампициллину, нитрофурантоину и ко-тримоксазолу.

В 2014-2015 гг. выделялось большое число штаммов УПМ, имеющих множественную устойчивость к АМП, что является одним из информативных показателей антропогенной нагрузки на водоёмы. Свойство полирезистентности было отмечено у представителей разных видов и родов условно-патогенных и патогенных бактерий.

В 2014 г. все представители родов *Yersinia, Rahnella, Kluyvera,* большая часть представителей родов *Escherichia, Klebsiella, Enterobacter* и *Morganella* обладали полирезистентностью, доля полирезистентных штаммов *Citrobacter* составила 42,9 %, *Proteus* - 33,3 %, *Acinetobacter* - 28,1 %, *Pseudomonas*- 25,0 %(рисунок 2).

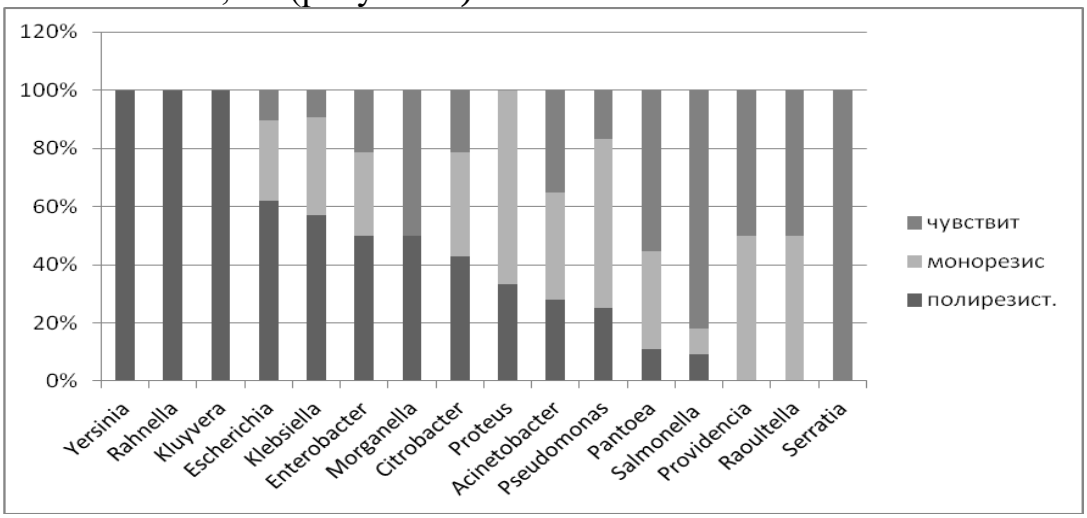


Рисунок 2. Распределение профилей антибиотикорезистентности по родам УПМ в 2014 г.

Больше всего монорезистентных штаммов выявлено среди бактерий родов *Proteus* (66,6 %) и *Pseudomonas* (58,3 %), половина представителей родов *Providencia* и *Raoultella* также оказались монорезистентными.

В 2015 г. доля полирезистентных штаммов заметно выросла. Сто процентов выделенных нами штаммов родов *Proteus, Rahnella, Leclercia, Erwinia, Ewingella, Kluyvera* обладали полирезистентностью. Большая часть представителей родов *Escherichia* (79,8 %), *Enterobacter* (88,4 %), *Citrobacter* (66,7 %), *Salmonella* (83,3 %), *Cronobacter* (60 %), *Pantoea* (60 %) также были полирезистентны (рисунок 3).

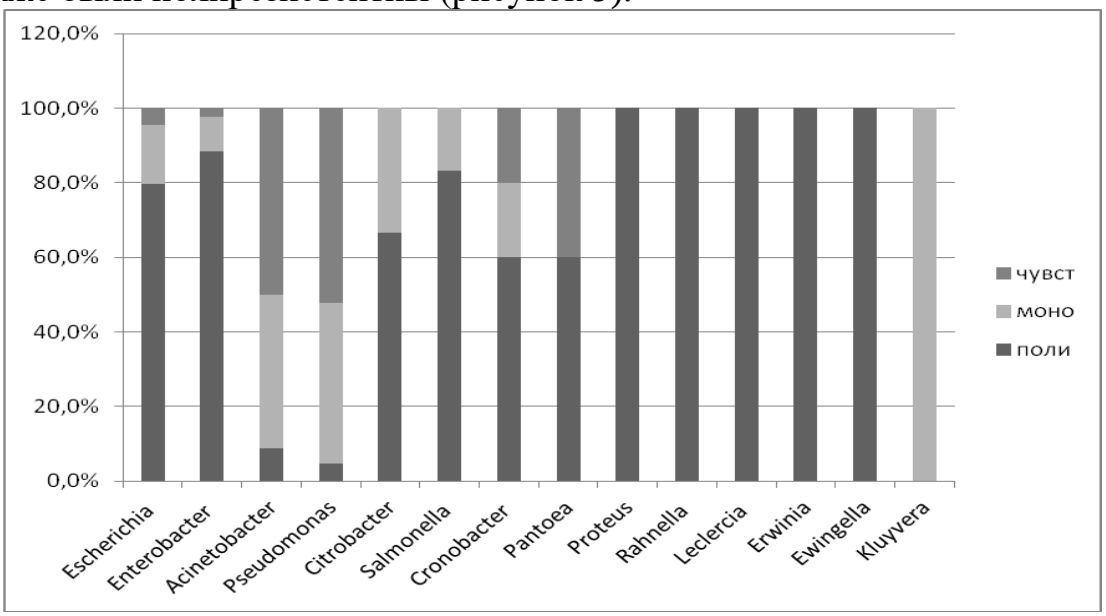


Рисунок 3. Распределение профилей антибиотикорезистентности по родам УПМ в 2015 г.

Среди выделенных в 2015 г. микроорганизмов, относящихся к разным родам УПМ, все, в той или иной степени, были устойчивы к АБП.

В результате проделанной работы установлено, что в 2015 г. увеличилась доля антибиотикорезистентных штаммов и штаммов с множественной резистентностью с преобладанием фенотипов устойчивости к трём, четырём и пяти АМП. В результате обобщения полученных данных о видовом разнообразии и антибиотикорезистентности УПМ создана информационная база данных «Антибиотикорезистентность условно-патогенных микроорганизмов поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону». Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных в Федеральной Службе по интеллектуальной собственности (РОСПАТЕНТ) в 2015 г. В базе данных содержатся сведения о спектре и резистентности к антибактериальным препаратам штаммов порядка *Enterobacteriales* и *Pseudomonadales*, выделенных из поверхностных водоёмов в период с мая по сентябрь в 2014 г. и в 2015 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гординская Н.А., Сабирова Е.В., Абрамова Н.В., Дударева Е.В., Савочкина Ю.А. Особенности нозокомиальных штаммов *Acinetobacter spp.* в травматологической клинике // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013; 15(2):143-6.

2. Решедько Г.К., Рябкова Е.Л., Кречикова О.И., Сухорукова М.В., Шевченко О.В. , Эйдельштейн М.В. , Козлов Р.С. Резистентность к антибиотикам грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в ОРИТ многопрофильных стационаров России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2008; 10(2):96-112.

3. Решедько Г.К., Щебников А.Г., Морозов М.В., Решедько Л.А. *Escherichia coli* как возбудитель нозокомиальных инфекций в ОРИТ // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2011; 13(4):314-21.

4. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования МАРАФОН в 2011-2012 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; (4): 12-20.

5. Lösch L.S., Alonso J.M., Merino L.A. Occurrence of antimicrobial-resistant *Enterobacteriaceae* in water from different sources in a subtropical region of Argentina // Revista Ambiente& Água – An Interdisciplinary J. Appl. Sci.2008; 3(2):28-36.

МОНИТОРИНГ БАКТЕРИАЛЬНОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВОДЫ НИЖНЕГО ДОНА (2011–2015 ГГ.)

П.В. Журавлёв[1], В.В. Алешня[1], О.П. Панасовец[1], К.В. Евдокимова[1], Г.В. Айдинов[2], М.М. Швагер[2], А.А. Глухов[3], Б.Х. Джансейидов[4], Г.А. Мартынов[4], Е.И. Деревякина[4]

[1]ФБУН «Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону;
[2]ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону;
[3]Территориальный отдел Управления Роспотребнадзора по Ростовской области в городе Азове, г. Азов;
[4]филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области в городе Зернограде» Роспотребнадзора, г. Азов

В эпидемиологическом отношении большую опасность

представляют поверхностные воды, которые постоянно открыты для всех видов контаминации и нередко являются местом сброса коммунальных, промышленных и сельскохозяйственных сточных вод [1, 2, 3, 4].

В связи с использованием поверхностных вод для питьевых целей, хозяйственно-бытовых нужд населения и для рекреации, серьёзного внимания заслуживает микробиологическое качество этих вод, так как спектр патогенных и условно-патогенных микроорганизмов, способных к распространению водным путем, достаточно широк [5, 6, 7].

Основной задачей исследования является многолетний мониторинг бактериального загрязнения воды Нижнего Дона. В настоящей работе приведены данные пятилетнего цикла исследований (2011-2015 гг.).

Исследования на наличие санитарно-показательных (ОКБ, ТКБ), потенциально патогенных микроорганизмов (клебсиелл, синегнойных палочек, глюкозоположительных колиформных бактерий – ГКБ) проводили с использованием жидкой среды накопления по МР № 01-19/98-17 «Усовершенствованный метод обнаружения энтеробактерий и неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов в объектах водной среды», Ростов-на-Дону, 1996 г., МР «Использование усовершенствованной питательной среды для выделения и идентификации синегнойных бактерий», М., 1978 г., разработанных в нашем институте. Для выделения и количественного учёта сальмонелл использовали разработанную нами питательную среду для накопления сальмонелл, готовую к применению (регистрационное удостоверение № ФСР 2009/05759 от 29.09.2009 г.), и МР № 07-03-10/384-4 «Использование готовой к применению питательной среды для выделения сальмонелл из водных объектов», Ростов-на-Дону, 2012.

Необходимость изучения циркуляции в водной среде глюкозоположительных микроорганизмов обусловлена тем, что глюкозный признак, наряду с оксидазной активностью, является более стабильным по сравнению с лактозным, поэтому показатель ГКБ объединяет широкий круг энтеробактерий, как патогенных – сальмонеллы, шигеллы, так и значительное число лактозоотрицательных потенциально патогенных микроорганизмов – протеи, серрации, цитробактеры, энтеробактеры [2].

Санитарно-бактериологические исследования воды Нижнего Дона на участке от Ростова-на-Дону до Азова показали широкое распространение и высокий уровень содержания патогенных, потенциально патогенных и санитарно-показательных микроорганизмов.

Частота обнаружения ОКБ, ТКБ, ГКБ и клебсиелл составила 100 %, синегнойных палочек – 70 %. Индекс ОКБ в среднем по водоёму равнялся 453600 КОЕ/100, ТКБ – 106100 КОЕ/100, ГКБ – 689600 КОЕ/100, клебсиелл составил 497500 КОЕ/100, СП – 2900 КОЕ/100.

Наиболее «чистым» в бактериальном отношении биотопом является

водозабор г. Ростова-на-Дону. Высокий уровень микробной контаминации воды азовского водозабора (индекс ОКБ в среднем 108170 КОЕ/100, ТКБ – 26700 КОЕ/100, ГКБ –346300 КОЕ/100, клебсиелл – 118850 КОЕ/100, СП – 1060 КОЕ/100) связан с тем, что он находится всего лишь в 37 км ниже выпуска сточных вод Ростовской городской канализации и на этом отрезке реки процессы бактериального самоочищения не заканчиваются.

Самый высокий уровень содержания санитарно-показательных микроорганизмов отмечался в биотопах ниже выпусков городских канализаций – ростовской и азовской, который в десятки и сотни раз выше, чем в условно «чистых» биотопах. Такое высокое бактериальное загрязнение может оказывать влияние и на качество воды биотопов, расположенных выше выпуска сточных вод, вследствие сгонно-нагонных явлений, способствующих распространению загрязнений вверх по реке (нагонные) и ухудшающих процессы бактериального самоочищения водоёма за счёт сгонных ситуаций.

Значительное бактериальное загрязнение рассматриваемой акватории отражается и на качестве воды городских пляжей: ростовского (ОКБ – 385000 КОЕ/100, ТКБ – 84000 КОЕ/100, ГКБ – 556000 КОЕ/100, клебсиелл – 412000 КОЕ/100, СП – 1320 КОЕ/100) и азовского (ОКБ – 468600 КОЕ/100, ТКБ – 116540 КОЕ/100, ГКБ – 961000 КОЕ/100, клебсиелл – 499650 КОЕ/100, СП – 2600 КОЕ/100).

Из воды Нижнего Дона в среднем выделены сальмонеллы в 38,8 % проб с НВЧ/1000 мл 10,5. За изучаемый период было выделено 274 культуры сальмонелл 36 сероваров.

Наиболее высокий процент выделенных культур сальмонелл относился к серогруппе группы В – 47,1 %, 19,3 % - к серогруппе Д, к серогруппе С – 16,1 %, к серогруппе Е –17,5 % (рисунок 1).

Рисунок 1 - Частота выделения сероваров сальмонелл из воды Нижнего Дона

Среди них наиболее часто выделялись сальмонеллы: *S. typhimurium, S. enteritidis, S. bredeney, S. essen, S. derby, S. virchow, S. anatum.* Прочие сальмонеллы были выделены от 2,2 % до единичных находок.

Таким образом, средний уровень содержания санитарно-

показательных микроорганизмов во всех изучаемых биотопах не соответствует гигиеническим нормативам, причём обращает на себя внимание, что содержание клебсиелл и ГКБ превышает количество нормируемых микроорганизмов – ОКБ и ТКБ. При этом установлена значимая корреляция между ГКБ и сальмонеллами ($r = 0,496$; $p = 0,002$), ГКБ и клебсиеллами ($r = 0,525$; $p = 0,001$), клебсиеллами и сальмонеллами ($r = 0,583$; $p = 0,001$). Следовательно, интегральный показатель ГКБ и клебсиеллы наиболее адекватно отражают степень потенциальной эпидемической опасности водоёма, а наличие сальмонелл свидетельствует о прямой эпидемической опасности при водопользовании.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адаменко О.Л. Водные ресурсы Ростовской области как объект антропогенного воздействия // Здоровье населения и среда обитания. – 2010. – №6. – С .9 – 11.
2. Журавлёв П.В., Алешня В.В., Панасовец О.П. и др. Санитарно-бактериологическая характеристика воды Нижнего Дона // Гигиена и санитария. – 2012. - № 4. -С. 28-31.
3. Обухова О.В., Ларцева Л.В., Лисицкая И.А. Санитарно-микробиологическая оценка гидросистемы дельты Волги при антропогенном загрязнении // Гигиена и санитария. – 2009. – № 1. – С. 23 – 25.
4. Соловьёв М.Ю., Ковалёв Е.В., Конченко А.В., Михеева И.В. О состоянии водоснабжения населённых мест Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2012. – № 12. – С. 31 – 33.
5. Алешня В.В., ПанасовецО.П., Журавлёв П.В. Изучение влияния отдельных факторов окружающей среды на жизнеспособность сальмонелл в воде для определения ее эпидемического потенциала // Гигиена и санитария. – 2015. – № 7. – С.40-41.
6. Астафьев В.А., Савилов Е.Д. Загрязнение объектов окружающей среды и заболеваемость инфекциями с водным путём передачи // Материалы IX съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 2007 г. – М., 2007. – Т.2. – С. 207.
7. Загайнова А.В., Талаева Ю.Г., Дмитриева Р.А. и др. Оценка эпидемической опасности патогенных и условно-патогенных бактерий, выделенных из воды различного вида водопользования / Гигиена и санитария. – 2010. – № 5. – С. 68–73.

ПРИМЕНЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ СПОСОБОВ ДЕКОНТАМИНАЦИИ ВОДЯНОГО БАЛЛАСТА

С.Ю. Водяницкая, Л.В. Судьина, В.В. Баташев, Н.В. Павлович

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

В настоящее время в результате расширения международного судоходства ежегодно происходит перемещение разнообразных животных и растительных организмов с судовыми балластными водами, при этом создаются условия для их укоренения в новом регионе. Нельзя не учитывать и тот факт, что вместе с ними в страны могут ввозиться и новые, нехарактерные для этих территорий микроорганизмы. Это создаёт предпосылки для серьёзных экологических, социальных и экономических последствий. В 2004 году принята Международная конвенция по контролю судовых балластных вод и осадков и управлению ими, которая предписывает, что к 2019 году все суда должны обрабатывать балластные воды механическими, биологическими, физическими, химическими и другими методами, обеспечивающими требуемую минимальную концентрацию жизнеспособных организмов и удаление осадков.

В соответствии со стандартом качества балластных вод, к индикаторным микробам балластной воды относят токсигенный холерный вибрион О1 и О139 серогрупп, кишечную палочку и кишечные энтерококки.

Известно пять основных методов, способствующих минимизации риска заноса нежелательных организмов, причем каждый из них имеет как свои преимущества, так и недостатки: исключение сброса балластной воды вообще; ограничение количества принимаемого водяного балласта на судно, выбор мест приёма балласта; обработка водяного балласта на борту судна; сдача балласта для обработки на береговые приёмные сооружения; смена балласта в водах открытого океана или его разбавление [1, 2].

При выборе методов обработки балласта следует помнить, что они должны отвечать следующим критериям: быть безопасными для человека и окружающей среды, эффективными и экономичными. Приемлемым методом, на наш взгляд, является обработка балластных вод на борту судна, включающая механический, физический и химический способы [3].

Механический способ, заключающийся в сепарации и фильтрации, является довольно грубым способом очистки водяного балласта [4], где в качестве фильтров используется резиновая крошка отработанных автопокрышек. В работе Feng D. с соавторами для повышения качества очистки балластных вод рекомендовано применение гидроциклонов с использованием коагулянтов [5]. Достоинством механического способа

является простота в применении. Однако среди недостатков необходимо отметить, что при повышении скорости фильтрации и сепарации возможно снижение качества очистки воды и образование осадка в балластных танках.

Самый простой физический способ - нагрев балластной воды с помощью теплообменников судов. В ряде публикаций зарубежных исследователей [6] рекомендовано три температурных интервала для деконтаминации балластных вод: 35 - 37,5°С в течение 60–120 мин, 40-45°С и 55–80°С в течение 30–90 мин. К существенным недостаткам способа можно отнести нарушение равновесия прибрежных экосистем вследствие сброса горячей воды в прибрежные акватории.

Ультрафиолетовое облучение для обеззараживания воды используется в медицине давно. Оно разрушает молекулярную структуру клеток, вызывает их полную гибель или нарушает репродуктивную способность. Оптимальное пиковое значение для уничтожения бактерий и водорослей в балластных водах - 254 нм - предложено в работе Jung Y.J. с соавторами [7].

Физический способ гидродинамической кавитации для обеззараживания балластных вод описан в работах Cvetković M. с соавторами. Гидродинамическая кавитация - явление, при котором нарушается однородность жидкости, появляются пузырьки или полости, состоящие из пара или газа. Авторами отмечено, что для полного уничтожения биоты в водяном балласте применение гидродинамической кавитации недостаточно и рекомендовано сочетать её с ультразвуковым воздействием [8]. Также показано, что ультразвук усиливает своё воздействие на морские организмы благодаря электролизу солей, растворённых в морской воде, находящейся в танках, и при коротком времени воздействия 60-150 мин и низком напряжении концентрация микробов уменьшается с 10^8 до 10^6 КОЕ/100 мл.

Для обработки водяного балласта довольно часто используют гидроксильные радикалы. При концентрации окислителя 0,7 мг/л и времени экспозиции 6 ч обработки наблюдалась 100 % гибель бактерий, а при концентрации окислителя 2,5 мг/л и 6-часовой экспозиции - обесцвечивался хлорофилл у водорослей, не вызывая полного уничтожения. ZhangY. с соавторами [9] подчёркивают, что использование радикалов ОН является эффективным и наиболее щадящим для окружающей среды. Таким образом, применение только лишь физических способов не приводит к 100 % деконтаминации балласта, вызывает коррозию металлических поверхностей и деталей судна, либо несёт ущерб прибрежным экосистемам.

Наиболее часто на практике используется химический способ для деконтаминации судового балласта.

Простой и недорогой в применении дезинфектант - перекись

водорода. При ее использовании нет риска образования побочных органических соединений и, кроме того, балластную воду можно сбрасывать без ущерба для окружающей среды после короткого времени экспозиции (24 ч) и относительно невысокой концентрации (5мг/мл) [10].

Изучению воздействия четвертичных аммониевых соединений (ЧАС) посвящены работы van Slooten C. Применение ЧАС в малой концентрации не даёт должного эффекта очистки судового балласта, при этом обнаружена высокая токсичность для окружающей среды химических реагентов этого класса [11].

Другим популярным химическим веществом для обеззараживания воды является хлор и его соединения. Биоцидное действие хлора объясняется высокой химической активностью и высокой окислительной способностью хлорноватистой кислоты по сравнению с анионами Cl^-. Хлорирование балластной воды эффективно при pH около 7,5 в концентрации 5 мг/м^3. А при сбросе воды его концентрация не должна превышать значений ПДК 0,03 г/м^3. Хлор на суда поставляется в стальных цилиндрах или стальных бочках. Агрессивность и токсичность хлора создаёт большие экономические затраты на создание специального оборудования по обеспечению биологической безопасности, хранение его запасов на судне несёт возможный риск для здоровья экипажа [12, 13].

Таким образом, существует множество способов и методов обработки водяного балласта на судах, которые свидетельствуют о том, что до сих пор так и не найден универсальный. Для определения контроля качества судовых балластных вод активно используют передовые методы молекулярной биологии и медицины: ПЦР в реальном времени, MALDI-TOF масс-спектрометрию [14].

В настоящее время в рамках НИР в Ростовском–на–Дону противочумном институте проводятся исследования химических и биологических веществ для деконтаминации судового балласта, результаты которых будут иметь большое значение в целях снижения заноса патогенных микроорганизмов судами, выполняющими международные рейсы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. – СПб.: ЗАО ЦНИИМФ, 2005. – 120 с.

2. Монография Программы Глобалласт (США). - Вып. 19. – 41 с.

3. Сагайдак А.И. Проблема водяного балласта и пути ее решения: Матер. докл. I-го науч.- практ. Семинара по проблеме управления судовыми балласт.водами. - Одесса. - 2003.

4. Tang Z. et al. Enhanced performance of crumb rubber filtration for ballast water treatment / Z. Tang, M.A. Butkus, Y.F. Xie [et al.] // Chemosphere,

2009. - № 3. – P. 1396 - 1399.

5. Feng D. et al. Inactivation of Heterosigmaakashiwo in ballast water by circular orifice plate-generated hydrodynamic cavitation / D. Feng, J. Zhao, T. Liu [et al.] // Environ. Technol., 2015.- № 10. – P. 1 - 10.

6. Hallegraeff G. M. Transport of toxdinoflagellates via ships ballast water: bioeconomic risk assessment and efficacy of possible ballast water management strategies// Marine Ecol. Prog. Ser., 1998. – Vol. 168. – P. 297-309.

7. Jung Y.J. et al. Evaluation of disinfection efficacy and chemical formation using MPUV ballast water treatment system (GloEn-Patrol) /Y.J. Jung, Y. Yoon, T.S. Pyo [et al.] // Environ .Technol., 2012. - № 9. – P. 1953 - 1961.

8. Cvetković M. et al. Application of hydrodynamic cavitation in ballast water treatment/ M. Cvetković, B. Kompare, K.A. Klemenčič [et al.]//Environmental Science and Pollution Research., 2015. - Vol. 22. - № 10.- P. 7422 - 7438.

9. Zhang Y. et al. OH Treatment for Killing of Harmful Organisms in Ship's Ballast Water with Medium Salinity Based on Strong Ionization Discharge/ Y. Zhang, M. Bai, C. Chen [et al.] // Plasma Chemistry and Plasma Processing., 2013. - Vol. 33. - № 8. - P. 751 - 763.

10. Kuzirian A.M. et al. Hydrogen peroxide: an effective treatment for ballast water/ A.M. Kuzirian, E.C. Terry, D.L. Bechtel [et al.] // Biol. Bull., 2001. - № 10. – P. 297 - 299.

11. Сустретова Н.В. Обеспечение экологической безопасности балластных вод на судах смешанного «река-море» плавания: Автореф. дис. … канд. технич. наук. - НижнийНовгород, 2011. - 25 с.

12. Santagata S. et al. Concentrated sodium chloride brine solutions as an additional treatment for preventing the introduction of nonindigenous species in the ballast tanks of ships declaring no ballast on board/ S. Santagata, K. Bacela, D.F. Reid [et al.] // Environ. Toxicol.Chem., 2009.- № 2. – P. 346 - 353.

13. van Slooten C. et al. Assessment of dodecyldimethylammonium chloride as a ballast water treatment method/ C. van Slooten, L. Peperzak, A.G. Buma [et al.] // Environ. Technol., 2015.- № 1. – P. 435 - 449.

14. Телесманич Н.Р., Чайка С.О., Водяницкая С.Ю. и др. Применение масс-спектрометрического метода MALDI-TOF для межвидовой дифференциации близкородственных вибрионов // Клин. лаб. диагностика. – 2014. – Т. 59. - № 8. – С. 27 – 38.

БИОИНДИКАЦИЯ КАЧЕСТВА ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. ИРКУТСКА ДЛЯ ЭКОЛОГО-ФЛОРИСТИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ МЕСТ ОБНАРУЖЕНИЯ ВИБРИОНА ЭЛЬ ТОР

Е.С. Куликалова[1], Л.Я. Урбанович[1], Г.И. Кобанова[2], Л.В. Миронова[1], С.В. Балахонов[1]

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

[2]Научно-исследовательский институт биологии ФГБОУ ВПО «Иркутский государственный университет», г. Иркутск

Микробиологический мониторинг водных объектов I и II категории – регулярное сезонное исследование проб из объектов водной окружающей среды – имеет важное эпидемиологическое значение с целью обнаружения токсигенного холерного вибриона как показателя появления на территории заносного штамма. Как известно, все находки вибрионов в поверхностных водоёмах имеют место в зонах влияния канализационно-бытовых сточных вод, содержащих органические загрязнения – продукты жизнедеятельности человека. Наиболее адекватно состояние водной системы можно оценить по составу сообществ водных организмов [1]. Водоросли, являясь автотрофами, составляют основу трофической пирамиды, поэтому первыми участвуют в утилизации трофического базиса экосистемы, потребляя для построения органического вещества биогенные соединения азота и фосфора. Интенсивность биогенной нагрузки водоёма отражается не только в обилии развивающихся водорослей, но и в их видовом составе. Именно эти характеристики (изменение численности и видового состава при изменении трофической базы водоёма) водорослей используются в биоиндикационных методах, дающих оценку результатам природных и антропогенных процессов, протекавших в водном объекте. На фоне ежегодного выделения представителей рода *Vibrio* в поверхностных водоёмах проводилось исследование вегетирующих в них водорослей (альгофлоры), потребляющих для построения органического вещества биогенные соединения азота и фосфора и являющихся индикаторами их загрязнения.

Для оценки степени органического загрязнения водных объектов чаще применяют метод Пантле-Бука в модификации Сладечека [2]. Метод основан на разной чувствительности водорослей к присутствию в водной среде растворённой органики. Одни виды выдерживают значительные концентрации органических веществ и даже успешно развиваются, а другие обитают исключительно в чистых водах. Такие виды служат индикаторами или показателями качества воды.

Исследования проводились в июле и августе 2014 г. в пяти

стационарных точках водоемов г. Иркутска (залив Ерши Иркутского водохранилища; р. Ангара в районе о. Юность, р. Ангара в районе сброса правобережных очистных сооружений; Шишиловская протока; р. Сарафановка, впадающая в болотно-озёрный комплекс) и дополнительно взятой точке – р. Ушаковка с целью определения индекса сапробности, отражающего уровень органического загрязнения водной экосистемы.

Пробы воды объемом 0,5 л из поверхностного слоя воды отбирали в июле и августе 2014 г., консервировали раствором Люголя. Пробы отстаивали в течение 10 дней, осадок концентрировался, в 0,1 мл его определялся видовой состав водорослей и их численность (световой микроскоп фирмы Leica DMLB). Фотодокументирование водорослей – с помощью цифровой фотокамеры Leica DC 300. Их таксономическая принадлежность устанавливалась по определителям [2-10].

Индекс сапробности рассчитывали по формуле Бариновой, балл частоты встречаемости для каждого вида определяли по [11].

В целом индекс сапробности (S) меняется от 0 до 4, соответствует пяти классам качества воды (I–V) и пяти зонам самоочищения (ксено-, олиго-, бета-мезо-, альфа-мезо- и полисапробная). Все индикаторные виды водорослей делят на пять сапробиологических групп: 1) ксеносапробы – обитатели очень чистых вод; 2) олигосапробы – живут в практически чистых водах; 3) бета-мезосапробы – выдерживают слабое органическое загрязнение и при этом активно развиваются; 4) альфа-мезосапробы – способны выдерживать значительную степень органического загрязнения; 5) полисапробы – обитают и размножаются в сильно загрязненных и сточных водах. В чистых водах обитает небольшое число видов водорослей. По мере увеличения растворенной органики в водной среде разнообразие видов возрастает.

Анализ альгофлоры вводоёмах г. Иркутска показал, что около половины всех зарегистрированных таксонов водорослей являются индикаторами сапробности. В составе показательных таксонов отмечены индикаторы всех зон сапробности, кроме полисапробной. Среди них преобладают бета-мезосапробы. Проведённая оценка качества вод показывает, что большая часть изученных водоемов имеет III класс чистоты воды (табл.).

Наибольшее органическое загрязнение регистрируется в р. Сарафановка. Воды этой речки относятся к альфа-бетамезосапробной зоне и IV классу чистоты вод. В июле 2014 г. водоросли здесь не обнаружены, что характерно для вод, в которых находятся токсические вещества.

Наименьшему загрязнению подвергаются воды залива Ерши. Воды этого залива наиболее чистые и соответствуют олиго-бетамезосапробной зоне с переходом к бета-олигомезосапробной, а их чистота занимает пограничное положение между II – III классами.

Полностью свободные от органического загрязнения воды в

исследованных водоёмах г. Иркутска в настоящее время не обнаружены.

Таблица. Изменения индекса органического загрязнения (S) в исследуемых акваториях по фитопланктону

Месяцы	Залив Ерши	Залив Юность	Ангара ниже КОС	Шишиловская протока	Р.Сарафановка	Р.Ушаковка
Июль	1,52	1,9	1,95	1,99	*	2,32
Август	1,63	1,78	1,91	2,02	2,7	-
Класс чистоты воды	II-III	III	III	III	IV	III

Примечание: *****– фитопланктон отсутствует.

Таким образом, проведённые исследования показали, что применение метода Пантле-Бука в модификации Сладечека для оценки степени органического загрязнения водных объектов отражает происходящие тенденции в водных экосистемах. Сапробиологический анализ указанных выше водных объектов убедительно показал, что эти экосистемы различаются по уровню антропогенной нагрузки.

Как известно, хитиновые покрытия членистоногих, некоторых диатомовых водорослей и грибов играют определённую роль в прикреплении, сохранении и эволюции холерного вибриона в водных экосистемах [12]. Хитин и продукты его гидролиза, образуемые под действием хитиназы, не только являются источниками азота и углерода для *V. cholerae*, но и субстратом, способствующим формированию биоплёнки, защищающей холерный вибрион от неблагоприятных факторов внешней среды [12]. Таким образом, хитинсодержащие водные организмы, включая водоросли, служат для *V. cholerae* местом обитания (резервуаром), питательным субстратом, своеобразным убежищем от неблагоприятных факторов среды [13].

Находки таксонов водорослей (около половины которых являются индикаторами сапробности) в местах обнаружения холерного вибриона в водоёмах г. Иркутска свидетельствуют об их роли в экологии *V. cholerae*, а одновременное выявление тех и других в одной экологической нише указывает на антропогенное загрязнение водоема.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баринова С.С., Медведева Л.А., Анисимова О.В. Биоразнообразие водорослей-индикаторов окружающей среды. Тель-Авив: Изд. Дом «PiliesStudio», 2006. 498 с.

2. Сладечек В. Общая биологическая схема качества воды. Санитарная и техническая гидробиология: материалы I съезда ВГБО // М.: Наука, 1967. – С. 26–31.

3. Забелина М.М., Киселев И.А., Прошкина-Лавренко А.И., Шешукова В.С. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 4. Диатомовые водоросли. М., 1951. 620 с.

4. *Голлербах М.М.,* Косинская Е.К., Полянский В.И. Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 2. Синезеленые водоросли. М., *1953*. 654 с.

5. *Матвиенко А.М.* Определитель пресноводных водорослей СССР. Вып. 3. Золотистые водоросли. М.: Советская наука, *1954*. 188 с.

6. Скабичевский А.П. Планктонные диатомовые водоросли пресных вод СССР: систематика, экология и распространение. Материалы к познанию фауны и флоры СССР. Новая серия, Отдел ботанический (Том 11). 1960. 384 с.

7. Сафонова Т.А. Эвгленовые водоросли (Euglenophyta) Западной Сибири. - Новосибирск: Наука. Сиб. отделение, 1987. 192 с.

8. Андреева В.М. Род Chlorella, Л: Наука, 1975, 82 с.

9. *Hindak, F.* Studies on the chlorococcal algae (Chlorophyceae). IV. Veda, Bratislava, Biologicke Prace, *1988* (34): 1-264.

10. *Рундина Л.А.* Зигнемовые водоросли России. СПб.: Наука, *1998.* 351 с.

11. Кузьмин Г.В. Таблицы для вычисления биомассы водорослей. Магадан, 1984. 48 с.

12. Марков Е.Ю., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я. Вишняков В.С. и др. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae* // Биохимия. – 2015. – Т. 80, вып. 9. - С. 1334–1343.

13. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Марков Е.Ю., Миронова Л.В. и др. Связь холерного вибриона с водными организмами и её значение в эпидемиологии холеры // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. - 2014. – Вып. 4 (77). - С. 19-25.

МИКРОБИОЛОГИЯ

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИНФЕКЦИОЗНОСТИ ПЛАНКТОННЫХ И БИОПЛЕНОЧНЫХ ФОРМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, РАЗЛИЧНЫХ ПО ПРОИСХОЖДЕНИЮ

С.В. Титова, Л.М. Веркина, Н.И. Пасюкова, Н.Д. Омельченко, Л.К. Лысова, А.В. Филиппенко, И.А. Иванова

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

Vibrio cholerae является природным обитателем пресных, морских и смешанных (эстуарных) вод. Согласно наблюдениям, в водной среде холерный вибрион формирует биоплёнки на абиотических и биотических поверхностях, в том числе на поверхностях зоопланктона, фитопланктона, водорослей и ракообразных. По современным представлениям, биоплёнка – непрерывный слой бактериальных клеток, прикреплённых к поверхности и друг к другу, заключённых в биополимерный матрикс, состоящий из полисахаридов и/или белков [1].

Такое состояние прикрепления к поверхности защищает *V. cholerae* от разнообразных стрессов (кислота в желудке, повышенный pH в тонком кишечнике, желчь, условия гипоксии), обеспечивает им питательные вещества и возможность приобретения нового генетического материала, что позволяет большему числу бактериальных клеток достигать места колонизации тонкого кишечника [2].

Предполагается, что биоплёнка – это та самая форма, в которой патогенные (токсигенные) *V. cholerae* поглощаются людьми, поэтому её можно считать основным механизмом водного пути передачи холеры. Способность бактерии переключаться с подвижного (планктонного) на прикреплённый (биоплёночный) образ жизни (и наоборот) в ответ на химические и физические изменения во внеклеточной среде имеет особое стратегическое значение для выживания *V. cholerae* в организме хозяина и эстуарных водах [3].

Целью работы являлось сравнение инфекциозности планктонных и биоплёночных форм холерных вибрионов, различных по происхождению.

В работе использовали штаммы с полноценными наборами генов вирулентности: *V. cholerae* El Tor 5879, изолированный от человека, и *V. cholerae* El Tor 19613, выделенный из водоёма. Штаммы были получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Биоплёнки холерных вибрионов получали на пластиковых

пластинках во флаконах с водопроводной кипячёной водой, в которые добавляли суспензию исследуемых штаммов холерных вибрионов в концентрации 10^4 мкл/мл, способом, описанным ранее [4]. На 5 и 10 сутки культивирования стёкла с образовавшейся биоплёнкой переносили во флаконы с физиологическим раствором, промывали 3-кратно физиологическим раствором от планктонной формы вибрионов, осушали на стерильной фильтровальной бумаге, помещали в стерильные пластиковые контейнеры с 3 мл изотонического раствора хлорида натрия (pH 7,0), завинчивали крышками и размещали на платформе Vertex (иногда для лучшего выхода биоплёнку механически с помощью скальпеля снимали со стекла), диспергируя биоплёнки в раствор. Жизнеспособность биоплёночных и планктонных форм холерных вибрионов учитывали по количеству колониеобразующих единиц (КОЕ/мл).

В качестве моделей использовались кролики-сосункив возрасте 12-16 дней и массой 180 г, поступившие из иммуноклиники при ФКУЗ Ростовском-на-Дону противочумном институте Роспотребнадзора.

В работе применяли одинаковые заражающие дозы для планктонной и биоплёночной форм вибрионов, которые составляли $2x10^2$ и $2x10^4$ м.к.

Внутрикишечное заражение кроликов-сосунков осуществляли по Dutta N.K., Habbu M.K. [5]. Всех павших животных вскрывали, описывали характер патоморфологических изменений органов желудочно-кишечного тракта и других органов.

О развитии заболевания судили по наличию у кроликов-сосунков клинических и патологических проявлений энтерита, а их выраженность оценивали в крестах (+) (слабо выраженные изменения - + и ++, сильно выраженная патология - +++ и ++++).

При сильно выраженной патологии (+++ и ++++) наблюдался холерогенный эффект: тонкий кишечник расширен, заполнен жидким содержимым, в некоторых случаях – гиперемирован; проксимальные участки толстого кишечника заполнены большим количеством бесцветной, прозрачной, опалесцирующей жидкости; слепая кишка и прилегающие отделы толстого кишечника сильно растянуты жидкостью; в желчном пузыре имеется желчь; мочевой пузырь пустой. Наличие холерных вибрионов в содержимом кишечника всех животных подтверждали микробиологическим выделением чистых культур.

Работу проводили согласно указаниям СП-1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I и II групп патогенности». Эксперименты с животными осуществлялись в соответствии с законодательством Российской Федерации и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях [6].

Опыты по моделированию холерной инфекции на кроликах-сосунках выявили, что у животных, инфицированных пятидневной биоплёнкой

штамма *V. cholerae* 19613 в концентрации $2x10^2$ и $2x10^4$ м.к., наблюдался выраженный холерогенный эффект на +++ и ++++ соответственно (табл. 1). Свободная (планктонная) форма холерных вибрионов этого штамма в тех же дозах вызвала патоморфологические изменения в кишечнике только на ++. Наличие холерных вибрионов подтверждалось бактериологически во всех случаях (табл. 2).

При сравнительном изучении действия планктонной и пятидневной биоплёночной форм штамма 5879 в концентрациях $2x10^2$ и $2x10^4$ м.к. отмечалась одинаковая картина с сильно выраженным холерогенным эффектом (++++) и отчётливым ростом на специфических средах (см. табл. 1).

Анализ инфекциозности микробных клеток холерного вибриона из 10-ти-дневных биоплёнок штамма 5879 в концентрации $2x10^2$ и $2x10^4$ м.к. показал, что она была снижена в обоих случаях и выражалась на + и ++, соответственно. В то же время, свободная (планктонная) форма вибрионов этого штамма обнаруживала высокую активность и вызвала патоморфологические проявления, оцененные на ++++. Опыты по изучению холерогенного действия 10-дневной биоплёнки штамма 19613, наоборот, выявили её высокую активность в исследуемых дозах – холерогенный эффект оценивался в ++++ по сравнению с планктонной формой (++). Наличие холерных вибрионов в содержимом кишечника во всех случаях было подтверждено микробиологическим выделением чистых культур возбудителя (см. табл. 2).

Таким образом, проведенные исследования показали, что холерные вибрионы в составе биопленок являются патогенетическим фактором заболевания.

Наибольшей инфицирующей активностью во всех проведенных экспериментах обладали биопленки штамма 19613, выделенного из окружающей среды, и планктонные формы штамма 5879 человеческого происхождения. Эти два факта предполагают разные механизмы.

Механизмы, обеспечивающие различия в инфекциозности планктонных и биопленочных вибрионов, по-видимому, зависят от штаммовых особенностей и требуют дальнейшего изучения. По литературным данным [7], биопленки, образованные штаммами, выделенными из внешней среды, более устойчивы к бактериофагам, амёбам, а также к действию дезинфектантов и антимикробных препаратов.

Таблица 1. Степень выраженности холерогенного эффекта у кроликов-сосунков, инфицированных планктонными и биоплёночными вибрионами различного происхождения

Заражающая доза (м.к.)	*Vibrio cholerae* 5879			*Vibrio cholerae* 19613		
	Планктонная форма	5-дневная биоплёнка	10-дневная биоплёнка	Планктонная форма	5-дневная биоплёнка	10-дневная биоплёнка
$2x10^2$	++++	++++	+	++	+++	++++
$2x10^4$	++++	++++	++	++	++++	++++

Таблица 2. Наличие холерных вибрионов в содержимом кишечника инфицированных животных

Заражающая доза (м.к.)	*Vibrio cholerae* 5879			*Vibrio cholerae* 19613		
	Планктонная форма	5-дневная биоплёнка	10-дневная биоплёнка	Планктонная форма	5-дневная биоплёнка	10-дневная биоплёнка
$2x10^2$	+	+	+	+	+	+
$2x10^4$	+	+	+	+	+	+

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J., Stewart P., Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections // Science. 1999; 284:1318-22.
2. Tamayo R., Patimalla B., Camilli A. Growth in biofilm induces a hyperinfectiousphenothype in Vibrio cholerae // Infect.Immun. 2010; 78(8):3560-9.
3. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis // PLoSNegl. Trop. Dis. 2016; 10(2):e0004330.
4. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биоплёнок in vitro с помощью нового методического подхода // Фундаментальные исследования. – 2014. - №10. – С. 375-379.
5. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholerain infant rabbits: a method for chemotherapeuticin vestigation // Brit. J. Pharmacol. 1955; 10:153-9.
6. Директива 2010/63 ЕИ Европейского парламента и совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. – СПб. – 48 с.
7. Романова Ю.М., Гинцбург А.Л. Бактериальные биоплёнки как естественная форма бактерий в окружающей среде и организме хозяина // Журнал микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2011. - №3. - С. 99-109.

ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОПЛЕНОК *VIBRIO CHOLERAE*

С.В. Титова, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, С.Н. Головин

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

В настоящее время считается общепринятым представление о том, что развитие биоплёночных сообществ – одна из основных стратегий выживания микроорганизмов в естественной среде обитания [1, 2, 3, 4]. В связи с этим возрастает интерес к изучению биоплёнкообразования у эпидемически и клинически значимых микроорганизмов, в том числе персистенции *Vibrio cholerae* в окружающей среде в составе биоплёнок [5, 6, 7]. Установлено, что адгезированные к биотическим и абиотическим поверхностям и окруженные матриксом вибрионы приобретают повышенную устойчивость к действию агрессивных факторов внешнего окружения, что способствует их выживанию [8, 9, 10]. В связи с этим актуальным является изучение существования *V. cholerae* в составе биоплёнок. Критерием существования биоплёнки (БП) микроорганизмов

является наличие двух обязательных составляющих: бактериальных клеток и межклеточного матрикса. Для их детекции используют различные методы [11, 12], основными из которых является спектрофотометрия и световая микроскопия.

Особое значение придают изучению межклеточного матрикса, являющегося одним из основных структурных компонентов биоплёнки, который обеспечивает не только защиту бактерий от агрессивных факторов внешней среды, но и определяет взаимоотношения внутри клеточного сообщества. Основу его составляет выделяемый на этапе созревания биоплёнок двуслойный экзогетерополисахарид, наружный слой которого содержит полисахариды в гидратированном состоянии, а внутренний наполнен мембранными везикулами, которые способны выступать в роли факторов патогенности.

В матриксе биоплёнки также находится экстрацеллюлярная ДНК, которая участвует в процессах адгезии, межклеточных взаимодействиях и обусловливает специфику существования биоплёночных сообществ [3].

Изучение состава матрикса и его формирования необходимо для выбора методов борьбы со «зрелой» БП.

Применение современного высокотехнологичного оборудования позволяет глубже изучать свойства и строение биоплёнок и расширять методологическую базу. Так, с помощью трансмиссионой электронной микроскопии (ТЭМ) можно осуществлять визуализацию матрикса и бактериальных клеток, а также изучать ультраструктурные компоненты БП и эффекты различных внешних биологических, химических и иных воздействий на БП.

С целью изучения биоплёнкообразования *V. cholerae* в условиях, приближённых к естественным, использовали авторскую методику, приоритет которой подтверждён патентом [13], с дополнениями к ней для подготовки к ТЭМ. Основной трудностью при исследовании БП методом ТЭМ является нарушение их структуры при пробоподготовке. Для предотвращения нарушения пространственной структуры биоплёнок был опробован новый способ их формирования. БП выращивали непосредственно на медных сеточках для ТЭМ с формваровой плёнкой-подложкой, смонтированных на предметных стеклах.

Приготовление плёнок-подложек, монтаж опорных сеток и фиксацию их на предметные стекла производили в стерильных условиях в боксе микробиологической безопасности 2 класса. 0,3% раствор формвара в дихлорэтане, выдержанный сутки при комнатной температуре, наливали в кювету Коплина, в которую на 5-10 секунд погружали химически чистое сухое стерильное предметное стекло. Затем стекло извлекали и высушивали на фильтровальной бумаге в вертикальном положении в течение 1-2 минут. В кристаллизатор наливали дистиллированную воду с образованием выпуклого мениска. Стекло с плёнкой под углом 30^{o}

погружали в воду. При этом пленка отделялась от стекла и оставалась на поверхности воды. На плавающую пленку помещали опорные сеточки в количестве 4-5 штук. Затем чистое предметное стекло опускали на плёнку с сетками, погружали в воду, быстро переворачивали под водой, извлекали и просушивали. Таким образом, получали субстрат для формирования биоплёнок.

Далее субстрат помещали во флаконы с автоклавированной (2 атм./134^{o}С – 20мин) водопроводной водой с суспендированными холерными вибрионами из 18-часовой агаровой культуры по отраслевому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО-42-25-59-86 П), в конечной концентрации 10^4 м.к./мл. Культивирование проводили при 22^{o}С в течение 5-10 сут.

Субстрат с образовавшейся биоплёнкой извлекали из флакона и контрастировали. Контрастирование проводили по схеме, позволяющей проводить одновременную фиксацию образца с его обеззараживанием (глутаровый альдегид, тетраоксид осмия), контрастированием (тетраоксид осмия) и визуализацией матрикса биоплёнки (рутениевый красный, тетраоксид осмия). При использовании этого метода на первом этапе образуется связь между катионом рутениевого красного и анионными группами кислых полисахаридов, а при последующей обработке тетраоксидом осмия в окислительно-восстановительной реакции, катализируемой рутениевым красным, низшие окислы осмия осаждаются на окисленном субстрате. Поскольку рутениевый красный обладает плохой проникающей способностью, его добавляют сразу в фиксирующую смесь. После высыхания образцы отделяли пинцетом от предметного стекла, помещали в держатель и исследовали при помощи просвечивающего электронного микроскопа Jeol JEM-1011, изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta.

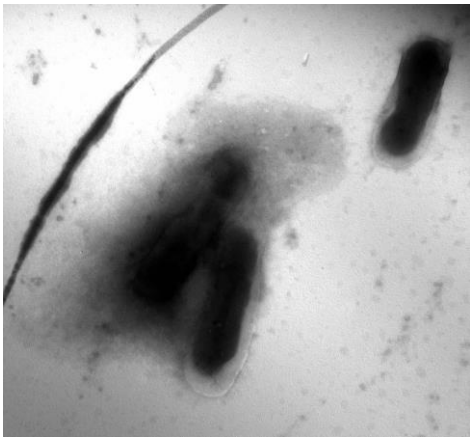


Рисунок 1. Электронная микрофотография биоплёнки *V. cholerae* 19667, увеличение х30000, ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия и рутениевым красным.

Представленная микрофотография демонстрирует эффективность предложенного метода культивирования биоплёнки и её контрастирования для изучения методом ТЭМ. Данный метод, сохраняя структуру биопленки, позволяет визуализировать компоненты матрикса и вибрионы в составе БП, что даёт возможность изучать их ультраструктуру и, в перспективе, эффекты различных внешних биологических, химических и иных воздействий на БП. Кроме того, возможность монтажа нескольких медных сеточек на одном субстрате позволяет осуществлять последовательное, практически ежедневное наблюдение за процессом формирования биоплёнки без её разрушения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Николаев Ю.А., Плакунов В.К. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? // Журн. микробиол.- 2007.- С. 149-163.

2. Wong G.C.L., O'Toole G.A. All together now: Integrating biofilm research across disciplines // MRSBulletin. 2011; P. 339-342.

3. Борисова М.И., Лазакович Д.Н., Сидорова Н.А., Савушкин А.И. Биоплёнкообразующая активность и феномен персистенции микроорганизмов // Journal of Biomedical Technologies. 2015; (2):С. 28–35.

4. Гостев В.В. Бактериальные биопленки и инфекции / В.В. Гостев, С.В. Сидоренко // Журн. инфектологии.- 2010.- 2(3).- С. 4-15.

5. Нефедов К.С. Сравнительный анализ фенотипических и молекулярно-генетических свойств холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в период седьмой пандемии холеры: дис. … канд. мед.наук: 03.00.07 / Нефедов Константин Сергеевич. - Саратов, 2009.- 141 с.

6. Кульшань Т.А. Анализ молекулярно-генетических особенностей штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического и эль-тор биоваров: дис. …канд. мед. наук: 03.02.03 / Кульшань Татьяна Алексеевна. - Саратов, 2013. - 129 с.

7. Куликалова Е.С. Экологические и микробиологические аспекты эпидемиологического надзора за холерой (по материалам Сибири и Дальнего Востока): дис. …канд. мед. наук: 14.02.02 / Куликалова Елена Станиславовна. - Иркутск, 2010 г.- 157 с.

8. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Саппо С.Г. и др. Биоплёнка холерного вибриона: получение, характеристика и роль в резервации возбудителя в водной окружающей среде // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2015. - N 1. - С. 3-11.

9. Сизова Ю.В., Черепахина И.Я., Балахнова В.В. и др. Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов в биоплёночных сообществах // Проблемы особо опасных инфекций.- 2012. - Вып. 113.

10. Титова С.В., Веркина Л.М., Кирилова О.Д. и др. Изучение

воздействия «велтолена» и этилового спирта на биоплёнки *Vibrio cholerae* eltor // Медицинский альманах.- 2015.- № 5.- С. 171-175.

11. Лямин А.В., Боткин Е.А., Жестков А.В. Методы выявления биоплёнок в медицине: возможности и перспективы // Клин. микробиол. антимикроб. химиотер. - 2012. - Т.14, №1. - С. 17-22.

12. Титова С.В., Веркина Л.М. Моделирование биоплёнок холерного вибриона на твёрдых поверхностях (стекло и пластик) и визуализация их в световом и люминесцентном микроскопах //Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - № 4. - С. 238-241.

13. Патент №2559546. Титова С.В., Кушнарева Е.В. «Способ моделирования образования биоплёнок холерных вибрионов в условиях эксперимента и устройство для его осуществления».

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ ЭЛЬ ТОР В ОТНОШЕНИИ БИОПЛЕНОК, ОБРАЗУЕМЫХ ШТАММАМИ-ХОЗЯЕВАМИ

Н.Е. Гаевская, С.В. Титова, Л.К. Лысова, С.Н. Головин, А.О. Кочеткова

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

Бактериальные биоплёнки – это классическая форма существования микроорганизмов в естественных условиях, их можно обнаружить на камнях в реке, в трубах, на промышленном оборудовании и медицинских имплантах, на стенках толстого кишечника и т.д. [1]. Микроорганизмы претерпевают глубокие фенотипические изменения во время перехода от свободно-плавающего планктонного состояния к прикрепленному росту в биоплёнках [2, 3]. По причине физиологических изменений и того, что клетки погружены в обширный экзополисахаридный матрикс с гетерогенным пространственным распределением, они более устойчивы к антибиотикам и другим антимикробным воздействиям, чем клетки, пребывающие в состоянии планктона [4].

Растёт интерес к естественной роли бактериофагов в модуляции развития биоплёнок и в особенности к потенциальной возможности использования бактериофагов для контроля образования биоплёнок в различных условиях. Существование бактерий внутри биоплёнок обеспечивает им преимущества для выживания по сравнению с отдельными клетками и является успешной стратегией защиты бактерий от неблагоприятных факторов среды [5].

Установлено, что бактериофаги препятствуют начальной стадии

образования биоплёнок сразу же после специфической адсорбции на поверхности клеток. Предполагается, что основным механизмом действия является нарушение клеточного барьера и целостности цитоплазматической мембраны, приводящее к существенному снижению трансмембранного потенциала [6]. При добавлении бактериофага, происходит нарушение трансмембранного потенциала (происходит расхождение мембран друг от друга на 20-40 нм, для клетки это, может, и не критично, но для протобиопленок имеет, возможно, критическое значение), так как фаг сорбируется довольно быстро, и происходит разрушение протобиоплёнок. Динамика сорбции вирулентного фага на поверхность клетки происходит со скоростью 90 % фага за 5 мин.

Формирование биоплёнок этими микроорганизмами как биологический феномен их жизнестойкости представляет не только научный, но и практический интерес. Изменения взаимодействия между клетками, ограниченными от окружающей среды выработкой специальных межклеточных веществи дополнительных оболочек, а также ход процессов роста клеток, подчинённых определённым фазам развития – всё это используется микроорганизмом в ходе эволюции и адаптации вида в природе.

Ассоциация фаг-бактерия в период формирования и стабилизации биоплёнок вибрионами, по-видимому, активно влияет на свойства лизогенных клеток в жидкой среде, а также на взаимоотношения свободных фагочастиц с фагочувствительными клетками хозяина.

Сведения о взаимодействии холерных вибрионов в биоплёночной форме с холерными бактериофагами в литературе отсутствуют.

Целью нашей работы было изучение действия холерных бактериофагов на биоплёнкухолерных вибрионов.

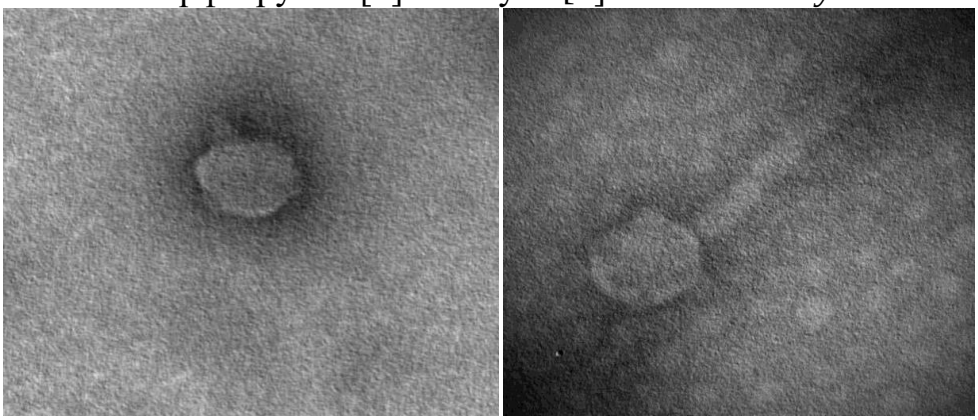
Были использованы бактериофаги CV-6 и CV-7 из коллекции лаборатории бактериофагов; штамм *V. cholerae El Tor* (ctx^+), чувствительный к исследуемым бактериофагам, который был получен из МЖК с ЦПВ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Формирование биоплёнки проводили способом, описанным в наших предыдущих работах, в качестве твёрдого субстрата использовали покровные стекла. Эффективность действия бактериофагов изучали, как в отношении чистых культур (контроль) штаммов, так и их биоплёнок. Жизнеспособность и концентрацию холерных вибрионов оценивали по количеству выросших колоний микроорганизмов (КОЕ/мл) на пластинах агара Мартена, в составе биоплёнки – после отпечатков покровных стёкол на агаре, в планктонной форме - путём прямого высева на агар [7]. В работе использовали биоплёнки на 1-15 сутки от начала культивирования, находящиеся в разных стадиях. Концентрация холерных вибрионов соответствовала 1×10^4 - 1×10^8 КОЕ/мл.

Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7 %, 1,5

% агар Мартена (pH 7,6–7,8).

В ходе предварительных исследований были отобраны два холерных бактериофага CV-6 и CV-7, которые характеризовались широким спектром литической активности, принадлежали к разным морфологическим группам и различались по биологическим свойствам.

По морфологическим характеристикам холерный бактериофаг CV-6, имеющий головку в форме икосаэдра размером 50,6×47,6 нм и короткий отросток длиной 8,4 нм,относился по морфологии корпускул к III морфогруппе [8] и типу С [9] семейства *Podoviridae*; фаг CV-7 с капсидом в виде икосаэдра размером 65,4×61 нм и сократимым отростком длиною 111,8 нм - к V морфогруппе [8] и типу А [9] семейства *Myoviridae*.



Podoviridae Myoviridae

Также отличались и показатели одиночного цикла репродукции у взятых в эксперимент холерных бактериофагов. У бактериофага CV-6 урожайность составляла 120±10 корпускул, минимальный латентный период 40±5 мин, адсорбция – 13 мин. Урожайность фага CV-7 была 29±4 корпускул, минимальный латентный период 13±2 мин, адсорбция – 11 мин.

По серологическим свойствам бактериофаг CV-6 относился ко 2 серологическому типу холерных фагов, а фаг CV-7 – к 7 серологическому типу.

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги.

При добавлении в экспериментальные пробы бактериофага CV-6 или CV-7 в титре $n\times10^8$ в первые двое суток от начала формирования биоплёнки на покровном стекле, что соответствует стадиям адгезии обратимой и необратимой (1-2 стадия) наблюдалось снижение концентрации холерных вибрионов до 1×10^2 КОЕ/мл. После внесения бактериофага на 4-5 сутки (стадии собственно биоплёнки) КОЕ холерных вибрионов на пластинках агара, как в планктонной, так и в биоплёночной

культурах не отмечалось. В контрольных пробах концентрация холерных вибрионов составляла $n \times 10^6$-10^8 КОЕ/мл на всех этапах эксперимента.

При добавлении бактериофага CV-6 на 5-6 сутки от начала формирования биоплёнок через сутки культура приобретала резистентность к данному бактериофагу, однако добавление бактериофага CV-7 (через сутки после добавления бактериофага CV-6) способствовало разрушению биоплёнки. Такую же картину наблюдали и при добавлении бактериофагов в другой последовательности, сначала CV-7, а потом CV-6. Если второй бактериофаг не добавляли, то к третьим суткам концентрация холерных вибрионов увеличивалась на 1-2 порядка. Поэтому для разрушения сформировавшихся «старых» биоплёнок обязательно использование набора фагов (минимум два) с различными биологическими свойствами.

Активность бактериофагов приводит, по-видимому, к лизису части инфицированных бактерий биоплёнки и появлению полостей и каналов. В «старых» биоплёнках *Vibrio cholerae* обнаружена индуцированная гибель клеток, за счет которой обеспечиваются пищей оставшиеся клетки и которая способствует структуризации биопленки – образованию полостей, каналов и пор, что соответствует данным, полученным Николаевым Ю.А. и Плакуновым В.К. (2007) при изучении биоплёнок, образованных *P. aeuginosa, S. Marcescens* и *P. tunicate*.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейших исследований в области применения холерных бактериофагов для борьбы с образованием биоплёнок штаммами холерных вибрионов и использования их в качестве бактерицидного средства.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Costerton J.W., Stewart P.S., Greenberg E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. // Science. 1999; 284:1318-22.
2. O'Toole G., Kaplan H.B. and Kolter R. Biofilm formation as microbial development // Annu. Rev. Microbiol. 2000; 54:49-79.
3. Каттер Э., Сулаквелидзе А. Бактериофаги: биология и практическое применение / Пер. с англ.: коллектив пер.; науч. ред. рус. изд. А.В. Летаров. Москва: Науч. Мир, 2012. – 636 с.
4. Bagge N., Hentzer M., Andersen J.B., Ciofu O., Givskov M., Hoiby N. Dynamics and spatial distribution of beta-lactamase expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. // Antimicrob.Agents Chemother. 2004; 48:1168-74.
5. Габисония Т.Г., Лоладзе М.Ж., Надирадзе М.М., Чахунашвили Н.К., Алибегашвили М.Г., Тамарашвили Н.Г., Пушкина В.А. Влияние бактериофагов на формирование биоплёнок штаммами *Pseudomonas aeruginosa* // Прикладная биохимия и микробиол. 2016; 52(3):312-7.

6. Игнатов С.Г., Волошин А.Г., Федюкина Г.Н., Ганина Е.А. Мочалов В.В., Денисенко Е.А. Перовская О.Н. Бактериальные плёнки и фаги / Инфекция и иммунитет. – 2014. – Спец. выпуск. – С. 82-83.
7. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок invitro с помощью нового методического подхода. Фундаментальные исследования. 2014; 10:375-9.
8. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. –170 с.
9. Ackerman H.B. // Microbiol. Sci.1987; 4(17):210-21.

ОЦЕНКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ

Е.А. Березняк, А.В. Тришина, Л.М. Веркина, И.Р. Симонова, А.Е. Бареева, Л.А. Егиазарян, М.В. Полеева

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

В условиях широкого и порой неконтролируемого применения антибиотиков увеличивается количество генных мутаций у таких ранее чувствительных бактерий, как *Escherichia spp., Klebsiella spp., Enterobacter spp., Citrobacter spp., Serratia spp.* Именно эти грамотрицательные микроорганизмы в последнее десятилетие стали определять микробиологическую картину современного стационара. Возрастает роль микроорганизмов, характеризующихся множественной резистентностью к антибактериальным средствам, которые традиционно используются в качестве базовых средств терапии [1].

Решение проблемы формирования и распространения мультирезистентных штаммов – задача не одного дня. Для этого требуется системный подход и объединение усилий специалистов на всех уровнях - от производителей антибактериальных препаратов и лечащих врачей до санитарно-микробиологических служб, занимающихся исследованиями объектов окружающей среды.

Возникновение антимикробной резистентности является естественным биологическим ответом на использование антимикробных препаратов. При этом приобретение множественной устойчивости бактерий к антибиотикам рассматривается в качестве показателя негативного влияния деятельности человека на природные экосистемы [2, 3, 4, 5]. Наиболее частой генетической основой резистентности является

наличие в бактериях внехромосомных факторов устойчивости к лекарственным веществам – плазмид и транспозонов. Плазмидная передача устойчивости к лекарственным веществам является наиболее важным механизмом возникновения резистентности в бактериальной популяции, особенно в семействе энтеробактерий. С эпидемиологической точки зрения наиболее опасна передача детерминант устойчивости от одного вида микроорганизмов к другому [6].

Возрастающая актуальность проблемы обеспечения эпидемической безопасности водных объектов требует углубленного изучения вопросов распространения условно-патогенных микроорганизмов (УПМ), значение которых растет как в этиологической структуре заболеваний, так и среди природных бактериальных сообществ во всем мире [7].

Материалы и методы. Идентификацию микроорганизмов начинали с изучения морфологии выросших колоний на агаре Хоттингера (pH ± 7,2) и селективных средах: Эндо, Плоскирева, Висмут-сульфит агаре, хромогенной питательной среде (HiCromUTIAgar, ModifiedHimedia - Индия) для одноэтапного выделения энтеробактерий. Для быстрой идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («BrukerDaltonics», Германия).

Выделенные в процессе мониторинга штаммы были протестированы на чувствительность/устойчивость к различным антибактериальным препаратам (АБП). Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04 .

Результаты. В Ростовском-на-Дону противочумном институте Роспотребнадзора в течение 2014-2015 гг. проведён санитарно-биологический мониторинг водных объектов в черте города, который включал в себя: сбор и анализ информации о санитарно-гигиеническом состоянии водоёмов; бактериологическое исследование УПМ поверхностных водоёмов; изучение антибиотикорезистентности выделенных штаммов.

Микробный пейзаж в открытых водоёмах варьирует в широких пределах и зависит от типа водоёма, степени загрязнения, изменений температуры, времени года. В 2014 г. было проанализировано 116 штаммов энтеробактерий, относящихся к 14 родам: *Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Salmonella, Pantoea, Proteus, Kluyvera, Providencia, Yersinia, Morganella, Raoultella, Rahnella, Serratia.*

В 2015 году с мая по сентябрь были исследованы 193 штамма условно-патогенных микроорганизмов. Идентифицированы представители 13 родов: *Escherichia, Enterobacter, Klebsiella, Citrobacter, Salmonella, Cronobacter, Pantoea, Proteus, Rahnella, Leclercia, Erwinia, Ewingella, Kluyvera*.

Штаммы, чувствительные ко всем АБП, среди представителей порядка *Enterobacteriales* в мае и августе 2014 и 2015 гг. не обнаружены (таблица 1).

Таблица 1. Распределение штаммов энтеробактерий в 2014-2015 гг. по чувствительности к антибактериальным препаратам (%)

Месяц	Май		Июнь		июль		август		сентябрь	
Год	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
Чувствительные	0	0	35,2	5,6	16,7	12.5	0	0	42,3	7,7
Монорезистентные	18,4	2,3	46,3	20,4	16,7	25	15	14,3	30,8	3,8
Полирезистентные	81,5	97,7	18,5	74,1	66,6	62,5	85	85,7	26,9	88,5

Доля монорезистентных УПМ варьировала в зависимости от месяца и года наблюдения. В июне и сентябре 2014 г. зарегистрирована высокая частота встречаемости таких штаммов - 46,3 % и 30,8 % соответственно, причём в июне монорезистентные штаммы встречались во всех исследуемых точках. В 2015 году штаммы, резистентные к одному АБП, регистрировались в течение всего периода наблюдения, однако их доля в отдельные месяцы несколько снизилась. Если в июне 2014 г. около половины штаммов были монорезистентными, то в 2015 г. их доля составила 20,4 %.

На протяжении 2014 и 2015 гг. выделялось большое число штаммов УПМ, имеющих множественную устойчивость к АБП. Этот фактор является одним из информативных показателей антропогенной нагрузки на водоемы. В работе Савилова Е.Д. [8] показано, что частота встречаемости антибиотикоустойчивых штаммов бактерий водных экосистем зависит от степени антропогенного загрязнения их среды обитания. В черте крупных городов, расположенных на берегах реки, частота встречаемости бактерий с множественной антибиотикорезистентностью достоверно выше.

При сравнении данных, полученных в 2014 и 2015 гг., заметно увеличение в 2015 г. уровня резистентных микроорганизмов в исследуемых водоемах г. Ростова-на-Дону в отношении группы условно-патогенных бактерий, относящихся к порядку *Enterobacteriales,* и снижение доли чувствительных и монорезистентных микроорганизмов (рисунок 1).

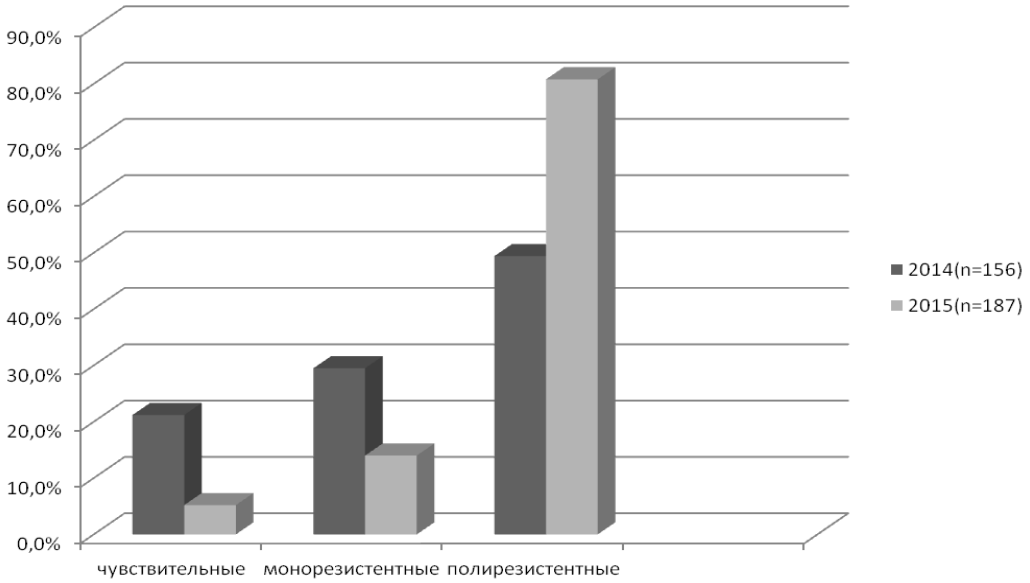


Рисунок 1. Динамика доли чувствительных, монорезистентных, полирезистентных к АБП штаммов УПМ в 2014-2015 гг.

Чувствительными ко всем АБП в 2014 г. были 21,2 % штаммов, в 2015 г. - 5,2 %, монорезистентными - 29,5 % и 14 % соответственно. Доля штаммов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью, в 2014 г. составила 49,4 %, в 2015 г. - 80,8 %.

Таким образом, в результате проведённого анализа выявлена тенденция нарастания доли штаммов энтеробактерий, обладающих множественной антибиотикорезистентностью. В 2015 г. их число увеличилось почти в 1,5 раза и варьировало от 62,5 % до 97,7 %. Такие данные могут свидетельствовать о возрастающей антропогенной нагрузке и неблагоприятной экологической обстановке в водных экосистемах г. Ростова-на-Дону.

Следует отметить, что устойчивость УПМ к препаратам выбора может стать реальной проблемой для нашего региона при возникновении заболеваний, вызванных энтеробактериями с множественной лекарственной устойчивостью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванов Д.В., Егоров А.М. Распространение и механизмы резистентности микроорганизмов, продуцирующих бета-лактамазы. Молекулярные механизмы устойчивости к бета-лактамным антибиотикам штаммов клебсиелл, выделенных при внутрибольничных инфекциях // Биомедицинская химия. 2008; 54(1):104-13.

2. Briggs C. Molecular characterization of an antibiotic resistance gene cluster of *Salmonella tyhimurium* DT104 // Antimic. Agent Chemoterapy. 1999; 43(4): 846-50.

3. Анганова Е.В., Рычкова Е.Н., Абель Н.А., Парышева Л.В.

Оценка антибиотикоустойчивости возбудителей кишечных инфекций на различных территориях Восточно-Сибирского региона // Сибирь–Восток. - 2006. - № 10. - С. 12-14.

4. Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study // The Lancet Infectious Diseases.2011; 11(5):355–62.

5. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистома, ее объем, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. 2013; (58): 5-6.

6. Кулмагамбетов И.Р., Сарсенбаева С.С., Рамазанова Ш.Х., Есимова Н.К. Современные подходы к контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности в мире // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2015; (9): 54-9.

7. Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Склеенова Е.Ю. и др. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов *Enterobacteriaceae* в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования Марафон в 2011-2012 гг. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014; (4):12-20.

8. Савилов Е. Д., Мамонтова Л.М., Анганова Е.В. и др. Условно-патогенные микроорганизмы в водных экосистемах Восточной Сибири и их роль в оценке качества вод // Журнал Бюллетень Сиб. Отд. Росс. Академии Мед. Наук. 2008; (1): 47-51.

КАРБОКСИМЕТИЛЦЕЛЛЮЛАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

С.Н. Козлов, Е.Ю. Марков, Л.Я. Урбанович

ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, г. Иркутск

Микробные гидролазы принимают широкое участие в метаболических процессах бактериальной клетки и играют определённую роль в процессах адаптации и персистенции в окружающей среде. Особое значение в этом придаётся хитинолитическим ферментам, поскольку продукты гидролиза хитина являются важным источником питательных веществ и энергии для *Vibrio cholerae*, а сам хитин играет большую роль в защите и удовлетворении питательных потребностей целого ряда бактерий. Многие представители рода *Vibrio* расщепляют этот полимер до олиго- и моносахаридов кооперативным действием мощного

хитинолитического комплекса, в который входит целый каскад ферментов, включая β-глюкозидазы (ЕС 3.2.1.21) и 1,4–β-глюканазы (ЕС 3.2.1.4) [1]. Известно, что некоторые бактериальные целлюллозы принимают участие в защите от фитопатогенов, а также в создании благоприятных условий для выживания некоторых спорообразующих микроорганизмов [2, 3, 4, 5]. Однако данных о гидролитической активности холерных вибрионов в отношении синтетических препаратов целлюлозы нам обнаружить не удалось.

Цель работы – изучить способность к гидролизу карбоксиметилцеллюлозы (целлюлозы) препаратами культуральных фильтратов *V.cholerae eltor* O1 и *V.cholerae* O139 серогрупп.

Материалы и методы. В работе было использовано 10 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных во время эпидосложнений и в благополучный по холере период. Бактерии выращивали на щелочном мясо-пептонном агаре при 37ºС в течение суток. После суточной инкубации культуру смывали физиологическим раствором, определяли концентрацию взвеси и переносили во флаконы с мясо-пептонным бульоном (рН 7,6) с тем расчётом, чтобы в 1 мл содержалось 2×10^8 клеток. Через 2 часа экспозиции при комнатной температуре с целью стерилизации во флаконы с бактериальной взвесью добавляли мертиолят натрия в конечной концентрации 0,01 % и инкубировали их в течение двух суток на холоду, после чего материал подвергали проверке на специфическую стерильность. После подтверждения специфической стерильности проводили центрифугирование материала при 10000 об/мин, далее супернатант (бесклеточная культуральная жидкость) был диализован и лиофильно высушен. Зимографический анализ осуществляли посредством ДСН-электрофореза в блоках 8 % полиакриламидного геля, содержащего гранулированную карбоксиметилцеллюлозу CM52 (“Whatman”) в конечной концентрации 0,1 %, по методу [6]. О наличии карбоксиметицеллюлазной активности судили визуально по формированию бесцветных полос гидролиза на фоне окрашенного субстрата.

Результаты. С помощью субстратного энзим-электрофореза в полиакриламидном геле установлено, что препараты культуральных фильтратов, полученных из токсигенных штаммов холерного вибриона – *Vibrio cholerae eltor* O1 М-878, И-1300, И-1334, *Vibrio cholerae* O139 И-12 обладают карбоксиметилцеллюлазной активностью. Указанные препараты характеризуются наличием двух высокомолекулярных полос гидролиза карбоксиметилцеллюлозы у препаратов *Vibrio cholerae* М-878 и *Vibrio cholerae* O139 И-12 и по одной у *Vibrio cholerae* И-1300 и И-1334. У препаратов, полученных из взятых в опыт нетоксигенных штаммов холерного вибриона, полос гидролиза не обнаружено.

Заключение. С помощью субстратной зимографии препаратов культуральной жидкости из штаммов холерного вибриона O1 и O139

серогрупп впервые обнаружена активность целлюлоз, и прослеживаются количественные различия их состава в зависимости от токсигенности штамма. Показана пригодность зимографического способа для определения наличия целлюлолитических ферментов и анализа их спектров.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Subin R., Bhat S.G. Seasonal variation in the hydrolyticexo-enzyme profile of *Vibrio sp*. Associated with the marine benthic environment of South India // Ind. J. Geo-MarineSci. 2011; 40(6):826–33.

2. Абдеев Р.М., Голденкова К.А., Мусийчук К.А., Пирузян Э.С. Свойства термостабильной целлюлазы *Clostridium thermocellum* // Биохимия. 2001; 66(7): 991–2.

3. Головченко Н.П., Идвильская Н.А., Акименко В.К. Состав целлюлазного комплекса *Clostridium thermocellum* // Биохимия. 1985; 50(1):109–13.

4. Клесов А.А. Биохимия и энзимология гидролизацеллюлозы // Биохимия. 1980; 55(10): 1731–65.

5. Ghose T.K., Bisaria V.S. Studies on the mechanism of enzymatic hydrolysis of cellulosic substances // Biotechnol. Bioeng.1992; 21:131–46.

6. Heussen C., Dowdle E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activator sinpolyacrylamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrates // Anal. Biochem. 1980; 102(1): 196–202.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

CTXAB$^-$ *TCPA*$^+$ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAE* КАК РЕЦИПИЕНТЫ ФАГА СТХФ И ВОЗБУДИТЕЛИ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ

С.В. Титова, Е.В. Монахова

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

Токсин-корегулируемые пили (TCP) являются одним их ключевых факторов патогенности *Vibrio cholerae* и в то же время служат рецептором для инфекционных вирионов СТХφ [16]. Как и в других странах мира, в Российской Федерации из воды поверхностных водоемов, от больных и носителей периодически выделяются *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ штаммы [1, 9], которые рассматриваются некоторыми авторами как потенциально эпидемически опасные на основании возможности их реверсии в токсигенные в результате специфической трансдукции [1-3, 7, 8, 19]. По-видимому, данная точка зрения основана на гипотезе Faruque S.M. *et al.* [14], согласно которой *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ штаммы, присутствующие в небольших количествах в водоемах, при попадании в кишечник человека могут быть инфицированы СТХφ и стать токсигенными. После размножения и выхода из организма хозяина их концентрация в водных объектах возрастает, что и приводит к эпидемическим вспышкам холеры. Поскольку TCP-зависимая передача СТХφ вибрионам Эль Тор происходит преимущественно *invivo*, очевидно, что для успешной реверсии необходимо одновременное попадание в кишечник *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ штамма и вирионов СТХφ. Такая ситуация вполне реальна на эндемичных территориях, где в связи со слабо развитым санитарным обеспечением открытые водоёмы довольно часто контаминируются *ctxAB*$^+$ штаммами, способными к выживанию в воде и к вирогении. При этом их концентрация должна быть достаточно высокой, поскольку СТХφ размножается без лизиса клетки-хозяина, и число фаговых частиц обычно невелико, хотя и может заметно увеличиваться под действием солнечного света [15]. Напротив, в благополучных странах с умеренным климатом, в том числе и в России, где в последнее время отдельные случаи холеры являются исключительно завозными, а обнаружение токсигенных штаммов в объектах окружающей среды носит единичный характер, вероятность одновременного заражения людей *ctxAB*$^-$ *tcpA*$^+$ штаммами и вирионами СТХφ крайне низка. Поэтому мы считаем нецелесообразным придавать *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ штаммам, выделяемым в нашей стране, статус «потенциально эпидемически опасных».

Другим аргументом в пользу нашей точки зрения является тот факт,

что на сегодняшний день известен ещё целый ряд фагов, успешно осуществляющих трансдукцию генов *ctxAB* и всего CTX профага от *ctxAB*$^+$ штаммов в *ctxAB*$^-$ независимо от присутствия генов *tcp*A. Это головчатые фаги CP-T1 [10, 16, 18], ФD7-20, ФА10-14, ФА10-25 [13] и филаментозные VGJφ, VEJφ и, предположительно, сходный с ними VSK [11]. Известно, что CP-T1 использует в качестве рецептора О-антиген, а филаментозные фаги – маннозо-чувствительные пили MSHA, которые, в отличие от TCP, эффективно образуются вибрионами в объектах окружающей среды [16]. Косвенную роль в горизонтальной передаче профага CTX играют и некоторые литические бактериофаги, такие как O141-специфический JSF141B, способствуя выходу из бактериальных клеток геномной ДНК, которая может в присутствии хитина трансформироваться в другие клетки [22]. Наконец, CTXφ может инфицировать *ctxAB*$^-$*tcpA*$^-$ штаммы *V.cholerae* за счет взаимодействия с продуктами генов *tolQRA*, хотя и с очень низкой частотой [5]. Множественность путей горизонтальной передачи профага CTX проиллюстрирована на рисунке.

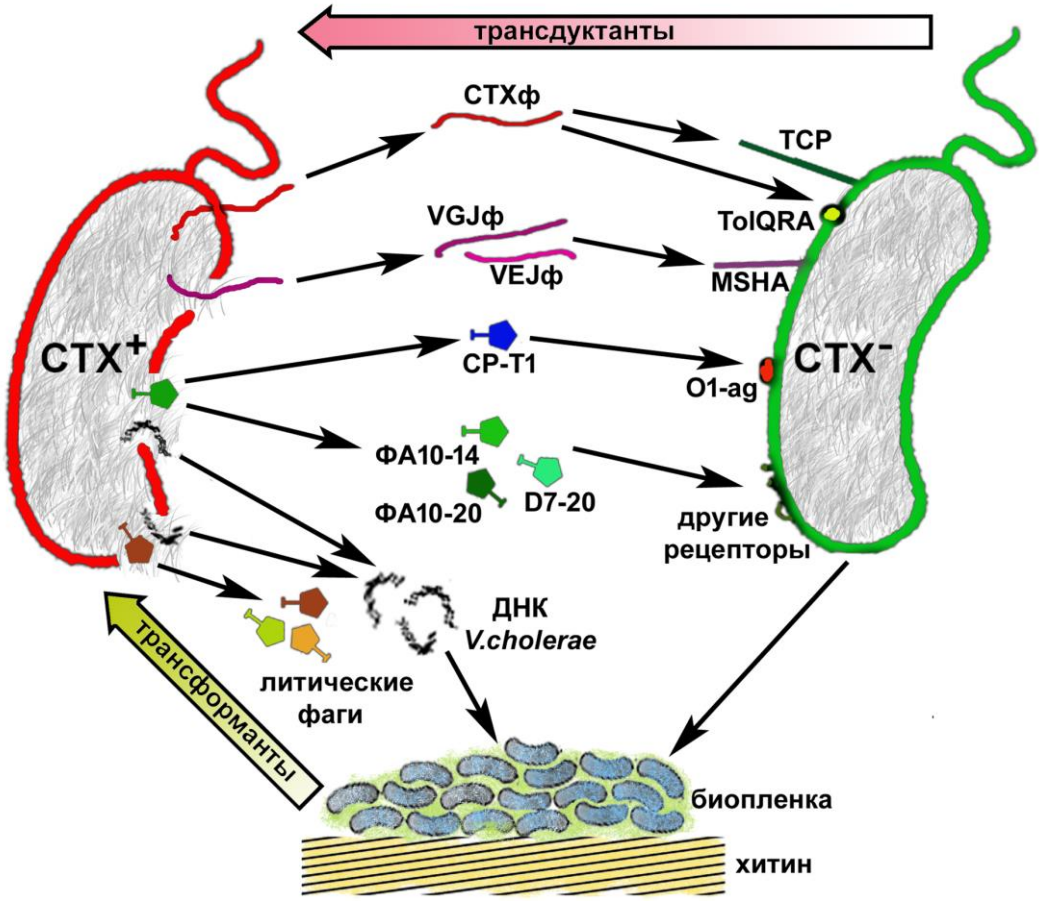


Рисунок. Множественность путей горизонтальной передачи профага CTX.

Несмотря на то, что TCP-независимая передача CTX может происходить вне организма человека, необходимым условием её осуществления остается длительная циркуляция в водоёмах *ctxAB*$^+$

штаммов – доноров инфекционных вирионов и/или геномной ДНК, что не соответствует ситуации в России, где благодаря постоянному эпиднадзору и своевременным мероприятиям такие штаммы быстро элиминируются.

В свете приведенных данных практически любой штамм можно считать «потенциально эпидемически опасным», и *tcpA*$^+$ не обладают какими-либо существенными преимуществами как реципиенты CTX.

Это же можно сказать и о значимости TCP в патогенезе. Являясь ключевым фактором колонизации кишечника, они, по всей видимости, так же «взаимозаменяемы», как и прочие факторы патогенности [4, 5]. Анализ заболеваемости за счет заражения *ctxAB*$^-$ штаммами *V. cholerae* показывает отсутствие корреляции между числом заболевших, степенью тяжести диарей и наличием у возбудителей гена *tcpA* [5]. Напротив, иногда прослеживались ситуации, когда *tcpA*$^+$ штаммы вызывали менее серьезные осложнения, чем *tcpA*$^-$. Так, вспышка в 2007 г. в Ростовской области [6], по сути, явилась «вспышкой носительства», что вполне могло быть связано с продукцией представителями вызвавшего её клона TCP, хотя аналогичная вспышка 1971 г. в Донецкой области Украины с преобладанием носительства была вызвана *tcpA*$^-$ клоном [5]. С другой стороны, несколько крайне тяжёлых спорадических случаев в Украине (1991) были вызваны *tcpA*$^-$ штаммами [5]. Лишь в одном из описанных случаев множественной заболеваемости за счет инфицирования *tcpA*$^+$ клоном (Южная Индия, 1993) симптоматика не отличалась от холерной [21].

По всей видимости, патогенетический потенциал каждого штамма зависит от эффективности экспрессии генов ряда факторов патогенности, присутствующих в их геномах в разных сочетаниях. К ним относятся кодируемые генами коровой области профага pre-CTXCep, Ace и Zot; цитотоксин MARTX; гемолизин HlyA; контакт-зависимые системы секреции T3SS и T6SS; гемагглютинин/протеаза, сериновая протеаза, цитотонический фактор Cef [4, 5]; дополнительный фактор колонизации AcfB [12], возможно, но не доказано, также cholix-токсин [4].

Происхождение *ctxAB*$^-$*tcpA* штаммов холерных вибрионов, выделяемых в России, не поддаётся точному определению. Чаще всего их связывают с заносом с других территорий. Вместе с тем, не исключено, что в определённые периоды времени они способны персистировать в водоёмах, составляя «минорную» часть популяции. TCP могут играть определённую роль в этой персистенции, поскольку участвуют в образовании и дифференциации биоплёнок на хитиновых поверхностях водных членистоногих [20], хотя и не являются единственными и незаменимыми участниками этого события. В присутствии хитина в биоплёнках также возможно приобретение *tcpA* за счёт трансформации, а в планктонной фазе – за счет неспецифической трансдукции фагом CP-T1 [18]. Как уже подчёркивалось выше, этот процесс в наших условиях ограничен недостатком генетического материала для горизонтального

переноса, однако его крайне низкая вероятность все жё не равна нулю. С другой стороны, получены экспериментальные доказательства тому, что *ctxAB*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ штаммы могут возникать из *ctxAB*$^{+}$*tcpA*$^{+}$ вследствие утраты профага CTX во время пребывания в водной среде [3, 7], а также в кишечнике [17]. На наш взгляд, формирование *ctxAB*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ штаммов может с равной вероятностью происходить обоими этими путями.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Ганин В.С. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке: результаты и направления совершенствования // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. Совещания специалистов Роспотребнадзора. Ростов н/Д, 2014. – Вып. 27. – С. 28-35.
2. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Хабаровского края // Пробл. особо опасных инф. – 2014. – № 1. – С. 121-125.
3. Кульшань Т.А., Барахнина Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Потенциально эпидемически опасные штаммы холерного вибриона: механизм возникновения и структура генома // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. пробл. комиссии. – Ростов н/Д, 2015. – Вып. 28. – С. 113-116.
4. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации // Пробл. особо опасных инф. – 2013. – № 4. – С. 60-68.
5. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: Автореф. дис. … докт. биол. наук. – Ростов н/Д, 2012.
6. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 *ctxAB*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2007. – № 1. – С. 23-29.
7. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Челдышева Н.Б., Осин А.В. Структурные и функциональные изменения генома возбудителя холеры в водной среде // Эпидемиология и инф. болезни. – 2007. – № 5. – С. 22-27.
8. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов // Пробл. особо опасных инф. – 2008. – Вып. 97. – С.3-12.

9. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Москвитина Э.А. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El-Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003–2014 гг. // ЗНиСО. – 2015. – № 2. – С. 39-41.

10. Boyd E.F., Waldor M.K. Alternative mechanism of cholera toxin acquisition by *Vibrio cholerae*: generalized transduction of CTXφ by bacteriophage CP-T1 // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67. – P. 5898-5905.

11. Campos J., Martínez E., Izquierdo Y., Fando R. VEJφ, a novelfilamentousphage of *Vibrio cholerae* able to transduce the choleratoxingenes // Microbiology. – 2010. – Vol. 156(Pt 1). – P. 108-115.

12. Chaparro A.P., Ali S.K., Klose K.E. The ToxT-dependent methyl-accepting chemoreceptors AcfB and TcpI contribute to *Vibrio cholerae* intestinal colonization //FEMS Microbiol.Lett. – 2010. – Vol. 302, No. 2. – P. 99-105.

13. Choi S., Dunams D., Jiang S.C. Transfer of cholera toxin genes from O1 to non-O1/O139 strains by vibriophages from California coastal waters // J. Appl. Microbiol. – 2010. – Vol. 108, No. 3. – P. 1015-1022.

14. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic*Vibrio cholerae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62, No. 4. – P. 1301-1314.

15. Faruque S.M., Asadulghani, Rahman M.M., Waldor M.K., Sack D.A. Sunlight-induced propagation of lysogenic phage encoding cholera toxin // Infect. Immun. – 2000. – Vol. 68, No. 8. – P. 4795-4801.

16. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholera* // Virulence. – 2012. – Vol. 3, No. 7. – P. 556-565.

17. Kamruzzaman M., Robins W.P., Bari S.M., Nahar S., Mekalanos J.J., Faruque S.M. RS1 satellite phage promotes diversity of toxigenic *Vibrio cholerae* by driving CTX prophage loss and elimination of lysogenic immunity // Infect. Immun. – 2014. – Vol. 82, No. 9. – P. 3636-3643.

18. O'Shea Y.A., Boyd E.F. Mobilization of the *Vibrio* pathogenicity island between *Vibrio cholerae* isolates mediated by CP-T1 generalized transduction // FEMS Microbiol. Lett. – 2002. – Vol. 214, No. 2. – P. 153-157.

19. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martín F., Ibarra C., Binsztein N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41, No. 1. – P. 124-134.

20. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin // J. Bacteriol. – 2005. – Vol. 187, No. 10. – P. 3551-3555.

21. Saha P.K., Koley H., Mukhopadhyay A. K., Bhattacharya S.R., Nair G.B., Ramakrishnan B.S., Krishnan S., Takeda T., Takeda Y. Nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba biotype El Tor associated with a cluster of

cases of cholera in Southern India // J. Clin. Microbiol. – 1996. – Vol. 34, No. 5. – P. 1114-1117.

22. Udden S.M., Zahid M.S., Biswas K., Ahmad Q.S., Cravioto A., Nair G.B., Mekalanos J.J., Faruque S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae*O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence // Proc. Natl.Acad.Sci. – 2008. – Vol. 105. (33) – P. 11951-11956.

АНАЛИЗ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников, В.Д. Кругликов, С.В. Титова

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

Анализ распределения единичных нуклеотидных замен (SNP) является одним из информативных методов генотипирования многих возбудителей, в том числе возбудителя холеры – тяжелого заболевания, склонного к эпидемическому распространению. И если ранее для изучения SNP проводили секвенирование одного или нескольких небольших участков ДНК (мультилокусное сиквенсное типирование, MLST), то в последнее время всё чаще используется полногеномное секвенирование. С одной стороны, прочтение полного генома микроорганизма существенно повышает разрешающую способность проводимого генотипирования. Однако, с другой стороны, это усложняет проведение сравнительного анализа, особенно если не удается собрать полный геном и все данные представлены в виде фрагментов различной длины (контигов).

Не меньшей проблемой является использование разными исследователями различных технологических платформ. Например, известно, что ошибки секвенирования на MiSeq чаще всего проявляются в виде замен, в то время как для IonTorrent больше были характерны делеции-вставки [1].

В связи с этим цель работы состояла в разработке алгоритма анализа, позволяющего проводить сравнение данных полногеномного секвенирования, полученных на различных аппаратных платформах, и проведении с его помощью анализа штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Российской Федерации в различные годы.

Важно отметить, что одним из обязательных условий проведения любых научных и лабораторных исследований является наличие

«внутренних» контрольных образцов, позволяющих подтвердить правильность проведения анализа. Однако данное правило практически не используется при анализе данных полногеномного секвенирования. На наш взгляд, в качестве «контрольных образцов при проведении анализа данных можно использовать одни и те же штаммы, но просеквенированные разными исследователями и на разных технологических платформах.

В настоящей работе в качестве «внутренних контрольных образцов» мы использовали штамм *Vibrio cholerae* № 18899, который был просеквенирован как на платформе MiSeq Illumina, так и на платформе IonTorrent и описан как P18899. Аналогично нами были взяты в работу последовательности штамма *V. cholerae* 81, прочтение которого проводили на разных технологических платформах. В качестве еще одного стандарта нами были подобраны «контрольные пары» штаммов *V. cholerae* по принципу «исходный штамм – изогенный мутантный вариант». Так, штамм *V. cholerae* P18899-D представляет собой изогенный мутант из штамма P18899, спонтанно утративший ген холерного токсина [2].

Анализ данных секвенирования, проведенный с помощью разработанного нами программного обеспечения, позволил распределить 73 штамма между 8 кластерами, обозначенными нами буквами латинского алфавита с «A» по «H». При этом все «контрольные» штаммы сгруппировались друг с другом, что подтверждает достоверность проводимого анализа.

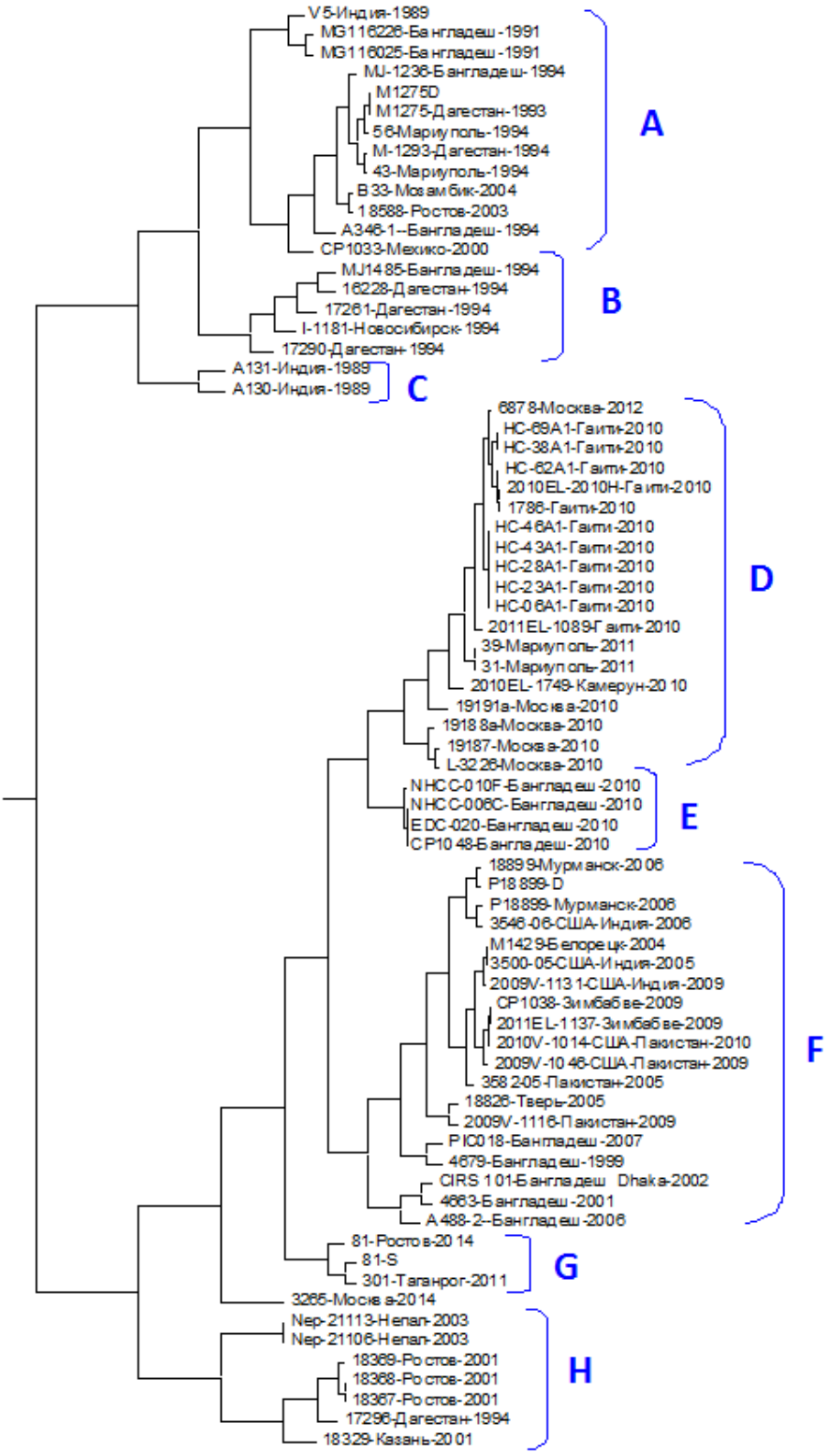


Рисунок. Дендрограмма, построенная на основе распределения SNP штаммов холерного вибриона.

При анализе дендрограммы становится видно, что штаммы, ответственные за эпидемические осложнения по холере в 1994 году, распределились между двумя кластерами «А» и «В». Обращает на себя

внимание генетическое сходство штаммов, изолированных в Дагестане, Мариуполе, Новосибирске и Бангладеш. Это позволяет сделать вывод о том, что данные штаммы относятся к группе так называемых «матлабских» штаммов. Не менее важным является попадание в кластер «А» штамма *V. cholerae* № 18588, выделенного из воды в г. Ростове-на-Дону в 2003 году.

Штаммы холерного вибриона, вызвавшие разлитую вспышку холеры на острове Гаити в 2010 году, составили кластер «D». В этот же кластер вошли штаммы, изолированные во время эпидемических осложнений по холере в г. Мариуполь в 2011 году и ряд токсигенных штаммов, выделенных в г. Москва в 2010- 2012 годах. Фактически это позволяет предполагать, что штаммы из «гаитянской группы» были практически одновременно занесены в Россию и Украину, однако в нашей стране, ввиду оперативного проведения противоэпидемических мероприятий, они не получили дальнейшего распространения.

Помимо этого, попадание в кластер «D» штамма 2010EL-1749 подтверждает версию о заносе холеры на остров Гаити из Камеруна.

В отдельный кластер «F» попали штаммы, выделенные в Мурманске (2006), Белорецке (2004), Твери (2005). Анализ состава данного кластера позволяет сделать предположение о заносе этих штаммов из Индии, в пользу чего свидетельствует попадание в этот же кластер большого числа «индийских» изолятов.

Штаммы холерного вибриона, выделенные в Ростовской области - *V. cholerae* 301 (2011) и *V. cholerae* 81 (2014) составили отдельный кластер, что объясняется отсутствием в анализе близкородственных штаммов. Обращает на себя внимание их генетическая удаленность от штаммов, вызвавших эпидемические осложнения в Мариуполе в 2011 году. Подтверждением этому служит еще и разный тип ctxB – у штаммов из Мариуполя обнаружен «гаитянский» тип ctxB (B7), в то время как у штаммов 301 и 81 ранее был выявлен ctxB (B1) классического типа [3].

Штаммы, вызвавшие вспышку холеру в г. Казань в 2001 г., попали в один кластер «H» со штаммами, выделенными в г. Ростов-на-Дону в этом же году. Обращает на себя внимание попадание в этот же кластер штамма *V. cholerae* 17296, выделенного в Дагестане. Немаловажно отметить, что штаммы, обусловившие эпидемические осложнения в Дагестане в 1994 году распределились между тремя разными кластерами «А», «В» и «Н», что позволяет высказать предположение о наличии как минимум трёх независимых заносов возбудителя холеры в Республику Дагестан.

Помимо этого, попадание в один кластер штаммов от одной вспышки (Дагестан 1994), но просеквенированных на разных технологических платформах, является косвенным подтверждением достоверности проведенного анализа.

Таким образом, в ходе настоящего исследования разработано программное обеспечение для проведения сравнительного анализа данных

полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона. Проведенный анализ позволил сделать предположения о происхождении штаммов *V. cholerae*, выделенных на территориях России и Украины.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoecke S., Verhelst J., Vuylsteke M., Saelens X. Analysis of the genetic diversity of influenza Aviruses using next-generation DNA sequencing // BMCGenomics. 2015 Feb 14;16:79. doi: 10.1186/s12864-015-1284-z.

2. Щелканова, Е.Ю. Конструирование штамма-продуцента в-субъединицы холерного токсина на модели атоксигенного геновариантa Vibrio cholerae / Е.Ю. Щелканова, Т.А. Кульшань, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова // 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. 144-146.

3. Писанов Р.В. Особенности структуры генома токсигенного штамма Vibrio cholerae El Tor Инаба, выделенного в 2014 г. из открытого водоема в Ростове-на-Дону / Р.В. Писанов, М.И. Ежова, Е.В. Монахова, А.В. Черкасов, Я.М. Краснов, А.С. Водопьянов, Т.А. Кульшань, Л.Ф. Ливанова, С.А. Портенко, А.С. Абдрашитова, В.Д. Кругликов, С.В. Титова // Проблемы ООИ. – 2015. - 2.

ICE-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.В. Архангельская, И.П. Олейников, С.В. Титова

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

Integrative Conjugative Elements (ICEs) представляют собой мобильные генетические элементы размером от 79 до 108 kb, способные интегрироваться в состав хромосомы хозяина и передаваться различным хозяевам путём конъюгации. В составе ICE элементов идентифицировано свыше 50 генов, детерминирующих процессы конъюгации, интеграции в хромосому, продукцию токсинов, устойчивость к антибиотикам, тяжёлым металлам, ДНК-азы и др. [1]. Данные ретроспективного анализа, проведенные разными группами авторов, показали, что вибрионы приобрели ICE элемент путём горизонтального переноса от гетерологичных микроорганизмов в период 1978-1984 годов [1].

У холерного вибриона первый ICE был описан в 1992 году у штамма серовара O139 и получил обозначение SXT/R391 элемент [1]. В дальнейшем разные группы авторов у разных штаммов описали несколько подобных ICE элементов под различными обозначениями. В настоящее время по итогам секвенирования предложено несколько классификаций, но, на наш взгляд, наиболее приемлемым представляется выделение трёх основных типов ICE элементов-«индийского», «мозамбикского» и «SXT» [2].

Практически все крупные вспышки холеры в мире в последнее время вызваны токсигенными штаммами, содержащими ICE элементы разных типов. Этот факт способствовал началу широкого изучения этой структуры и у нас в стране [3]. Для оценки целесообразности проведения анализа на наличие ICE элемента в практике молекулярного мониторинга холеры следует изучить частоту встречаемости различных типов этой генетической структуры у штаммов холерного вибриона различного происхождения, выделенных на территории Российской Федерации из различных объектов.

Цель работы - с помощью ПЦР на коллекции штаммов различного происхождения оценить степень распространения различных типов ICE элементов среди штаммов холерного вибриона, выделенных на территории Российской Федерации.

Работа проведена на 104 токсигенных штаммах O1 выделенных в различные сроки в различных регионах мира, 27 атоксигенных штаммах и 92 штаммах не O1/не O139, выделенных в Ростовской области в период 2011-2014 годов. ПЦР ставили с родовыми и типоспецифическими праймерами, описанными в литературе [2]. Полученные результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1. Результаты анализа коллекции штаммов *Vibrio cholerae* в ПЦР на определение наличия ICE элемента и его основных типов

Генотип	Число штаммов	Наличие ICE элемента		Тип ICE элемента «индийский»/«мозамбикский»/ «SXT»
		+	-	
O1 ctx+tcpA+	104	89	15	24/65/0
O1ctx-tcpA+	27	0	27	
O1ctx-tcpA-	77	0	77	
неO1/неO139	92	44	48	0/0/0

Отсутствие ICE элемента 15 изученных токсигенных штаммов можно объяснить их ранним сроком выделения до наступления этапа приобретения ICE элемента [1]. Все ICE+ штаммы были успешно протипированы и содержали один из двух основных типов ICE элемента: «индийский» или «мозамбикский». При этом все свежевыделенные токсигенные штаммы содержали элемент «индийского» типа, что совпадает с данными литературы [1, 2]. Ни один из атоксигенных штаммов

O1 не содержал ICE элемент.

Интересную картину наблюдали в случае анализа штаммов не O1/не O139, выделенных на территории Ростовской области из объектов окружающей среды. Практически половина штаммов содержала ICE элемент, однако эта структура не относилась ни к одному из трех основных типов [2]. На наш взгляд, дальнейшие усилия целесообразно сосредоточить на подобных штаммах, выделенных от людей [4].

На основании проделанной работы можно сделать выводы, что ICE элемент является информативным генетическим маркером токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 и для молекулярного типирования вполне достаточно определения двух основных типов. Так как атоксигенные штаммы O1 были выделены в Ростовской области, то отсутствие ICE элемента в перспективе позволит использовать выявление ICE элемента как признак характерный для «заносных» штаммов.

Наличие ICE элемента неустановленного типа у половины вибрионов не O1/не O139 указывает на широкую распространенность близкородственного элемента среди этих вибрионов. Этот результат не позволяет рассматривать выявление ICE элемента у не O1/не O139 вибрионов как критерий их «заносного» происхождения.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niygi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L.N., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic // Nature. 2011; 477(7365):462–5.

2. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M. M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in V. cholerae 7th pandemic variants // J. Microbiol. Methods. 2012; 88:98–102.

3. Захарова И.Б., Водяницкая С.Ю., Подшивалова М.В., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Викторов Д.В. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов Vibrio cholerae NON-O1/NON-O139, выделенных из балластных вод судов и акватории портов Ростовской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2015. - № 3.-С. 47-50.

4. Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Авдеева Е.П., Божко Н.В., Смоликова Л.М. Характеристика штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, вызвавших заболевания людейв Ростовской области // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2011. - № 5. - С. 18-22.

АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ХАРАКТЕРИСТИК ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА О1, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ УКРАИНЫ В 1992-2012 ГОДАХ

А.С. Водопьянов[1], Н.Н. Пидченко[2], С.О. Водопьянов[1], И.П. Олейников[1], С.В. Титова[1], С.Н. Тихонов[2]

[1]ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону
[2]ПЧС Республики Крым Роспотребнадзора, г. Симферополь

Анализ штаммов холерного вибриона, выделенных в различные периоды времени на территории Российской Федерации, с помощью современных молекулярно-генетических методов прочно вошел в практику проведения эпиднадзора за холерой. Одним из таких методов является метод VNTR-анализа [1, 2]. Таким образом, можно получить информацию о происхождении штамма, генетических особенностях и путях его распространения и на основании полученных результатов оптимизировать проведение противоэпидемических мероприятий. Однако для получения полной картины о свойствах циркулирующих штаммов и путях распространения инфекции подобные исследования целесообразно проводить и со штаммами, изолированными на сопредельных территориях.

Цель настоящей работы заключалась в анализе штаммов холерного вибриона, выделенных в период 1992-2013 гг. на территории Украины.

В работе использовали 30 штаммов *Vibrio cholerae El Tor* O1 из коллекции Крымской противочумной станции, выделенных в различных регионах Украины в период 1992-2013 годов. ПЦР и VNTR-анализ проводили, как описано ранее [1]. Выявление ICE элемента и его типирование проводили по описанному методу [3]. Полученные результаты представлены в таблице.

Таблица 1. VNTR-генотипы штаммов холерного вибриона O1, выделенных на территории Украины в 1991-2013 годах

Год	Число штаммов	ctx		VNTR-генотип, (число штаммов данного генотипа)	Тип ICE
		-	+		
1992	1	0	1	B2	0
1993	1	0	1	B1	0
1994	2	0	2	A2,C1	Мозамбикский
1995	1	0	1	A1	Мозамбикский
1998	1	1	0	E1	0
2010	3	0	3	A3,A4,C2	Мозамбикский
2011	18		13	B3,D1,D2,D3(10)	Индийский
		5		E2,F2,E3(2),G1	0
2012	1	1	0	G2	0
2013	2	2	0	F1,H1	0

Все 30 исследованных штаммов (21 токсигенный и 9 атоксигенных) были успешно протипированы и сформировали 20 VNTR-генотипов. При этом по результатам кластерного анализа по методу UPGMA токсигенные штаммы (кластеры A-D) чётко дискриминировались от атоксигенных, составившие кластеры E-H (Рисунок).

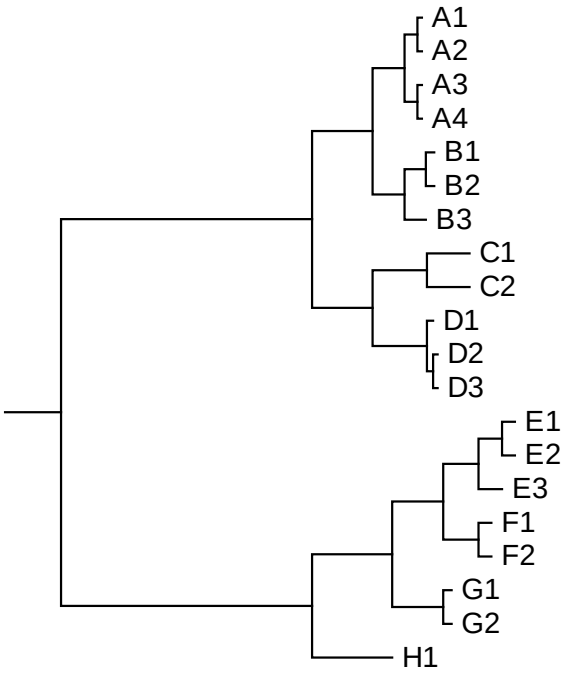


Рисунок. Дендрограмма распределения VNTR-генотипов штаммов холерного вибриона, выделенных на территории Украины в 1991-2013 годах.

Представленные штаммы на основании паспортных данных были выделены как при спорадических случаях заболеваний, так и в период эпидемических осложнений в 2011 году. Среди изученной выборки в этот период было выделено 18 штаммов, при этом 13 штаммов содержали ген холерного токсина, а пять штаммов были атоксигенными (Таблица). На основании данных VNTR-анализа можно утверждать, что данная вспышка имела моноклональную природу, поскольку была вызвана штаммами вибриона одного мажорного генотипа D3 (10 культур), при этом ещё две культуры, выделенные в этот период, были производными от мажорного клона и имели сходные VNTR-генотипы, обозначенные как D1 и D2. Обращает на себя внимание изолирование этот период токсигенного штамма генотипа B3, что может являться следствием независимого заноса возбудителя. Одновременно с токсигеными клонами в период эпидемии были выделены пять атоксигенных культур с четырьмя чётко отличающимися VNTR-генотипами. Это позволит исключить их происхождение путём утраты профага, содержащего гены холерного

токсина. Подобный факт одновременной циркуляции атоксигенных клонов в период эпидемических осложнений был описан нами ранее при анализе insilico штаммов вибрионов, выделенных в период эпидемии на Гаити в 2010 году [4]. Остальные токсигенные культуры были выделены при спорадических случаях и не имели связи с клонами, вызвавшими эпидемию 2011 года.

При выявлении ICE элемента и его генотипировании было показано, что все атоксигенные O1 изоляты лишены данного мобильного генетического элемента. Токсигенные штаммы, выделенные в период 1992-1993 годов, также не содержали ICE элемент, что полностью согласуется с данными литературы о времени приобретении вибрионами этой структуры [3]. Однако все токсигенные штаммы, начиная с 1994 года, содержали ICE элемент (Таблица). При этом у токсигенных штаммов, выделенных в 1994-2010 годах, выявлено наличие ICE элемента «мозамбикского» типа, в то время как изоляты, вызвавшие эпидемические осложнения в 2011 году, несли ICE элемент «индийского» типа.

Полученные данные позволяют утверждать, что на территории Украины в 1992-2013 годах отмечена циркуляция большого количества токсигенных и атоксигенных штаммов. На наш взгляд, дальнейшая работа должна быть направлена на сравнительное изучение генетических характеристик этих штаммов со свойствами штаммов, выделенных в эти же периоды на территории Российской Федерации. Полученные данные, проведенные и на коллекции штаммов из других сопредельных регионов, возможно, позволят установить источники заноса возбудителя на территорию Украины и нашей страны.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., Романова Л.В., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Мишанькин М.Б., Черепахина И.Я., Дуванова О.В., Шишияну М.В. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов Vibrio cholerae O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2004. - № 4.- С. 28.

2. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в различные периоды текущей пандемии холеры // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. - 2015. - Т. 33, № 1. - С. 15-21.

3. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M. M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in V. cholerae 7th pandemic variants // J. Microbiological Methods. 2012; 88:98–102.

4. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе

неполных сиквенсов ДНК штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 // Здоровье населения и среда обитания.– 2013. - № 3. - С. 28-31.

СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ И БЕЛКОВ CHOLIX-ТОКСИНА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ О1/НЕ О139 СЕРОГРУПП

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

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

Cholix-токсин (ChxA) холерных вибрионов был впервые описан в 2008 г. [8] как третий член группы дифтерийного токсина семейства моно-АДФ-рибозилтрансфераз, включающего также экзотоксин А псевдомонад, с которым особенно сходен. Механизм действия ChxA состоит в ингибировании белкового синтеза эукариот за счёт АДФ-рибозилирования фактора элонгации 2. Этими и последующими авторами методами кристаллографии была детально изучена структура данного белка и сконструированы трёхмерные модели его молекулы [4, 6, 8, 9], а также определено биологическое действие на моделях *invitro* и *invivo* [4]. Cholix-токсин встречается в трех формах – I, II и III, различающихся по структуре активных доменов. ChxAI и II (но не III) обладают цитотоксической активностью, при внутривенном введении вызывают коагуляционный некроз клеток печени и гибель мышей [4], обусловливают апоптоз культивируемых клеток [10]. Однако их роль в патогенезе острых кишечных инфекций (ОКИ) остается спорной. Поскольку в условиях эксперимента ни один из вариантов ChxA не вызывал накопления жидкости в кишечнике кроликов [4], его считают причастным в основном к развитию внекишечных форм заболеваний. С другой стороны, высказывалось предположение, что он может усиливать тяжесть ОКИ, содействуя развитию воспалительных процессов [9, 11]. Кроме того, ему отводится роль фактора, способствующего колонизации водных ракообразных и угнетающего рост дрожжевых грибов [8, 9], т.е. повышающего персистентный потенциал вибрионов в объектах окружающей среды. Наконец, ChxA привлекает внимание исследователей ещё и как иммунотоксин, активные домены которого предполагается использовать при разработке стратегии терапии раковых опухолей [9].

Гены *chxA* были вначале обнаружены у *V.cholerae* не О1/не О139 серогрупп [4], позднее и у О1/О139 [5], причём содержащие их штаммы распространены по всему миру. Биоинформационный анализ большого числа нуклеотидных последовательностей этих генов показал высокую

степень их гетерогенности, затрагивающей участки, кодирующие активные домены – RBD (связывающийся с рецептором), TD (транслокационный) и CD (каталитический) [4, 11].

Недавно гены *chxA* были впервые выявлены нами у ряда клинических штаммов не O1/не O139 серогрупп, выделенных в России [1, 2] и в Узбекистане, поэтому представляло интерес сравнить их с уже описанными в литературе. Для этой цели мы использовали 12 генов *chxA*, которые нам удалось идентифицировать с помощью программы BLASTN 2.2.29 в полных геномах, секвенированных на платформе MiSeqIllumina. Девять штаммов из этой группы были выделены в Ростовской области, 1 – в республике Калмыкия и 2 – в Узбекистане в разные годы. Нуклеотидные последовательности генов депонированы в NCBIGenBank под номерами KR259135-259138, KR265171265175, KR362249, KR362250, KU215668.

Результаты анализа сиквенсов с помощью программы AlignX(VectorNTI 11) подтвердили наши данные, полученные ранее с помощью ПЦР [1, 2]: только один штамм (P-912, Ростовская обл., 1968) содержал *chxAIII*, все остальные – *chxAI*. К сожалению, единственный ген *chxAIII* оказался дефектным, что исключает возможность дальнейшего изучения свойств его продукта. Делеция одного нуклеотида G1540 привела к сдвигу рамки считывания (ORF) и образованию «преждевременного» стоп-кодона TAA (1645-1647). В остальном же этот ген на 99 % идентичен генам *chxAIII*, найденным в NCBIGenBank (AB754432, AB754433, AB754434, AB754436). Усечённый продукт состоит из 549 аминокислотных остатков (аа) вместо 655 в полноценном белке, имеет отличную от прототипа С-концевую последовательность, а CD необратимо поврежден. Гены *chxAI* двух штаммов из Узбекистана, 18363 и 18362, выделенных в одно и то же время в одном регионе, но от разных больных, были бы полностью идентичны, если бы второй не содержал однонуклеотидной вставки T1691, которая привела к сдвигу ORF и образованию «преждевременного» стоп-кодона TGA (1750-1752). Продукт этой усечённой рамки (1722 п.н. вместо 1971 п.н. у прототипа), состоящей из 573 аа (вместо 656), также имеет иной С-конец и необратимо повреждённый CD. Наконец, необычный ген *chxAI* обнаружен у штамма P-950, выделенного в 1968 г. в Ростовской области. Его ORF длиной 1785 п.н. имеет иную, чем у прототипа, 5’-концевую последовательность при совпадении дистальных участков. Тем не менее, этот ген не уникален, т.к. практически полностью идентичен таковому клинического штамма 10432-62, выделенного в Филиппинах в 1962 г. Последний интересен тем, что содержит одну хромосому, а не две [7]. Его ген *chxA* (VAB027 в сиквенсе CP010812) имеет два возможных старт-кодона, тогда как в сиквенс штамма P-950 попала только вторая ORF и дистальная половина первой.

Остальные гены *chxAI* содержали ряд различных однонуклеотидных замен (SNP) по сравнению с прототипным AY876053. Поскольку в связи с

вырожденностью генетического кода SNP не всегда влекут за собой соответствующие замены аминокислотных остатков в продукте, мы в большей степени полагались на сравнительный анализ последних, исключив из него дефектный *chxAI* штамма 18962 и включив «виртуально восстановленный» ген *chxAIII* штамма P-950 (с G1540). Вначале мы провели AlignX-анализ только наших штаммов с типовыми *chxA*I, II и III [4] (рис.1). Это позволило выявить идентичные белки ChxA, большинство из которых сгруппировалось в кластер ChxAI, а ChxAIII оказался близким таковому прототипа. ChxAII среди исследованных сиквенсов выявлено не было.

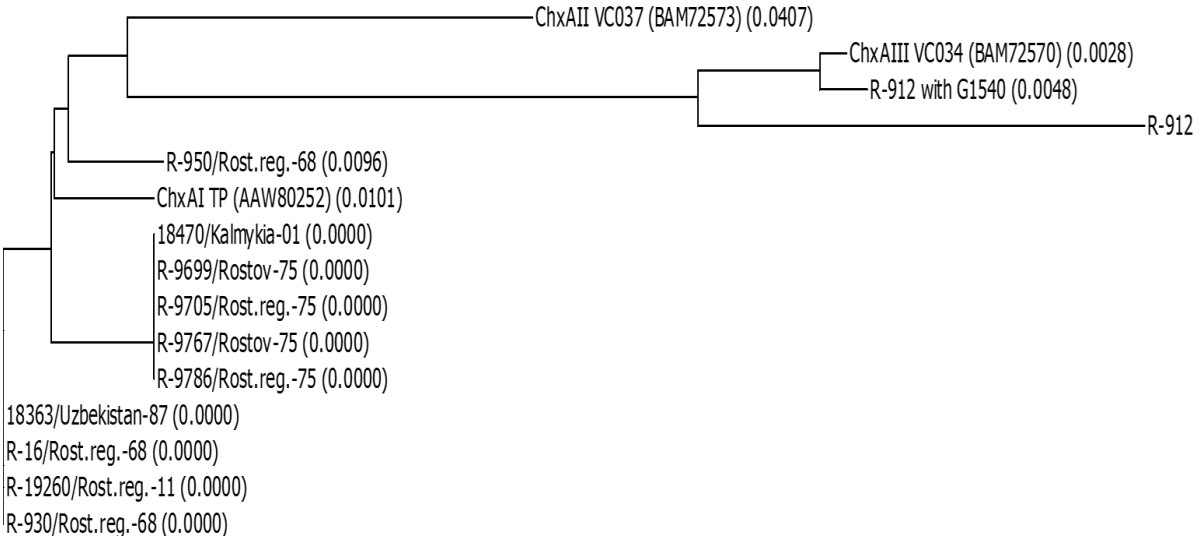


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа генов *chxA* клинических штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных в России и Узбекистане.

Из рисунка также видно, что 11 ChxAI разделились на 3 ветви – первая включала всего один белок штамма P-950, вторая – 5, третья – 4 полностью идентичных белка. Таким образом, выявлено всего 3 аллеля, отличающихся от типового ChxAI.

Ранее Awashti S.P. *et al*. [4] провели сравнительный анализ 53 генов *chxA*, из которых 33 попали в кластер *chxAI*, представленный 18 аллелями, только один из которых был идентичен типовому (AY876053). Гены принадлежали штаммам, выделенным от больных из внешней среды в Индии (годы выделения авторами не указаны). На представленной ими дендрограмме мы обнаружили как уникальные гены, так и группы идентичных. Мы взяли все уникальные гены и по одному из идентичных, транслировали их в белки и сравнили с тремя аллелями ChxAI, выявленными у наших штаммов. В анализ также включили ChxA вышеупомянутого филиппинского штамма 10432-62. Этот белок, представленный в GenBank как «exotoxinAcatalyticfamilyprotein»

(AKB06426), состоял из 661 аа, и мы добавили продукт его второй ORF, идентичной таковой ChxA P-950 (594 аа).

Как видно из полученной дендрограммы (рис.2), 2 аллеля, найденные у наших штаммов, ранее уже были известны, тогда как третий (присутствующий у 5 штаммов) был близок, но не идентичен таковому штаммов из Индии. Тем не менее, возможно, что полностью идентичный ему аллель существует в геномах штаммов (выделенных не только в Индии, но и в других регионах мира), проанализированных Purdy A.E. *et al* .[11], которые мы не использовали в анализе, поскольку в GenBank депонированы неполные последовательности их *chxA*. В дальнейшем мы предполагаем провести сравнительный анализ отдельных активных доменов ChxA исследуемых штаммов, включив в него и эти сиквенсы.

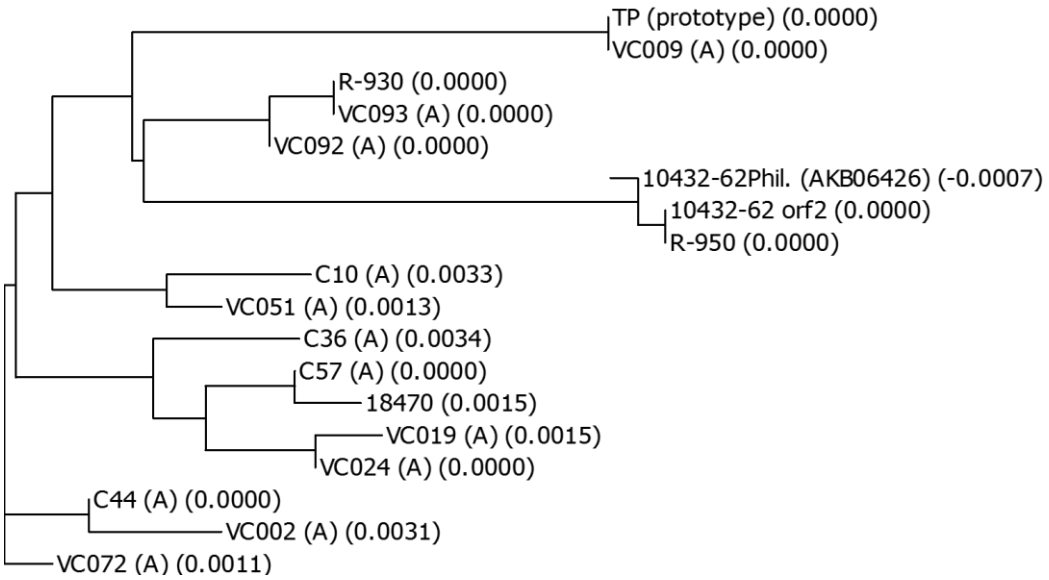


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа разных аллелей генов *chxAI V.cholerae* non O1/non O139. (A) – штаммы, выделенные в Индии и описанные Awashti S.P. *et al*. [4].

Результаты проведённых исследований подтверждают данные зарубежных авторов о гетерогенности гена *chxA*. Вероятно, продукты разных аллелей последнего также могут различаться по биологической активности, с которой связана способность вибрионов как к персистенции в разных экологических нишах, так и к проявлению патогенных свойств. Недавно нами также были выявлены «отечественные» штаммы O1 серогруппы, содержащие ген *chxA* [3]. Глобальное распространение этого гена указывает на значимость его продукта как фактора патогенности/персистенции холерных вибрионов, поэтому дальнейшие исследования его структуры и функций представляются актуальными.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholera* non O1/non O139, выделенных в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 3. – С. 25-27.

2. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В., Ежова М.И., Кругликов В.Д. ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных в Ростовской области // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора. – Ростов н/Д, 2014. – Вып. 27. – С. 66-70.

3. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Водопьянов С.О. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. // Пробл. особо опасных инф. – 2016. –№ 1.– С. 20-27.

4. Awasthi S.P., Asakura M., Chowdury N., Neogi S.B., Hinenoya A., Golbar H.M., Yamate J., Arakawa E., Tada T., Ramamurthy T., Yamasaki S. Novel cholixtoxin variants, ADP-ribosilatingtoxinsin *Vibrio cholera* non O1/non O139 strains, and their pathogenicity // Infect. Immun. – 2013. – Vol. 81, No. 2. – P. 531-541.

5. Awasthi S.P., Asakura M., Neogi S.B., Hinenoya A., Ramamurthy T., Yamasaki S. Development of a PCR-restriction fragment length polymorphism assay for detection and subtyping of cholix toxin variant genes of *Vibrio cholerae*// J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 63(Pt 5). – P. 667-673.

6. Fieldhouse R.J., Jorgensen R., Lugo M.R., Merrill A.R. The 1.8 Å cholix toxin crystal structure in complex with NAD+ and evidence for a new kinetic model // J. Biol. Chem. – 2012. – Vol. 287. – P. 21176–21188.

7. Johnson S.L., Khiani A., Bishop-Lilly K.A. Chapman C., Patel M., Verratti K., Teshima H., Munk A.C., Bruce D.C., Han C.S., Xie G., Davenport K.W., Chain P., Sozhamannan S. Complete genome assemblies for two single-chromosome Vibrio cholerae isolates, strains 1154-74 (serogroup O49) and 10432-62 (serogroup O27) // Genome Announc. – 2015. – Vol. 3, No. 3. – e00462-15.

8. Jorgensen R., Purdy A.E., Fieldhouse R.J., Kimber M.S. Cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from Vibrio cholerae // J. Biol. Chem. – 2008. – Vol. 283, No. 16. – P. 10671-10678.

9. Lugo M.R., Merrill A.R. The father, son and cholix toxin: the third member of the DT group mono-ADP-ribosyltransferase toxin family // Toxins (Basel).– 2015. – Vol. 7, No. 8. – P. 2757-2772.

10. Ogura K., Yahiro K., Tsutsuki H., Nagasawa S., Yamasaki S., Moss

J., Noda M. Characterization of cholix toxin-induced apoptosis in HeLa cells //J. Biol. Chem. – 2011. – Vol. 286, No. 43. – P. 37207-37215.

11. Purdy A.E., Balch D.,Lizarraga-Partida M.L.,Islam M.S., Martinez-Urtaza J., Huq A., Colwell R.R., Bartlett D.H. Diversity and distribution of cholix toxin, a novel ADP-ribosylating factor from *Vibrio cholera* // Environ. Microbiol. Reports. – 2010. – Vol. 2, No. 1. – P. 198–207.

РОЛЬ МАЛЫХ РНК В КОНТРОЛЕ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, ВОВЛЕЧЕННЫХ В РЕАЛИЗАЦИЮ ПАТОГЕННОСТИ *VIBRIO CHOLERAE*

Р.В. Писанов, Д.И. Симакова

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

В настоящее время малые РНК бактерий с регуляторными функциями характеризуют как гетерогенную совокупность высокоструктурированных одноцепочечных РНК, которые обычно не транслируются в белки, варьируют по длине от 50 до 400 нуклеотидов [1]. Большую группу малых РНК составляют малые регуляторные РНК, функционирующие по механизму комплементарного взаимодействия, оснований малой регуляторной РНК с матричными РНК (мРНК) бактерий. В отношении малых РНК гибридизация бывает двух типов:антисмысловая гибридизация РНК-нуклеотидов, происходящая с участием цис-малых РНК и несовершенная (неполная) гибридизация с участием транс-малых РНК, выступающих в роли полифункциональных регуляторов [2].

Образованные при участии малой РНК дуплексы совместно с белком регулятором Hfq впоследствии гидролизуются рибонуклеазами [3]. Так осуществляется деградация транскрипта и, как следствие, репрессируется синтез соответствующего белка.

В холерных вибрионах Hfq-зависимые sRNAs управляют экспрессией генов, ответственных за вирулентность и формирование биоплёнки. Показано, что с Hfq связываются все известные на настоящий момент tesRNA, активирующие синтез σ^s-фактора РНК-полимеразы, так же, как и OMP-регулирующие sRNAMicA и RyhB, которые контролируют активность σ^e – фактора по механизму обратной связи. Данные σ-факторы управляют системами вирулентности бактерий и контролируют экспрессию до 60 % генного пула бактерий [4]. Есть свидетельства того, что некоторые из Hfq-ассоциированных tesRNA холерного вибриона прямо или косвенно участвуют в регуляции вирулентности холерного вибриона

[1, 5]. У холерных вибрионов известно два основных фактора патогенности: холерный токсин (CT) и токсин ко-регулируемые пили (TCP), способствующие межклеточной агрегации, колонизации кишечника микроорганизма и служащие рецептором для CTXϕ фага. Известна и система генной регуляции основных факторов патогенности, в которой ToxT является основным регуляторным белком, контролирующим транскрипцию ctxAB и tcpA-F. Транскрипция ToxT активируется белками TcpH и TcpP, а также ToxR-трансмембранным белком, для работы которого необходим протеин ToxS, ассоциированный с внутренней мембраной. Под воздействием различных факторов внешней среды происходит изменение экспрессии факторов патогенности посредством TcpH-P или ToxR-S регуляции, находящейся под контролем комплекса AphA-B белков активаторов [7]. Данная регуляция находится в непосредственной зависимости от состояния «кворум сенсинг» бактериальной культуры *V. cholerae* и управляется четырьмя малыми РНК, получившими название Qrr1-4. Установлено, что штаммы с делецией генов этих РНК не способны осуществлять продукцию холерогена, пилей адгезии и формировать биоплёнку. Холерный вибрион производит и реагирует на два QS аутоиндуктора: ХАИ-1 (холера аутоиндуктор-1) и АИ-2 (аутоиндуктор-2), производимые белками CqsA и LuxS. Аутоиндукторы холерных вибрионов производятся с постоянной. Для каждого аутоиндуктора на внутренней мембране имеется свой мембранный рецептор: CqsS для ХАИ-1 и LuxP/Q для АИ-2. Каждый рецептор передаёт сигнал регуляторному белку LuxO. При низкой плотности клеток происходит фосфорелирование LuxO и активация четырёх малых РНК Qrr1-4. Они функционируют совместно с Hfq,ингибируя трансляцию сразу нескольких матричных РНК генов, вовлечённых в регуляцию вирулентности *V. cholerae*: hapR –глобального регулятора/репрессора генов патогенности, aphA –индуктора экспрессии генов патогенности и гена vca0939,стимулирующего формирование биоплёнки [1, 8]. Система секреции шестого T6SS типа у холерогенных штаммов *V. cholerae* была ранее открыта как система доставки факторов патогенности в клетки-мишени. У холерных вибрионов она также используется для уничтожения простейших и бактериальных конкурентов в окружающей среде. В геноме холерного вибриона T6SS представлена одним большим VCA0107-VCA0124 и двумя малыми кластерами генов VC1415-VC1421, VCA0017-VCA0021. Достоверно установлено, что малые РНК Qrr1-4 управляют этой системой посредством репрессии. Открыто два механизма контроля:при высокой плотности клеток культуры малые РНК Qrr1-4 блокируют трансляцию белка регулятора HapR посредством прямой гибридизации с мРНК как активатора генов T6SS малого кластера;при низкой плотности клеток культуры происходит прямая репрессия малыми РНК Qrr1-4 трансляции белка регулятора VasH, ген которого располагается в большом

кластере T6SS [6].

В окружающей среде холерный вибрион может существовать как в свободной форме, таки в виде биоплёнки, ассоциированной с различными поверхностями. Биоплёночная форма холерного вибриона максимально устойчива к воздействию различных факторов окружающей среды и обладает повышенными вирулентными свойствами относительно свободной формы. Активация компетенции холерных вибрионов контролируется двумя основными регуляторными белками: TfoX и HapR. TfoX регулирует гены, важные для связывания и перемещения экзогенной ДНК в периплазму клетки. Кроме того, TfoX в сочетании с HapR косвенно регулирует гены, ответственные за стабилизацию ДНК в периплазме и поглощение через внутреннюю мембрану с помощью ко-активации регулятора транскрипции QstR [5]. Прекращение синтеза малых РНК Qrr1-4 под воздействием аутоиндукционных сигналов в биоплёнке приводит к возрастанию концентрации белка HapR, чтотак же индуцирует экспрессию каскада генов естественной компетентности клеток *V. cholerae* и, как следствие, восприимчивость к горизонтальному переносу генетической информации. Мозаичная структура генома холерных вибрионов, по мнению некоторых исследователей, являетсярезультатом многочисленных событий горизонтального переноса генов.

Представители рода *Vibrio*, как и большинство грамотрицательных бактерий, продуцируют в процессе жизнедеятельности везикулы наружной мембраны,в состав которых входят ДНК, РНК, белки наружной мембраны и периплазмы, липополисахариды, фосфолипиды. Согласно одной из теорий, функции бактериальных везикул заключаются в переносе и доставке факторов патогенности к эукариотическим клеткам. Процесс формирования везикул у холерного вибриона управляется малой РНК, получившей название VrrA [1]. В геноме *V. cholerae* она располагается в межгенной области генов vc1741-vc1743 и её длина всего 140 пн. Протеин OmpA (outermembraneporin) имеет важное значение для колонизирующей способности холерных вибрионов. Штаммы с делецией в гене ompA обладают пониженной колонизирующей способностью (в 10 раз от исходного), в то время как штаммы с инактивированным геном малой РНК vrrA показывают пятикратное увеличение колонизирующей активности, что говорит о VrrA как о модуляторе вирулентности холерных вибрионов. Установлено, что малая РНК VrrA продуцируется и накапливается в пост-логарифмическую фазу роста и связывается с матричной РНК ompA, препятствуя её трансляции и блокируя синтез OmpA. Продукция везикул холерными вибрионами зависит от концентрации OmpA в клетке. Подавление синтеза OmpA через VrrA приводит к повышению продукции везикул культурой и повышению выживаемости биопленки [3]. VrrA снижает вирулентность *V. cholerae* путём подавления экспрессии гена *tcpA* посредством связывания с мРНК. Таким образом, VrrA как репрессор

колонизирующей активности вибрионов может рассматриваться в качестве одной из мишеней при создании вакцинных штаммов.

Таким образом, исходя из различных литературных данных, можно сделать вывод о непосредственном участии малых РНК в реализации патогенных свойств и регуляцию вирулентности холерогенных штаммов *V. cholerae.* Однако изучение малых РНК сопряжено с различного рода трудностями: не разработана унифицированная система для выделения малых РНК и Hfq-ассоциированных tesRNA, отсутствует методическая база по работе с малыми РНК с учетом СП 1.3.1285-03 (Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности). Тем не менее, работы в нашей стране по использованию малых RNA как маркеров вирулентности у разных штаммов *V. cholerae* ещё не осуществлялись, но, несомненно, выглядят многообещающими в свете последних научных изысканий.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Liu J.M., Camilli A. A broadening world of bacterial small RNAs.Curr.Opin.Microbiol. 2010; 13(1):18-23.

2. Repoila F, Darfeuille F. Small regulatory non-coding RNAs in bacteria: physiology and mechanistic aspects // Biol. Cell. 2009; 101(2):117-31.

3. Yanjie Ch., Vogel J. The role of Hfq in bacterial pathogens // Curr. Opin. Microbiol. 13.1 (2010):24-33.

4. Bardill J.P., Hammer B.K. Non-coding sRNAs regulate virulence in the bacterial pathogen Vibrio cholerae //RNA Biol. 2012; 9(4):392-401.

5. Hammer B.K., Bassler B.L. RegulatorysmallRNAscircumvent the conventionalquorum sensingpathway in pandemicVibrio cholerae // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007; 104(27):11145-9.

6. Bejerano-Sagie M., Xavier K.B. The role of smallRNAs in quorumsensing // Curr.Opin.Microbiol. 2007; 10(2):189-98.

7. Kovacikova 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; 41(2):393-407.

8. Waters L.S, Storz G. Regulatory RNAs in bacteria // Cell. 2009; 136(4):615-28.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН ГЕМОЛИЗИНА *VIBRIO CHOLERAE* В *ESCHERICHIA COLI* ПОД КОНТРОЛЕМ Т5 ПРОМОТОРА

Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, Г.В. Демидова, Н.Б. Непомнящая, Е.А. Меньшикова

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

Растворимый гемолизин/цитолизин (HlyA, VCC) является одним из факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов Эль Тор [4, 5]. В то же время способность к его продукции до настоящего времени используется при определении эпидемической опасности возбудителей в качестве показателя ее отсутствия [3]. Обычно гемолитичность штаммов проверяют в пробе Грейга. Данный метод имеет ряд существенных недостатков в связи с нестандартностью и необходимостью постоянно иметь в распоряжении свежие эритроциты барана, что возможно далеко не во всех диагностических лабораториях, а консервированные, как показывает практика, дают нестабильные результаты. Это обусловливает актуальность разработки альтернативных диагностикумов на основе специфических антител. В свою очередь, для их создания требуются препаративные количества искомого антигена, наиболее эффективным способом получения которых остаётся использование лабораторных штаммов *Escherichia coli* – эффективных продуцентов рекомбинантных белков. Ранее нами был сконструирован такой штамм - *E.coli* D1210pES4H, содержащий в составе рекомбинантной плазмиды помимо гена *hlyA* также *hlyB* и *lipA* и экспрессирующий их под контролем собственных промоторов [1, 2]. Неконтролируемая экспрессия и наличие в клетках нецелевых продуктов дополнительных генов затрудняло очистку искомого белка. Поэтому целью настоящей работы явилось клонирование гена *hlyA* в составе плазмидного вектора pQE30, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем мощного Т5-промотора, и создание штамма *E. coli* – суперпродуцента рекомбинантного белка proHlyA *Vibrio cholerae*.

На основе анализа нуклеотидной последовательности гена VCA0218 в составе малой хромосомы *V. cholera* N16961 (AE003853) нами были сконструированы специфические праймеры для ПЦР-синтеза гена *hlyA*, содержащие на 5'-конце сайт рестрикции для эндонуклеазы, образующей липкие концы: BamHI для прямого праймера и PstI – для обратного в соответствии с порядком расположения сайтов рестрикции в полилинкере векторной плазмиды pQE30, что обеспечивало встраивание амплификата в вектор в ориентации, обеспечивающей направление транскрипции под

контролем Т5-промотора.

Донором ДНК для ПЦР-амплификации гена *hlyA* служил высокогемолитичный нетоксигенный штамм *V. cholerae* O19337 биовара Эль Тор. Полученный амплификат длиной 2291 п.н. и плазмида pQE30 были обработаны указанными эндонуклеазами и лигированы. Сконструированная таким образом рекомбинантная плазмида pHlyA была трансформирована в несколько штаммов *E. coli*: HB101, C600, BW, Jm101, Jm103, JM109, Stratagen, M15[pREP4]. Тестирование бульонных культур трансформантов, выращенных с ампициллином и индуктором ИПТГ, в лунках кровяного агара показало, что наилучшая продукция proHlyA обеспечивалась клонами штаммов *E. coli* M15[pREP4]pHlyA и Jm103pHlyA.

Для оценки уровней экспрессии гена в этих штаммах их выращивали в бульоне LB, содержащем 50 мкг/мл ампициллина, с шуттелированием в течение 4 ч, затем добавляли индуктор ИПТГ до конечной концентрации 1 мМ и продолжали шуттелирование в течение еще 1,5 ч. Затем клетки осаждали центрифугированием, растворяли осадок в лизис-буфере при 100°С и подвергали SDS-электрофорезу в 10 % полиакриламидном геле.

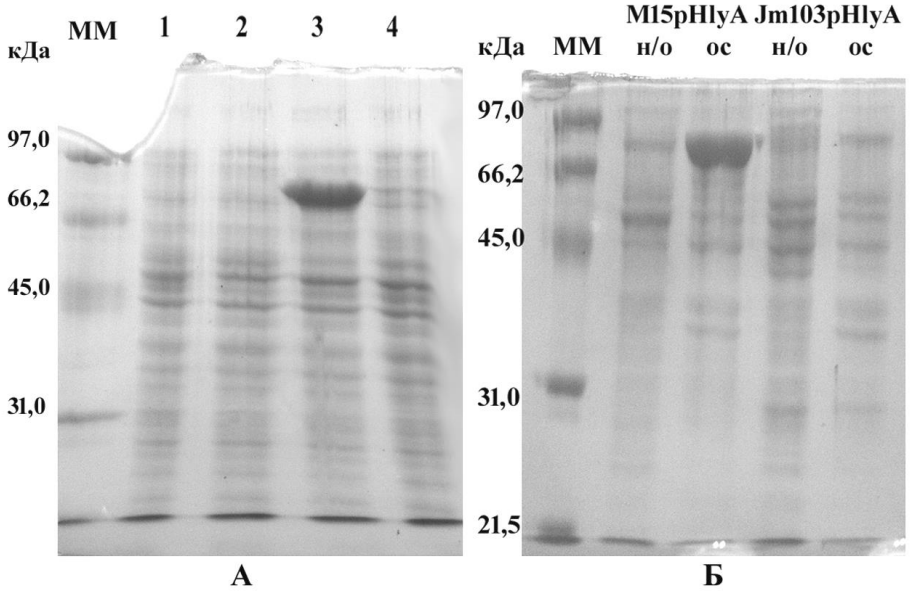


Рисунок. Продукция proHlyA рекомбинантными штаммами *E. coli*, выращенными с индукцией ИПТГ (SDS-электрофорез в 10 % ПААГ). А – лизаты целых клеток: 1.Jm103pQE30, 2.Jm103pHlyA, 3.M15[pREP4]pHlyA, 4.M15[pREP4]pQE30; Б – растворимая (н/о) и нерастворимая (ос) фракции ультразвуковых дезинтегратов.

Как видно из рисунка (А), значительное увеличение количества белка с ММ ~80 кДа (соответствующей ММ proHlyA) наблюдалось только в лизате клеток *E. coli* M15[pREP4]pHlyA, в отличие от таковых Jm103pHlyA и обоих контрольных штаммов, содержащих векторную

плазмиду без вставки. По данным программы QuantityOne, количество продукта составляло приблизительно 13 % суммарных клеточных белков штамма M15[pREP4]pHlyA. Для определения локализации рекомбинантного proHlyA клетки продуцентов разрушали ультразвуком на дезинтеграторе QsonicaQ700 в течение 10 мин (40 импульсов по 5 сек, 357Дж с перерывами в 10 сек; амплитуда 50) и подвергали электрофорезу растворимую (н/о) и нерастворимую (ос) фракции клеток, разделённых центрифугированием. Искомый белок был выявлен в нерастворимой фракции (тельцах включения) штамма [pREP4]pHlyA (рисунок, Б), где его содержание составляло ~17 % суммарных клеточных белков.

Таким образом, нами сконструирован штамм *E. coli* M15[pREP4]pHlyA – суперпродуцент прогемолизина *V. cholerae* Эль Тор, который в перспективе может быть использован для выделения данного белка в препаративных количествах. Продукт клонированного гена, несмотря на отсутствие процессинга и присутствие на N-конце гексагистидинового блока (6His-tag), обладает гемолитической активностью по отношению к эритроцитам барана. Наличие 6His-tag позволит выделять очищенный препарат с помощью специфически связывающих 6His-белки сорбентов в целях создания специфических диагностикумов, а также изучения значимости гемолизина как фактора патогенности/персистенции. В случае необходимости получения зрелой формы HlyAc ММ 65 кДа, обладающей повышенной гемолитической и цитолитической активностью, прогемолизин может быть подвергнут протеолитическому процессингу с помощью обработки трипсином либо гемагглютинин/протеазой [8].

Преимуществами полученного продуцента по сравнению с холерными вибрионами является высокий выход искомого белка, возможность культивирования без соблюдения режима работы с возбудителями особо опасных инфекций, отсутствие способности к синтезу каких-либо дополнительных биологически активных субстанций, которые могли бы затруднить его выделение и очистку, а по сравнению с известными рекомбинантными штаммами-продуцентами [1, 2, 6, 7] – непродолжительный период наращивания биомассы (4-6 часов, включая индукцию), что обеспечит возможность ускоренного получения препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Власов В.П., Монахова Е.В., Ушакова И.Е., Михась Н.К., Данилкина Е.Б., Ломов Ю.М. Гемолизин *Vibrio cholerae* eltor: клонирование и экспрессия генов в *Escherichia coli* // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 1992. – № 7-8. – С. 14-20.

2. Власов В.П., Михась Н.К., Монахова Е.В., Ушакова И.Е., Бугаенко Н.И., Новохатский А.С. Штамм бактерий *E.coli* – продуцент гемолизина *Vibrio cholerae* eltor. Авторское свидетельство № 1649809 от

15.01.91.

3. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство / Онищенко Г.Г., Кутырев В.В. (ред.) – М. «Шико», 2013.

4. Banerjee K.K., Mazumdar B. *Vibrio cholerae* hemolysin: anenigmaticpore-formingtoxin // Epidemiological and molecular aspects on cholera / T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya (eds.). – Springer Science+Business Media, 2010. – Ch.16. – P. 277-290.

5. Cinar H.N., Kothary M., Datta A.R., Tall B.D., Sprando R., Bilecen K., Yildiz F., McCardell B. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, developmental delay, and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans //* PLoS One. – 2010. – Vol. 5, No. 7. – e11558.

6. Goldberg S.L., Murphy J.R. Molecular cloning of the hemolysin determinant from *Vibrio cholerae* El Tor // J.Bacteriol. – 1984. – Vol. 160, No. 1. – P. 239-244.

7. Manning P.A., Brown M.H., Heuzenroeder M.W. Cloning of the structural gene (*hly*) of *Vibrio cholerae* El Tor strain 017 // Gene. – 1984. – Vol. 31. – P. 225-231.

8. Nagamune K., Yamamoto K., Naka A., Matsuyama J., Miwatani T., Honda T. In vitro processing and activation of the recombinant precursor of El Tor cytolysin/hemolysin (pro-HlyA) of *Vibrio cholerae* by soluble hemagglutinin/protease of *V.cholerae*, trypsin and other proteases // Infect. Immun. – 1996. – Vol. 64, No. 11. – P. 4655-4658.

АНАЛИЗ ФЕНОТИПИЧЕСКИХ СВОЙСТВ И ОЦЕНКА УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ И БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ У ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, УТРАТИВШИХ ПРОФАГ СТХФ

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

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

Возбудитель холеры способен существовать как в организме хозяина (человека), так и во внешней среде. Адаптация возбудителя к разным экологическим нишам обусловлена изменением экспрессии множества генов, связанных либо с вирулентностью, либо с выживанием в изменяющихся условиях окружающей среды. В свою очередь переключение экспрессии генов вирулентности и жизнеобеспечения

осуществляется различными генными сетями – группами координированно функционирующих и взаимодействующих между собой генов, контролирующих формирование фенотипических признаков [1]. Среди них наиболее важны генные сети регуляции вирулентности, а также формирования биоплёнки, в составе которой холерные вибрионы надёжно защищены от разных стрессовых воздействий [2, 3].

Ранее нами в модельных экспериментах на 20 клинических штаммах было показано, что токсигенные штаммы в водной среде в 60 % случаев утрачивают профаг CTXφ, несущий гены холерного токсина. Результатом такой утраты является образование нетоксигенных вариантов. По данным современной генетики, утрата одних генов может повлечь за собой изменение экспрессии других генов, связанных между собой через генные сети.

Цель работы – комплексный анализ различных фенотипических свойств нетоксигенных мутантов, связанных с вирулентностью и образованием биоплёнки, а также оценка уровня экспрессии регуляторных генов, контролирующих эти свойства.

Объектом исследования служили две пары изогенных штаммов – исходные токсигенные (Tox^+) штаммы M888, P18899 и их спонтанные нетоксигенные (Tox^-) мутанты M888D и P18899D.

По данным ПЦР-анализа и полногеномного секвенирования было установлено, что мутант M888D утратил гены лишь профага CTXφ, тогда как у второго мутанта P18899D, помимо генов CTXφ, были потеряны соседние участки ДНК, содержащие профаги RS1φ иTLCφ.

При сравнительном анализе фенотипов было обнаружено, что потеря профага CTXφу нетоксигенных штаммов сопровождалась изменением морфологии колоний**,** снижением продукции экзополисахарида, активности процесса образования биоплёнок, колонизирующей способности, подвижности, а также снижением уровня продукции растворимой гемагглютинин/протеазы.

Сравнение нуклеотидных последовательностей структурных и регуляторных генов, определяющих изученные свойства у нетоксигенных штаммов, с исходными токсигенными не обнаружило никаких других изменений генома, кроме утраты профага и прилегающих к нему участков генома.

Одна из причин одновременного изменения нескольких фенотипических свойств могла заключаться в различной активности регуляторных генов, входящих в 2 разные генные сети – вирулентности и биоплёнкообразования. Генная сеть регуляции вирулентности, включающая в себя регуляторные гены *toxR, toxS, tcpP, tcpH, aphA, aphB, toxT*, тесно связана с генной сетью, контролирующей процесс формирования биоплёнки, основными компонентами которой являются гены *vpsT* и *vpsR*, через экспрессию регуляторного гена *aphA*.

Для подтверждения этого предположения мы оценили уровень транскрипции пяти регуляторных генов, входящих в генную сеть вирулентности: *toxR, aphA, tcpP, tcpH* и *toxT*. В результате было выявлено заметное снижение уровня транскрипции всех изученных регуляторных генов у Tox$^-$ мутантов в сравнении с исходными штаммами. Учитывая, что белковый продукт гена *toxT* является прямым позитивным регулятором структурного гена *tcpA* кодирующего биосинтез основной субъединицы пилей адгезии, был определен уровень его транскрипции. Оказалось, что у мутантов уровень транскрипции *tcpA* действительно снижен. Важным следствием этих событий явилось обнаруженное нами снижение способности мутантов колонизировать тонкий кишечник крольчат.

Снижение уровня транскрипции генов вирулентности не могло не отразиться на экспрессии регуляторных генов, входящих в состав другой генной сети, контролирующей процессе образования биоплёнки. В этой связи был определён уровень транскрипции регуляторных генов *vspT* и *vspR*, активирующих экспрессию структурных генов экзополисахарида, а также *flaA* и *motX,* участвующих в биосинтезе нити жгутика и кольца жгутикового мотора соответственно. Уровень транскрипции всех этих генов был заметно ниже у мутантов в сравнении с исходными штаммами. Полученные данные полностью соответствуют результатам фенотипического анализа изогенных штаммов**.**

Для понимания причин снижения продукции растворимой гемагглютинин/протеазы, у мутантов была изучена активность регуляторного гена *hapR*. Оказалось, что у мутантов уровень транскрипции гена *hapR* был ниже, чему исходных штаммов. Такие данные полностью согласуются с пониженной продукцией ими HA/P.

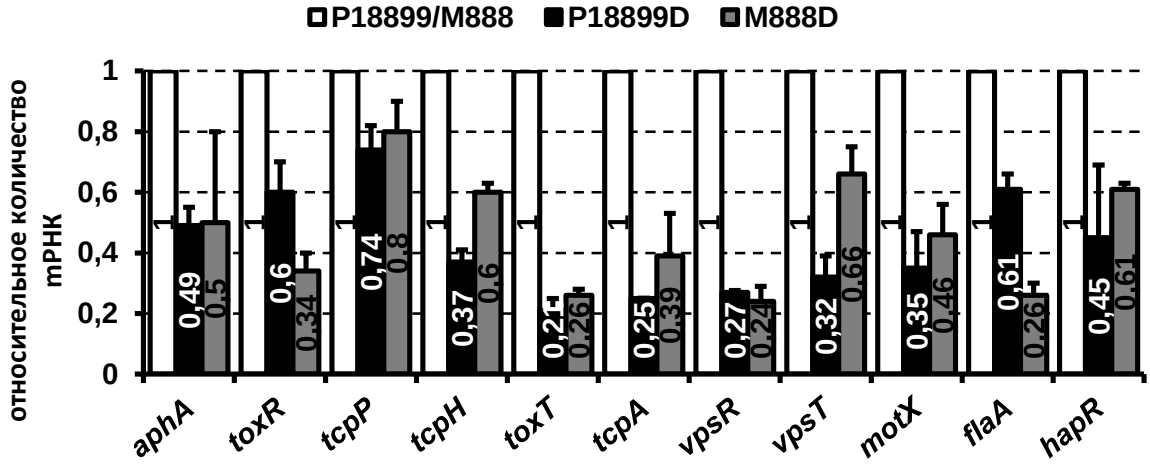


Рисунок 1. Относительный уровень транскрипции генов регуляторных сетей вирулентности и образования биоплёнки.

Таким образом, обнаружено, что делеция профага CTXφ приводит к

одновременному изменению у мутантов нескольких фенотипических свойств, связанных с вирулентностью и образованием биоплёнки: подвижности, колонизирующей способности, продукции гемагглютин/протеазы и экзополисахарида. Впервые установлено, что причиной плейотропного эффекта делеции CTXφ является каскадное снижение уровня транскрипции регуляторных генов (*toxR, aphA, tcpP, tcpH, toxT, vpsT, vpsR*), контролирующих вирулентность и процессы формирования биоплёнки у возбудителя холеры. Полученные результаты способствуют пониманию причин одновременного изменения разнообразных свойств возбудителя холеры при его попадании в водную среду, что важно учитывать при планировании проведения противоэпидемических мероприятий, а также необходимы для дальнейшего поиска генов, делеция которых позволит нарушать функционирование регуляторных сетей, что весьма полезно при конструировании штаммов с заданными свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меркулова Т.И., Ананько Е.А., Игнатьева Е.В., Колчанов Н.А. Регуляторные коды транскрипции геномов эукариот // Генетика. – 2013. – Т.49. № 1. – С. 37-57.

2. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expression // Infect. Immun. – 2007.– Vol. 75. № 12.– P. 5542-5549.

3. Teschler J.K., Zamorano-Sánchez D., Utada A.S. et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 13. № 5. – P. 255-268.

ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ В ШТАММАХ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

И.Б. Захарова, М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, Я.А. Лопастейская, А.А. Замарин

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

Представители рода *Vibrio* широко распространены в морских средах и пресноводных водоёмах. Возможность вибрионов занимать различные ниши обитания является свидетельством их высокого адаптационного

потенциала [1]. Важным фактором в этом процессе у вибрионов является горизонтальный перенос генов, представляющий механизм передачи ДНК из одной бактериальной клетки в другую без необходимости деления клеток [2, 3, 4]. Привнесенная ДНК интегрирует в геном реципиента как путем гомологичной рекомбинации, так и посредством мобильных генетических элементов [5], что обеспечивает ее стабильное наследование.

Ранее считалось, что детерминанты резистентности к антибиотикам имеют у вибрионов исключительно внехромосомную локализацию. Однако в 1992 году, во время крупной вспышки холеры в Индии, в клиническом изоляте *V. cholerae* MO10 новой O139 серогруппы был обнаружен хромосомный трансмиссивный генетический элемент, названный SXT^{MO10}, на котором были локализованы гены резистентности к сульфаметоксазолу (Su), триметоприму (TM), хлорамфениколу (Cm) и стрептомицину (Sm) [6]. В настоящее время для идентифицированных до 2006 года интегративных конъюгативных элементов (ICE) используют устоявшиеся названия, а для вновь описываемых элементов данного типа принята универсальная номенклатура: префикс ICE, аббревиатура вида происхождения элемента, 3 буквы названия страны выделения и количество генов резистентности [7].

Консервативные последовательности ICEs представлены генами, участвующими в интеграции/вырезании, конъюгативном переносе и регуляторных процессах. Кроме того, все известные ICEs содержат вариабельную ДНК, придающую элемент-специфические свойства. Среди функций, кодируемых в вариабельной ДНК ICEs, - устойчивость к антибиотикам и тяжёлым металлам, регулирование образования биоплёнки и подвижности [7]. Кроме того, гены вариабельной ДНК предположительно участвуют в модификации ДНК, рекомбинации и репарации, кодируя разнообразные системы рестрикции-модификации, геликазы и эндонуклеазы. Такие гены могут обеспечивать защиту от инвазий чужеродных ДНК, в том числе фаговой инфекции, и/или содействовать целостности генома ICE в процессе его конъюгативной передачи [8].

ICE семейства SXT/R391 широко распространены в штаммах рода *Vibrio,* выделенных как от больных, так и из воды открытых водоёмов, и обычно ассоциированы с мультирезистентностью к целому ряду антибактериальных препаратов [9]. Ранее нами было показано наличие различных типов SXT в составе геномов штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных в 90-е годы на территории Волгоградской области [10]. Известно, что многие виды рода *Vibrio* могут служить источником для холерных вибрионов новых, ранее не встречавшихся у них комбинаций генов устойчивости к антимикробным соединениям [4]. В связи с этим было логично оценить распространённость данных генетических элементов среди автохтонной вибриофлоры региональных

открытых водоёмов.

Мы провели скрининг 136 штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139 и 43 штаммов *Vibrio spp*., не относящихся к виду *V. cholerae*, выделенных на территории Волгоградской области, для поиска последовательностей SXT-элемента. Амплификация с парой праймеров SXT-F/SXT-B, специфичных гену интегразы *int*SXT, показала наличие этого гена у 60 штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139 и у 25 штаммов *Vibrio spp*. Причём хронологически первым SXT-положительным *V. cholerae* non-O1/non-O139 был водный штамм 34-I, выделенный в 2003 году, спустя десятилетие после выделения в 1993 году первого регионального штамма, несущего SXT - *V. cholerae* O1 El Tor B-161.

Молекулярное типирование вариантов SXT проводили с использованием праймеров, специфичных генам устойчивости к сульфаметоксазолу *sulII*, стрептомицину *strB*, канамицину *kan* и детерминантам резистентности к триметоприму – дигидрофолатредуктазам *dfr18* и *dfrA1*, характерным для вариантов SXT^{MO10} и SXT^{ET} соответственно.

Анализ вариабельного региона VR III показал присутствие детерминант устойчивости к стрептомицину(*strB*) и триметоприму (*dfr18*) в двух штаммах *V. cholerae* non-O1/non-O139 (233 и 298-13), в 7 штаммах (127, 135, 162, 174, 270-1, 305-9 и 982) – только *dfr18*, в 2 штаммах (18/841 и 34-I) – *dfr*18 и *sul*II. В ICEs всех исследованных штаммов *Vibrio spp*. кластер генов антибиотикорезистентности (*strB, sul2, dfr18*) в VR III не обнаружен. Однако в ICE штамма *Vibrio* sp. 287-9 обнаружена вставка в HS3, содержащая ген резистентности к триметоприму *dfrA1*, характерный для SXT^{ET} штаммов *V. cholerae* O1.

Интересно отметить, что из 24 non-O1/non-O139 штаммов, выделенных в период 2003-2007 гг., только два (18/841 и 34-I) имели в составе генома ICE типаSXT^{MO10} с частично делетированными кластерами антибиотикорезистентности. В то же время более 50 % штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139, выделенных через 10 лет, содержали интегративные конъюгативные элементы также SXT^{MO10} типа, но с иными вариантами состава кластера генов резистентности.

Таким образом, показано присутствие и быстрое распространение среди автохтонной вибриофлоры региональных открытых водоемов интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391. Считалось, что распространение генов резистентности – это их основная роль, но сейчас очевидно, что ICEs могут быть посредником для передачи самого разнообразного набора функций. Они позволяют бактериям быстро адаптироваться к новым условиям окружающей среды и колонизировать новые ниши.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Thompson F.L., Iida T., Swings J. Biodiversity of vibrios // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – V. 68.- P. 403–431.
2. MacDonald D., Demarre G., Bouvier M., et al. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination // Nature. – 2006. – Vol. 440. – P. 1157—1162.
3. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution // Nat. Rev. Microbiol. – 2006. – Vol. 4. – P. 608-620.
4. 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.
5. Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M. et al. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance //J. Bacteriol.– 2008. – V. 190(4). – P. 5095–5100.
6. Waldor M., Tschäpe H., Mekalanos J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in Vibrio cholerae O139 // J. Bacteriol. – 1996. – V. 178(14). – P. 4157-4165.
7. Burrus V., Marrero J., Waldor M. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements // Plasmid. - 2006. - V. 55, № 3. - P. 173-183.
8. Wozniak R.A, Fouts D.E, Spagnoletti M. et al.Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs // PLoS Genet.– 2009. - V. 5. - № 12.-e1000786.doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.
9. Захарова И.Б., Викторов Д.В. Интегративные конъюгативные элементы микроорганизмов (ICEs) // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2015. – Т. 33, № 3. – С. 9–16.
10. Подшивалова М.В., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б. и др. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов Vibrio cholerae, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT-типа // Эпидемиология и инфекционные болезни. –2014. – № 3. – С. 34-39.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ БИОТИПИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAE O1* В СВЯЗИ С ГЛОБАЛЬНЫМ РАСПРОСТРАНЕНИЕМ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ (ГИБРИДНЫХ) ВАРИАНТОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

В.Н. Савельев, А.Н. Куличенко, И.В. Савельева, Б.В. Бабенышев,
О.В. Васильева, Л.В. Гусева, Е.И. Подопригора

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь

Работы зарубежных и отечественных исследователей, проведённые за более чем 50-летний период течения седьмой пандемии холеры, значительно расширили и упорядочили знания в области таксономии и классификации вибрионов, вызывающих холеру. К настоящему времени сформировались 3 эпидемически опасных, отличающихся по фенотипическим и генотипическим признакам, варианта возбудителя холеры: *Vibrio cholerae O1 biotype classical, Vibrio cholerae O1 biotype El Tor* и *Vibrio cholerae O139* серогруппы. Названные возбудители холеры содержат в своих геномах оперон *ctxAB*, кодирующий биосинтез холерного токсина классического (СТ-1) или Эль Тор (СТ-2) типа – основного патогенетического фактора холерной инфекции.

Вид микроба – это совокупность популяций, имеющих общее происхождение и генотип, морфологические, биохимические, физиологические и другие признаки, способные в определённых условиях вызывать у человека патологические процессы. Исходя из сказанного, вид *Vibrio cholerae O1* подразделён на два биовара – классический и Эль Тор по схеме, включающей такие фенотипические признаки, как чувствительность к полимиксину В (тест PBS), агглютинация куриных эритроцитов (ССА) или эритроцитов морской свинки (АМС), реакция Фогес-Проскауэра (VP-тест), лизабельность фагами Эль Тор (ЭII) или классическим (С) [1, 2, 3].

В связи с глобальным распространением генетически измененных (гибридных) вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор, прототипом которых явились типичные токсигенные холерные вибрионы биовара Эль Тор [4, 5, 6, 7, 8,], мы изучили фенотипические свойства штаммов названных холерных вибрионов, обращая внимание на значения тестов, дифференцирующих *Vibrio cholerae O1* на биовары классический и Эль Тор.

Установлено [9], что генетически изменённые (гибридные) варианты биовара Эль Тор (таблица 1) по своим морфологическим, биохимическим, серологическим и гемолитическим свойствам неотличимы от таковых у типичных холерных вибрионов биовара Эль Тор, обусловивших эпидемиологические осложнения по холере в шестидесятые – начале девяностых годов XX столетия. Вместе с тем (таблица 1) у части (48,7 %) гибридных штаммов фенотипические свойства, определяющие биовар, были смешанными, т.е. характерными для биовара Эль Тор и классического, что делает невозможным отнести изучаемые штаммы

холерных вибрионов к определённому биовару. Подобные штаммы с неопределённым биоваром обнаруживались в Индии [5] и Таиланде [10].

Таблица 1. Фенотипические свойства, определяющие биовар, у токсигенных типичных и гибридных вариантов Эль Тор

Год, место выделения штаммов *Vibrio cholerae O1,* (n)	Фенотипические тесты					Биовар эльтор	% Штам-мов
	РВ	ЭМС	VP	ЭII	С		
1970-1989, Азербайджан, (50)	R	+	+	+	–	типичный	100
1970, Грузия, (10)	R	+	+	+	–	типичный	100
1970-1973, Дагестан, (35)	R	+	+	+	–	типичный	100
1970-1975, Ставропольский край, (56)	R	+	+	+	–	типичный	100
1993, 1994, 1998, Дагестан, (98) из них: (40)	R	+	+	+	–	типичный	41,3
(58)	RS	+–	+–	–	–	смешанный	48,7
Пакистан 5	S	–	–	–	+	классический	100

Примечание: РВ – полимиксин В, 50 ЕД; ЭМС – эритроциты морской свинки, 2,5%; VP– реакция Фогеса-Проскауэра; ЭII – диагностический бактериофаг эльтор II в ДРТ; С – диагностический бактериофаг классический в ДРТ.

Полученные данные свидетельствуют, что в 90-е годы прошлого столетия (Дагестан, 1993, 1994, 1998 гг.) появились генетически измененные штаммы холерного вибриона О1 серологической группы с типичными фенотипическими признаками биовара Эль Тор (41,3 %), продуцирующие классический тип холерного токсина (СТ-1) и с фенотипическими признаками биоваров Эль Тор и классического (48,7 %), но также с продукцией холерного токсина классического типа (СТ-1).

Фенотипические тесты (VP–3,8 %; РВ+АЭМС+ ЭII–7,5 %; РВ+ ЭII–20,8 %; ЭII–58,5 %), определяющие биовар *Vibrio cholerae O1*, оказались недостаточными для классификации на биовары данного таксона. Очевидно, в существующую схему биотипирования необходимо включить генетические маркеры, то есть маркерные гены классического и Эль Тор биоваров.

Установлено, что генетическая структура профагов CTX_{phi} и RS1 у типичных токсигенных штаммов холерного вибриона Эль Тор, выделенных от людей в Азербайджане, Дагестане, Ставропольском крае в 1970–1990 гг., представлена типичным для биовара Эль Тор набором ключевых генов патогенности: $ctxB^{El}$, $rstR^{El}$ и rstC. Генетическая структура профагов CTX_{phi} и RS1 у выделенных от больных штаммов холерных

вибрионов в Дагестане в 1993, 1994 и 1998 годах претерпела изменения и представлена различными комбинациями генов патогенности классического и типичного Эль Тор биоваров: $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, $rstR^{El}$, rstC; $ctxB^{CL}rstR^{EL}$, rstC; $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, rstC; $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, $rstR^{El}$. Маркерными генами классического биовара являются ключевые гены патогенности классического филаментозного фага (CTX^{CL}_{phi}): $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$.

Принимая во внимание вышеизложенное, предлагается схема классификации *Vibrio cholerae O1* с учётом значения традиционных фенотипических тестов и маркерных генов патогенности классического, типичного и генетически изменённого (гибридного) биоваров холерных вибрионов (таблица 2).

Таблица2.Схема био-генотипирования *Vibrio cholerae O1*

Фенотипические и генотипическиетесты	Биовары *Vibrio cholerae O1*						
	Classical Koch, 1883 г.	El Tor нетокси-генный Gotschich, 1905 г.	El Tor типичный токсиген-ный De Moor, 1962г.	El Tor генетически изменённый Nair, Nusrin, Safa, 2002 – 2005 гг.			
(VP)	–	+	+	+–	+–	+–	+–
(PBS 50 ЕД)	+	–	–	–+	–+	–+	–+
(АЭМС)	–	+	+	+–	+–	+–	+–
(Э II)	–	+	+	+	+	+	+
(С)	+	–	–	–	–	–	–
(Hly)	–	+	–	–	–	–	–
Маркеры токсигенности классического вибриона $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$	+	–	–	–	–	–	–
Маркеры токсигенности типичного вибриона Эль Тор $ctxB^{El}$, $rstR^{El}$, rstC	–	–	+	–	–	–	–
Маркеры токсигенности генетически измененных вибрионов Эль Тор: – $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, $rstR^{El}$, rstC – $ctxB^{Cl}$, $rstR^{El}$, rstC – $ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, rstC –$ctxB^{Cl}$, $rstR^{Cl}$, $rstR^{El}$	– – – – –	– – – – –	– – – – –	+ – – – –	– + – – –	– – + – –	– – – + –
Холерный токсин (СТ-1)	+	–	–	+	+	+	+
Холерный токсин (СТ-2)	–	–	+	–	–	–	–
ГЕНОТИП	I	–	II	III	IV	V	VI

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Методические указания, МУК 4.2.2218–07, Лабораторная диагностика холеры.– Москва, 2007.

2. Faruque S.M., Albert M.J.,Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae.* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62. – P. 1301-1314.

3. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev.– 1995. - Vol. 8. – P. 48-86.

4. Kumar, P., Jain M., Goel A.K. et al. A large cholera autbreak due to a new cholera toxin variant of the Vibrio cholerae O1 eltor biotype in Orissa, Eastern India // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – P. 234-238.

5. Kumar P.,Jain M., Goel A.K. et al. A large cholera autbreak due to a new cholera toxin variant of the Vibrio cholerae O1 eltor biotype in Orissa, Eastern India // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – P. 234-238.

6. Raychoudhuri A.,Pan A., Dutta D. et al. Emergence of tetracycline-reSistant *Vibrio cholerae* O1 serotype Inaba, in Kolkata, India // I. Infect. Dis. - 2008.–Vol. 61, No 2.– P. 128-129.

7. Raychoudhuri A., PatraT., Ramamurthy T. et al., Classical ctxB in Vibrio cholerae O1, Kalkata, India // Emerg. Infect. Dis. – 2009. – Vol. 15, N 1.– P. 131-132.

8. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // Trends Microbiol. - 2010. – Vol. 18. – P. 46-54.

9. Савельева И.В., Хацуков К.Х., Савельева Е.И. и др. Совершенствование лабораторной диагностики холеры, обусловленной генетически измененными (гибридными) вариантами холерного вибриона биовара Эль Тор // ЖМЭИ. –2015. – № 1.– С. 46-51.

10. Na-Ubol M., Srimanote P., Chong sanguan M. et al. Hybrid El Tor variant biotypes of *Vibrio cholera* O1 in Thailand // Indian. J. Med. Res. – 2011 April. – Vol. 133(4). – P.387-394.

INDEL-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, О.А. Рыковская, С.О. Водопьянов, Е.Н. Голенищева, И.П. Олейников

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

Фундаментальные исследования в области генетики микроорганизмов в последнее десятилетие позволили расширить наши возможности идентификации микроорганизмов и изучения генетического разнообразия популяций. Применение молекулярных методов внутривидового типирования бактерий позволяет проводить анализ и прогнозировать распространение клонов с повышенной вирулентностью,

устойчивостью к внешним факторам и антибактериальным препаратам. Одним из новых молекулярных методов является INDEL-типирование, в основе которого лежит поиск спонтанных вставок/делеций (insertion/deletion) нескольких нуклеотидов, отличающихся по длине у различных особей. INDEL-метод с успехом применяется для генотипирования как микроорганизмов [1], так и человека [2]. Водопьяновым А.С. с соавт. разработана система INDEL-типирования *Vibrio cholerae*, включающая в себя четыре гена и систему специфических праймеров [3]. Сведений об использовании приёма INDEL-типирования для парагемолитических вибрионов мы в литературе не встретили.

Целью настоящего исследования являлись разработка и изучение коллекции штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, выделенных на территории Российской Федерации, с помощью метода INDEL-типирования.

В работе использовали 101 штамм *V. parahaemolyticus*, выделенный из объектов окружающей среды и клинических образцов на территории России с 1972 по 2015 г. Штаммы были представлены четырьмя вариантами: tdh+trh+, tdh+trh-, tdh-trh+, tdh-trh-. ПЦР со сконструированными праймерами к шести INDEL-локусам вибрионов (табл. 1) проводили по уже описанной ранее методике [4]. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с помощью программы GeneExpert (ФКУЗ Ростовский-на-Донупротивочумный институт Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Россия).

Проведённый INDEL-анализ 101 штамма *V. parahaemolyticus* позволил выявить 25 уникальных генотипов, которые на основании кластерного анализа распределились между 5 кластерами, обозначенными буквами латинского алфавита с «A» по «F» (рис. 1). В целом для штаммов была характерна низкая клональность – большинство генотипов было представлено одним или двумя изолятами, из 25 генотипов лишь 11 включали от 3 до 13 штаммов.

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

N	INDEL-локус	Праймер		Размер ампликона, п.о.
		Прямой	Обратный	
1	Vp967	ACAAAAGAGCGAGCACTGAAAC	GATCCAAGATGAGCTGGAAAAC	112/94
2	Vp08	TGAAAAACTGGGTTAAGGTTGC	AGACATGCCCACCTTGACTTC	104/89
3	Vp619	ACCTGTGACTGAACCAGAACC	CCCACTGAATGAAGCTACCTGT	114/92
4	Vp2256	AAAAAGCGGCAGATAATGCAC	CCTTATCAATGGCTTCTTGTCC	111/99
5	VpA472	CGTGAACTGGCAAGACTGGA	CCAATGCGATTTGGTAAGTGTC	95/77
6	Vp506	AAGCACCACAGTCATCCTGTAA	GCGGTCTGTAGTCGTGTGAA	85/79

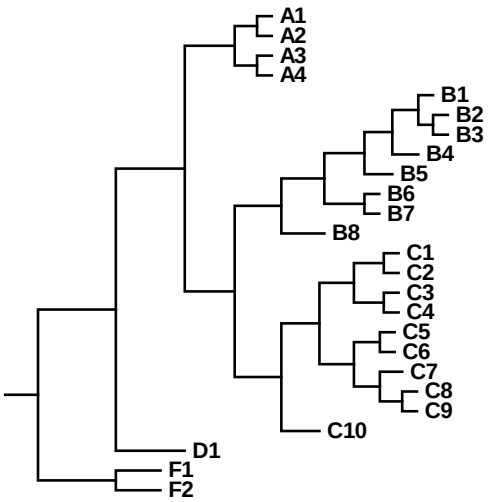


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная на основании кластерного распределения и INDEL-аллелей у штаммов *V. parahaemolyticus,* выделенных на территории Российской Федерации.

При анализе мест выделения штаммов для большинства генотипов не выявлено четкой географической привязанности, что возможно объясняется широким распространением штаммов парагемолитических вибрионов по транспортным схемам рыбной продукции, с балластными водами судов.

Патогенность возбудителя *V. parahaemolyticus* связывают с продукцией токсинов-гемолизинов: термостабильного прямого гемолизина (TDH – Thermostable Direct Hemolysin) и TDH-родственного гемолизина (TRH – TDH-related hemolysin), кодируемых соответственно генами *tdh* и *trh*. Штаммы, содержащие ген *tdh,* входили в кластеры B, C и D, большинство из них относились к генотипам C9 и D1. *trh+* штаммы относились к кластерам A, B, C. Отдельный кластер F составили штаммы не несущие генов основных факторов патогенности, кроме того авирулентные парагемолитические вибрионы относились к A, B и C кластерам, преимущественно к генотипам A3 и A4.

Начиная с 1996 года и по настоящее время было выявлено, что доминирующее значение в этиологии пищевых токсикоинфекций играют штаммы *V. parahaemolyticus* серогруппы O3:K6, получившие в зарубежной литературе название «пандемичных». «Пандемичные» штаммы *V. parahaemolyticus*, взятые в наше исследование относились к геновариант D1, только один штамм – к варианту C6. Полученные нами данные подтверждают имеющееся в зарубежной литературе мнение о клональном происхождении «пандемичных» штаммов.

На основании исследования методом INDEL-типирования можно заключить, что штаммы парагемолитических вибрионов, выделенные из объектов окружающей среды и клинических проб на территории Российской Федерации с 1972 по 2015 г., могут быть типированы в

зависимости от наличия генов основных факторов патогенности и принадлежности к «пандемичному» клону.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Oka K., Asari M., Omura T., Yoshida M. et al. Genotyping of 38 insertion/deletion polymorphisms for human identification using universal fluorescent PCR //Mol. Cell Probes. - 2014. - Vol. 28(1). - P. 13-18.

2. Larsson P., Svensson K., Karlsson L., Guala D. et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of Francisella tularensis // Emerg. Infect. Dis. – 2007. - Vol. 13 (11). - P. 1725-1732.

3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., ЕжоваМ.И. INDEL- и VNTR-типирование штаммов Vibrio cholerae, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации // Здоровье населения и среда обитания. - 2015. - № 5 (266). - С. 41-44.

4. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М. Мультилокусное VNTR-типирование культур холерных вибрионов, выделенныхв г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 года // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2003. - № 6. - С. 11-15.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ И КЛОНИРОВАНИЕ ГЕНА ПРЕДПОЛАГАЕМОЙ ЛИПАЗЫ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

Е.В. Монахова, Г.В. Демидова, О.А. Подойницына, Н.Б. Непомнящая, Р.В. Писанов

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

Как известно, патогенность возбудителей пищевых токсикоинфекций *Vibrio parahaemolyticus* в основном связана с продукцией прямого термостабильного (TDH), родственного ему гемолизина (TRH) и компонентов системы секреции третьего типа T3SS2, и большинство клинических штаммов, выделенных в России и бывших республиках СССР, содержали их генетические детерминанты. Вместе с тем, на территориях Украины и Туркменистана было зарегистрировано довольно большое число случаев заболеваний, вызванных штаммами, лишёнными генов *tdh, trh* и кластеров T3SS2, что указывает на реализацию ими стратегии вирулентности за счёт продукции дополнительных

факторов патогенности [5]. Ранее нами было высказано предположение о том, что одним из таких факторов может служить белок NP_800369, обозначенный в базах NCBIGenBank как предполагаемая липаза (lipaseputative) [4]. Это предположение основано на высоком уровне сходства (66,9 % и 53,6 % идентичности) данного белка с цитотоническим фактором Cef (CHOcellelongatingfactor) *V. cholerae* (AAV40602), принадлежность которого к факторам патогенности/персистенции доказана [1, 2]. Кроме того, в базах данных была найден ещё один более короткий белок *V. parahaemolyticus* (ZP_01993895) длиной 266 аа, обозначенный в аннотации как CHOcellelongatingfactor, хотя никаких данных о его ферментативной и биологической активности не представлено ни в аннотации, ни в публикациях. Его аминокислотная последовательность, кроме первых 42 аа, полностью идентична С-концевой последовательности (355-578) NP_800369 (длиной 802 аа).

Проведённый в рамках настоящей работы более подробный сравнительный биоинформационный анализ выявил в составе NP_800369 *V. parahaemolyticus* такие же домены, как уAAV40602 *V. cholerae*: субстрат-связывающий (100 % сходства), домен Куница (61,1 %) и лейциновая «молния» (95,5 %), локализованные в одинаковом порядке (рис.1). В связи с этим представляют интерес дальнейшие исследования свойств этой липазы как возможного фактора вирулентности/персистенции парагемолитических вибрионов и выявление её возможной роли в патогенезе заболеваний, обусловленных *tdh*$^-$*trh*$^-$T3SS2$^-$ штаммами. Поэтому мы осуществили клонирование её гена (VPA0859 в малой хромосоме типового штамма RIMD2210633), который мы обозначили как *cefVp*, в составе плазмидного вектора pBAD18.

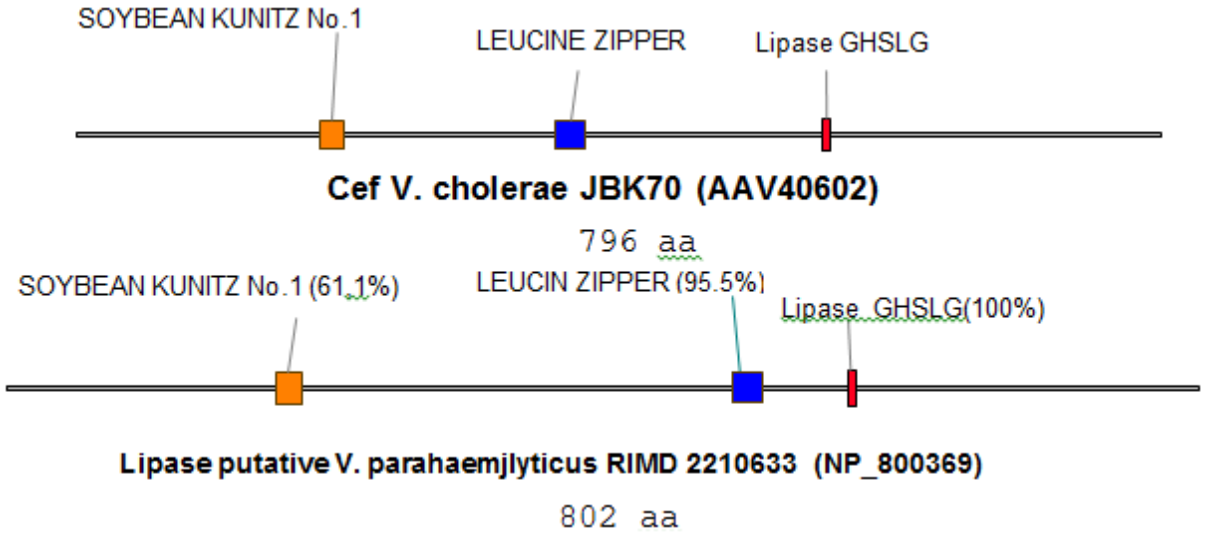


Рисунок 1. Схема локализации доменовв белках Cef *V. cholerae* и предполагаемой липазы *V. parahaemolyticus.*

Плазмида pBAD18 была выбрана в целях облегчения последующего

изучения экспрессии *cefVp* и свойств его продукта в сравнении с таковыми *cef V. cholerae*, клонированного нами ранее в составе этого вектора [2, 3]. Донором ДНК для амплификации служил штамм *V. parahaemolyticus* 13580. ПЦР-амплификат *cefVp* длиной 2420 п.н., полученный с использованием специально сконструированных праймеров, был встроен в полилинкер указанной плазмиды по сайтам EcoRI-SmaI. Поскольку последняя образует тупые концы, в обратный праймер не был внесен сайт рестрикции, и в полученной рекомбинантной плазмиде pCefVp сайт SmaI утрачен. Для подтверждения наличия вставки мы использовали эндонуклеазу BamHI (рис.2), поскольку pBAD18 содержит 2 ее сайта – один перед P_{BAD}промотором, второй – в полилинкере «ниже» сайта SmaI.

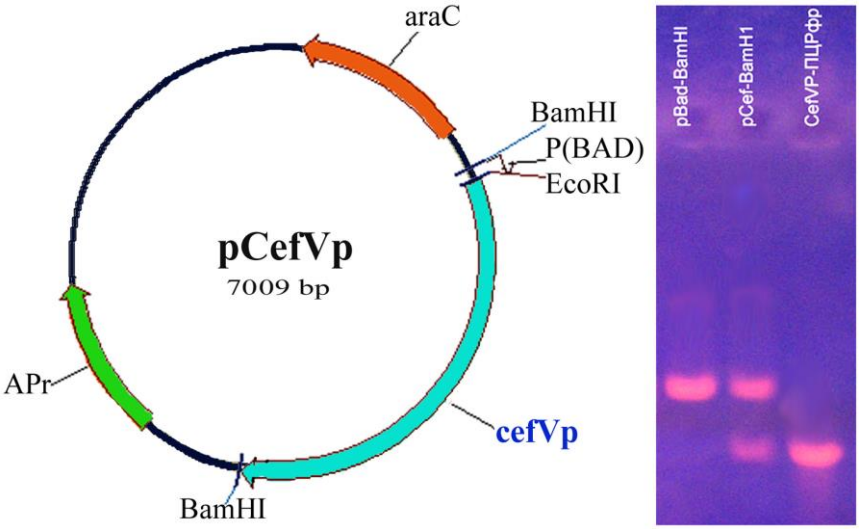


Рисунок 2. Рекомбинантная плазмида pCefVp (слева) и электрофорез ее BamHI-рестрикта (справа) в агарозном геле.

Полученную плазмиду трансформировали в штаммы *E.coli* HB101, BL-2, BW, Jm101, Jm103, JM109, Stratagen. Для определения экспрессии гена в этих штаммах их выращивали в бульоне LB, содержащем 50 мкг/мл ампициллина, с шуттелированием в течение 4 ч, затем добавляли индуктор L-арабинозу до конечной концентрации 0,2 % и продолжали шуттелирование в течение еще 1,5 ч, после чего вносили культуры в лунки агара, содержащего 0,5 % твинов 20, 40, 60, 80 и трибутирина как описано для продуцентов Cef *V. cholerae* [1-3]. На следующие сутки вокруг лунок наблюдалось помутнение сред с твинами и просветление среды с трибутирином, отсутствующие в контролях (штаммы, содержащие векторную плазмиду без вставки), что свидетельствовало об экспрессии клонированного гена в разных штаммах кишечной палочки. При этом субстратная специфичность CefVp не отличалась от таковой Cef *V. cholerae*.

Таким образом, нами сконструирована рекомбинантная плазмида, экспрессирующая ген предполагаемой липазы парагемолитических вибрионов в штаммах *E. coli*. В дальнейшем предполагается отбор

наиболее активных продуцентов искомого белка и их использование для получения препаратов в целях определения его биологической активности *invitro* и *invivo* и выяснения возможной роли в вирулентности негемолитичных штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *V.cholerae*: Автореф. дис. … докт. биол. наук. – Ростов н/Д, 2012. – 46 с.

2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Миронова А.В., Веркина Л.М., Михась Н.К., Асеева Л.Е., Каграманов В.С. Клонирование гена цитотонического фактора Cef (CHO-cellelongatingfactor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P_{BAD}-промотора // Биотехнология – 2005. – № 6. – Р. 12-18.

3. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Писанов Р.В., Алексеева Л.П., Маркина О.В., Веркина Л.М., Миронова А.В. Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированный ген *cef* (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* (варианты) и штамм *Escherichia coli* – продуцент Cef (CHO cell elongating factor) *Vibrio cholerae* (варианты) // Патент № 2313577 от 27.12.07.

4. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Мазрухо А.Б., Маркина О.В., Алексеева Л.П. Свойства Cef (CHO cell elongating factor) холерных вибрионов: биоинформационный анализ и экспериментальные данные // Мол. генет., микробиол. и вирусол. – 2012. – № 2. – С. 10–14.

5. Подойницына О.А. Генотипическая характеристика штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств: Автореф. дис. … канд. биол. наук. – Ростов н/Д, 2013. – 22 с.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIOALGINOLYTICUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ И СОПРЕДЕЛЬНЫХ СТРАН

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Е.Н. Голенищева

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

Микроорганизмы вида *Vibrio alginolyticus* являются грамнегативными, галофильными бактериями, естественными

обитателями прибрежных зон и эстуариев [1]. Эти вибрионы обнаруживают в воде, донных отложениях, зоопланктоне, моллюсках и рыбе. Бактерии вида являются человеческими патогенами, вызывая раневые инфекции, отиты и гастроэнтериты [2]. Вспышки гастроэнтерита, вызванные этими вибрионами, как правило, связаны с употреблением в пищу крабов, креветок, устриц и омаров. Однако внекишечная форма носит более распространенный характер, чем кишечная. Кроме того, *V. alginolyticus* вызывают болезни морских рыб и беспозвоночных. Ареал распространения *V. alginolyticus* достаточно широкий. Они обнаруживаются у берегов Северной и Центральной Америки, в ряде стран Азии и Европы, Австралии, Африки, на побережье Каспийского, Балтийского, Японского, Белого, Черного и Азовского морей [3]. Для выяснения особенностей циркуляции штаммов с разными свойствами представляется важным и интересным провести тестирование представителей вида *V. alginolyticus,* выделенных в разные временные промежутки, из разных источников и мест, на наличие генов патогенности и видоспецифичности.

Целью настоящей работы явилось изучение распространения штаммов вида *V. alginolyticus* с разными генотипами, выделенными на территории Российской Федерации и сопредельных стран с 1972 по 2012 год, и создание на основании полученных результатов геоинформационной системы (ГИС).

В работу из коллекции Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора было взято 125 штаммов *V. alginolyticus,* выделенных из морской воды, от гидробионтов и людей в регионах Черного, Азовского, Каспийского, Японского морей в период с 1972 по 2012 год. У всех исследуемых штаммов была проведена ПЦР-детекция генов, ассоциированных с вирулентностью *tdh, trh, pmp, paracef, ure (уреаза), T3SS2α и T3SS2β* и с видовой принадлежностью *tlh, gyrB, toxR, flaVp, vapC и vppC*. В работе были использованы праймеры, предложенные и сконструированные зарубежными авторами [4-10].

Проведённый биоинформационный анализ результатов ПЦР-тестирования 125 штаммов *V. alginolyticus* с помощью авторского программного обеспечения [11] позволил выявить 15 генотипов, которые распределились между 6 кластерами, обозначенными буквами латинского алфавита от A до F (таблица 1, рисунок 1). При этом кластер F представлен всего одним клиническим штаммом *V. alginolyticus* 16600, выделенным в 1975 году в Новороссийске и единственным содержащим гены *trh, ure, T3SS2b*. Внутри остальных кластеров штаммы отличались друг от друга наличием/отсутствием нескольких генов.

Таблица 1.Генотипы коллекционных штаммов *V. alginolyticus*

Геноти-тип	Tlh	gyrB	flaVp	toxRS	vppC	vapC	tdh	trh	ure	T3SS2a	T3SS2b	pmp	para cef
A1	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A2	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
A3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B1	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
C1	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
C2	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+
D1	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D2	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D3	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
D4	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E1	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-
E2	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
E3	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
F1	+	+	-	+	-	+	-	+	+	-	+	+	+

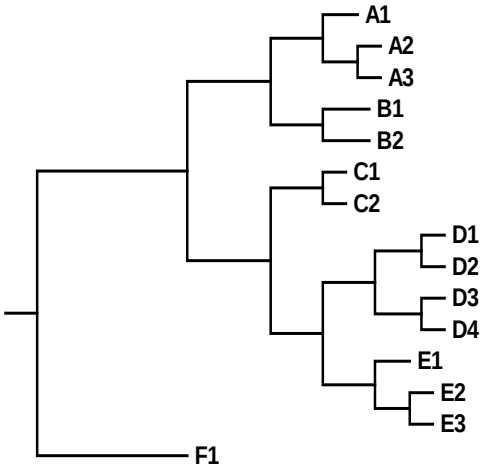


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная на основании кластерного анализа распределения генов *V. alginolyticus*, выделенных с 1972 по 2012 год.

Клинические штаммы характеризовались большим разнообразием генотипов и вошли в состав всех кластеров, кроме B. A штаммы, выделенные из окружающей среды, были отмечены во всех кластерах, кроме F. Причем культуры, выделенные из морской воды, в большинстве случаев имели схожие генотипы, что, вероятно, обусловлено циркуляцией алгинолитических вибрионов только в данной экологической нише. При анализе связи генотипа с годом выделения исследуемых штаммов закономерность не выявлена. Если проводить связь генотипа штаммов с местом выделения, то можно выявить некоторые закономерности. Так в Алуште был отмечен только генотип E3, даже по истечении 6 лет. В

Туркмении были выявлены только штаммы кластера D.

Штаммы, составляющие доминирующий кластер E, выделялись на обширной территории повсеместно и в разные годы от Владивостока до Ялты. Также отсутствовала связь генотипа с местом выделения при анализе штаммов кластера C. Штаммы генотипов B1 были изолированы только в Керчи в 1990 году и B2 в Новороссийске в 1973 году. И один штамм генотипа F1 был выделен в 1975 году в Новороссийске.

При анализе мест выделения штаммов в период с 1982 по 1989 год отмечено, что в этот период были изолированы только штаммы *V. alginolyticus* генотипов A, D и E, для которых выявлена чёткая географическая привязанность (рисунок 2). Так, штаммы, составляющие кластер E, выделялись исключительно на побережье Чёрного моря в Алуште, Ялте и Новороссийске. Штаммы генотипа D были выделены в Туркмении. А штаммы кластера A- только в Кольском заливе.

Рисунок 2. ГИС «*Vibrio alginolyticus*» - генотипы штаммов, выделенных в период с 1982 по 1989 год.

В результате данных исследований были определены генотипы коллекционных штаммов *V. alginolyticus*, выделенных на территории РФ и сопредельных стран в разные годы. Биоинформационный анализ результатов ПЦР-тестирования исследуемых штаммов *V. alginolyticus* позволил выявить некоторые закономерности при связи генотипа с местом выделения и показал отсутствие связи с годом выделения. Таким образом, была подтверждена генетическая неоднородность штаммов *V. alginolyticus*. Генотипическая характеристика штаммов легла в основу ГИС «*Vibrio alginolyticus*».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joseph S. W., Colwell R. R., Kaper J.B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios // Crit. Rev. Microbiol. – 1982. – Vol. 10, № 1. – P. 77 - 124.

2. Reilly G., Reilly C., Smith E. Vibrio alginolyticus-associated wound infection acquired in British waters // Euro Surveill. – 2011. – 16(42).

3. Mustapha S., Mustapha E. M., Nozha C. *Vibrio alginolyticus*: An Emerging Pathogen of Foodborne Diseases // International Journal of Science and Technology. – 2013. – Vol. 2, № 4. –P. 302 - 309.

4. Boyd E. F., Cohen A. L., Naughton L. M. *et al*. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 8. – P. 110.

5. Hayashi S., Okura M., Osawa R. Soft-agar-coated filter method for earley detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH) – or TDH-related haemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in seafood // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 7. – P. 4576-4582.

6. Okada N., Iida T., Park K. S. *et al.*Identification and characterization of a novel type III secretion system in *trh*-positive *Vibrio parahaemolyticus* strain TH3996 reveal genetic lineage and diversity of pathogenic machinery beyond the species level // Infect. Immun. – 2009. – Vol. 77, № 2. – P. 904 - 913.

7. Croci L., Suffredini E., Cozzi L. *et al.* Evaluation of different polymerase chain reaction methods for the identification of *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated by cultural methods // AOAC Int. – 2007. – Vol. 90. - P. 1588 - 1597.

8. Di Pinto A., Ciccarese G., Tantillo G. A collagenase-targeted bultiplex PCR assay for identification of *Vibrio alginolyticus,Vibrio cholerae,* and *Vibrio parahaemolyticus* // J. of Food Protection. – 2005. – Vol. 68, № 1. – P. 150 - 153.

9. Kim Y., Okuda J., Matsumoto C. *et al.*Identification of strains at the species level by PCR targeted to the *toxR*gene // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, 34. – P.1173-1177.

10. Venkateswaran K., Dohmoto N., Harajama S. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB*gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp // Appl. Environ. Microbiol. – 1998. – Vol. 64, № 2. – P. 681 - 687.

11. Рыковская О.А., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Смоликова Л.М., Монахова Е.В. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621362. Фено- и генотипическая характеристика штаммов *V. alginolyticus*. – 2014.

ИММУНОЛОГИЯ

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ ПРЕПАРАТОВ

И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, И.А. Беспалова, А.В. Филиппенко

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

Вакцинация населения с целью защиты от различных патогенов и предотвращения развития иммунопатологических процессов является актуальной проблемой современной медицины. Вакцины способны вызывать как активацию, так и супрессию отдельных иммунных функций, а вакцинация лиц с нарушениями иммунного статуса может усугубить эти нарушения и быть неэффективной [1]. Вакцинация в отдельных случаях способна подавлять неспецифическую антиинфекционную резистентность, вследствие чего могут происходить обострения латентно протекающих процессов и хронических инфекций [2]. Поэтому ведется активный поиск препаратов (адьювантов, иммуномодуляторов), способных, во-первых, усилить иммунизирующее действие современныхвакцин, особенно у лиц с вторичными иммунодефицитами, а во-вторых, направить развитие иммунного ответа по гуморальному или клеточному типу в зависимости от свойств патогена [1, 3].

Для развития полноценного иммунного ответа на вакцины и уменьшения их отрицательного влияния на организм человека с успехом применяются препараты цитокинов и различных иммуномодуляторов.

Современные иммуномодуляторы бестим и беталейкин повышают иммунологическую безопасность вакцины «Энджерикс В» против вирусного гепатита В, увеличивая эффективность вакцинации у пациентов с вторичными иммунодефицитами и хроническим инфекционным синдромом [4]. Экспериментальные исследования показали, что сочетанное использование при иммунизации культуральной антирабической вакцины (концентрированной, очищенной методом ультрафильтрации) и рекомбинантных цитокинов человека IL-1β и TNFα в виде монопрепаратов, а также комплекса цитокинов (IL-1β, IL-2, TNFα) повышает её протективное действие [5]. В экспериментах на мышах установлено стимулирующее действие ряда цитокинов на иммуногенную активность вакцины против клещевого энцефалита (ВКЭ). Наиболее выраженное действие оказывали используемые в виде монопрепаратов рекомбинантные IL-1β и TNFα, комплекс рекомбинантных цитокинов (IL-

1β, IL-2, TNFα), гибридный белок неотим (Tα-TNF-Tα), а также иммуномодулятор имунофан, которые усиливали иммуногенность вакцины в 1,3-1,5 раза. Исследуемые препараты цитокинов повышали также и протективный эффект ВКЭ, оцениваемый по уровню резистентности мышей линии Balb/c к заражению вирулентным штаммом "Абсеттаров" вируса клещевого энцефалита по сравнению с животными, иммунизированными одной вакциной [6]. Доказана эффективность сочетанного действия иммуномодуляторов ридостина, полирибоната, глюкозо-мурамилпептида и пептидогликана-160 со специфическими вакцинами при экспериментальных арбовирусных инфекциях (восточный энцефаломиелит лошадей и клещевой энцефалит). Применение ридостина при специфической вакцинации рекомендовано для клинических испытаний при клещевом энцефалите в очагах инфекции [7]. Показано, что включение виферона в комплекс противогриппозной вакцинации способствует раннему формированию специфического иммунитета и снижает частоту и тяжесть заболевания в эпидемический сезон [8].

При оценке влияния препарата тимогена на эффективность и безопасность вакцинации детей против кори и паротита был сделан вывод о том, что назначение иммуномодулятора способствует более интенсивному синтезу специфических антител в ранние сроки. Кроме того, у этой группы детей не было выявлено патологических реакций на прививку [9]. Имеются положительные результаты использования иммуномодуляторов имунофана [10], миелопида и полиоксидония [11] при вакцинации против дифтерии длительно и часто болеющих детей. И в том, и в другом случае отмечено увеличение антителообразования и повышение эффективности вакцинации. При сочетанном применении миелопида и полиоксидония наблюдалась активация клеточного звена иммунитета. Аналогичные данные были получены на фоне применения этих иммуномодуляторов при ревакцинации часто болеющих детей против гепатита В, кори, краснухи, паротита [11].

Из данных литературы известно о положительных результатах применения иммуномодуляторов для совершенствования специфической и экстренной профилактики ООИ. Так, доказана целесообразность введения левамизола, Т-активина [12], ликопида и сальмозана [13, 14] в схему экстренной и специфической профилактики сибиреязвенной инфекции. Показано повышение эффективности антибактериальной терапии при острой инфекции *Burkholderia pseudomallei* с помощью применения иммуномодулятора ликопида [15] и ИФ-γ [16, 17], а также иммуногенности и протективности антигенов возбудителя мелиоидоза рекомбинантными цитокинами [18] и иммуномодулятором бестимом [19]. Зарубежные исследователи эффективно использовали ИЛ-12 для совершенствования как специфической [20], так и экстренной профилактики легочной туляремии [21]. Экспериментально показана целесообразность снижения

иммунизирующей дозы чумной вакцины и, следовательно, её побочного влияния на организм за счёт сочетанного применения с иммуномодуляторами типа бемитила [22]. При экспериментальной легочной чуме у иммунизированных мышей оказалось перспективным применение в качестве адъюванта ИЛ-12 [23]. Показана адъювантная способность препарата беталейкина (рекомбинантного ИЛ-1β) и полиоксидония в отношении иммуногенной и протективной активности живой противочумной вакцины в опытах на взрослых кроликах и морских свинках [24, 25].

О возможности использования иммуномодуляторов при профилактике экспериментальной холеры свидетельствуют результаты, полученные при создании экспериментальных вакцин на основе коньюгатов деацилированных липополисахаридов сероваров Инаба или Огава [26], В-субъединицы холерного токсина [27] и N-окиси этиленпиперазина и N-ацилгидразида этиленпиперазиний бромида (полиоксидония) с 2,4,6-трихлор-S-триазином в качестве связующего агента. Однократное введение вакцинирующей смеси вышеуказанных конъюгатов приводило к увеличению протективности и иммунологической эффективности антигенов, принимающих участие в формировании антибактериального и антитоксического противохолерного иммунитета. В лаборатории иммунологии ООИ Ростовского противочумного института выявлено, что применение иммуномодулятора имунофана предотвращает развитие транзиторного поствакцинального апоптотического иммунодефицита и снижает степень выраженности инфекционного процесса при экспериментальной холере, что доказывает перспективность использования препарата для совершенствования профилактики этого заболевания [28, 29].

Таким образом, всё вышеизложенное свидетельствует об эффективности применения иммуномодуляторов для совершенствования специфической профилактики инфекционных заболеваний. Учитывая, что эффективность вакцинации зависит не только от качества и особенностей используемых вакцин, но и от особенностей генотипа индивидуума, необходимо создание вакцин с включением в них стимулирующих компонентов, что позволит повысить их иммуногенность целенаправленным действием на иммунную систему организма [30]. Такой подход может быть использован для повышения эффективности применяемых вакцин, в том числе и противохолерных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Симбирцев А. С., Петров А. В., Пигарева Н. В., Николаев А. Т. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации // Биопрепараты. – 2011.- Т. 41, № 1.- С. 16-20.

2. Медуницын Н.В. История, принципы конструирования

комбинированных вакцин и проблемы вакцинопрофилактики при их применении // Журн. микробиол. - 2001. - № 1. - С. 90-91.

3. Медуницын Н.В., Покровский В.И. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней. Руководство для врачей. Гэотар-Медиа, 2005.

4. Абрамова Н.Н., Симбирцев А.С., Долгушин И.И. Влияние бестима и беталейкина на иммунный статус больных с вторичными иммунодефицитными состояниями при вакцинации против вирусного гепатита В // Цитокины и воспаление. - 2004. - Т. 3, № 4. - С. 29-35.

5. Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Медуницын Н.В. Показатели клеточного иммунного ответапри иммунизации мышей антирабической вакцинойна фоне цитокинов // Цитокины и воспаление. - 2008. - Т. 7, № 4. - С. 15-20.

6. Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А., Никитина Т.Н., Ращепкина М.Н., Медуницын Н.В. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита // Цитокины и воспаление. - 2009. - Т. 8, № 2. - С. 25-29.

7. Баринский И.Ф., Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М. Изучение эффективности использования отечественных иммуномодуляторов, а также их сочетанного действия со специфическими вакцинами при экспериментальных арбовирусных инфекциях // Иммунология. – 2012. - №4. –С. 181-183.

8. Чеботарева Т.А., Каряева С.К., Малиновская В.В., Мазанкова Л.Н., Калоева З.Д. Современные возможности повышения эффективности вакцинации против гриппа у детей высокого риска заболеваемости //Иммунология. – 2011. - № 3. – С. 146-150.

9. Харит С.М., Началова Е.П., Петленко С.В. Применение тимогена для повышения эффективности иммунизации против кори и паротита у детей, проживающих в экологически неблагоприятных регионах // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2005. - № 2. – С. 15-21.

10. Маркова Т.П., Чувиров Д.Г. Клинико-иммунологическое обследование и отбор пациентов с дисфункциями иммунной системы для проведения форсифицированной вакцинации, определения уровня специфических антител // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2003. – № 9. – С. 84-86.

11. Маркова Т.П., Харьянова М.Е. Форсификация поствакцинального иммунитета у длительно и часто болеющих детей // Аллергия, астма и клиническая иммунология. – 2001. - № 1. – С. 21-25.

12. Шляхов Э.Н., Кику В.Ф. Стимуляция поствакцинального процесса на примере иммунизации против сибирской язвы. – Кишинёв: Штиинца, 1984. – 197 с.

13. Коготкова О.И., Буравцева Н.П. Повышение эффективности

неспецифических и специфических средств защиты при сибиреязвенной инфекции с помощью иммуномодуляторов // Матер. науч.- практич. конф., посвящ. 100-летию образования противочумн. службы России. – Саратов, 1997. – Т. 1 – С. 220.

14. Коготкова О.И., Аксёнова Л.Ю., Буравцева Н.П., Ерёменко Е.И. Сочетанное применение в эксперименте сибиреязвенной вакцины СТИ-ПР с ликопидом // Мед.микробиол. – XXI век: Матер. Всерос.науч.-практ. конф., Саратов, 2004. – С. 119-120.

15. Пяткова Н.В. Комплексная терапия экспериментального мелиоидоза у золотистых хомячков препаратами фторхинолонов и иммуномодуляторов // Диагн., лечение и проф. опасных и особоопасных инфекционных заболеваний - Матер. Всеросс. науч. конф. - Киров, 2008.- С. 110-111.

16. Propst K.L., Troyer R.M., Kellihan L.M. et al. Immunotherapy markedly in creases the effectiveness of antimicrobial therapy for treatment of *Burkholderia pseudomallei* infection // Antimicrob Agents Chemother. – 2010, V. 54, № 5. - P. 1785–1792.

17. Lauw F.N., Simpson A.J., Prins J.M. et al. The CXC chemokines gamma interferon (IFN-gamma) –inducible protein10 and monokine induced by IFN-gamma are released during severe melioidosis //I nfect. Immun. - 2000.- V.68.- P. 2034-2042.

18. Демьянова О.Б. Стимуляция иммуногенных и протективных свойств антигенов возбудителя мелиоидоза цитокинами. Автореф.дис. … канд. мед.наук. - 2009. - 18 с.

19. Демьянова О.Б., Жукова С.Б., Авророва И.В. и др. Иммуностимулирующая активность синтетического дипептида бестима при мелиоидозной инфекции // Матер. X съезда ВНПОЭМП.- Москва, 2012. - Т. 2, № 1, 2. - С. 99-100.

20. Duckett N.S, Olmos S, Durrant D.M, Metzger D.W. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain // Infect Immun. - 2005. – V. 73, № 4.– P. 2306-2311.

21. Pammit M.A. Intranasal interleukin-12 treatment promotes antimicrobial clearance and survival in pulmonary *Francisella tularensis* subsp. novicida infection // Antimicrob.AgentsChemother. – 2004. – V. 48, № 12. – P. 4513–4519.

22. АвророваИ.В. Использование актопротекторов в качестве иммуномодуляторов при чуме // Матер. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию образования противочум. службы России, Саратов, 1997. – Т. 1. – С. 170.

23. Kumar D., Kirimanjeswara G., Metzger D.W. Intranasal administration of an inactivated *Yersinia pestis* vaccine with interleukin-12 generates protective immunity against pneumonic plague // Clin. Vaccine

Immunol. – 2011. – V.18, № 11.– P. 1925–1935.

24. Каральник Б.В., Пономарева Т.С. Дерябин П.Н. и др. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины // Журн. микробиол. - 2014. - № 6. - С. 108-112.

25. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В. и др. Влияние беталейкина на показатели антигенспецифического иммунного ответа в модельных опытах иммунизации животных живой противочумной вакциной // Цитокины и воспаление.-2014.-Т. 13, № 1.-С. 57-62.

26. Петров Р.В.; Хаитов Р.М.; Некрасов А.В.; Берестецкая Т.З.; Наумов А.В.; Горькова А.В.; Джапаридзе М.Н.; Щуковская Т.Н. Способ получения вакцины против холеры. Патент РФ №2021816 от 30.10.1994

27. Петров Р.В.; Хаитов Р.М.; Некрасов А.В.; Берестецкая Т.З.; Голубинский Е.П.; Урбанович Л.Я.; Марков Е.Ю.; Медведев С.А. Способ получения вакцины против холеры. Патент РФ №2021817 от 30.10.1994

28. Иванова И.А., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Ломов Ю.М. Современное состояние вопроса и перспективы развития неспецифической профилактики холеры // Здоровье населения и среда обитания (ЗНиСО). - 2012.-№ 4.- С. 15-17.

29. Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Телесманич Н.Р. и др. Изучение роли апоптоза лимфоцитов, индуцированного антигенами *Vibrio cholerae*, в формировании вторичного иммунодефицита и возможности его коррекции // Мед. вестник Юга России. - 2013. - № 1. - С. 24-27.

30. Петров Р.В., Хаитов Р.М. Иммуногены и вакцины нового поколения. М., Гэотар-Медиа, 2011.

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ *VIBRIO CHOLERAE,* ВЫДЕЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

И.А. Беспалова, И.А. Иванова, Н.Д. Омельченко, А.В. Филиппенко

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

Одним из главных компонентов клеточной оболочки грамотрицательных микроорганизмов является липополисахарид (ЛПС), от структуры которого зависит характер колоний на плотных питательных средах – гладкие или шероховатые. Молекула ЛПС состоит из трёх компонентов – липида А, коровой части и О-полисахаридной цепи, которая отсутствует у R-форм бактерий. ЛПС обладает свойствами эндотоксина, но является веществом, свободным от белков. Для терминов

эндотоксин и ЛПС введён еще один синоним – О-антиген, который означает наличие гладкой поверхности колоний у бактерий с полной структурой ЛПС [1]. Липополисахариды играют основную роль в проявлении специфичности бактерий, обусловливают их серологическую изменчивость и являются важными компонентами в обеспечении антибактериального иммунитета. Широкий спектр биологической активности ЛПС (иммуногенность, адъювантность, пирогенность, митогенная активность, способность индуцировать образование цитокинов, взаимодействие с бактериофагами, способность вызывать неспецифическую резистентность, радиопротекторное действие, противоопухолевый эффект и др.) [1] привлекает внимание исследователей к этим биополимерам.

В Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте давно занимаются исследованиями, связанными с получением, очисткой, изучением состава, биологических свойств ЛПС холерных вибрионов и возможностью его последующего использования в составе диагностических препаратов. Наличие широкой гетерогенности ЛПС возбудителя холеры обусловливает существование большого числа серогруппоспецифических вибрионов, что осложняет их диагностику.

В зависимости от целей и задач исследований применялись разные методы выделения ЛПС.

В 1971 г. Лобанов В.В. с соавт. сообщили о получении из холерных и нехолерных вибрионов эндотоксина по методу Буавена (1935), липополисахарида водно-фенольным методом Вестфаля (1965) [2] и фенольного экстракта по Лавровской (1964) [3]. Все полученные препараты практически не отличались по содержанию углеводов, но различались количеством белка: в образцах, выделенных по Вестфалю, его было 2-5 %, тогда как в Буавеновских антигенах определялось до 20 % белков. Дозы, характеризующие LD_{50}, так же, как и выход препаратов, широко варьировали. В группе холерных вибрионов эти колебания для ЛПС были в пределах 0,3-1,3 мг и 1,0-4,3 %, а для антигенов, выделенных по Буавену – 0,7-1,2 и 0,5-1,8 соответственно. Авторы делают вывод об отсутствии преимуществ в отношении токсичности у какого-либо метода выделения препаратов и отмечают сходные свойства по большинству изученных признаков у эндотоксинов холерных и нехолерных вибрионов.

В 1972 г. Яговкин Э.А. с соавт. доложил об иммунохимической гетерогенности очищенного S-ЛПС холерного вибриона Эль-Тор, выделенного им по собственной модификации метода Вестфаля [4]. Препарат проявлял протективные свойства, стимулировал образование вибриоцидных антител при небольшой токсичности и средней степени пирогенной активности. При одновременном внутрикишечном введении животным ЛПС усиливал холерогенное действие экзотоксина холерного вибриона [4].

В последующих экспериментах было определено, что очищенные препараты ЛПС при однократном введении вызывают образование вибриоцидных, но не агглютинирующих антител [5]. Следовательно, для усиления антигенности липополисахарида необходимо присутствие в нем белкового компонента – модель эндотоксина. Было осуществлено выделение белково-липополисахаридного комплекса по методу Месробеану (1933 г.) экстракцией клеток ТХУ. Полученный препарат содержал до 20 % белков и, как и ожидалось, проявлял повышенные антигенные свойства [5].

В дальнейшем автор предпринял попытку разделить полученный иммунологически гетерогенный препарат ЛПС на составляющие компоненты с помощью различных способов фракционирования: дифференциального препаративного ультрацентрифугирования и ионообменной (на целлюлозе CellexD) и гель-хроматографии (на агарозе Bio-GellA5m) [6].

В 1989 г. Лобанов В.В. и Сухарь В.В. [7] предложили получать холерный антиген липополисахаридной природы из экстрацеллюлярных продуктов бульонной культуры. При этом можно использовать различные питательные бульоны, в том числе среду КПС (казеиново-подсолнечнико-сахарозную), разработанную в Ростовском противочумном институте. В отличие от традиционного получения ЛПС из бактериальной массы, выделение его из культуральной жидкости позволило авторам увеличить выход препарата более чем в 2 раза. Кроме того, предложенная схема исключала необходимость длительного ультрацентрифугирования очищаемого препарата.

Группа исследователей под руководством Алексеевой Л.П. создала панель моноклональных антител (МКАТ), строго специфичных в отношении ЛПС, выделенного по методу Вестфаля, с эпитопной направленностью к его О-полисахаридной цепи. Полученный набор МКАТ выявлял поверхностные полисахариды холерных вибрионов О139 серогруппы, что позволило проводить дифференциацию холерных вибрионов, выделенных из клинического материала и из воды поверхностных водоемов на территории России [8, 9, 10].

Существующая клиническая опасность холерных вибрионов не О1/не О139 серогрупп, вызывающих спорадические и групповые диарейные заболевания, требовала повышения эффективности серологического типирования этих микроорганизмов. Для решения этой задачи Авдеевой Е.П. на основе О-антигенов был создан соответствующий набор сывороток диагностических моноспецифических кроличьих сухих для слайд-агглютинации [11, 12], расширяющий возможности мониторинга холерных вибрионов. Был усовершенствован технологический процесс получения иммунных сывороток и адсорбции их от перекрестно реагирующих антител.

В настоящее время в Ростовском противочумном институте продолжаются работы по выделению ЛПС холерных вибрионов с целью создания на их основе диагностических препаратов. При конструировании антигенного холерного полимерного диагностикумав качестве сенситина был использованЛПС, выделенный из клеточных оболочек холерного вибриона О1 серогруппы авторским методом с использованием протеолитических ферментов и осаждением этанолом. Диагностикум выявляет противохолерные антитела к О1 серогруппе и не даёт реакции с сыворотками к холерному вибриону О139 серогруппы и к другим возбудителям кишечных инфекций [13].

Таким образом, на иммунохимические и биологические свойства ЛПС влияют не только методы экстракции и очистки препаратов, но и выбор исходного сырья (бактериальная масса, клеточные стенки и т.д.), используемого для извлечения антигенов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Книрель Ю.А., Кочетков Н.К. Строение липополисахаридов грам-отрицательных бактерий // Биохимия. – 1993. – Т. 58, №2. - С. 166-201.
2. Westphal O., Jann K. Bacterial lipopolysaccharide extraction with phenol/water and further applications of the procedure // Methods Carbohydr. Chem. NewYork, Acad. Press, 1965, 5: 83-87.
3. Лобанов В.В., Илюхин В.И., Филиппова Л.И. Биологические и иммунохимические свойства эндотоксинов холерных и нехолерных вибрионов // Пробл. особо опасных инф. – 1971. -Вып. 6(22). – С. 19-23.
4. Яговкин Э.А., Домарадский И.В., Киселева В.И., Лобанов В.В. Получение и некоторые биологические свойства липополисахарида холерного вибриона // ЖМЭИ. – 1972.- № 10. – С. 47-52.
5. Яговкин Э.А., Домарадский И.В., Гриценко А.Н., Фомичева А.С. Антигенные и протективные свойства липополисахаридов холерного вибриона Эль-Тор // Спец. профилактика холеры: Тез.докл. Всесоюз. симпоз. – Саратов, 1975.- С. 84-86.
6. Яговкин Э.А. Иммунохимическая гетерогенность липополисахаридов V. cholera ElTor и методы их фракционирования // ЖМЭИ. – 1981. - № 5. – С. 93-96.
7. Лобанов В.В., Сухарь В.В. Схема получения липополисахарида холерных вибрионов из безмикробного центрифугата бульонной культуры // Пробл.-тематич. комиссия по проблеме «Холера». Ростов-на-Дону, 1989. – С. 35-37.
8. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Чемисова О.С., Смирнова О.В., Мазрухо Б.Л., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к ЛПС V. cholerae О139 и их характеристика // Холера и патоген. для человека вибрионы: Информ. пробл. комиссии (46.04). – Ростов-на-Дону, 2000. – №

13. - С. 71-72.

9. Сальникова О.И., Алексеева Л.П., Мазрухо Б.Л., Лобанов В.В., Чемисова О.С.,Смирнова О.В. Использование МКАТ для анализа поверхностных полисахаридов вибрионов О139 серовара различного происхождения // Холера и патоген. для человека вибрионы: Информ. пробл. комиссии (46.04). – Ростов-на-Дону, 2000. – № 13. - С. 72-73.

10. Алексеева Л.П., Сальникова О.И., Мазрухо Б.Л., Маркина О.В., Чемисова О.С., Лобанов В.В. Моноклональные антитела к липополисахариду Vibrio cholerae O139 // Биотехнология. – 2002.-№ 2. – С. 79-84.

11. Авдеева Е.П. Совершенствование способов получения и применения агглютинирующих диагностических сывороток против холерных вибрионов не О1/не О139 серогрупп // Холера и патоген. для человека вибрионы: Сб. матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2005. – № 18. - С. 122-127.

12. Авдеева Е.П. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов не О1/не О139 серогрупп. Автореф. дис. …канд. мед.наук. - Ростов-на-Дону, 2006. – 22 с.

13. Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Наркевич А.Н., Кочеткова А.П., Люкшина Е.Ю. Конструирование полимерного антигенного ЛПС-01 холерного диагностикума для выявления специфических антител // Общие угрозы – совместные действия. Ответ государств БРИКС на вызовы опасных инфекц. бол-ней: Мат. Междунар. конф. – М., 2015.- С. 226-228.

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ СУХОГО ГИДРОЛИЗАТА КАЗЕИНА В ПРОИЗВОДСТВЕ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

О.В. Громова, Ю.А. Алешина, Л.Ф. Ливанова, О.С. Дуракова, А.Ю. Ульянов, Н.И. Белякова, К.И. Холматов, О.А. Волох, М.В. Антонычева

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

В связи с эпидемической ситуацией по холере в России и в мире необходима специфическая профилактика этого заболевания. В 2001 году в России вакцинация против холеры была включена в календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям (Приказ Минздрава России от 27.07.2001, №229), поэтому разработка и

усовершенствование современных безопасных химических вакцин против холеры является важным и перспективным направлением научных исследований [1]. Процесс культивирования лежит в основе каждого микробиологического производства, определяя его эффективность, количество и качество продуктов микробного синтеза. В настоящее время в конструировании полноценных питательных сред для выращивания микроорганизмов мясные основы уступают место казеиновым. Это сырьё для изготовления питательных компонентов является более доступным, стандартным и дешевым. В технологии производства холерной химической таблетированной вакцины института «Микроб» используется метод глубинного культивирования производственных штаммов на бульоне из казеина с 1 % пептона [2]. Данная среда производится в отделе питательных сред, характеризуется некоторой нестандартностью от серии к серии и требует больших материальных затрат. В этой связи внедрение в процесс производства вакцины более стандартных сред является важным и перспективным направлением научных исследований.

Цель работы – апробация эффективности использования питательной среды – бульона на основе панкреатического гидролизата казеина сухого (ГНЦ ПБМ Оболенск) в экспериментально-производственных условиях.

Эффективность жидких экспериментальных питательных сред определяли в условиях малообъемного культивирования в колбах Эрленмейера (250 мл) на термостатируемом шейкер-инкубаторе InforsMultitronII и в биореакторе Biotron с автоматическим поддержанием параметров культивирования. Объём питательной среды при культивировании в колбах составлял 25 мл, температура культивирования 37 С, скорость вращения платформы – 200 об/мин. Параметры культивировании в биореакторе с рабочим объемом 200 л: аэрация 0,5–0,7 л воздуха на 1 л питательной среды, скорость перемешивания 500 об/мин. Регламентная питательная среда – бульон из ферментативного казеинового гидролизата pH 7,8+0,2, содержащий 0,2 % аминного азота, 0,1 % пептона, 0,5 % хлорида натрия и 0,05 % двузамещенного фосфата натрия при подкормке глюкозой и солями аммония. Концентрацию микробов измеряли по ОСО мутности. Забор проб бульонной культуры из реактора осуществляли через 5, 6, 7, 8, 9, 10 часов роста.

Первым этапом нашей работы явилось определение количества аминного азота в питательной среде для оптимального выхода антигенов. Для этого нами были приготовлены среды с содержанием аминного азота от 40 мг% до 120 мг%. Малообъёмное культивирование производственных штаммов *Vibrio cholerae* М41 серовара Огава и *Vibrio cholerae* 569В серовара Инаба проводилось на колбах в течение 9 ±1,5 часов на экспериментальных средах. В пробах после выращивания была определена концентрация микробных тел, выход антигенов и ферментов. Оптимальная

концентрация биомассы обоих штаммов и содержание антигенов отмечалось при использовании среды с содержанием аминного азота 100 и 120 мг%. Содержание холерного токсина у штамма *V. cholerae* 569B в реакции пассивного иммунного гемолиза (РПИГ) максимальным явилось также при данных концентрациях аминного азота (1:612). Поэтому для дальнейшей работы нами была выбрана среда с содержанием аминного азота 100 мг%.

Далее нами было проведено экспериментально-производственное выращивание штаммов-продуцентов в объёме 100 л в производственных ферментерах. В процессе выращивания каждый час, начиная с 5 часов роста, производили отбор проб культуры, которые контролировали по мутности, содержанию О-антигена и холерного токсина (в РДП с гомологичными сыворотками). В результате сравнительного анализа выращивания производственного штамма *V. cholerae* M41 видно, что концентрация микробных тел при выращивании на экспериментальной среде была выше (37,4 млрд), чем на регламентном казеиновом бульоне (30,8 млрд). Что касается содержания О-антигена, то его количество было значимо выше (в 4 раза) при выращивании на экспериментальной среде. При культивировании штамма *V. cholerae* 569B концентрация микробных тел и О-антигена Инаба была однозначной (44 млрд) и титр 1:8, но содержание холерного токсина при выращивании на экспериментальной среде было значимо выше по данным реакции пассивного иммунного гемолиза (1:256 и 1:64 соответственно) и в реакции Крейга. Анализ специфических фракций, выделенных в процессе производства, также показал более высокую специфическую активность как О-антигена, так и холерного токсина, что позволяет получить большее количество таблеток вакцины из экспериментального реактора.

Таким образом, сравнивая эффективность питательной среды на основе сухой стандартной основы и среды производства института «Микроб» при глубинном культивировании производственных штаммов в условиях ферментера, можно сделать вывод о перспективности использования данной среды в производстве холерной вакцины.

Последним этапом нашей работы явилась апробация новой среды для получения тест-токсина, который используется для производства антихолерогенной сыворотки и в качестве компонента реакции для определения активности специфических фракций и таблеток вакцины. Для этого мы вырастили штамм *V. cholerae* 569B в колбах и бутылях в течение 18 ч, что позволило получить бульонную культуру с концентрацией микробных тел 16 и 10 млрд соответственно. Далее мы получили стерильный фильтрат культуральной жидкости (10 л) и сконцентрировали его методом тангенциальной фильтрации последовательно через фильтры 300 кДа и 10 кДа до объема 1л. Далее токсин был осажден в изоточке в присутствии ГМФ. Полученный после осаждения, диализа и

хроматографической очистки препарат тест-токсина показал высокую активность в пробе Крейга – 40000 - и может быть использован для контроля.

Таким образом, нами проведена работа по испытанию в экспериментально-производственных условиях питательной среды – казеинового бульона на основе сухой основы (панкреатический гидролизат казеина сухой, производство ГНЦ ПБМ Оболенск). Показана возможность применения данной среды при экспериментальных и масштабированных выращиваниях в производственных условиях, а также для получения тест-токсина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кутырев В.В., Щуковская Т.Н. Холерные вакцины / В кн.: «Вакцины и вакцинация: национальное руководство» / под ред. Зверева В.В., Семенова Б.Ф., Хаитова Р.М., М. ГЭОТАР–Медиа, 2011. – С. 431–445.

2. Еремин С.А., Алешина Ю.А., Комиссаров А.В., Громова О.В., Васин Ю.Г., Никифоров А.К., Ливанова Л.Ф., Волох О.А., Лобовикова О.А., Бронникова В.С. Методы и технологии культивирования холерного вибриона (обзор) // Проблемы особо опасных инфекций.– 2013. - № 4. – С. 95–101.

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

ХОЛЕРНЫЕ БАКТЕРИОФАГИ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

Н.Е. Гаевская, А.О. Кочеткова, С.Н. Головин

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

Широкое географическое распространение продолжающейся седьмой пандемии холеры усилило интерес исследователей к вопросам оптимизации лабораторной диагностики возбудителя. Для индентификации холерных вибрионов прочно вошёл в практику метод определения фагочувствительности изучаемых культур с помощью холерных диагностических фагов [1, 2, 3, 4]. В период седьмой пандемии холеры при широком использовании специфических холерных фагов для идентификации представителей вида *Vibrio cholerae*, определении вирулентности и фаготипа различные исследователи столкнулись с фактом появления таких форм бактерий, когда при сохранении признаков вида и рода они становились устойчивыми к фагу. По данным ежегодного анализа с 2001 по 2014 г. наблюдается неуклонное снижение чувствительности холерных вибрионов к применяемым диагностическим фагам (бактериофагу Эль Тор, фагам ctx^+ и ctx^-) [5]. Приобретенная фагорезистентность диктует необходимость разработки новых диагностических фаговых препаратов. Поэтому целью нашей работы было провести отбор новых диагностических фагов для идентификации холерных вибрионов.

При отборе холерного фага для диагностики холеры нами учитывались следующие показатели: максимально высокая репродуктивная активность в отношении вибрионов Эль Тор; специфичность литического действия; степень лизиса гомологичных бактерий; продолжительность культивирования; скорость размножения; посевные дозы бактерий и фагов.

В работе использовано 267 музейных устойчивых к диагностическим холерным фагам штаммов *Vibrio cholerae El Tor*, выделенных в 2001-2015 гг. из различных источников, а также 24 штамма *Vibrio cholerae classical*. Все изученные штаммы отличались в отношении генов: ctx^+tcp^+, ctx^-tcp^+, ctx^-tcp^-.

Для изучения и сохранения биологического разнообразия бактериофагов, а также для выполнения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные вибрионы» в Ростовском-на-Дону

противочумном институте собрана коллекция холерных фагов разного происхождения.

Из данной коллекции изучены 25 холерных фагов по чувствительности к отобранным штаммам. Критерием отбора фагов является лизис фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в различные годы от людей и из внешней среды (2001-2013 гг.). Изучение свойств фагов проводили общепринятым методом [6].

Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7 %, 1,5 % агар Мартена (pH 7,6 – 7,8).

В результате проведенной работы были отобраны четыре холерных бактериофага, лизирующие холерные вибрионы, устойчивые к коммерческим диагностическим фагам. Изучаемые фаги, цельные и в разведении наносили на газон холерных культур. Предлагаемые бактериофаги имеют различный спектр литической активности в отношении холерных вибрионов Эль Тор и classical. Диапазон литической активности: фага El 1 – 57,5 %, фага O1 – 64,6 %, фага El 2 – 66,3 %, фага Cl – 83,3 %. Данные фаги в процессе исследования образовали следующие варианты лизиса (Таблица).

Таблица. Варианты лизиса штаммов *V. cholerae* O1 холерными бактериофагами

Микроорганизмы	Холерные бактериофаги			
	№O1	«Cl»	El1	El 2
V. cholerae O1 биовара *classical*	+(-)	+	-	-
V. cholerae O1 биовара *El Tor*	+(-)	-	+	+
	+(-)	-	+	-
	+(-)	-	-	+
V. cholerae O1 двух биоваров	+	-	-	-

Примечание: «+» - наличие лизиса, «-» - отсутствие лизиса.

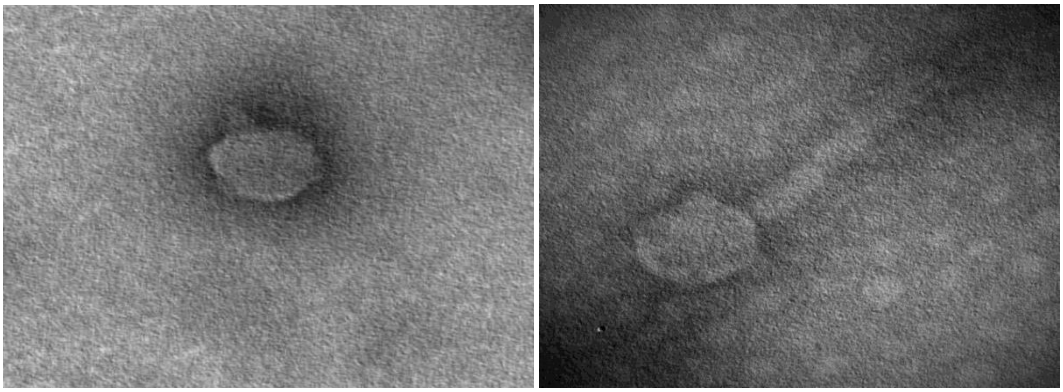
Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae*, которые не лизировали испытуемые фаги.

При изучении действия инактивирующих агентов – хлороформа и повышенной температуры - было установлено, что к действию хлороформа фаги *V. cholerae* устойчивы и инактивировались при температуре 65-70°C в течение 30 мин.

По данным электронно-микроскопического исследования новые холерные бактериофаги относились по морфологии корпускул: фаги O1, El 1 и фаг Cl к III морфогруппе [7] и типу C [8] семейства Podoviridae; фаг El 2 к V морфогруппе [7] и типу A [8] семейства Myoviridae (рис. 1).

Попытки использовать данные холерные фаги в различных вариантах смесей не были успешными, так как происходило снижение

диапазона литической активности и титров фагочастиц до 10^{-5}-10^{-7} БОЕ/мл, в то время как у монофагов титры сохранялись на уровне 10^{-8}-10^{-10} БОЕ/мл.



Podoviridae Myoviridae

Рисунок 1. Морфология бактериофагов холерных вибрионов(вид в электронном микроскопе JEM-1011, увеличение 100000).

Для размножения и контроля новых рас диагностических бактериофагов было необходимо найти новые авирулентные тест-штаммы. В качестве одного из наиболее перспективных тест-штаммов для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов мы использовали нетоксигенную культуру *Vibrio cholerae El Tor* 19546, которая была депонирована в ГКПБ «Микроб» под № КМ-276.

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что изученные холерные фаги, обладающие избирательной литической активностью, могут быть применены для диагностики фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов. Актуальность использования метода фаговой диагностики заключается в том, что он исключает применение дорогостоящей аппаратуры и большие материальные затраты. Техническая простота и доступность отличают его и позволяют в кратчайший срок (12-18 часов) получить ответ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быстрый Н.Ф. Метод дифференциации вирулентных и авирулентных вибрионов с помощью специфических бактериофагов / Н.Ф. Быстрый, В.Т. Середин, Н.В. Урюпина и др. // Пробл. особо опасн. инф. – 1970. – Вып. 1. – С. 141-146.

2. Дрожевкина М.С., Арутюнов Ю.И. Типирование холеных вибрионов новым набором фагов // Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. – Прага, 1979. – Т. 23, № 3. – С. 306-312.

3. Коровкина Г.И., Мороз В.П., Грижебовский Г.И. К разработке фагового метода дифференциации эпидемических (ctx^+) и неэпидемических (ctx^-) вибрионов эльтор // Микробиол., лаб. диагн. и спец.

проф. карант. инф. – Саратов, 1989. – С. 132-136.

4. Актуальные проблемы холеры. / Под ред. академика РАМН, проф. В.И. Покровского и чл.-корр. РАМН Г.Г. Онищенко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. – 384 с.

5. Овчинникова М.М., Аленкина Т.В., Коровкина Г.И., Грачева И.В. Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемически неопасных штаммов V.cholerae eltor к бактериофагу диагностическому холерному ctx^- // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2010. – С. 62-66.

6. Адамс М. Бактериофаги: Пер. с англ. – М., 1961. – 522 с.

7. Тихоненко А.С. Ультраструктура вирусов бактерий. – М.: Наука, 1968. – 170 с.

8. Ackerman H.B. // Microbiol. Sci. – 1987. – Vol. 4, № 17. – P. 210-214.

ПРИМЕНЕНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ *TCP*$^+$ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 И О139 СЕРОГРУПП

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, М.Э. Яговкин

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

В настоящее время в лабораторной диагностике холеры актуальной задачей по-прежнему остаётся разработка новых диагностических средств обнаружения антигенов, специфичных исключительно для *V. cholerae* О1 и О139. Решением данной задачи может быть использование в качестве детектирующих антител моноклональных иммуноглобулинов, направленных к определённым эпитопам диагностически значимых антигенов холерных вибрионов. Нами была получена панель МКА, методом иммуноблоттинга изучена их эпитопная направленность. Выявлены МКА, специфичные к мембранному белку OmpU и/или OmpT холерных вибрионов О1, О139 [1]. При оценке диагностической значимости полученных моноклональных антител на наборе штаммов холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, а также гетерологичных и близкородственных микроорганизмов было установлено, что МКА H2F6 выявляют в иммуноферментном методе только *tcp*$^+$ штаммы *V. cholerae* О1 и О139 [2]. Цель данной работы – получение пероксидазных конъюгатов на основе МКА H2F6 и изучение возможности их использования в прямых методах ИФА для выявления *tcp*$^+$ штаммов холерных вибрионов О1, О139

серогрупп.

Источником МКА служили культуральные жидкости, накопленные при многократном пассировании гибридомы-продуцента H2F6 .Выделение иммуноглобулиновой фракции из культуральных жидкостей осуществляли преципитацией сульфатом аммония [3] с последующим диализом. Конъюгацию очищенных иммуноглобулинов с пероксидазой хрена проводили по методу Nakane P.K. [4] в соотношении 2:1 соответственно. Постановку прямого ТИФА в полистироловых планшетах осуществляли по общепринятой методике [5]. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioTekEL*800 (BioTekInstruments, U.S.A.) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм). Для постановки дот-ИФА по стандартной методике [5] использовали нитроцеллюлозную мембрану (НЦМ) с диаметром пор 0,45 мкм (Bio-Rad). После проведения реакции специфические пятна проявляли диаминобензидином (Aldrich). Антигеном в ТИФА и дот-ИФА служили обеззараженные кипячением взвеси исследуемых культур.

Было получено две серии препаратов пероксидазных конъюгатов на основе МКАН2F6. Рабочий титр конъюгатов в прямом ТИФА определяли на штамме *V. cholerae* 13020 (*El Tor*). Оба препарата титровались до 1:128, для дальнейшей работы использовалиих в рабочем разведении 1:32. Специфичность полученных конъюгатов оценивали на наборе штаммов холерных вибрионов, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов. Были подобраны культуры *V. cholerae* O1 и O139 с генотипами: tcp^+ и tcp^-. В таблице 1 приведены результаты прямого ТИФА.

Таблица 1. Взаимодействие холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с моноклональными антителами H2F6, меченными пероксидазой хрена, в прямом ТИФА

№ п/п	Бактериальные штаммы (обеззараженные кипячением)	Количество исследуемых штаммов	Количество штаммов, положительно взаимодействующих в ТИФА с ПХ-МКА H2F6
1	*V.choleraecholerae* tcp^+	8	8
2	*V.cholerae El Tor*tcp^+	16	16
3	*V.cholerae El Tor*tcp^-	8	0
4	*V.cholerae*O139tcp^+	6	6
5	*V.cholerae*O139tcp^-	6	0
6	*E. coli*	2	0
7	*V.cholerae*не O1/не O139	4	0
8	*Aeromonas spp*.	4	0
9	*Salmonella spp.*	2	0

Данные таблицы 1 подтверждают установленную в предыдущих опытах [1, 2] специфичность МКА H2F6 в отношении tcp^+ штаммов *V. cholerae* O1, O139. Кроме того, выявлено, что исследуемые антитела

взаимодействуют как с эльторовскими, так и с классическими штаммами холерных вибрионов, что указывает на сходство у биоваров антигенной структуры мембранного порина, к которому направлены МКА H2F6 [1]. Конъюгаты ПХ-МКА H2F6 также были исследованы в прямом дот-иммуноферментном анализе (рис. 1).

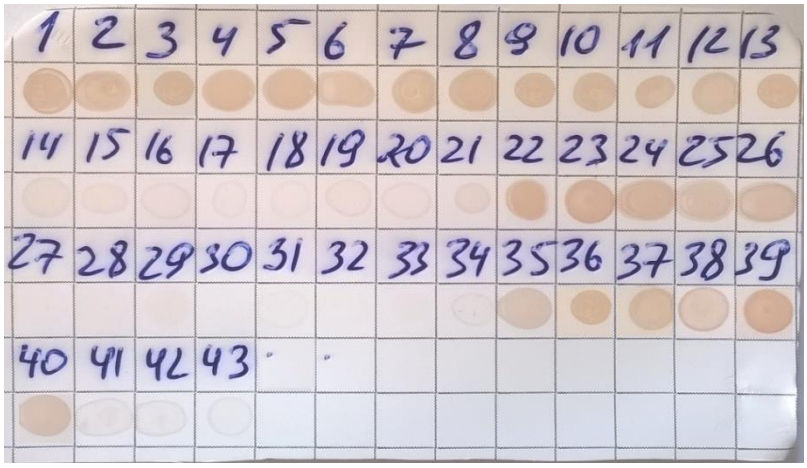


Рисунок 1. Дот-ИФА исследуемых культур с ПХ-МКА H2F6. Штаммы микроорганизмов: *V. cholerae El Tor tcp*$^+$ (1-13), *V. cholerae El Tor tcp*$^-$ (14-21), *V. cholerae cholerae tcp*$^+$ (22-26), *V.cholerae* не O1/не O139 (27-29), *E. coli* (30), *Aeromonas spp* (31-34), *V.cholerae* O139 *tcp*$^+$ (35-40), *V. cholerae* O139 *tcp*$^-$ (41-43).

Таким образом, полученные моноклональные пероксидазные конъюгаты на основе МКА H2F6 имеют диагностическую значимость, т. к. способны выявлять в прямых методах ИФА tcp$^+$ штаммы *V. cholerae* O1, O139, в том числе и нетоксигенные. Как известно, наличие пилей адгезии у нетоксигенных штаммов холерных вибрионов создает потенциальную возможность адсорбции на них фага СТХф, в результате чего может произойти формирование нового патогенного клона [6]. Адгезируясь на клетках тонкого кишечника с помощью tcp-пилей, холерные вибрионы образуют микроколонии с филаментозным матриксом, который окружает бактериальные клетки и защищает их от антибактериальных компонентов [7]. Поэтому штаммы ctx$^-$ tcp$^+$ обладают большим патогенетическим потенциалом и возможностью выжить в условиях кишечника хозяина, в сравнении со штаммами, не несущими ген *tcp*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Моноклональные антитела к термостабильным поверхностным антигенам холерных вибрионов О1- и О139-серогруппы. Эпидемиол. и инф. болезни. 2015; 3: 51-57.

2. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Бурша О.С., Архангельская И.В., Яговкин М.Э. Моноклональные антитела к иммунореактивным антигенам холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп // Проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы». Ростов-на-Дону; 2015; 28: 164-168.

3. Кэтти Д., ред. Антитела: Методы. М.: Мир; 1991; кн. 1.

4. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody anew method of conjugation. J. HistochemCytochem. 1974; 22:1084-91.

5. КэттиД., ред. Антитела: Методы. М.: Мир; 1991; кн. 2.

6. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, andecology of toxigenic Vibrio cholerae. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1998; 62(4):1301-14.

7. Krebs S.J., Taylor R.K. Protection and attachment of *Vibrio cholerae* mediated by the toxin-coregulated pilus in the infant mouse model. J. Bacteriol. 2011; 193(19): 5260-5270.

ХРАНЕНИЕ И ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ

В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, Г.Г. Шубин, М.Э. Яговкин

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

На базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора получены экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе видоспецифических моноклональных антител (МКА), направленных к эпитопам О-полисахарида холерных вибрионов О1 серогруппы (ПХ-МКА О1) и соответственно серогруппы О139 (ПХ-МКАО139). Разработанные препараты предназначены для детекции и дифференциации холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп прямым методом планшетного ИФА и дот-ИФА как в стационарных, так и полевых условиях (без приборного обеспечения). Их применение исключает возможность перекрестных реакций с представителями близкородственных микроорганизмов [1], необходимость использования дорогостоящих антивидовых конъюгатов, сокращает общее время анализа до 70-90 минут. Преимущества прямых вариантов иммуноферментного анализа позволяют использовать их в качестве альтернативы или в дополнение к другим диагностическим экспресс-тестам детекции холерных вибрионов, а также в научных исследованиях.

Цель данной работы – оценить специфическую активность

лиофильно высушенных моноклональных пероксидазных конъюгатов в прямом методе ТИФА на штаммах*Vibrio cholerae* O1 и *V. cholerae* O139.

По отработанной схеме [2] приготовили экспериментальные образцы моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139. Определены рабочие титры препаратов: для ПХ-МКА O1– 1:64, ПХ-МКА O139 – 1:128. В качестве криопротектора использовали бычий сывороточный альбумин (BSA, BiotechnologyGrade, Amresco) в концентрации 1 %. Жидкие препараты расфасовывали по 1 мл в стеклянные флаконы емкостью 5 мл с резиновыми пробками и замораживали. Далее проводили стабилизацию пероксидазных конъюгатов методом лиофильного высушивания (сушка Heto PowerDry PL9000, Thermo Scientific, Дания) в течение 11 часов, плавно изменяя температуру сушки с -25ºС до +30ºС. Высушенные препараты герметично укупоривали резиновыми пробками, завальцовывали алюминиевыми колпачками и хранили при +4ºС. Специфическую активность регидратированных конъюгатов устанавливали в прямом ТИФА по общепринятой методике [3]. Использовали взвеси штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139, обеззараженные кипячением, в дозе 10^8 м.кл./лунку. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре BioTekEL*800 (BioTekInstruments, U.S.A.) при длине волны 450 нм (референс-волна 630 нм). Постановку планшетного ТИФА осуществляли в трёх повторностях, при анализе результатов были использованы методы, описанные И.П. Ашмариным [4]. Показатели оптической плотности (ОП) представлены в таблице.

Таблица. Результаты исследования стабильности специфической активности пероксидазных конъюгатов после лиофилизации

№ п/п	Штамм	ОП в ТИФА до лиофилизации		ОП вТИФА после лиофилизации	
		ПХ-МКА O1 (1:64)	ПХ-МКА O139 (1:128)	ПХ-МКА O1 (1:64)	ПХ-МКА O139 (1:128)
1	*V. cholerae El Tor*18895	1,168±0,017	-	1,023±0,018	-
2	*V. cholerae El Tor*18963	1,123±0,014	-	1,006±0,012	-
3	*V. cholerae cholerae*569-B	1,097±0,004	-	0,987±0,008	-
4	*V. cholerae* 16064(O139)	-	1,195±0,023	-	1,105±0,008
5	*V. cholerae* 16485(O139)	-	1,244±0,009	-	1,203±0,010
6	*V. cholerae* 17916(O139)	-	1,215±0,011	-	1,197±0,014

Примечание: в таблице представлены средние значения оптических плотностей (ОП) и стандартное отклонение. ОП $К^-$ = 0,023±0,006

Как видно из данных таблицы, рабочий титр ПХ-МКА O1 и ПХ-МКА O139 после лиофилизации остаётся на исходном уровне, наблюдается лишь незначительное снижение показателя оптической плотности в прямом ТИФА: для ПХ-МКА O1 в среднем на 0,124 ед., для ПХ-МКА O139 на 0,050 ед.

Регидратированные препараты разливали на аликвоты и хранили при -20°С в течение 18 месяцев, затем была проверена их специфическая активность в ТИФА. Рабочий титр также оставался на исходном уровне, наблюдалось незначительное снижение показателей оптической плотности не более чем на 0,150 ед. у ПХ-МКА О1 и ПХ-МКА О139.

Таким образом, стабилизация моноклональных пероксидазных конъюгатов ПХ-МКА О1 и ПХ-МКА О139 методом лиофильного высушивания позволяет сохранить исходный рабочий титр препаратов и их специфическую активность в отношении штаммов *V. cholerae* О1 и *V. cholerae* О139 соответственно. В дальнейшем необходимо оценить физико-химические свойства и специфическую активность приготовленных сухих препаратов после хранения их в условиях холодильника (+4°С) в течение нескольких лет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Евдокимова В.В., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. Новые препараты на основе моноклональных антител в лабораторной диагностике холеры // Материалы пробл. комиссии «Холера и патоген. для человека вибрионы». Ростов-на-Дону; 2014; 27: 156-160.

2. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В., Кретенчук О.Ф., Яговкин М.Э., Бурша О.С. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов О1, О139 в реакции дот-иммуноанализа // Клин. лаб. диагностика. 2013; 3: 26 – 29.

3. Кэтти Д., ред. Антитела: Методы. М.: Мир; 1991; кн. 2.

4. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз.; 1962; 180с.

ДЕЙСТВИЕ N-АЦЕТИЛ-L-ЦИСТЕИНА НА БИОПЛЕНКИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин, С.В. Титова, Л.К. Лысова, Л.А. Корнеева

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

N-ацетил-L-цистеин (АЦЦ) относится к лекарственным средствам, интерес к которым со временем не только не ослабевает, но и усиливается, так как открываются новые области и возможности их применения.

Известно, что антибактериальные свойства АЦЦ характеризуются высокими значениями минимальных подавляющих концентраций (МПК),

доходящих до 5 - 80 мг/мл [1], хотя имеются сообщения о повышенной чувствительности штаммов, например, псевдомонад до уровня 2 - 20 мкг/мл [2]. Низкая токсичность препарата ($ЛД_{50}$ для крыс при оральном применении составляет более 5 г/кг), а также хорошая переносимость позволяет длительно использовать его в высоких концентрациях и при разных способах введения при лечении различных заболеваний. Ранее была предпринята попытка изучения и анализа действия этого биологически активного препарата на планктонные формы холерного вибриона [3]. Однако отсутствие в доступной литературе сведений по влиянию АЦЦ на биоплёнки холерного вибриона диктует целесообразность изучения действия этого препарата.

Материалы и методы: при выполнении исследований в зависимости от решаемой задачи использовали разные группы штаммов: *Vibrio cholerae* О1 Эль Тор (ctx+ tcp+), *V. cholerae* О139 серогруппы (ΔctxΔtcp), дефектные по синтезу токсина и токсинкорегулируемых пилей, выделенныеиз воды поверхностных водоёмов, и (ctx+ tcp+), выделенные из клинического материала. Штаммы получали из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, где их хранили в лиофилизированном состоянии. В работе использовали препарат N-ацетил-L-цистеина (BioChemica, Россия). Получение биоплёнок холерных вибрионов проводили способом, описанным ранее [4]. Действие препарата АЦЦ (0,5-4 мг/мл) анализировали по его влиянию на этапы формирования биоплёнки и на уже сформированную 5-7-суточную биоплёнку. Инкубацию с препаратом проводили при 20° С. Через 0, 1, 3, 6, 24, 48 часов, 5-14 суток инкубации осуществляли высев планктонной культуры и биопленок на пластинки агара Мартена (рН 7,7). Результат учитывали через 24 часа по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов.

Результаты исследования. В результате проведённого исследования обнаружено, что препарат АЦЦ влияет на формирование биоплёнок у представителей *V. cholerae* О1 и О139 серогрупп уже через 1-3 часа, после добавления препарата в концентрации 1-4 мг/мл. Он также действует на сформированную 5-7-суточную биоплёнку и планктонную форму, проявляя антибактериальный эффект независимо от наличия/отсутствия генов ctx/tcp в концентрациях 2-4 мг/мл. Следует отметить, что в данных концентрациях препарат действует уже через 3 часа инкубации, как на планктонную культуру, так и на сформированную биопленку. Учитывая низкую токсичность и хорошую переносимость АЦЦ, полученные результаты представляют теоретический и практический интерес, так как препарат может быть использован в терапии случаев диареегенных заболеваний, обусловленных возбудителями II-IV групп патогенности.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aslam S., Darouiche R.O. Role of antibiofilm-antimicrobial agents

in controlling of device-related infections. // Int. J. Artif. Organs. - 2011. - Vol. 34,№ 9. - P. 752 - 758.

2. Parry M.F., Neu H.C. Effect of N-acetylcysteine on antibiotic activity and bacterial growth in vitro. // J .Clin.Microbiol. - 1977.- Vol. 5, № 1.- P. 58 -61.

3. Дуванова О.В., Кругликов В.Д., Романова Л.В., Водопьянов А.С., Мишанькин Б.Н. Действие N-ацетил-L-цистеина на холерный вибрион. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2013. - Вып. 26. - С. 191 - 194.

4. Титова С.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биоплёнок invitro с помощью нового методического подхода // Фундаментальные исследования. - 2014.-№ 10.-С. 375-379.

РАЗРАБОТКА И КОНСТРУИРОВАНИЕ ПОЛИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО ДИАГНОСТИКУМА НА ОСНОВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ АНТИТЕЛ

Д.И. Симакова, Л.В. Ларионова, А.Н. Наркевич, А.П. Кочеткова, Е.Ю. Люкшина, Л.К. Лысова

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

При диагностике холеры серологические методы исследования используются как для идентификации возбудителя, так и для выявления противохолерных антител. Выявление у людей антител к *Vibrio cholerae*, величина и динамика их титров оцениваются в сочетании с клинико-эпидемиологической ситуацией и характеристикой обследуемого контингента. При этом серопозитивные результаты в структуре критериев диагностики холеры могут иметь решающее значение при проведении ретроспективного эпидемиологического анализа при отсутствии возможности получения результатов бактериологического анализа в случаях завоза инфекции [1, 2]. В конце прошлого века были предложены методики выявления противохолерных антител у людей с помощью эритроцитарных диагностикумов в реакциях пассивной гемагглютинации и нейтрализации антител. Основой предложенных диагностических препаратов являлся носитель – эритроцит, имеющий на своей поверхности биологически-активные молекулы, играющие роль рецепторов для иммуноглобулинов. На протяжении нескольких десятилетий достаточно широко обсуждался вопрос о замене эритроцитов, используемых в

качестве носителей специфических антигенов или антител, синтетическими полимерными латексами [3, 4, 5, 6]. Биологические носители имеют ряд недостатков – зависимость от генетических особенностей и возраста донора, времени годы, условий содержания животного и т.д., что обусловливает нестандартность и нестабильность эритроцитарного носителя. Кроме того, на поверхности эритроцитов присутствуют изоантигены, способные вызывать ложноположительные реакции. В связи с этим альтернативой эритроцитарных диагностикумов могут быть диагностические препараты на основе полимерных микросфер. Использование разработанных авторами технологий позволяет получить синтетические носители с различными реакционно-способными группами на поверхности частиц, способнымииммобилизировать антигены и антитела, что способствует получению стандартизованных диагностических препаратов. Синтетические полимерные носители применяются для ковалентной и сорбционной иммобилизации ферментов, белков различной природы, для получения гелей и микрокапсул.

В серологической диагностике холеры в соответствии с МУК 4.2.2315-08 предложены подходы с использованием эритроцитарных диагностикумов [7]. Однако применение выпускаемых Казахским центром карантинных и зоонозных инфекций диагностических препаратов (антигенный для РНГА, иммуноглобулиновый для РНАг, энтеротоксический для РНГА) в настоящее время в России ограничено.

Привлекает внимание возможность создания антигенных полимерных диагностических препаратов для выявления противохолерных антител на основе высокоспецифических холерных антигенов, таких как липополисахарид. Разработанные полимерные диагностические препараты используют в реакции агломерации объемной (РАО), относящейся к методам анализа без разделения реагирующих компонентов, что значительно снижает вероятность заноса артефактов, ускоряет учет реакции и упрощает ее использование в режимных и полевых условиях работы. Ранее авторами были сконструированы полимерные антигенные диагностические препараты, в которых для сенсибилизации полимерного латекса использовались клеточные лизаты холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп. Однако данные диагностические препараты имели недостаточную аналитическую специфичность при высокой аналитической чувствительности. В связи с этим создание полимерных диагностикумов с использованием специфических антигенов холерного вибриона, одним из которых является липополисахарид, является весьма актуальным.

Для конструирования диагностического препарата синтезировали полиакролеиновые микросферы с реакционными альдегидными группами. В качестве сенситина использовался липополисахарид холерного вибриона О1 серогруппы, полученный водно-фенольным методом по Вестфалю и

Людеритцу. Аналитические характеристики разработанного препарата исследовали в реакции агломерации объемной (РАО). Результаты реакции учитывали через 2 часа. За положительный результат принимали цветной ярко-розовый агломерат, равномерно выстилающий дно лунки. В отрицательных случаях и контроле образуется «колечко» или «точка» в центре лунки.

Для исследования аналитической чувствительности диагностикума использовали коммерческие лошадиные и экспериментальные кроличьи сыворотки, полученные авторами к холерному вибриону О1 серогруппы. Аналитическая чувствительность препарата составила 1:320 – 1:1280. Коммерческие сыворотки различных серий отличались по содержанию антител к липополисахариду, так в коммерческих холерных сыворотках без указания серовара титры составляли 1:320 – 1:1280, в сыворотках «Огава» и «Инаба» - 1:320 – 1:640. В экспериментальных кроличьих авторских сыворотках титр антител составил 1:640.

Специфичность диагностикума исследовали с коммерческими и экспериментальными кроличьими сыворотками к холерному вибриону О139 серогруппы, экспериментальными кроличьими авторскими сыворотками к не О1/не О139 серогруппам, а также с коммерческими гетерологичными сыворотками (сальмонеллёзной, шигеллёзной, эшерихиозной). Разработанный холерный полимерный антигенный диагностикум давал отрицательную реакцию со всеми исследованными коммерческими и экспериментальными сыворотками к возбудителю холеры О139 серогруппы, к не О1/не О139 серогруппам, а также с набором коммерческих гетерологичных сывороток.

Таким образом, получен диагностический полимерный антигенный препарат на основе липополисахарида холерного вибриона О1 серогруппы для выявления противохолерных антител, характеризующийся высокой чувствительностью и специфичностью, а также унифицирован метод получения диагностикума и его внедрения в серийное производство.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов А.К. // Иммунология холеры. – Саратов. – 1981.
2. Ефременко В.И., Савельев В.Н. Лабораторная диагностика холеры: состояние и перспективы // Современные технологии в диагностике особо опасных инфекционных болезней. – Саратов. - 2003. - С. 57-62.
3. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Перспективы создания препаратов для индикации возбудителей ООИ и других актуальных инфекций // Материалы IX съезда всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. - Москва.-2007.-С. 60-61.
4. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав

потребителей и благополучия человека № 88 от 17 марта 2008 г. «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней».

5. Подосинникова Л.С., Ломов Ю.М., Королёв Ю.С. и др. Серологическая диагностика холеры // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2005. – Выпуск № 18. – С. 131 – 133.

6. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания МУК 4.2.2218-07. - Москва. – 2007. – С. 69-74.

7. Серологические методы в диагностике холеры. МУК 4.2.2315-08.-М. - 2010. - С. 10-16.

РАЗРАБОТКА НОВОГО МЕТОДА ОЧИСТКИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

О.В. Громова, М.Н. Киреев, А.В. Гаева, Л.Ф. Ливанова, А.Ю. Ульянов, О.А. Волох

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, 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. Качество холерогена-анатоксина определяется специфической активностью холерного токсина, которая тестируется в соответствии с промышленным регламентом № ПР 01898109–39–12 на производство методом кожной пробы по Craig (1965). В данной реакции используется холерный токсин (ХТ). Получение ХТ состоит из многих последовательно выполняющихся стадий, в том числе: отделение центрифугированием микробной биомассы штамма холерного вибриона 569В Инаба, полученной в реакторе глубинным методом; стерилизация центрифугата через бактериальные свечи; осаждение белковых фракций из фильтрата 50 % раствором соляной кислоты в присутствии 0,25 % гексаметафосфата натрия при pH 4,0; выделение полученного осадка центрифугированием; диализ; центрифугирование для удаления нерастворимых примесей; ионообменная хроматография на фосфоцеллюлозе; диализ; стерилизующая фильтрация; лиофильное высушивание. Недостатком вышеуказанного способа является большая продолжительность технологического процесса получения ХТ, наличие множества стадий. В связи с этим разработка новых подходов к получению препарата тест-токсина, используемого в производстве вакцины, является

актуальным.

Цель работы – разработка более простого и экономичного способа, позволяющего получить препарат ХТ для контроля вакцины.

Первым этапом нашей работы было получение осадка, содержащего ХТ. При этом мы применяли разработанный ранее метод тангенциальной фильтрации [1]. Технологический процесс фракционирования и концентрирования складывался из ряда последовательно выполняющихся операций: стерилизующей фильтрации культуральной жидкости *Vibrio cholerae* 569В (10 л) на мембранах 0,22 мкм, выделение ХТ методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с номинальной отсечкой по молекулярной массе (НОММ) 100 кДа, концентрирование ХТ методом тангенциальной ультрафильтрации с использованием мембран с НОММ 10 кДа (1л). Далее фракцию, содержащую ХТ, осаждали из концентрата гексаметафосфатом натрия в кислой среде (рН 4,0±0,1), центрифугировали и диализовали. Полученный препарат (100 мл), содержал ХТ (титр в РДП 1:32), О-антиген (титр в РДП 1:2) (Таблица). Содержание белка по Лоури составляло 1 мг/мл.

Таблица. Контроль содержания холерного токсина на этапах его выделения

N	Стадия выделения	РДП	
		Холерный токсин	О-антиген
1	Стерильный фильтрат (безмикробный центрифугат после стерилизующей фильтрации)	1:2	ц
2	Концентрат 300 кД	1:2	1:8
3	Фильтрат (пермеат) 300 кД	-	-
4	Концентрат 10 кД	1:8	-
5	Фильтрат (пермеат) 10 кД	-	-
6	Полуфабрикат (осадок в изоточке с ГМФ)	1:32	1:2
7	Очищенный холерный токсин	1: 64	-

Дальнейшая очистка ХТ проводилась двумя различными методами. В первом случае полуфабрикат подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-60 в три ступени. Элюцию осуществляли 0,01 М фосфатным буфером рН 7,0, фракционируя по 5 мл. Фракции спектрофотометрировали при 280 нм и анализировали в реакции иммунодиффузии по Оухтерлони с антихолерогенной (АХС) и О-сывороткой. На второй ступени фракции, содержащие ХТ, объединяли, концентрировали и вновь наносили на колонку. Нами было проведено три ступени очистки на TSK-геле HW-60. Полученный ХТ1 диализовали против 0,9 % хлорида натрия и анализировали.

При получении ХТ2 для освобождения полуфабриката, содержащего ХТ от О-антигена, имеющего полисахаридную природу, проводили

фильтрацию разведенного осадка через фильтр фирмы «Cuno» 3MCompanyZetaplus. Данная процедура позволяет при хроматографической очистке ХТ получать препарат, свободный от О-антигена. Далее препарат подвергали гельпроникающей хроматографии на колонке с TSK-гелем HW-60.

Анализ препаратов ХТ1 и ХТ2 показал, что содержание белка после диализа и концентрирования составляло 0,8–1 мг/мл, титр РДП с антихолерогенной сывороткой 1:32 (64), с О-сывороткой отрицательный, активность в пробе Крейга соответственно 10000 и 40000. Также были исследованы электрофоретическая подвижность и иммунохимическая специфичность полученных препаратов в иммуноблоттинге с антихолерогенной сывороткой (Рисунок). Полученные данные свидетельствуют о том, что белковые комплексы ХТ1 и ХТ2 соответствуют таковым у ХТ, приготовленного по существующей технологии.

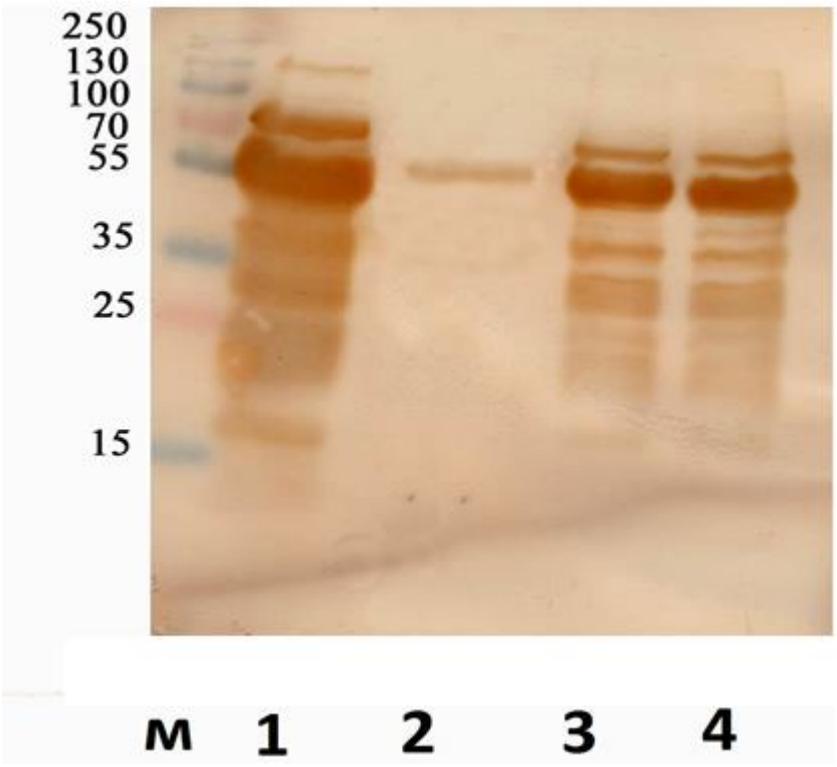


Рисунок. Иммуноблоттинг препаратов холерного токсина.
м– маркеры молекулярного веса, 1 – исходный образец (полуфабрикат), 2 – токсин, полученный по методу Mekalanos, 3 – образец, ХТ1, 4 – образец, ХТ2.

Таким образом, в результате последовательного применения методов ультрафильтрации, дополнительной фильтрации и хроматографической очистки нами получен препарат ХТ (ХТ2), который соответствует регламентным требованиям и может применяться для контроля

специфических фракций и готовой продукции – таблеток холерной химической вакцины.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Комиссаров А.В., Алешина Ю.А., Громова О.В. и др. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // Пробл. особо опасных инф. – 2012. – Вып. 4(114). – С. 65–68.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ НОВОЙ ФОРМЫ ВЫПУСКА ХОЛЕРНЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СЫВОРОТОК

А.В. Комиссаров, М.В. Овчинникова, С.А. Бадарин, Д.Н. Бибиков, Н.В. Синицына, Н.И. Костылева, И.А. Плотников

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

В институте «Микроб» производятся 4 наименования диагностических холерных сывороток для постановки реакции агглютинации: сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая; сыворотки диагностические холерные Огава и Инаба адсорбированные сухие; сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая. Данные медицинские изделия производятся в лиофилизированной форме в ампулах.

Существующая технология предусматривает, в том числе, выполнение следующих технологических операций:

- замораживание разлитого в ампулы препарата в низкотемпературном холодильнике;
- перенос замороженного материала на полки сублимационной установки;
- непосредственно лиофилизация;
- герметизация ампул их запаиванием с использованием горючих газов (пропана, бутана, кислорода).

Во время выполнения вышеперечисленных стадий производственного процесса не исключено возникновение ситуаций, ухудшающих качество конечного продукта. Так, во время переноса замороженного материала на полки сублимационной установки может произойти его частичное оттаивание, приводящее к развитию «коллапса» и снижению активности сухого биопрепарата. При выгрузке ампул после лиофилизации и в процессе их запаивания может произойти контаминация образцов.

При применении горючих газов для герметизации ампул, в случае их

неконтролируемого выхода в производственные помещения, существует риск отравления персонала и возможного взрыва.

Предотвратить появление подобных ситуаций представляется возможным разработкой технологии лиофилизации холерных диагностических сывороток во флаконах на сублимационном сушильном оборудовании, позволяющем производить операции замораживания препарата и герметизации первичной упаковки непосредственно в камере лиофилизатора. Современный рынок предлагает достаточно широкий спектр такого оборудования [1].

Все вышеперечисленное определило перспективность экспериментального обоснования новой формы выпуска холерных диагностических сывороток в лиофилизированной форме во флаконах.

Исследования проводились на сублимационной сушильной установке Martin Christ Epsilon 2-6D (Германия). Препараты 4-х наименований сывороток разливали по 1 мл в пенициллиновые флаконы вместимостью 10 мл, закрывали специальными колпачками для лиофилизации и замораживали доминус 50°С в камере сублимационной установки. Процесс высушивания вели по параметрам технологического процесса, показанным на рисунке. Одновременно производили препараты по традиционной технологии.

Рисунок. Режим высушивания

Сравнительный анализ качества диагностических препаратов, полученных по предлагаемой (лиофилизат во флаконах) и традиционной технологиям (лиофилизат в ампулах), представлены в таблице.

Анализ данных таблицы позволил сделать вывод о подобности свойств препаратов.

Таким образом, в ходе проведения исследований экспериментально подтверждена возможность выпуска новой формы холерных диагностических сывороток в виде лиофилизата во флаконах.

Таблица. Сравнительная характеристика основных контролируемых показателей диагностических холерных сывороток, изготовленных по традиционной и предлагаемой технологии

№ п/п	Наименование препарата	Контролируемые показатели производственных серий			Контролируемые показатели экспериментальных серий		
		Специфическая активность	pH	Потеря в массе при высушивании (%)	Специфическая активность	pH	Потеря в массе при высушивании (%)
1	Сыворотка диагностическая холерная О1 адсорбированная сухая, для реакции агглютинации (РА)	1:2000	8,42±0,2	0,64±0,2	1:2000	8,5±0,3	0,80±0,1
2	Сыворотка диагностическая холерная RO адсорбированная сухая, для реакции агглютинации (РА)	1:800	8,76±0,1	0,39±0,2	1:800	8,8±0,1	0,42±0,2
3	Сыворотка диагностическая холерная Огава адсорбированная сухая, для реакции агглютинации (РА)	1:400	8,50±0,2	0,55±0,3	1:400	8,8±0,3	0,60±0,2
4	Сыворотка диагностическая холерная Инаба адсорбированная сухая, для реакции агглютинации (РА)	1:400	8,40±0,1	0,54±0,1	1:400	8,23±0,1	0,55±0,3

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Технология лиофилизации – наука, искусство и люди, или как добиться безупречной лиофилизации // Фармацевтические технологии и упаковка. – 2010. – № 4. – С. 72-73.

ОПТИМИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА *VIBRIO CHOLERAE O1* В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МАГНОИММУНОСОРБЕНТОВ

И.В. Савельева, И.С. Тюменцева, Е.Н. Афанасьев, И.В. Жарникова, С.А. Курчева, В.Н. Савельев, Д.С. Агапитов

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь

В настоящее время большинство лабораторных методов диагностики холеры, не отличаясь очень высокой чувствительностью, требуют для своей постановки предварительного концентрирования возбудителя в исследуемых пробах с одновременным отделением выявляемых микроорганизмов от контаминирующей микрофлоры и других примесей окружающей среды.

В течение последних десятилетий для избирательного концентрирования и обнаружения антигенного материала, в том числе бактериальных клеток, вирусов, ферментов применяются различные иммуносорбционные методы. Один из них – иммуномагнитная сепарация – позволяет одновременно сконцентрировать искомый патоген и очистить его от примесей, подготавливая образец к дальнейшим микробиологическим, серологическим, молекулярно-генетическим и другим методам исследования.

Полагая, что данная методология может быть эффективна при исследовании объектов окружающей среды на поиск холерного вибриона, мы осуществили разработку магноиммуносорбентной тест-системы, предназначенной для селективного концентрирования холерного вибриона из водных объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов, сточные воды, вода из кранов, арыков и т.д.) на магноиммуносорбенте (МИС) с последующей постановкой иммуноферментного анализа (ИФА).

При конструировании МИС в качестве сорбционного материала использовали кремнезем-алюмосиликат, химическое модифицирование которого с целью образования на нем функционально активных групп, способных ковалентно связаться с белковыми лигандами (IgG, выделенными ПЭГ-6000 из смешанных 1:1 агглютинирующей и

препитицирующей сывороток), осуществляли в присутствии полимера – декстрана и ПАВ – вторичного алкилсульфата натрия, магнитным компонентом служил оксид железа (FeO). Эти же белковые лиганды применяли при изготовлении иммунопероксидазных конъюгатов, рабочий титр которых составил 1:600-1:800. При использовании в качестве твёрдой фазы МИС вместо традиционных полистироловых планшет изготовленные серии тест-системы показали специфическую активность, чувствительность и специфичность.

После проведения медицинских и технических испытаний тест-системы получено регистрационное удостоверение Росздравнадзора (№ РЗН, 2013/431), и препарат допущен к обращению на территории Российской Федерации (рисунок 1).

Рисунок 1.Набор реагентов «ИФА-МИС-Холера-СтавНИПЧИ»

Согласно распоряжению Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителя и благополучия человека А.Ю. Поповой, с 6 по 10 сентября было проведено эпидемиологическое расследование причин контаминации *V. cholerae O1 Inaba (*атоксигенный штамм*)* воды в реке Агура Хостинского района г. Сочи с использованием холерных МИС. К этому времени специалистами Сочинского ПЧО ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция Роспотребнадзора» в период с 29.07.2015 г. по 10.09.2015 г. были выделены 78 штаммов *V. cholerae O1, Inaba* (*ctxA*$^{-}$, *tcpA*$^{-}$) из 12 точек отбора воды традиционным методом для микробиологического исследования (МУК 4.2.2218–07).

Для поиска вероятного источника контаминации воды нами были определены оптимальные точки на реке Агура, в которых установили магнитные ловушки с холерными магноиммуносорбентами на 5-6 часов:

точка № 1 – устье реки Агура; точка № 2 – вода у моста через реку Агура; точка № 3 – вода у моста 20 м вниз; точка № 4 – вода из реки напротив минерального источника; точка № 5 – вода из реки напротив минерального источника на 10 м вниз; точка № 6 – вода реки ниже минерального источника на 70 м (стихийный пляж); точка № 7 – вода реки ниже минерального источника на 100 м.

Через 5-6 часов ловушки извлекали и отправляли на исследование. Одновременно в момент извлечения ловушки в этой же точке специалисты Сочинского ПЧО ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция Роспотребнадзора» забирали 1 л воды в 2 стерильные бутылки объемом 0,5 л для контрольных исследований с целью обнаружения холерных вибрионов.

Результаты исследования проб воды, отобранных традиционным способом и с помощью магноиммунносорбентных ловушек, бактериологическим, ПЦР, МИС+ИФА методами представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Результаты исследования проб воды из реки Агура бактериологическим, ПЦР и МИС+ИФА методами (выборочно, отбор проб 08.09.2015)

№ пробы	Методы исследования		
	Бактериологический	ПЦР	МИС+ИФА
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	–	+
4	–	–	–
5	+	+	+
6	–	–	–
7	+	+	+

Таким образом, проведённые исследования подтвердили высокую степень контаминации воды реки Агура, при этом иммуномагнитная сепарация в сочетании с ИФА, как и ПЦР, показали высокую эффективность, достоверность и удобство проведения эпидемиологического расследования. Следует отметить, что оба метода при отборе проб ловушками могут быть использованы как экспрессные для детекции холерных вибрионов О1 серогруппы ещё до подращивания их в средах обогащения.

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* О1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР С РАЗЛИЧНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Е.Ю. Баранихина, Т.А. Кульшань, Н.И. Смирнова

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

Возбудитель холеры способен обитать не только в организме человека, колонизируя его тонкий кишечник, но и в водных экосистемах [1, 2]. При мониторинге из водной среды на территории России нередко выделяются нетоксигенные (*ctxAB*$^-$) штаммы *Vibrio cholerae* О1 биовара Эль Тор. Среди них особое значение имеют изоляты, несущие гены токсин-корегулируемых пилей адгезии *(tcpA-F),* за счёт которых происходит колонизация тонкого кишечника человека [3, 4]. В этой связи такие штаммы могут определять появление вибриононосителей. Кроме того, токсин-корегулируемые пили или TCP являются ещё рецептором для CTXφ, несущего ген холерного токсина (*ctxAB*). Из этого следует, что существует вероятность приобретения профага CTXφза счет фаговой конверсии [4].

До недавнего времени все штаммы с генотипом *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ относили к потенциально эпидемически опасным. Однако при молекулярно-генетическом анализе полных геномов таких штаммов, выделенных как на территории России, так и зарубежных стран, эндемичных (Индия, Бангладеш, Вьетнам) и не эндемичных (Туркменистан, Грузия) по холере, установлено, что нетоксигенные *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ штаммы различаются между собой по присутствию в геноме различных мобильных генетических элементов (МГЭ). Так, *ctxAB*$^-$*tcpA*$^+$ изоляты, выделенные на не эндемичных территориях (Россия, Туркменистан, Грузия), не содержат в своем геноме 4-х МГЭ (профагов CTXφ и RS1φ, а также островов пандемичности VSP-I и VSP-II). Генотип таких штаммов CTXφ$^-$VPI$^+$VSP$^-$. Вместе с тем штаммы с эндемичных территорий, полные геномы которых представлены в GenBank, не содержат лишь одного или двух профагов (CTXφ или CTXφ и RS1φ) и имеют генотип CTXφ$^-$VPI$^+$VSP$^+$. Кроме того, при филогенетическом SNP-анализе установлено, что CTXφ$^-$VPI$^+$VSP$^+$ штаммы с эндемичных территорий входят в одну группу с токсигенными. Это может свидетельствовать о том, что такие штаммы являются производными токсигенных, утратившие профаг CTXφ при существовании в водных условиях. В то же время CTXφ$^-$VPI$^+$VSP$^-$ штаммы представляют собой независимую филогенетическую группу, не связанную с токсигенными и CTXφ$^-$VPI$^+$VSP$^+$ штаммами. В этой связи эпидемическая

значимость нетоксигенных *ctxAB*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ не может быть одинаковой. Штаммы, лишенные 4-х МГЭ, эпидемически безопасны, тогда как штаммы с отсутствием лишь профага CTXφ могут представлять потенциальную эпидемическую опасность, а выделение таких штаммов на территории России может служить косвенным признаком более раннего заноса токсигенных штаммов.

Цель работы состояла в разработке способа дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с разной эпидемиологической значимостью.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенные на территории России в разные годы. Бактериальную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (Интерлабсервис). Амплификацию проводили на программируемом амплификаторе «Mastercycler Gradient», (Eppendorf, Германия) при следующих условиях: температура денатурации – 95°С в течение 5 мин; 32 цикла – денатурация ДНК при температуре 94°С в течение 30 сек, отжиг праймеров 56,7°С – 30 сек, синтез комплементарной цепи при температуре 72°С – 30 сек, заключительный синтез комплементарной цепи при температуре 72°С в течение 1 мин. В работе использовали праймеры, рассчитанные с помощью программ IntegratedDNATechnologies (http://eu.idtdna.com/site) и OligoAnalyzer 1.0.2. Детекцию продуктов амплификации после ПЦР осуществляли методом горизонтального гель-электрофореза в 1,5 % агарозном геле и последующей визуализацией с помощью гель-документирующей системы VersaDoc и пакета программ Quantity One (США).

*Результаты исследования.*В качестве ДНК мишеней были выбраны четыре гена: *ctxA*, кодирующий А-субъединицу холерного токсина и входящий в состав профага CTXφ, ген *tcpA,* определяющий биосинтез основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей из острова патогенности VPI-1, VC0180 - гипотетический белок, входящий в состав острова пандемичности VSP-I, и VC0514- метил-акцептирующий белок хемотаксиса из VSP-II. Выбор генов VC0180 и VC0514 из островов пандемичности VSP-I и VSP-II соответственно обусловлен их постоянным присутствием во всех токсигенных и *ctxAB*$^{-}$*tcpA*$^{+}$ штаммах *V.cholerae* биовара Эль Тор, имеющих как полные, так и делетированные острова пандемичности. Одновременная амплификация фрагментов четырёх генов с образованием ампликонов размерами 456 п.н. (*tcpA*), 525 п.н. (*ctxA*), 604 п.н. (VC0514) и 719 п.н. (VC0180) указывает на то, что данный штамм является токсигенным эпидемически опасным (рис. 1, дорожки 1, 2). Образование 3-х фрагментов размерами 456 п.н. (*tcpA*), 604 п.н. (VC0514) и 719 п.н. (VC0180) позволяет обнаружить нетоксигенный штамм, несущий в геноме не только остров патогенности VPI-1, но и два острова пандемичности VSP-I и VSP-II, т.е. штаммы с генотипом CTXφ^{-}VPI^{+}VSP^{+},

которые представляют потенциальную эпидемическую опасность (рис. 1, дорожка 3). При амплификации одного фрагмента размером 456 п.н., соответствующего гену *tcpA*, можно сделать вывод о выявлении нетоксигенных, эпидемически безопасных штаммов с генотипом CTXφ^{-} VPI^{+}VSP^{-}(рис. 1, дорожки 4, 5).

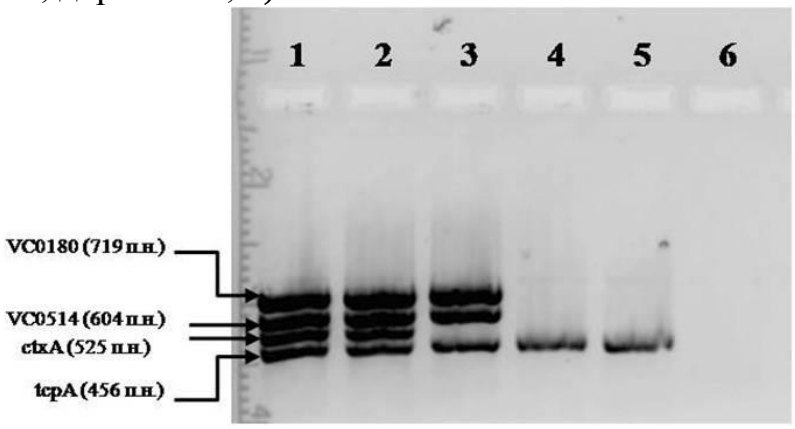


Рисунок 1. Результаты определения генов *ctxA, tcpA,* VC0514 и VC0180 у исследуемых штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Примечание: токсигенные эпидемически опасные штаммы *V. cholerae*; 1−M888 (Астрахань, 1970), 2−P18899 (Мурманск, 2006); нетоксигенный потенциально эпидемически опасный штамм *V. cholerae*; 3−M888D (производный M888); нетоксигенные эпидемически безопасные штаммы *V. cholerae* 4−M1501 (Калмыкия, 2011); 5−M1518 (Калмыкия, 2012); 6−отрицательный контроль (очищенная вода).

Таким образом, разработанный нами способ дифференциации нетоксигенных штаммов с различной эпидемической значимостью предоставляет возможность быстрого выявления нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и пандемичности, что позволяет использовать его в качестве дополнительного метода при определении эпидемиологической значимости штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных как от людей, так и из объектов окружающей среды.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. O'shea Y. A. et al. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Т. 42. – №. 10. – С. 4657-4671.

2. Teschler J. K. et al. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio cholerae* biofilms // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – Т. 13. – №. 5. – С. 255-268.

3. Титова С.В. и др. Холера: Оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогнозна 2016 г. // Пробл. особоопасныхинф. – 2016. - №1. – С. 20-27.

4. Waldor M. K., Mekalanos J. J. Lysogenic conversion by a

filamentous phage encoding cholera toxin // Science. – 1996. – Т. 272. – №. 5270. – С. 1910-1914.

ПОИСК ШТАММА-ПРОДУЦЕНТА ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ПРЯМОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH) *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

О.А. Рыковская, О.С. Чемисова, М.В. Полеева, Е.М. Санамянц

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

Vibrio parahaemolyticus – основная причина пищевых токсикоинфекций, особенно в Японии, Юго-Восточной Азии и Приморском крае [1]. Развитие болезни связано с употреблением в пищу сырых или недостаточно термически обработанных морепродуктов. Почти у всех клинических штаммов отмечается положительная гемолитическая реакция на специальной среде – агаре Вагатцума, получившая название феномена Канагава (КР). Показано наличие прямой корреляции между Канагава-позитивными штаммами и продукцией термостабильного прямого гемолизина (TDH). Этот гемолизин проявляет энтеротоксигенные, кардиотоксические и цитотоксические свойстваза счет нарушения потока ионов в клетках. Канагава-позитивные и Канагава-промежуточные штаммы рассматриваются как потенциально опасные. У Канагава-негативных штаммов в большинстве случаев ген *tdh* отсутствует. Однако Канагава-негативные, как и Канагава-промежуточные штаммы могут содержать *tdh*, который не экспрессируется, либо экспрессируется слабо и непостоянно. Было показано, что утрата $КР^{+}$фенотипа может быть обусловлена двумя нуклеотидными заменами в промоторной области гена *tdh*. Штаммы с характеристикой $tdh^{+}КР^{-}$ следует считать потенциально опасными, поскольку одна точечная мутация в промоторе может привести к возникновению $КР^{+}$ клонов [2]. Поэтому для изучения патогенеза заболевания, а также для прикладных целей, связанных с лабораторной диагностикой, необходимы препараты токсинов и, следовательно, их продуценты. В связи с этим целью настоящей работы явился подбор штамма-продуцента термостабильного прямого гемолизина (TDH) *V. parahaemolyticus.*

Поиск продуцента термостабильного прямого гемолизина (TDH) проведен среди 250 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных на территории России и сопредельных стран с 1973 по 2015 год и хранившихся в Музее живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Гемолитическую активность парагемолитических вибрионов изучали в тесте Канагава по способности лизировать эритроциты человека на среде Вагатцума. Штаммы оценивали как Канагава-позитивные, если зона чёткого лизиса достигала 3-х и более миллиметров, считая от края колонии до наружного края зоны. При зоне менее 3 мм результат оценивали как слабоположительный [3].

У всех исследуемых штаммов была проведена ПЦР-детекция генов *tdh*и *trh* [4] с использованием праймеров, предложенных Hayashi S. et al., 2006 [5].

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Нуклеотидные последовательности праймеров	Длина ампл.,п.н
Tdh	CCACTACCACTCTCATATGC	251
	GGTACTAAATGGCTGACATC	
Trh	TTGGCTTCGATATTTTCAGTATCT	485
	CATAACAAACATATGCCCATTTCCG	

Цитотоксичность определяли на культуре клеток мышечных фибробластов L-929 [6].

На первом этапе нашей работы все исследуемые штаммы *V. parahaemolyticus* были протестированы на наличие гемолитической активности на среде Вагатцума (тест Канагава) и генов *tdh* и *trh* (методом ПЦР). При сравнительном изучении гемолитической активности парагемолитических вибрионов на среде Вагатцума и наличия в геноме основных детерминант патогенности - термостабильного прямого гемолизина (TDH) и TDH-родственного гемолизина (TRH) - было показано, что большинство $tdh^{+}trh^{-}$ штаммов были Канагава-позитивными, тогда как большинство $tdh^{-}trh^{-}$ штаммов не вызывали гемолиза (Канагава-негативные), что совпадает с литературными данными. По результатам теста Канагава исследуемые культуры были разделены на 3 группы. Первая включала Канагава-позитивные штаммы ($КР^{+}$), которые образовывали на среде Вагатцума четкую зону β-гемолиза, вторая – Канагава слабопозитивные (промежуточные) ($КР^{+-}$), у которых слабовыраженная зона неполного гемолиза наблюдалась не во всех повторностях опыта, и третья – Канагава-негативные ($КР^{-}$), т.е. полностью лишённые гемолитической активности. $КР^{+}$ штаммы выделены преимущественно от больных. Культуры, изолированные от вибрионосителей и из объектов окружающей среды, за редким исключением отнесены к Канагава-негативным, т.е. авирулентным. У 10 $КР^{+-}$ штаммов оценка вирулентности по этому тесту вызывала затруднение. 19,2 % $КР^{-}$ культур, выделенных от больных, не обладали способностью лизировать эритроциты на среде Вагатцума.

Далее мы из числа всех протестированных штаммов провели отбор штаммов, величина зоны гемолиза которых через 48 часов составила 5 мм.

Затем у отобранных штаммов с высокой гемолитической активностью дополнительно провели оценку цитотоксических свойств на культуре клеток L-929. Наибольшая цитотоксическая активность была выявлена у *tdh*$^{+}$*trh*$^{-}$ штамма *V. parahaemolyticus* 14810, выделенного от больного в 1974 году в г. Новороссийске (серогруппа O4:K12). Таким образом, выявленная высокая гемолитическая и цитотоксическая активность этого штамма может служить основанием для использованияего в качестве продуцента TDH.

В результате проведенного исследования изучена гемолитическая активность коллекционных штаммов *V. parahaemolyticus* разных серогрупп и генотипов в тесте Канагава и цитотоксическая активностьна культуре клеток. Из числа Канагава-позитивных и обладающих геном *tdh* был выбран штамм *V. parahaemolyticus*, обладающий высокой гемолитической активностью, определяемой на среде Вагатцума, и цитотоксической на культуре клеток L-929. Данный штамм-продуцент TDH может быть использован для получения и изучения функциональных особенностей термостабильного прямого гемолизина *V. parahaemolyticus*.

СПИСОКЛИТЕРАТУРЫ

1. Joseph S. W., Colwell R. R., Kaper J.B. *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic Vibrios // Crit. Rev. Microbiol. – 1982. – Vol. 10, № 1. – P. 77 - 124.

2. Подойницына О. А. Генотипическая характеристика штаммов *V. parahaemolyticus*, циркулирующих на территориях России и сопредельных государств: Автореф. дис…. канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2013. – 23 с.

3. МУК 4.2.2046–06. Методы выявления и определения парагемолитических вибрионов в рыбе, нерыбных объектах промысла, продуктах, вырабатываемых из них, воде поверхностных водоемов и других объектах: Методические указания. – М. Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. – 26 с.

4. МУК 1.3.2569–09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I - IV групп патогенности. Методическиеуказания (утв. Роспотребнадзором 22.12.2009).

5. Hayashi S., Okura M., Osawa R. Soft-agar-coated filter method for early detection of viable and thermostable direct hemolysin (TDH) – or TDH-related haemolysin-producing *Vibrio parahaemolyticus* in sea food // Appl. Environ. Microbiol. – 2006. – Vol. 72, № 7. – P. 4576 - 4582.

6. Чемисова О.С., Рыковская О.А., Смоликова Л.М., Даликова Р.Р., Алексеева Л.П., Татаренко О.А. Изучение биологической активности штаммов *Vibrio parahaemolyticus* // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии Координационного научного совета по

санитарно-эпидемиологической охране территории РФ. – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2012. – Вып. 25. – С. 137 - 140.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

РЕЗУЛЬТАТ ПЕРЕСМОТРА НАУЧНОЙ ТЕМАТИКИ, ВЫПОЛНЯЕМОЙ УЧРЕЖДЕНИЯМИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА В РАМКАХ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ 48.04 «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

С.В. Титова, И.А. Щипелева, Л.П. Алексеева, Е.И. Марковская

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

В соответствии с Решением о пересмотре всей научной тематики, принятым по результатам работы Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2015 г., переходящие темы всех противочумных институтов были скорректированы с целью повышения их эффективности, практической значимости, комплексности и оптимизации сроков выполнения исследований. Плюс к 8 НИР, завершенных в 2015 г. согласно плану, досрочно была завершена разработка еще 5 тем. Для части научно-исследовательских работ (НИР) были сокращены сроки их выполнения. С целью исключения дублирования тематики, в результате проведенной работы, было принято решение о комплексной межинститутской разработке 10 приоритетных, наиболее актуальных на сегодняшний день направлений исследований по Проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы».

Направление совершенствования эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации реализуется Ростовским-на-Дону, Иркутским противочумными институтами и Российским противочумным институтом «Микроб» в рамках 3 совместных НИР. Результатом выполнения данного направления исследований будет научное обоснование районирования административных территорий РФ по типам эпидемических проявлений холеры с определением соответствующей тактики надзора [1] и переработка действующих СП по эпидемиологическому надзору за холерой на территории РФ. Методы организации и проведения противохолерных мероприятий будут усовершенствованы. На случай выделения от людей или из объектов окружающей среды нетоксигенных, но содержащих токсинкорегулируемые пили (ctxAB$^-$ tcpA$^+$) штаммов *V. cholerae,* будет определен порядок проведения санитарно-противоэпидемических мероприятий [2]. Продолжается работа по созданию информационного

фонда по холере: формируются проблемно-ориентированные базы данных и пополняются базы данных ГИС «Холера Эль-Тор. Мир» (глубина ретроспективы – с 1961 г.), «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия» (с 1970 г.), «Холерные вибрионы. Россия» (с 1990 г.), «Холера, обусловленная ctx$^-$ холерными вибрионами. Россия» (с 1999 г.), «Холера 1989-2014» и «Холера. Штаммы - VNTR». Вся эта информация используется для оценки состояния и тенденций заболеваемости холерой, характеристики причинно-следственных связей активизации эпидемического процесса при холере на различных территориальных уровнях, а также составления ежегодных прогнозов по эпидемиологической ситуации по холере на глобальном уровне и в России.

Ростовским-на-Дону, Иркутским, Ставропольским противочумными институтами и Российским противочумным институтом «Микроб» совместно в рамках 1 общей НИР решаются вопросы совершенствования мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды. В сравнительном аспекте продолжается изучение свойств штаммов холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды на разных территориях России. Изучается стабильность отдельных генетических локусов разных групп штаммов *V. cholerae* в неблагоприятных условиях окружающей среды. Результатом данных исследований, осуществленных с помощью разработанных ПЦР-тест систем, будет дополнение системы мониторинга молекулярно-генетическим анализом основных генов патогенности, кодирующих биосинтез энтеротоксина Эль Тор или классического типов. Будет разработана схема молекулярного типирования галофильных вибрионов, изолируемых от больных и из объектов окружающей среды.

Планируется дать оценку эффективности подходов к молекулярному типированию в рамках оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа для выяснения путей заноса и распространения холеры на территории, а также при изучении эволюционной истории патогена. Будет оптимизирован алгоритм молекулярного типирования штаммов холерных вибрионов. Разработан новый комплексный метод VNTR-, INDEL-типирования штаммов [3].

Планируется включение MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа в схему бактериологического исследования на холеру. Сравнительные (мультицентровые) испытания позволят оценить эффективность и диагностическую ценность MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов в системе микробиологического мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды в сопоставлении с классической бактериологической идентификацией и молекулярно-генетическим определением таксономической принадлежности изолируемых культур.

Осуществляется ретроспективный и оперативный анализ

показателей высеваемости микроорганизмов рода *Vibrio* в стационарных точках отбора проб на территориях, относящихся к разным типам по эпидемическим проявлениям холеры [4]. На основании данных ретроспективного анализа предполагается разработка и внедрение алгоритма мониторинговых исследований вибриофлоры с учетом внутрисубъектовой дифференциации по степени риска сохранения и накопления в водных объектах микроорганизмов рода *Vibrio*. Запланирована оценка полноты охвата диагностическими исследованиями на холеру определенных нормативными документами контингентов риска.

Две НИР Ростовского-на-Дону противочумного института, выполняемые совместно с Ростовским-на-Дону институтом микробиологии и паразитологии, территориальным управлением Роспотребнадзора по Ростовской области и ФБУЗ ЦГиЭ по Ростовской области, посвящены изучению экологии возбудителя холеры. В результате выполнения данных НИР предполагается определение родственных связей между атоксигенными культурами, оценка роли природных популяций холерных вибрионов, циркулирующих в России, как резервуаров разных аллелей генов факторов патогенности и персистенции, а также выяснение возможного происхождения токсигенных культур. Получены данные о взаимодействии и возможном конкурентном воздействии представителей автохтонной вибриофлоры в отношении завозных токсигенных холерных вибрионов. С помощью INDEL-маркеров разработан способ оценки внутривидовой конкурентной активности вибрионов в планктонной форме и в составе биопленки [5]. Изучается роль биоплёнки *Vibrio cholerae* в обеспечении персистенции холерных вибрионов во внешней среде, в повышенной инфекциозности, в способности противостоять воздействию дезинфектантов, антибиотиков и других неблагоприятных факторов [6]. Разработаны способы получения биоплёнок, отвечающие требованиям биологической безопасности, предъявляемым к работе с возбудителями II группы патогенности [7]. Планируется проведение сравнительного биоинформационного анализа факторов персистенции штаммов холерных вибрионов, различающихся по способности к выживанию в объектах окружающей среды. По результатам оценки вибриопейзажа поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону планируется создание паспорта. Результаты выполнения данных исследований будут использованы при организации мероприятий по улучшению санитарно-гигиенического состояния поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону для обеспечения биологической безопасности при проведении массовых мероприятий с международным участием в 2018 г.

Работа Ростовского-на-Дону противочумного института по научному обоснованию внедрения положений Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении имина территории РФ с целью предотвращения заноса возбудителя холеры и

других патогенных для человека вибрионов продолжается совместно с территориальным управлением Роспотребнадзора по Ростовской области. Результатом выполнения исследований в данном направлении будут предложения к эпиднадзору за холерой в части, касающейся мониторинга воды поверхностных водоемов в акватории международных портов, и дополнения к СП «Профилактика холеры». Будет дана эпидемиологическая оценка способов деконтаминации водяного балласта, изучена возможность применения химических препаратов, их влияние на эксплуатационные свойства балластных танков и экосистему.

Все противочумные институты, в рамках 3 совместных НИР, принимают участие в комплексном анализе механизмов изменения вирулентных, иммуногенных и адаптивных свойств природных штаммов возбудителя холеры в современный период его эволюции. В результате выполнения данных тем будут разработаны молекулярно-генетические критерии оценки эпидемического и патогенетического потенциала возбудителей и вероятности их сохранения в объектах окружающей среды. Анализ генетического разнообразия интегративных конъюгативных элементов штаммов *V. cholerae*, изолированных на территории РФ, позволит определить их роль в формировании комбинаций генов, расширяющих адаптационный потенциал микроорганизма. Запланировано создание электронной базы данных нуклеотидных последовательностей ICE. Будут изучены молекулярные механизмы персистенции и закономерности адаптации типичных, генетически измененных и авирулентных штаммов *V. cholerae* (в том числе в некультивируемом состоянии и в составе биоплёнки). Запланировано исследование состава, генетической структуры и особенностей функционирования микробного сообщества (метагенома) в организме экспериментальных животных и воде и определение способов взаимодействия возбудителя холеры с другими представителями микробиоценоза. Будет оценен потенциал для трансформации биологических свойств *V. cholerae*, в том числе патогенный потенциал, в определенных экологических нишах. С учетом РНК-омных данных предполагается выработка предложений по дополнению систем генодиагностики вирулентности *V. cholerae* O1 серогруппы.

Запланировано конструирование донорных штаммов, способных к переносу профага CTXφ классического типа в типичные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, для последующего получения геновариантов, содержащих профаг CTXφ классического типа. Будут изучены структуры ключевых генов патогенности у полученных геновариантов на основе секвенирования.

Осуществляется полногеномное секвенирование токсигенных инетоксигенных, но содержащих токсинкорегулируемые пили ($ctxAB^-$ $tcpA^+$) штаммов *V. cholerae*. В результате проведения запланированных

исследований намечается разработка и государственная регистрация пакета программ для анализа полногеномных сиквенсов вибрионов.

Для быстрого анализа результатов полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae*, с определением вида, серогруппы, биовара анализируемого штамма, а также ряда мобильных генетических элементов и островков, в Ростовском-на-Дону противочумном институте разработана программа SeqAnalyzer. 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/).

В Ростовском-на-Дону противочумном институте разрабатывается направление по созданию новых эффективных фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов. Осуществлен поиск вирулентных рас диагностических холерных фагов, активных в отношении фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор. В результате проведенных исследований получен диагностический холерный фаг для идентификации холерных вибрионов Эль Тор [8].

Специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института запланировано создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов. Результатом разработки данного направления будет расширенная молекулярная характеристика и паспортизация имеющихся на сегодняшний день плазмид, включая секвенирование клонированных в их составе генов и биоинформационный анализ их продуктов. Предполагается конструирование новых плазмид, более эффективно экспрессирующих гены холерного токсина, гемолизина и нейраминидазы *V. cholerae* под контролем мощных промоторов, входящих в состав векторов нового поколения. Предполагается создание штаммов *Escherichia coli* – суперпродуцентов белков *V. cholerae*, необходимых для получения основ диагностических и вакцинных препаратов и фундаментальных исследований. Специалистами Российского противочумного института «Микроб» на основе нетоксигенного варианта штамма геновариант 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 [9].

С целью оптимизации лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института разработана и готовится к государственной регистрации предназначенная для идентификации и дифференциации

холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп в прямых вариантах ИФА тест-система видо- и сероваростпецифических моноклональных антител пероксидазных конъюгатов [10]. С целью последующей государственной регистрации получен и охарактеризован препарат термостабильного гемолизина *V. parahaemolyticus*, оценена диагностическая значимость полученных к нему сывороток. [11].

Специалистами Иркутского противочумного института запланирована разработка ПЦР тест-системы для детекции клинически значимых микроорганизмов рода *Vibrio.*

В Ростовском-на-Дону и Иркутском противочумных институтах разрабатываются ПЦРтест-системы для детекции галофильных вибрионов в исследуемом материале.

Специалистами Ставропольского противочумного института осуществляется разработка ПЦРтест-систем обеспечивающих возможность детекции, идентификации и генотипирования *V. cholerae* Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные варианты. Планируется внедрение магноиммуносорбентных технологий для мониторинга за возбудителем холеры в объектах окружающей среды.

Результатом исследования Ростовского-на-Дону противочумного института, посвященного изучению механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиску высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности, будет созданная с использованием ГИС-технологий пространственно-ориентированная база данных резистентности штаммов холерных вибрионов, выделенных на различных территориях РФ из водных источников и от людей, а также ряд отобранных комбинаций антибактериальных препаратов и комбинаций антибиотиков с различными биологически активными веществами, способных к преодолению антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae*.

В направлении оптимизации специфической профилактики холеры совместно Ростовским-на-Дону противочумным институтом и Российским противочумным институтом «Микроб» предполагается экспериментальное обоснование возможности повышения иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бивалентной химической вакцины с помощью разных по происхождению иммуномодуляторов.

В результате пересмотра научной тематики, выполняемой учреждениями Роспотребнадзора в рамках Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы», все текущие научные исследования приведены в соответствие требованиям сегодняшнего дня и направлениям утвержденной Приказом Роспотребнадзора № 5 от 13.01.2016 г. Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и

паразитарными болезнями».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии: от общей тактики до дифференцированного объема мероприятий с учетом районирования страны по типам эпидемических проявлений холеры (Сообщение 1) // Здоровье населения и среда обитания.- 2015. - № 9. - С. 43-47.
2. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. и др. Совершенствование эпидемиологического надзора за холерой в России в период седьмой пандемии (Сообщение 2) // Здоровье населения и среда обитания. - 2015. - № 10. - С. 47-51.
3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. и др. Алгоритм анализа результатов полногеномного секвенирования на примере штаммов возбудителя холеры, выделенных на территории Российской Федерации // Мол.диагностика.- 2014. - Том 1. - С. 461-462.
4. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю. и др. Актуальные вопросы совершенствования мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов в системе эпидемиологического надзора за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып. 28.-С. 37-44.
5. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П. и др. Разработка метода оценки внутривидовой конкуренции холерных вибрионов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып. 28.-С. 116-119.
6. Титова С.В., Веркина Л.М., Кирилова О.Д. и др. Действие перекиси водорода и хлорамина Б на биоплёнки холерных вибрионов // Дезинфекционное дело.-2015.-№ 3.-С. 6-13.
7. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Использование нового метода изучения динамики образования биоплёнок холерными вибрионами в условиях, приближенных к естественным // Известия ВУЗ Сев.- Кав. Региона.- Естественные науки.- 2014.- № 5.- С. 73-77.
8. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных для человека вибрионов // Клин.лаб. диагностика.-2015.-№ 4.-С. 62-64.
9. Щелканова Е.Ю., Кульшань Т.А., Заднова С.П. и др. Конструирование штамма-продуцента В-субъединицы холерного токсина на модели атоксигенного геновариантa *Vibrio cholerae* // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып. 28.-С. 144-146.
10. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В. и др.

Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов серогрупп О1, О139 в реакции дот-иммуноанализа // Клин.лаб. диагностика. - 2013.-№ 3. -С. 26-29.

11. Даликова Р.Р., Чемисова О.С., Писанов Р.В. и др. Получение иммунных сывороток к термостабильному прямому гемолизину Vibrio parahaemolyticus // Матер. VII Ежегод. Всерос. Конгресса по инф. бол-ням с международ. участ.- М., 2015. // Инф. болезни.-2015.- Т. 13, Прилож. 1.- С. 103.

РЕШЕНИЕ ВОПРОСОВ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО ХОЛЕРЕ И ОБЕСПЕЧЕНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РАМКАХ ТЕМАТИЧЕСКОЙ РАБОЧЕЙ ГРУППЫ

С.В. Титова, Л.П. Алексеева, Е.И. Марковская, И.А. Щипелева

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

По распоряжению Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека для профилактики холеры на современном этапе и формирования программных документов стратегии мониторинга была организована тематическая рабочая группа. В состав рабочей группы вошли ведущие эпидемиологи, микробиологи и специалисты в области молекулярной биологии и генетики противочумных институтов Роспотребнадзора для комплексного подхода к решению поставленных задач в масштабе всей противочумной системы, с целью межрегионального взаимодействия учёных, занимающихся проблемой «Холера и патогенные для человека вибрионы». Председателем комиссии назначена директор ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора С.В. Титова.

Совместно с сотрудниками ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора составлен общий план по реализации основных направлений стратегии совершенствования эпидемиологического надзора и противохолерных мероприятий в Российской Федерации. План согласован с ФКУЗ Иркутский и Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора и подписан директорами противочумных институтов.

В план рабочей группы включены разделы: эпидемиологический надзор за холерой; микробиология и лабораторная диагностика; разработка и переиздание (переработка) нормативно-методических документов,

посвящённых проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы». Из числа членов рабочей группы назначены специалисты,ответственные за определённые направления работы.

Заседания тематической рабочей группы в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте проводятся по мере поступления вопросов, требующих решения.

Информация о состоявшихся заседаниях и принятых решениях доведена до сведения всех противочумных институтов. Осуществляется взаимодействие по всем обсуждаемым вопросам в интерактивном режиме.

Удалось решить ряд вопросов, касающихся систематики, номенклатуры и терминологии, обсудить проект документа Федерального уровня внедрения по районированию Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры, рассмотреть вопросы обеспеченности диагностическими препаратами и питательными средами.

Осуществлён ретроспективный анализ нормативной документации, касающейся эпидемиологического надзора за холерой, в плане оценки эпидзначимости атоксигенных штаммов, необходимости дифференцированного проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Проведена большая аналитическая работа с учётом мнения всех учёных, приславших свои предложения, по систематизации данных и определению понятия «возбудитель холеры», а также терминов «токсигенный» или «холерогенный», принято общеезаключение:

Возбудителями холеры являются эпидемически значимые, содержащие гены холерного токсина (*ctxAB*$^{+}$) и токсин-корегулируемыхпилей (*tcpA*$^{+}$) *Vibrio cholerae* O1 серогруппы, биоваров classical и El Tor, а также *Vibrio cholerae* O139 серогруппы.

Выделенные из поверхностных водоёмов и других объектов окружающей среды нетоксигенные (не содержащие гена холерного токсина–ctxAB^{-}) холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп могут вызывать единичные заболевания (вибриононосительство) и вспышки острой кишечной инфекции установленной этиологии.

Обсуждение вопросов о правомочности существования терминов «токсигенный» или «холерогенный» привело к общему заключению, что во всех ранее разработанных и действующих методических и правовых документах использовался термин «токсигенные» и «нетоксигенные». В проекте Санитарно-эпидемиологических правил «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», представленных в Роспотребнадзор на утверждение, тоже использована эта терминология. В связи с этим рекомендовано оставить термин «токсигенные» *V. cholerae* El Tor ctxAB^{+} и «нетоксигенные» *V. cholerae* El Tor ctxAB^{-}.

Проект нормативно-методического документа на основе

переработанных методических рекомендаций «Порядок определения эпидемического потенциала административной территории для районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры», авторами которого являются сотрудники ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, был обсуждён на заседании рабочей группы. Документ рассмотрен во всех научно-исследовательских противочумных институтах, после чего обсуждён на заседании Учёного Совета Ростовского-на-Дону противочумного института, утверждён директором института и направлен в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Работа тематической группы проходит в период наступившего эпидемического сезона, что ещё сильнее подчёркивает актуальность поставленных задач. Большое значение имеет тенденция совершенствования лабораторной диагностики холеры. Проведён анализ перечня используемых диагностических препаратов с целью совершенствования мониторинга холеры и исключения дублирования исследований, направленных на разработку препаратов. В проект МУК 4.2…. «Лабораторная диагностика холеры» внесены изменения: сокращено количество диагностических тестов до 10; в этапы диагностики включены методы с использованием новых зарегистрированных препаратов на основе флуоресцирующих и агглютинирующих моноклональных антител, ИХА тест-полосок, а также масс-спектрометрии.

Рассмотрены перспективы государственной регистрации диагностических препаратов. Получена информация обиспользуемых в практике диагностики холеры ПЦР тест-системах, прошедших государственную регистрацию, и экспериментальных тест-системах, имеющихся в арсенале противочумных институтов. Отмечены следующие проблемы: отсутствие контрольной панели образцов ДНК холерного вибриона, сложности диагностики проб объектов окружающей среды в связи с неопределённостью сроков сохранения ДНК. Обсужден вопрос о нецелесообразности проведения ПЦР-диагностики объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов

В соответствии с Резолюцией совещания специалистов Роспотребнадзора 2014 года по вопросам совершенствования эпиднадзора за холерой, утверждённой руководителем Роспотребнадзора А.Ю. Поповой, пункт 2.8 «Обеспечить проведение научных исследований по подбору новых популяций фагов с целью совершенствования идентификации штаммов *Vibrio cholerae*», специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института была запланирована тема «Совершенствование фаговой диагностики холерных вибрионов Эль Тор». В результате выполнения данной темы были получены новые расы бактериофагов для диагностики холерных вибрионов, экспериментальные

серии направлены в противочумные учреждения Роспотребнадзора для подтверждения их эффективности на свежевыделенных штаммах холерного вибриона из объектов окружающей среды. С 2017 года планируется научная тема «Усовершенствование диагностического препарата на основе бактериофагов для дифференциации холерных вибрионов О1 серогруппы» совместно с ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» с целью улучшения диагностики холеры. В основе научных разработок будут использованы полученные ранее и охарактеризованные по биологическим свойствам новые расы холерных бактериофагов.

В плане совершенствования лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой продолжается интенсивная работа по разработке и регистрации питательных сред для холерного вибриона. Представлена информация о разработанных базовых средах для холерного вибриона сухих и готовых к использованию, элективно-дифференциальных, а также о перспективах государственной регистрации: ХДС-агара – декабрь 2016 г., ХДС-Н – декабрь 2017 г., СЭДХ-М – декабрь 2018 г.

Деятельность тематической рабочей группы будет продолжена в соответствии с планом работы и с учётом вновь возникающих конкретных ситуационных задач текущего эпидемического сезона.

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНЫХ РАЗРАБОТОК ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ», ВЫПОЛНЯЕМЫХ В РОСТОВСКОМ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОМ ИНСТИТУТЕ В 2016 ГОДУ

И.А. Щипелева, Е.И. Марковская, С.В. Титова, Л.П. Алексеева

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

В 2016 г. во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» выполнялось 15 научно-исследовательских работ (НИР), из них 2 – завершаются в 2016 г., а выполнение 13 переходящих тем будет продолжено в 2017 г.

48.04.01 Экология вибрионов, эпидемиология холеры и эпиднадзор

В рамках направления «Совершенствование эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации. Оптимизация эпидемиологических и других информационно-аналитических критериев при районировании, как подсистеме эпидемиологического надзора, а также мониторинге и прогнозировании холеры» завершается 1 тема и продолжается выполнение 2 тем:

- 150-4-12 «Информационное обеспечение научных исследований по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» с использованием информационных технологий» (срок выполнения темы: 2012-2016 гг., руководитель НИР:Э.А. Москвитина).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Сформирована информационно-библиографическая база данных «Холера и патогенные для человека вибрионы». Эта база данных формируется с 1987 г. по настоящее время и включает 12965 рефератов.За период выполнения НИР в базу данных было введено 2096 рефератов (821 из отечественных источников и 1275 из зарубежных), использовано 112 отечественных источников литературы, в том числе 25 периодических изданий, а также 367 зарубежных источников, в том числе из базы данных «PubMed» и из on-line журналов. В базу данных заложена достоверная и идентичная информация, то есть соответствующая первоисточнику. Рефераты включены в рубрики по разделам «Холера», «Холерные вибрионы не O1/не O139» и «Холерные вибрионы других видов». Выпущены библиографические указатели «Холера и патогенные для человека вибрионы», с включением литературы за 2011, 2012, 2013, 2014, 2015 гг. Рефераты в разделах сгруппированы по 12 рубрикам: 1. Общие

вопросы; 2. Эпидемиология; 3. Борьба и профилактика; 4. Микробиология; 5. Биохимия; 6. Генетика, молекулярная биология; 7. Токсины; 8. Лабораторная диагностика; 9. Патогенез; 10. Клиника, лечение; 11. Иммунология, вакцины; 12. Биологическая безопасность и биотерроризм.

- 165-4-14 «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2014-2017 гг., руководитель НИР:Э.А. Москвитина).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Разработаны и направлены для утверждения в Роспотребнадзор Методические рекомендации «Порядок определения эпидемического потенциала административной территории для районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры» (уровень внедрения – федеральный). Методика определения эпидемического потенциала административной территории при холере предусматривает анализ и оценку комплекса показателей, характеризующих эпидемические проявления холеры, контаминацию холерными вибрионами поверхностных водоемов, используемых в качестве источников хозяйственно-бытового и рекреационного водопользования, миграцию населения различными видами международного транспорта, данные социально-гигиенического мониторинга поверхностных водоемов I и II категорий по территориям, отнесенным ранее к различным типам по эпидемическим проявлениям холеры.
- В субъектах Российской Федерации проведена ревизия стационарных точек отбора проб на соответствие СП 3.1.1.2521-09. Для определения степени потенциальной эпидемической опасности субъектов Российской Федерации осуществляется эпидемиологическая оценка и анализ эпидемических проявлений холеры; контаминации холерными вибрионами О1 и О139 серогрупп поверхностных водоёмов, используемых в качестве источников питьевого хозяйственно-бытового централизованного водоснабжения и рекреационного водопользования; миграции населения; эпидемической опасности, связанной с источниками централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения; качества воды централизованных систем хозяйственно-питьевого водоснабжения и водообеспечения населения; качества воды нецентрализованного хозяйственно-питьевого водоснабжения; условий рекреационного водопользования.

На основе разработок, выполненных в рамках темы, Постановлением Главного государственного санитарного врача РФ № 65 от 17.05.2016 г. внесены изменения в СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации».

- 158-4-13 «Конструктивный эпидемиологический анализ при холере в мире, странах СНГ и России с использованием информационных

технологий» (срок выполнения темы: 2013-2017 гг., руководители НИР:Э.А. Москвитина, С.В. Титова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Подготовленное информационное письмо «Эпидемиологическая обстановка по холере в мире в 2015 г. и прогноз на 2016» направлено в Роспотребнадзор и передано Руководителем Роспотребнадзора А.Ю. Поповой для использования в работе руководителям управлений Роспотребнадзора по субъектам РФ и железнодорожному транспорту, руководителям противочумных учреждений Роспотребнадзора, руководителям органов исполнительной власти в субъектах РФ в области охраны здоровья.
- Информация об эпидемиологической обстановке по холере в мире и в России еженедельно представляется в Роспотребнадзор и на сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.
- Анализ эпидемиологической ситуации по холере в мире за 2006 – 2015 гг. и прогноз эпидемиологической ситуации по холере на 2016 г. в мире, странах СНГ и России представлен в 1 номере журнала «Проблемы особо опасных инфекций» за 2016 г.
- Продолжается работа по пополнению проблемно-ориентированных баз данных «Холера Эль-Тор. Мир», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия», «Холерные вибрионы. Россия».

В рамках направления «Научное обоснование внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории Российской Федерации» продолжается выполнение 1 темы:

- 159-4-13 «Изучение способов обработки судового балласта, контаминированного *Vibrio cholerae»* (срок выполнения темы: 2013-2016 гг., руководители НИР:С.Ю. Водяницкая, Л.П. Алексеева, О.С. Чемисова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Предложен метод определения токсичности дезинфектантов in vitro с использованием культур клеток позвоночных, с помощью которого изучена токсическая активность препаратов на основе четвертичных аммонийных соединений в концентрациях, оказывающих бактерицидный эффект. Выявлена корреляция устойчивости у отдельных представителей рода *Vibrio* к антибактериальным препаратам и дезинфицирующим средствам.
- Подобран, охарактеризован и представлен к депонированию тест-штамм *V. cholerae* (III группы патогенности) для использования в лабораторных условиях при оценке бактерицидной активности химических препаратов.

В рамках направления «Изучение экологии возбудителя холеры и других, патогенных для человека вибрионов, с использованием

современных методов. Разработка системы внешнего контроля качества при проведении мониторинга за холерой» продолжается выполнение 2 тем:

- 177-4-15 «Особенности формирования биоплёнки холерными вибрионами и её роль, как патогенного биологического агента (ПБА)» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководитель НИР:С.В. Титова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Показана роль биоплёнок холерных вибрионов в сохранении возбудителя в окружающей среде. Дана сравнительная оценка динамики выживания в окружающей среде холерных вибрионов в виде биоплёнки и в планктонной форме в зависимости от температуры, состава среды, токсигенности.
- Определено дезинфицирующее действие на биоплёнки холерных вибрионов О1, О139 и не О1/не О139 этилового спирта, хлорамина, перекиси водорода, «Велтолена» и др. Установлено, что, по сравнению с планктонными формами, в составе биоплёнок холерные вибрионы достоверно более устойчивы к действию дезинфицирующих средств.
- Показано, что вибрионы в биоплёночной форме высокорезистентны ко всем антибактериальным препаратам, за исключением ципрофлоксацина и цефтазидима.
- Получена приоритетная справка на патент «Способ оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам».
- Изучено влияние холерных бактериофагов на биоплёнку на разных этапах её формирования. Установлено, что при взаимодействии с бактериофагом происходит разрушение протобиоплёнок и зрелых биоплёнок, а в старых биоплёнках происходит формирование резистентности к бактериофагу, который способствует структуризации биоплёнки. Только взаимодействие старой биоплёнки с несколькими вирулентными холерными бактериофагами способствует её разрушению.
- 180-4-15 «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоёмов города Ростова-на-Дону» (срок выполнения темы: 2015-2018гг., руководители НИР:С.В.Титова, С.О. Водопьянов).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- На сайте института создана и работает (в режиме ограниченного доступа для сотрудников Роспотребнадзора по паролю) ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой». ГИС пополняется информацией об уточнённых географических координатах точек отбора проб воды на вибриофлору в Ростовской области и выделенных штаммах.
- Осуществляется сбор информации о физико-химических и санитарно-гигиенических характеристиках водоёмов г. Ростова-на-Дону.
- Получена приоритетная справка на патент «Способ отбора

проб воды с поверхности водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов и переносное устройство для его осуществления».

- При плановом обследовании на вибриофлору стационарных точек с помощью индикаторной системы специально подобранных холерных тест-штаммов проведены исследования по выявлению холерных фагов из проб воды поверхностных водоёмов и стоков канализационных вод.

В рамках направления «Совершенствование мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, с использованием молекулярно-биологических методов» продолжается выполнение 1 темы:

- 157-4-13 «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2013-2017 гг., руководитель НИР:В.Д. Кругликов).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Отобраны наиболее информативные INDEL-маркеры для генотипирования атоксигенных штаммов холерного вибриона. С помощью VNTR- и INDEL-типирования изолируемых штаммов установлена генетическая близость между штаммами 2016 г. и штаммами, выделенными ранее. Установлено, что ряд генотипов штаммов холерного вибриона, выделенных на территории Ростовской области, циркулировали в предыдущие годы, в то время как некоторые штаммы, вероятнее всего, являются заносными.

- Для размещения на Геоинформационном портале института на языке программирования php создана программная оболочка интернет-ГИС. В интернет-ГИС внесены данные о VNTR-генотипах штаммов, выделенных ранее.

- На основе анализа распределения SNP создан авторский алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования. Разработан алгоритм анализа данных полногеномного секвенирования, проведённого на различных технологических платформах. Разработано авторское программное обеспечение на языке Java, реализующее указанные алгоритмы.

- С целью использования в качестве положительных контролей при ПЦР-генотипировании: для выявления у холерных вибрионов генов chxAI и chxAIII депонированы в ГКПБ «Микроб» штаммы *V. cholerae* non O1/non O139, содержащие гены cholix-токсина (chxA) I и III типов, а также для выявления у холерных вибрионов гена rstRenv – штамм *V. cholerae* non O1/non O139 P17449, содержащий аллель гена rstRenv.

48.04.02 Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов

В рамках направления «Комплексный анализ механизмов

изменения вирулентных, иммуногенных и адаптивных свойств природных штаммов возбудителя холеры в современный период его эволюции. Полногеномное секвенирование современных штаммов возбудителя холеры. Создание электронной базы данных полногеномных нуклеотидных последовательностей ДНК возбудителя холеры и других патогенных вибрионов»продолжается выполнение 2 тем:

- 182-4-16 «Молекулярные основы персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов различного происхождения» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководитель НИР:Е.В. Монахова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Проведено полногеномное секвенирование ДНК 42 штаммов холерных вибрионов О1, 4 штаммов О139 и 21 штамма не О1/не О139 серогрупп; сиквенсы депонированы в Российском ГенБанке. В полных геномах идентифицированы и депонированы в NCBI GenBank отдельные гены, их кластеры и мобильные элементы, имеющие отношение к вирулентности и способности к персистенции в разных экологических нишах.
- Усовершенствована авторская программа GeneExpert, позволяющая выявлять набор заранее заданных генов в результатах полногеномного секвенирования без предварительной сборки генома. Разработан алгоритм анализа генов при попадании гена в разные контиги. Создана программа, реализующая указанный алгоритм.
- 171-4-14 «Изучение транс-кодируемых малых РНК, ассоциированных с белком Hfq, *Vibrio cholerae* О1 серогрупп» (срок выполнения темы: 2014-2018 гг., руководитель НИР:Р.В. Писанов).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Подготовлен и направлен в печать обзор литературы «Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae*». Подготовлены к патентованию документы на плазмиду pHFQ30 с клонированным геном hfq *V. cholerae* О1. Подготовлен к депонированию штамм *E. coli* – продуцент рекомбинантного белка *V. cholerae* шаперона Hfq. Подготовлены методические рекомендации по выделению и очистке tesRNA *V. cholerae*.

В рамках направления «Создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов» продолжается выполнение 1 темы:

- 178-4-15 «Формирование коллекции рекомбинантных плазмид, экспрессирующих гены патогенных для человека вибрионов» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководители НИР:Е.В. Монахова,

Р.В.Писанов).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Подготовлены к депонированию: штамм *E. coli* – суперпродуцент прогемолизина *V. cholerae*; а также штаммы-продуценты, содержащие сконструированные рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие гены гемолизина TDH и предполагаемой липазы (CefVp) *V. parahaemolyticus*.

В рамках направления «Создание новых эффективных фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов. Коллекционирование бактериофагов патогенных вибрионов и изучение их геномов методом полногеномного секвенирования с последующим созданием рекомбинантных диагностических бактериофагов» продолжается выполнение 1 темы:

- 179-4-15 «Совершенствование фаговой диагностики холерных вибрионов Эль Тор» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководитель НИР:Н.Е. Гаевская).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Депонирован в ГКПБ «Микроб» тест-штамм *Vibrio cholerae* El Tor 19546 под № КМ-276 для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов. Получены антифаговые сыворотки к четырём холерным фагам новой расы. Успешно проведены учрежденческие и межучрежденческие лабораторные испытания экспериментальных серий новых диагностических холерных фагов для идентификации холерных вибрионов О1 серогруппы. Составлена инструкция по применению диагностических холерных бактериофагов жидких (О1, Cl, El1, El2).
- С помощью экспериментальных диагностических холерных фагов для идентификации холерных вибрионов проводится мониторинг объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов в период их выделения.
- Разработаны методические рекомендации «Правила работы с бактериофагами микроорганизмов I-IV групп патогенности», в которых описаны основные правила работы, необходимое оборудование для работы с бактериофагами, режим работы с бактериофагами и тест-штаммами I-II групп патогенности.

В рамках направления «Анализ механизмов формирования у возбудителя устойчивости к антимикробным соединениям и использование высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности» продолжается выполнение 1 темы:

- 183-4-16 «Экспериментальное обоснование возможных путей преодоления антибиотикоустойчивости у холерных вибрионов» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководители НИР:Л.М. Веркина, Н.А.Селянская).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Дана оценка характера антибиотикоустойчивости у природных штаммов холерных вибрионов. Пополнена база данных «Антибиотикорезистентность клинических штаммов холерных вибрионов».
- Проведено полногеномное секвенирование ряда штаммов с детекцией генов антибиотикорезистентности, выявившее наличие в составе генома интегративного конъюгативного элемента SXT с генами резистентности к стрептомицину (strB) и сульфаметоксазолу (sulII), горячая точка HS3 - ген резистентности к триметоприму (dfrA1).
- Сформирована пространственно-ориентированная база данных «Устойчивость к антибиотикам холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации».
- Отобран и подготовлен для депонирования бактериофаг, активный в отношении антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae*.

48.04.04 Разработка современных медико-иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами

В рамках направления «Оптимизация лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий. Разработка и внедрение современных импортозамещающих и новых питательных сред» завершается 1 тема и выполнение 1 темы продолжается:

- 152-4-12 «Создание видо- и сероваростецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов О1, О139 серогрупп в реакции дот-иммуноанализа» (срок выполнения темы: 2012-2016 гг., руководитель НИР:Л.П. Алексеева).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Подтверждена лабораторными испытаниями диагностическая ценность разработанного набора «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* О1 и О139 (in vitro) методом ИФА и дот-ИФА». Подготовлена нормативная документация на диагностический набор.
- 160-4-13 «Получение и характеристика термостабильного прямого гемолизина *Vibrio parahaemolyticus»* (срок выполнения темы: 2013-2017 гг., руководитель НИР:О.С. Чемисова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Получен и очищен методом хроматографии препарат термостабильного прямого гемолизина, с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии охарактеризован его спектр, полученные результаты могут быть использованы для совершенствования метода определения вирулентности штаммов парагемолитических вибрионов.
- Сконструированы праймеры и зонды видоспецифические к

галофильным вибрионам для ПЦР в режиме реального времени. Подана заявка на патент.

- Получено свидетельство о государственной регистрации базы данных «Гены *Vibrio parahaemolyticus*, содержащие INDEL-маркеры». Гены *V. parahaemolyticus*, отличающиеся по длине у различных штаммов за счет вставок-делеций (Insertion-Deletion, INDEL), были выявлены по результатам компьютерного анализа. Для каждого выявленного INDEL-маркера была определена вариабельность и другие характеристики. В базу данных входят структуры праймеров, предназначенные для практической проверки вариабельности выявленных INDEL-маркеров.

Кроме того, в соответствии с «Сетевым графиком разработки и внедрения препаратов для диагностики особо опасных инфекционных болезней на 2015-2018 гг.» в 2016 г.:

- Завершится процедура государственной регистрации Плотной питательной среды для культивирования и выделения холерного вибриона, готовой к использованию после переплавки «Холерная дрожжевая среда агаризованная (ХДС – агар)». Питательная среда предназначена для выделения от человека и из объектов окружающей среды (ООС) и культивирования штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп. Питательная среда может применяться как в стационарных, так и мобильных лабораториях в полевых условиях и даёт возможность получать оперативную информацию при исследовании материала от людей (больных, вибрионосителей, контактных, декретированных контингентов населения и т.д.) и проведении мониторинга объектов окружающей среды.
- Начата процедура государственной регистрации жидкой накопительной питательной среды для выделения и культивирования холерного вибриона, готовой к использованию «Холерная дрожжевая среда накопительная (ХДС–Н)». Проведены технические испытания на базе аккредитованного испытательного центра. Осуществлена экспертиза и принято решение Регистрирующего органа о проведении клинико-лабораторных испытаний. Питательная среда предназначена для выделения от человека и из объектов окружающей среды (ООС) и культивирования штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп. Питательная среда может применяться как в стационарных, так и мобильных лабораториях в полевых условиях и даёт возможность получать оперативную информацию при исследовании материала от людей (больных, вибрионосителей, контактных, декретированных контингентов населения и т.д.) и проведении мониторинга объектов окружающей среды

В рамках направления «Оптимизация специфической профилактики холеры за счет новых методических подходов»

продолжается выполнение 1 темы:

- 185-4-16 «Повышение иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бивалентной химической вакцины с помощью разных по происхождению иммуномодуляторов у экспериментальных животных» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководитель НИР:И.А. Иванова).

В рамках данной НИР в 2016 г. получены следующие результаты:

- Подготовлен аналитический обзор по проанализированным и обобщенным данным отечественной и зарубежной литературы, посвященным изучению возможности повышения эффективности существующих и экспериментальных вакцин с помощью иммуномодуляторов. Подобраны модели экспериментальных животных для оценки эффективности разных по происхождению иммуномодуляторов при специфической профилактике холеры, а также отработаны способы введения этих препаратов и таблетированной холерной бивалентной химической вакцины, позволяющие обеспечить стандартность и воспроизводимость экспериментов. Изучены различные дозы и схемы применения полиоксидония, миелопида, дерината с целью оценки их влияния на формирование поствакцинального иммунитета у экспериментальных животных.

Таким образом, в 2016 г. во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рамках работы по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» подготовлены и направлены для утверждения проекты 3 инструктивно-методических документа федерального уровня; разработаны 4 инструктивно-методических документа регионального и учрежденческого уровня; подготовлены информационно-методические письма федерального и регионального уровней; депонированы в NCBI GenBank нуклеотидные последовательности ДНК ряда отдельных генов, их кластеров и мобильных элементов; разработан и подготовлен к государственной регистрации пакет программ для анализа полногеномных сиквенсов вибрионов, создано авторское программное обеспечение на языке Java, реализующее указанные алгоритмы; разработана программная оболочка интернет-ГИС; созданы еще 2 ГИС федерального и регионального уровней; продолжается работа по интеграции пополняемых баз данных по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» в геоинформационный портал Ростовского-на-Дону противочумного института; депонированы и подготовлены к депонированию в Государственных коллекциях 10 бактериофагов, гибридом и тест-штаммов микроорганизмов; депонированы штаммы и на учрежденческом уровне; зарегистрировано 3 патента и 2 базы данных, подано ещё 2 заявки на регистрацию патентов; завершается процедура государственной регистрации питательной среды, подготовлены документы для

регистрации еще одной питательной среды и диагностического набора; выпущен библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы»; за первое полугодие 118 научных работ направлены в печать, из них 78 в журналы, индексируемые в российских и международных информационно-аналитических системах научного цитирования.

РЕФЕРАТЫ ЗАКЛЮЧИТЕЛЬНЫХ ОТЧЕТОВ ПО НИР

ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

Э.А. Москвитина, Ю.И. Арутюнов, Т.В. Ковалёва, И.Т. Андрусенко, Л.Г. Худобец-Шереминская, Г.Б. Анисимова

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

Информационно-библиографическая база данных «Холера и патогенные для человека вибрионы» формируется с 1987 г. по настоящее время и включает 12965 рефератов. Из них в 2011 г. было введено 535 рефератов (151 реферат из отечественных источников и 384 из зарубежных); в 2012 г. – 360 рефератов (113 и 247); в 2013 г. – 407 рефератов (162 и 245), в 2014 г. – 420 (206 и 214), в 2015 году - 374 реферата (189 и 185). За период выполнения НИР в базу данных было введено 2096 рефератов (821 из отечественных источников и 1275 из зарубежных). Рефераты включены в рубрики по разделам «Холера», «Холерные вибрионы не О1/не О139» и «Холерные вибрионы других видов». Совершенствовано программное обеспечение баз данных (БД), функций и интерфейса информационно-поисковой системы. В структуру логической модели БД входят: справочники видов инфекций key; рубрик mrub; словарь ключевых слов keyword; блок для хранения рефератов из источников. Реализация автоматизированной информационной системы выполнена на платформе СУБД Access 2007. Выпущены библиографические указатели «Холера и патогенные для человека вибрионы». Указатели состоят из трёх разделов: Холера и холерные вибрионы О1/О139 серогрупп; Холерные вибрионы не О1/не О139 серогрупп; Другие патогенные для человека вибрионы. Рефераты в разделах сгруппированы по 12 рубрикам: 1. Общие вопросы. 2. Эпидемиология. 3. Борьба и профилактика. 4. Микробиология. 5. Биохимия. 6. Генетика, молекулярная биология. 7. Токсины. 8. Лабораторная диагностика. 9. Патогенез. 10. Клиника, лечение. 11. Иммунология, вакцины. 12. Биологическая безопасность и биотерроризм.

№ государственной регистрации 01201252080.

СОЗДАНИЕ ВИДО- И СЕРОВАРОСПЕЦИФИЧЕСКИХ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ ПЕРОКСИДАЗНЫХ КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1, О139 СЕРОГРУПП В РЕАКЦИИ ДОТ-ИММУНОАНАЛИЗА

Л.П. Алексеева, В.Д. Кругликов, В.В. Евдокимова, О.Ф. Кретенчук, И.В. Архангельская, М.Э. Яговкин

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

Цель и задачи исследования: Совершенствование лабораторной диагностики холеры путем конструирования пероксидазных конъюгатов на основе МКА для идентификации и дифференциации холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп в дот-иммуноферментном анализе.

Разработана экспериментально-производственная технология изготовления моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации и дифференциации холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп. Видоспецифические моноклональные пероксидазные конъюгаты могут быть использованы для идентификации холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп прямым методом ТИФА и дот-ИФА как в стационарных, так и полевых условиях (без приборного обеспечения). Получены и апробированы лабораторно-экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов на основе МКА к мембранным белкам для детекции *tcp*$^{+}$ штаммов холерных вибрионов О1, О139 серогрупп в прямых методах ИФА.

Подготовлена нормативная документация (Технические условия и Инструкция по применению) на диагностический набор.

Видоспецифические моноклональные пероксидазные конъюгаты могут быть применены на всех этапах лабораторной диагностики холеры после выделения чистой культуры.

№ государственной регистрации 01201252078.

ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ БЕЛКОВЫХ ПРОФИЛЕЙ МАСС-СПЕКТРОВ РАЗЛИЧНЫХ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ВИДА *VIBRIO CHOLERAE* ДЛЯ СОЗДАНИЯ БАЗЫ ДАННЫХ

О.С. Чемисова, О.А. Рыковская, И.А. Чайка, С.О. Чайка, Е.М. Санамянц, М.В. Полеева, М.М. Сагакянц

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

Цель исследования: создание базы данных белковых профилей коллекции штаммов холерных вибрионов для экспресс-дифференциации и выявления генетически измененных вариантов возбудителей холеры.

Новизна исследований: Впервые штаммы *V. cholerae* разных биоваров, серологических групп и токсигенности охарактеризованы по спектру белков. Сравнительный анализ масс-пик листов позволил получить новые данные об отличительных особенностях состава рибосомальных белков, характерных для представителей каждой группы холерных вибрионов. Впервые создана база данных масс-спектров холерных вибрионов O1, O139, не O1/не O139 серогрупп, что позволит проводить идентификацию *V. cholerae* в формате масс-спектрометрического анализа.

Полученные результаты: Отработаны режимы безопасности при проведении масс-спектрометрии с ПБА I-II групп патогенности. Изучена возможность идентификации и типирования *V. cholerae* с определением их филогенетического родства по результатам белкового масс-спектрометического профилирования. Показано, что данные протеомного типирования сопоставимы с данными VNTR-анализа и дополняют генетическую характеристику штаммов. Выявлены мажорные белковые пики штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор биоваров.

Практическая значимость: С помощью созданной персональной базы масс-спектров холерных вибрионов проведено молекулярное изучение свежевыделенных культур и ретроспективное типирование музейных штаммов, выделенных в разные годы и на разных территориях, что позволило определять степень филогенетического родства штаммов на основе белкового профилирования. Создание персональной библиотеки масс-спектров возбудителей холеры и изучение дискриминирующей способности и диагностической ценности базы данных позволит проводить экспресс-идентификацию и, возможно, внутривидовую дифференциацию холерных вибрионов.

Форма внедрения: База данных «Белковые профили масс-спектров представителей вида *Vibrio cholerae* для программы MALDI Biotyper». База данных «Белковые профили масс-спектров микроорганизмов I-II групп патогенности для программы MALDI Biotyper». МР 4.2.0089-14

«Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I-II групп патогенности». Опубликовано 11 научных работ.

Возможная область применения: Результаты работы могут быть использованы лабораториями при диагностике холеры, а также при исследовании проб из ООС, при проведении научных исследований и в коллекционной деятельности.

№ государственной регистрации 01201459210.

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННЫХ И ПРОТЕКТИВНЫХ СВОЙСТВ ПРЕПАРАТОВ НАРУЖНЫХ МЕМБРАН ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин

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

В рамках данной темы впервые получены в щадящих условиях (по авторской методике) препараты внешних мембран (НМ) из отобранных штаммов *Vibrio cholerae* с разным составом структурных белков (IIB, ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора).

Подобраны экспериментальные модели на животных, разработаны способы и схемы их иммунизации полученными препаратами (IIB, ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора).

Изучено формирование поствакцинального клеточного и гуморального иммунного ответа у экспериментальных животных (белых мышей и взрослых кроликов). При сравнительной оценке иммуногенности НМ выявлена разная степень индукции иммунного ответа на изучаемые препараты. Наиболеее адекватную иммунологическую перестройку, по сравнению с другими препаратами, вызывали НМ, выделенные из *V. cholerae El Tor* 18950 (ctx^-, tcp^-, $OmpT^+$, $OmpU^-$, $OmpW^+$), что выражалось в увеличении количества антителообразующих клеток, пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов, киллерной активности фагоцитов. Наблюдалась более активная продукция иммуноглобулинов в сыворотке крови и слизистой кишечника (IIB, ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора).

Оценена протективность выделенных препаратов, их влияние на развитие, течение и исход экспериментальной холеры. Отобран препарат, обладающий наибольшей протективной активностью. Предложены оптимальные иммунизирующие дозы и схемы применения препарата внешних мембран, выделенных из *V. cholerae El Tor* 18950 (ctx^-, tcp^-, $OmpT^+$, $OmpU^-$, $OmpW^+$), предотвращающие развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных (IIB, ФКУЗ Ростовский

противочумный институт Роспотребнадзора).

Препарат внешних мембран, выделенных из штамма *V. cholerae El Tor* 18950 (ctx^-, tcp^-, $OmpT^+$, $OmpU^-$, $OmpW^+$), предотвращает развитие инфекционного процесса у экспериментальных животных, протективный эффект после иммунизации длится до 5 месяцев. Полученные данные могут найти применение в прикладных и фундаментальных работах по совершенствованию специфической профилактики холеры, а также будут полезны при разработке новых иммунобиологических препаратов профилактического действия (IIB, ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора).

№ государственной регистрации 01201459.

ЭКОЛОГО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ПРОЯВЛЕНИЙ СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ В СИБИРИ И НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ

С.В. Балахонов[1], Л.В. Миронова[1], Е.С. Куликалова[1], Л.Я. Урбанович[1], Е.А. Басов[1], В.С. Ганин[1], Е.Ю. Марков[1], М.В. Афанасьев[1], В.Б. Николаев[1], Ж.Ю. Хунхеева[1], Э.Г. Гольдапель[1], А.С. Пономарева[1], С.К. Миткеева[1], Н.В. Яковчиц[1], А.В. Корнева[1], С.Н. Козлов[1], Ю.О. Попова[1], С.Ю. Соловьев[1], Е.Г. Токмакова[1], Т.Т. Шкаруба[1], А.С. Мачнев[2], А.Б. Мошкин[2], В.А. Агапов[2], А.В. Алленов[3], В.П. Борзов[3], В.Н. Краснощеков[3], А.С. Ким[3], Т.В. Хоменко[3], Н.С. Солодкая[3], Т.В. Громова[4], Ю.С. Мусатов[4], Л.Г. Гриднева[4], Л.И. Иванов[4], Н.М. Пуховская[4], А.Г. Ковальский[4]

[1]ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск;
[2]ФКУЗ Читинская противочумная станция, г.Чита;
[3]ФКУЗ Приморская противочумная станция, г. Уссурийск;
[4]ФКУЗ Хабаровская противочумная станция, г. Хабаровск

Цель исследования: Изучение адаптивных особенностей, молекулярно-генетических аспектов патогенности и эволюции *Vibrio cholerae*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока.

Новизна исследования. Установлены молекулярно-генетические и экологические закономерности проявлений холеры в Сибири и на Дальнем Востоке в современный период седьмой пандемии.

Полученные результаты: За период с 2011 по 2015 г. из объектов окружающей среды изолировано 70 штаммов *V. cholerae El Tor*. Выявлена связь между выделением холерного вибриона, неудовлетворительным

санитарно-микробиологическим состоянием воды и существованием в этих биотопах определенных видов зоо- и фитопланкона. Расследование причин обнаружения изолятов холерного вибриона в ряде водоёмов в благополучный по холере период и данные молекулярно-генетического типирования (VNTR, PFGE) указывают на их заносный характер (Алтайский край, 2011 г., Иркутск, 2011, 2014, 2015 гг., Хабаровск, 2013 г.).

Установлено, что эпидемические осложнения по холере, зарегистрированные в Сибири и на Дальнем Востоке с 90-х гг. прошлого столетия, обусловлены атипичным генетически измененным вариантом вибриона Эль Тор, несущим в геноме характерную для классического биовара аллель гена субъединицы В холерного токсина. Разработанная схема генотипирования по комплексу биовароспецифических и ассоциированных с патогенностью генов позволяет дифференцировать атипичные варианты вибриона Эль Тор на генотипы, ассоциированные с направлением заноса возбудителя. Разработаны методологические подходы к идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* на этапах бактериологического анализа на основе MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа.

По результатам макрорестрикционного анализа геномной ДНК (PFGE-типирование) дана характеристика структуры популяции *V. cholerae El Tor*, выделенных в г. Южно-Сахалинске в период эпидосложнений 1999 г., и сделано заключение о клональном характере вспышки холеры.

Показана консервативность структуры генов жизнеобеспечения микробной клетки («housekeeping» genes) эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* независимо от места, времени и структуры детерминант патогенности, в то время как нетоксигенные штаммы характеризуются вариабельностью, ассоциированной с принадлежностью к серогруппе и в ряде случаев с территорией выделения. Выявленные различия структуры «housekeeping» генов холерного вибриона разной эпидемической значимости могут свидетельствовать о разных направлениях эволюции этих групп штаммов.

При экспериментальном изучении механизмов адаптации холерного вибриона в условиях эксперимента выявлены особенности цитоархитектоники биоплёнки с выраженным полиморфизмом клеток, формированием микроколоний с участием межклеточных связей и пилей, а также экстрацеллюлярного матрикса.

В препаратах субклеточных фракций и культуральной жидкости штаммов *Vibrio cholerae* с использованием радиальной энзимодиффузии и субстратного электрофореза обнаружены протеазы, липолитические ферменты, хитиназы, пептидогликангидролазы, сульфатазы, гидролазы солей желчных кислот, в препаратах наружных мембран – протеазы,

расщепляющие кроличьи и человеческие IgG.

Форма внедрения: Методические указания (1), руководство к практическим занятиям (1) и учебно-методическое пособие по лабораторной диагностике холеры федерального уровня (1), методические рекомендации (6), патент на изобретение (1). По теме опубликовано 60 научных работ. В государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур (ГКПМ-Оболенск) депонированы 7 штаммов *V. cholerae El Tor*. В международную базу данных GenBank депонированы нуклеотидные последовательности «housekeeping» генов, полные нуклеотидные последовательности геномов двух штаммов *V. cholerae El Tor*. Зарегистрированы две базы данных.

Возможная область применения: Медицина: эпиднадзор за холерой, лабораторная диагностика.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПЕЦИФИЧНЫХ МАРКЕРОВ ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ И ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ПАСПОРТИЗАЦИИ ШТАММОВ V*IBRIO CHOLERAE* С МНОЖЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТЬЮ К АНТИБИОТИКАМ

И.Б. Захарова[1], Л.М. Веркина[2], М.В. Подшивалова[1], Н.А. Селянская[2], Н.Н. Тетерятникова[1], Я.А. Лопастейская[1], Ю.А. Кузютина[1], А.А. Замарин[1]

[1]ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Волгоград
[2]ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ростов-на-Дону

Объектом исследования служили антибиотикорезистентные штаммы *V. cholerae* различных серогрупп, интегроны, интегративные конъюгативные элементы (ICE), нуклеотидные последовательности генов резистентности к антибиотикам.

Целью исследования являлась детекция и молекулярно-генетическая характеристика маркеров резистентности к антибактериальным препаратам у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп.

Разработаны алгоритмы ПЦР-детекции генов резистентности различных классов, идентифицированы мобильные генетические элементы, обеспечивающие горизонтальный перенос генов лекарственной устойчивости, проведена генетическая паспортизация антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* на основе маркеров, связанных с интегронами и интегративными конъюгативными элементами (ICE).

Апробирована техника сравнительного генетического анализа изолятов *V. cholerae* O1, O139 и не O1/O139 на основе сопоставления VCR-фингерпринтов, исследования области кассетных вставок интегронов класса 1 в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп.

Проведен анализ распространённости ICE в штаммах *V. cholerae* O1, O139 и не O1/O139, выделенных в различных регионах РФ. Молекулярное типирование ICE выявило варианты элементов семейства SXT/R391, различающихся по структуре регионов вариабельной ДНК, несущей гены антибиотикорезистентности.

Направлен для депонирования в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» набор штаммов *V. cholerae*, имеющих ICE семейства SXT/R391 с различными вариантами структуры вариабельных регионов, несущих детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам.

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ, ИНСТРУКТИВНЫХ И ДРУГИХ ДОКУМЕНТОВ

ПОРЯДОК ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АДМИНИСТРАТИВНОЙ ТЕРРИТОРИИ ДЛЯ РАЙОНИРОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ТИПАМ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ ХОЛЕРЫ (МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)

Е.Б. Ежлова[1], Ю.В. Дёмина[1], Н.Д. Пакскина[1], Э.А. Москвитина[2], А.В. Самородова[2], В.Д. Кругликов[2], С.В. Титова[2], Е.Г. Тюленева[2], Г.Б. Анисимова[2], В.В. Кутырев[3], С.А. Щербакова[3], В.П. Топорков[3], И.Г. Карнаухов[3], Е.В. Куклев[3], О.В. Кедрова[3], Н.И. Смирнова[3], Л.В. Миронова[4], А.К. Носков[4], М.В. Чеснокова[4], Л.Я. Урбанович[4], С.В. Балахонов[4], В.Е. Безсмертный[5], С.М. Иванова[5], Ю.М. Федоров[5], П.В. Журавлёв[6], В.В. Алешня[6], А.А. Каськов[7], М.Ю. Соловьёв[8], Е.В. Ковалёв[8], С.А. Ненадская[8], Ю.В. Рыжков[8]

[1]Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека;
[2]ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора;
[3]ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора;
[4]ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт;
[5]Противочумный центр, [6]Ростовский НИИ микробиологии и паразитологии;
[7]Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по железнодорожному транспорту;
[8]Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Ростовской области

В методических рекомендациях представлен порядок определения эпидемического потенциала субъекта Российской Федерации (область, край, республика) при холере с учётом показателей и данных, характеризующих эпидемические проявления холеры, контаминацию поверхностных водоёмов холерными вибрионами О1 и О139 серогрупп, миграцию населения, условия водоснабжения и водопользования, с последующим районированием административных территорий Российской Федерации по типам эпидемических проявлений.

Методические рекомендации предназначены для специалистов органов, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический

надзор в Российской Федерации, специалистов противочумных и других учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Одобрены Учёным советом (протокол № 2 от 08.04.2016 г.), утверждены директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и направлены для утверждения в Роспотребнадзор.

ПРОГРАММА КУРСОВ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ ВРАЧЕЙ-БАКТЕРИОЛОГОВ И БИОЛОГОВ «ОСОБО ОПАСНЫЕ ИНФЕКЦИИ»

С.В. Титова, В.Д. Кругликов, И.Я. Черепахина, Э.А. Москвитина, О.С. Бурлакова, О.С. Чемисова, Ю.В. Сизова, В.В. Балахнова, В.А. Коршенко

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

Программа рассчитана на очное обучение в течение 500 часов, включает разделы, посвящённые актуальным для России и мирового сообщества инфекционным болезням человека, современным алгоритмам и методам лабораторной диагностики инфекций, и позволяет целенаправленно проводить усовершенствование специалистов с акцентом на работу с возбудителями инфекций, наиболее значимыми в настоящий момент для системы здравоохранения. Слушатели имеют возможность проводить самостоятельную работу с реальными возбудителями болезней человека бактериальной природы с использованием современного диагностического оборудования. Освоение разделов программы контролируется сдачей зачетов, решением бактериологических задач и сдачей заключительного экзамена.

Программа предназначена для специалистов учреждений Роспотребнадзора, учреждений других министерств и ведомств, которым по роду своей деятельности требуется специальная подготовка по биологической безопасности при работе с ПБА I-II групп патогенности, а также по микробиологии и лабораторной диагностике особо опасных инфекций (врачей-бактериологов, а также биологов, имеющих высшее профессиональное образование по специальности «Биология», «Микробиология», «Генетика», «Биохимия», «Биофизика»).

Программа одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 6 от 2.07.2015г.)

и утверждена директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ/УСТОЙЧИВОСТИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К *DICTYOSTELIUM DISCOIDEUM*»

А.В. Миронова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Е.М. Курбатова, Е.А. Меньшикова, О.В. Маркина, Р.В. Писанов

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

Клеточный слизевик *Dictyostelium discoideum*, относящийся к типу *Mycetozoa* (миксомицеты), является одним из важных модельных организмов в клеточной биологии, генетике и биологии развития. При выращивании на бактериальном газоне *D.discoideum* размножается митотически в виде подвижных амёб, которые передвигаются по поверхности агара и образуют зоны просветления (бляшки) за счёт поедания бактерий. Применительно к холерным вибрионам *D. discoideum* обычно используют в качестве своеобразной модели макрофагов для изучения экспрессии системы секреции шестого типа (T6SS). Штаммы *V. cholerae*, не экспрессирующиеT6SS, как правило, успешно поедаются амёбами, и на газоне образуются бляшки. Напротив, экспрессирующие T6SS убивают либо обездвиживают амёб, и бляшки не образуются. Мы также не исключаем, что некоторые штаммы холерных вибрионов могут продуцировать и другие факторы, обеспечивающие им устойчивость к поеданию, и использование данной модели может способствовать их выявлению и идентификации, что немаловажно для оценки как свойств дополнительных токсинов возбудителя, так и его способности к персистенции в объектах окружающей среды. Недостатком модели является потребность *D. discoideum* в довольно низкой оптимальной температуре роста, при которой холерные вибрионы могут не экспрессировать те или иные имеющиеся у них гены, однако она вполне адекватна для изучения конкурентоспособности возбудителя в природных резервуарах.

В настоящих рекомендациях приведен отработанный нами метод фенотипического изучения антагонизма холерных вибрионов по отношению к *D. discoideum*, максимально адаптированный для изучения холерных вибрионов с неодинаковыми питательными потребностями и скоростью роста. За основу были взяты методики, представленные на

сайте http://dictybase.org; внесенные нами модификации подобраны эмпирически в процессе многократной постановки экспериментов.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 9 от 08.12.2015 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПЦР-ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ»

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

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

В методических рекомендациях предложен способ ускоренной идентификации штаммов *V. parahaemolyticus, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. mimicus, V. vulnificus* и *V. harveyi* с помощью полимеразной цепной реакции. Определение видовой принадлежности выделенных культур вибрионов необходимо при осуществлении текущего надзора на этапах производства и реализации морепродуктов, при проведении исследований по эпидпоказаниям или в случае возникновения неблагополучной экологической ситуации в регионе лова рыбы, моллюсков и ракообразных, а также при формировании коллекций патогенных для человека вибрионов.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 6 от 02.07.2015 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «АЛГОРИТМ ОПРЕДЕЛЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ВИРУЛЕНТНОСТИ V*IBRIO CHOLERAE* МЕТОДОМ ДВУХСТАДИЙНОЙ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

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

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, г. Саратов

Методические рекомендации содержат алгоритм относительной количественной оценки экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae* методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Экспрессия гена оценивается количественно, относительно ПЦР-стандартов с известной концентрацией, с последующей нормализацией по гену «домашнего хозяйства» (чья экспрессия постоянна и не зависит от условий внешней среды) и штамму сравнения (калибратору). Алгоритм включает пять этапов: 1) получение калибровочной кривой плазмидной ДНК с известной концентрацией; 2) выделение и очистка тотальной РНК из исследуемых штаммов; 3) синтез кДНК на матрице РНК; 4) проведение ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным методом учета результатов; 5) обработка и анализ полученных данных.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №6 от 08.12.2015 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРИМЕНЕНИЕ 2D - ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ «БЕЛКОВЫХ ПОРТРЕТОВ» ФРАКЦИЙ ЭКЗОПРОТЕИНОВ БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ»

Т.А. Полунина, С.П. Заднова, Я.М. Краснов

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

Методические рекомендации содержат описание высокоэффективного комплексного метода получения «белковых портретов» фракций экзопротеинов бактериальных культур, включающего

этап приготовления образцов в результате их осаждения из культуральной жидкости ТХУ и дальнейший анализ методом 2D-электрофореза. После окрашивания 2D гели анализируют с помощью ПО Dymension мультифункциональной системы гель-документирования Syngene. Предназначены для специалистов, занимающихся протеомными исследованиями возбудителей особо опасных инфекций.

Методические рекомендации одобрены Ученым Советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №2 от 28.04.16 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОДГОТОВКА БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУР ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ ПО ТЕМЕ «МИКРОБИОЛОГИЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ»

Е.В. Растунцева, Е.В. Сазанова

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

Одним из основных разделов учебных программ является модуль «Микробиология и лабораторный диагноз холеры», включающий теоретические и практические занятия. Базой для реализации учебного плана практических занятий является подготовка бактериальных культур. В настоящих методических рекомендациях предлагается алгоритм подготовки культур микроорганизмов, включающий организацию внутреннего контроля качества подготовки; процедуру ведения штаммов (этапы пассирования, проверки их чистоты, жизнеспособности и аутентичности, подготовки для хранения в рабочей коллекции); обеспечение биологической безопасности работ. Предназначены для преподавателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по специальностям бактериология, эпидемиология, лабораторное дело с освоением приемов безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I – IV групп патогенности.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №1 от 26.02.2016 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОБ-ИМИТАТОРОВ ПАТОГЕННЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ АГЕНТОВ ДЛЯ ПРАКТИЧЕСКИХ ЗАНЯТИЙ В РАМКАХ УЧЕБНОГО МОДУЛЯ «МИКРОБИОЛОГИЯ И ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ХОЛЕРЫ»

Е.В. Растунцева, Е.В. Сазанова

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, г. Саратов

В методических рекомендациях предлагаются методики приготовления проб-имитаторов объектов, используемых на практических занятиях в процессе модуля «Микробиология и лабораторная диагностика холеры», для освоения регламентированных методов индикации и идентификации возбудителя холеры: образцов клинического материала, проб из объектов окружающей среды, пищевых продуктов. Указаны меры, направленные на снижение биологических рисков в процессе обучения. Предназначены для преподавателей курсов профессиональной переподготовки и повышения квалификации по специальностям «бактериология», «эпидемиология», «лабораторное дело» с освоением приемов безопасной работы с возбудителями особо опасных инфекций.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №2 от 28.04.2016 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФОРМАЛЬДЕГИДА В ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЕ МЕТОДОМ ГАЗОВОЙ ХРОМАТОГРАФИИ»

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

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, г. Саратов

В методических рекомендациях представлено описание способа определения концентрации формальдегида в холерной химической вакцине методом газовой хроматографии с использованием портативного

газового хроматографа с фотоионизационным детектором.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №6 от 08.12.2015 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЛИОФИЛИЗАЦИЯ ПРОТЕКТИВНЫХ АНТИГЕНОВ V*IBRIO CHOLERAE*»

А.В. Комиссаров, О.А. Волох, С.А. Бадарин, Д.Н. Бибиков, Н.В. Синицина, Н.И. Костылева, Ю.А. Алешина, О.Д. Клокова, А.К. Никифоров

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, г. Саратов

В методических рекомендациях представлено описание параметров лиофилизации протективных антигенов – компонентов химической холерной вакцины - холероген-анатоксина и О-антигенов.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" (протокол №1 от 26.02.2016 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «АЛГОРИТМ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЯ (MLST)»

Л.В. Миронова, С.В. Балахонов

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

В методических рекомендациях приводится последовательность анализа данных секвенирования комплекса генов «домашнего хозяйства» *Vibri ocholerae*, в т.ч. перечень используемого программного обеспечения, подходы к редактированию нуклеотидных последовательностей, характеристике нуклеотидных замен, определению аллельного профиля и сиквенс-типа изолята, кластерному анализу, а также формированию

локальной базы сиквенс-типов штаммов холерного вибриона в программе Bionumerics 6,0.

Методические рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений, занимающихся молекулярным типированием возбудителей особо опасных инфекций.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом института (протокол № 7 от 20.10.2015 г.) и утверждены зам. директора ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ДИАГНОСТИКУМ ХОЛЕРНЫЙ АНТИГЕННЫЙ ЛПС-О1 ПОЛИМЕРНЫЙ СУХОЙ ДЛЯ РАО» «ХОЛПАГ ЛПС-О1»ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНЫХ АНТИТЕЛ

Л.В. Ларионова, Д.И. Симакова, А.Н. Наркевич, Е.Ю. Люкшина, И.В. Архангельская, А.П. Кочеткова, Л.К. Лысова

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

Сконструирован антигенный холерный полимерный диагностикум на основе липополисахарида холерного вибриона О1 серогруппы.

Диагностикум предназначен для выявления противохолерных, анти-ЛПС антител к возбудителю холеры О1 серогруппы.

В качестве носителя использовали окрашенные полиакролеиновые микросферы размером 1±0,1мк. В качестве сенситина использовали липополисахарид выделенный из бактериальной массы холерного вибриона О1 серогруппы двумя методами: классическим водно-фенольным и авторским из клеточных оболочек с использованием протеолитических ферментов и осаждения этанолом. Метод выделения сенситина не влиял на аналитические характеристики диагностического препарата.

Аналитическая чувствительность диагностикума составляет 1:320-1:1280 с коммерческими сыворотками различных серий. Диагностикум выявляет противохолерные антитела к О1 серогруппе и не дает реакции с сыворотками к холерному вибриону О139 серогруппы и к другим возбудителям кишечных инфекций.

В набор реагентов входят: диагностический препарат холерный антигенный ЛПС-О1 полимерный сухой во флаконе 6 мг; нормальная кроличья сыворотка (НКС) сухая -1:10; забуференный физиологический раствор; планшет для иммунологических реакций.

Нормативная документация на диагностический набор одобрена Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 5 от 05.05.2015 г.) и утверждена директором института.

АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» В 2015 – 2016 ГГ.

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТОКСИЧЕСКОГО ЭНТЕРОСОРБЕНТА ДЛЯ ИНТРАИНТЕСТИНАЛЬНОЙ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ЭКЗОТОКСИНА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

диссертация на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Овчинникова Мария Владимировна
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Впервые разработана биотехнология и получен новый лечебно-профилактический препарат – антитоксический иммуноэнтеросорбент для интраинтестинальной нейтрализации экзотоксина холерного вибриона. Охарактеризованы его физико-химические и биологические свойства. Экспериментально обосновано использование высокомолекулярного хитозана в качестве эффективного сорбционного материала для конструирования противохолерного препарата. Разработан комплекс методов оценки токсиннейтрализующих свойств и общей адсорбционной способности сконструированного иммуноэнтеросорбента, в тестах invivo и invitro подтверждены токсиннейтрализующие и сорбционные свойства полученного препарата. Разработана стабильная лекарственная форма антитоксического иммуноэнтеросорбента – таблетка, покрытая кишечнорастворимой оболочкой. Установлено, что антитоксический энтеросорбент в дозе 100 мг защищает опытных животных от заболевания холерой при внутрикишечном заражении вирулентным штаммом *Vibrio cholerae* 569BO1 серогруппы в заражающей дозе $1x10^5$ м.к./мл. Изучена стабильность специфического энтеросорбента в процессе хранения и установлен срок годности препарата – 2 года при температуре от 2 до 8^oC.

Диссертация защищена 16.12.2015 г. в диссертационном совете Д002.146.01 на базе ФГБУН института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ

диссертация на соискание учёной степени кандидата технических наук

по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

Перепелица Александр Иванович
ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора

Создана оригинальная конструкция системы очистки отходящих от биореактора газов, обеспечивающая биологическую безопасность технологического процесса производства холерной химической вакцины. Использование физического метода определения защитной эффективности системы очистки отходящих газов от биореактора, и отдельно фильтров, с использованием аэрозоля диэтилгексилсебацината, позволяет сократить процедуру проверки с 2-3 дней до 1-2 часов. Научно обоснована и экспериментально подтверждена технология обессоливания протективных антигенов штаммов *Vibrio cholerae* 569B серовара Инаба и M-41 серовара Огава диафильтрацией в периодическом режиме с использованием метода тангенциальной ультрафильтрации. Определена оптимальная температура проведения процесса стерилизующей фильтрации холерогена-анатоксина и обоснован технологический приём его очистки перед проведением данного процесса, заключающийся в осветлении белкового раствора путем тангенциальной фильтрации с использованием мембранного модуля с размером пор 0,45 мкм. Разработана технология выделения холерогена-анатоксина штамма *V. cholerae* 569B серовара Инаба методом тангенциальной ультрафильтрации, приоритетность которой подтверждена патентом РФ на изобретение № 2535122.

Диссертация защищена 04.03.2016 г. на заседании диссертационного совета Д006.069.01 при Всероссийском научно-исследовательском и технологическом институте биологической промышленности.

РАСПРОСТРАНЕНИЕ И СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ОБУСЛОВИВШИХ ВСПЫШКИ ХОЛЕРЫ ЭЛЬ ТОР НА КАВКАЗЕ В ПЕРИОД СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ

диссертация на соискание учёной степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология

Васильева Оксана Васильевна
ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора

Впервые на Кавказе выявлены генетически измененные варианты V. cholerae биовара Эль Тор и установлено, что эпидемические осложнения по холере 1970-1990 гг. были обусловлены типичными штаммами, а в 1993,

1994 и 1998 гг. – генетически изменёнными вариантами. Установлена изменчивость профага CTXφ у генетически измененных вариантов V. cholerae биовара Эль Тор, обусловленная присутствием разных аллелей гена rstR (rstRclass, rstREL).

Наибольшее количество штаммов, выделенных на Кавказе (72 %), содержали два аллеля гена rstR. Показано, что генетически измененные варианты по своим морфологическим, биохимическим и гемолитическим свойствам не отличаются от типичных холерных вибрионов биовара Эль Тор. Однако часть штаммов оказалась резистентной к фагу Эль Тор (78,4 %) и не агглютинировала эритроциты морской свинки (3,9 %), не образовывала ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра (13,7 %).

Создана информационная система «Холера на Кавказе: штаммы холерных вибрионов», которая включает в себя 6181 паспорт штаммов холерного вибриона, выделенных от больных, вибриононосителей и из объектов окружающей среды в период 1969-2010 гг. на территории Кавказа. Представлены данные о биологических свойствах штаммов холерных вибрионов (биохимических, серологических, фаголизабельных и чувствительности к антибиотикам) и генетических особенностях возбудителя холеры.

Впервые с использованием квартильного анализа проведена оценка факторов риска заноса и распространения холеры в Ставропольском крае. Выделены четыре группы административных территорий с низким, средним, высоким и очень высоким риском как заноса, так и распространения холеры, определен комплекс первоочередных противохолерных мероприятий.

Диссертация защищена 05.06.2015 г. на заседании диссертационного совета Д208.130.02 приФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России.

ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И СВИДЕТЕЛЬСТВА ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ

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

Способ молекулярно-генетического типирования *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп.

Патент №2575046 от 18.01.16г.

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н.

Способ моделирования образования биопленок холерных вибрионов в условиях эксперимента и устройство для его осуществления.

Патент №2559546 от 14.07.15г.

Титова С.В., Кушнарева Е.В.

Способы определения полиамина кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп.

Патент №2566558 от 29.09.15 г.

Писанов Р.В., Сизова Ю.В., Черепахина И.Я., Бурлакова О.С.

Способы оценки адгезивных свойств холерных вибрионов *V.cholerae El Tor* и *Vibrio cholerae* O139 на клеточной культуре HUTU-80.

Решение о выдаче от 05.05.2016г.

Татаренко О.А., Коршенко В.А., Титова С.В., Алексеева Л.П., Черепахина И.Я.

Способы получения липополисахарида *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп.

Заявка № 2015151510 от 01.12.2015г.

Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Сорокин В.М., Люкшина Е.Ю., Алексеева Л.П.

Способы оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам.

Заявка № 2015155126 от 22.12.15г.

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Титова С.В.

Способы отбора проб с поверхности водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов, и переносное устройство для его осуществления.

Заявка № 2016111504 от 28.03.16г.

Титова С.В., Веркина Л.М., Головин С.Н., Тришина А.В.

Способы молекулярно-генетического внутривидового типирования токсигенных штаммов *V. cholerae EL TOR.*

Заявка №2016117833 от 04,05,16г.

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П.

База данных "Антибиотикорезистентность клинических штаммов холерных вибрионов".

Свидетельство №2015621001 от 30.06.2015г.

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Водопьянов А.С.

База данных "Антибиотикорезистентность условно-патогенных микроорганизмов поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону".

Свидетельство №2015621634 от 09.11.2015г.

Березняк Е.А., Тришина А.В., Симонова М.Ф., Веркина Л.М., Сагакянц М.М.

База данных "Гены *Vibrio parahaemolyticus*, содержание INDEL–маркеры.

Свидетельство №2016620699 от 26.05.16г.

Водопьянов С.О., Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Олейников И.П.

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

Способ дифференциации токсигенных генетически изменённых штаммов Vibrio cholerae биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом методом мультиплексной ПЦР и тест-система для его осуществления.

Патент № 2556127 от 10.07.2015 г.

Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Заднова С.П., Челдышова Н.Б.

Способ одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Патент №2560280 от 20.08.2015 г.

Заднова С.П., Плеханов Н.А., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.

Способ получения таблетированной формы холерной бивалентной химической вакцины

Патент №2563620 от 20.09.2015 г.

Комиссаров А.В., Еремин С.А., Задохин С.Н., Ливанова Л.Ф., Лобовикова О.А., Шульгина И.В., Никифоров А.К.

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ

Перечень штаммов рода *Vibrio*, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в период с 27.04.2015г. по 15.05.2016 г.

V.cholerae КМ254 (Р-19260) неО1/неО139 серогруппа. Положительный контроль при проведении ПЦР для выявления гена cholix-токсина I типа у холерных вибрионов Авторское депонирование.

Дата депонирования:25.11.2015г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.*

V.cholerae КМ255 (Р-912) не О1/не О139 серогруппа. Положительный контроль при проведении ПЦР для выявления гена cholix-токсина III типа у холерных вибрионов Авторское депонирование.

Дата депонирования:25.11.6015г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.*

V.cholerae КМ256 (Р-17449*rst*R^{env}) не О1/не О139 серогруппа. Положительный контроль при проведении ПЦР для выявления гена *rst*R^{env} у холерных вибрионов. Авторское депонирование.

Дата депонирования:25.11.2015г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.*

V.cholerae КМ276 (Р-19546) О1 серогруппа. Индикаторный штамм для холерных фагов №№ 6, 7, перспективных в качестве диагностических. Патентное депонирование.

Дата депонирования: 26.11.2015г.

Депозиторы: Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.*

V.cholerae КМ277 (1-2) (М-1275, М-1275 (VSP-IΔ) О1 серогруппа. Изогенные штаммы с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I. Авторское депонирование.

Дата депонирования:20.10.2015г.

Депозиторы: Плеханов Н.А., Заднова С.П., Крепостнова И.М.,

Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора.*

V.cholerae КМ2015 (КМ234-1 ΔTn5mobTox^{+}) О1 серогруппа. Инсерционный мутант, продуцирующий холерный токсин (6 мкг/мл), полученный путем внедрения транспозона Tn5mob в хромосому *V.cholerae* МАК757, предназначен для изучения генетических механизмов изменения экспрессии гена холерного токсина. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2016 (КМ234-4 ΔTn5mobTox^{-}) О1 серогруппа. Инсерционный мутант, не продуцирующий холерный токсин, полученный путем внедрения транспозона Tn5mob в хромосому *V.cholerae* МАК757, предназначен для изучения генетических механизмов изменения экспрессии гена холерного токсина. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2017 (КМ234-8 chr::Tn5mobTox^{+}) О1 серогруппа. Инсерционный мутант, продуцирующий холерный токсин (2,7 мкг/мл), полученный путем внедрения транспозона Tn5mob в хромосому *V.cholerae* МАК757, предназначен для изучения генетических механизмов изменения экспрессии гена холерного токсина. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2018 (КМ234-9 chr::Tn5mobTox^{++}) О1 серогруппа. Инсерционный мутант, продуцент холерного токсина (45 мкг/мл), полученный путем внедрения транспозона Tn5mob в хромосому *V.cholerae* МАК757, предназначен для изучения генетических механизмов изменения экспрессии гена холерного токсина. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2019 (КМ234-10 chr::Tn5mobTox^{-}) О1 серогруппа. Инсерционный мутант, не продуцирующий холерный токсин, полученный путем внедрения транспозона Tn5mob в хромосому *V.cholerae* МАК757, предназначен для изучения генетических механизмов изменения экспрессии гена холерного токсина. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Щелканова Е.Ю., Заднова С.П., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ*

РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора

V.cholerae КМ2020 (КМ7Р *ctx*B1, *rst*R^{Eltos}, *tcp*A^{Eltor}, Km^{R}) О1 серогруппа. Донорный штамм биовара Эль Тор, содержит транспозон Tn5mob, внедренный в область профага СТХφ^{Class}. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2021 (М818 Str^{R}) О1 серогруппа. Устойчивый к стрептомицину реципиент профага СТХφ^{Class}. Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2022 (М818-R4 *ctx*B1, *rst*R^{Class}, *rst*R^{Eltos}, *tcp*A^{Eltor}, Km^{R}, Str^{R}Tox^{++}) О1 серогруппа. Рекомбинант, получивший профаг СТХφ классического типа в результате коньюгационного скрещивания, продуцирует холерный токсин на уровне 32 мкг/мл (GM_1 ELISA). Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

V.cholerae КМ2023 (М818-R7 *ctx*B1, *rst*R^{Class}, *rst*R^{Eltos}, *tcp*A^{Eltor}, Km^{R}, Str^{R}Tox^{++}) О1 серогруппа. Рекомбинант, получивший профаг СТХφ классического типа в результате коньюгационного скрещивания, продуцирует холерный токсин на уровне 15 мкг/мл (GM_1 ELISA). Авторское депонирование.

Дата депонирования:27.04.2016г.

Депозиторы: Агафонов Д.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. -*ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора*

Информация о депонировании нуклеотидных последовательностей в международной базе данных GENBANK ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности:

- Профагов RS1 штамма *Vibrio cholerae* О1, pre-CTX 3 штаммов *Vibrio cholerae* О1 и 3 штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139 под номерами KM816584, KR063267, KT728930, KT728931, KP972568, KP972569, KR063268 .

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В.

- Профага CTX^{Sudan} штамма *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенного от больного в Узбекистане, под номером KR072210.

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

- Генов коровой области профагов CTX 5 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KT779270-KT779274.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А.

- Генов *ctxAB7* штамма *Vibrio cholerae* O1 под номером KU215666.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А.

- Островов патогенности VPI 2 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KT970467-KT970468.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А., Титова С.В.

- *nan-nag*-области острова патогенности VPI-2 штамма *Vibrio cholerae* O1 под номером KU215667.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А.

- Островов пандемичности VSP-II 2 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KU601747-KU601748.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А., Титова С.В.

- Генов *rtxA* 2 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KU601749- KU601750.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А., Титова С.В.

- Генов cholix-токсина (*chxA*) 12 штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139 под номерами KR259135-KR259138, KR265171-KR265175, KR362249-KR362250, KU215668.

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

- Генов cholix-токсина (*chxA*) 2 штаммов *Vibrio cholerae* O139 под номерами KR337501-KR337502.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В.

- Генов гемагглютинин/протеазы (*hapA*) 3 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KT728927-KT728929.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В.

- Генов *cef*, детерминирующих синтез цитотонического токсина, 11 штаммов *Vibrio cholerae* O1 и 2 штаммов *V.cholerae* O139 под номерами KR827238-KR827243, KT188942, KT728924-KT728926, KR864904-KR864905.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В.

- Генов *cef*4 штаммов *Vibrio cholerae* O1 под номерами KT779266-KT779269.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А.

ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

Сборник статей Проблемной комиссии (48.04)
Координационного научного совета
по санитарно-эпидемиологической
охране территории Российской Федерации

Выпуск № 29

Подписано в печать 20.09.2016 г.
Заказ № 2682 от 19.10.2016 г.
Обложка: меловка 300 г/м2, ламинация.
Внутри бумага офсетная 80 г/м2.
Формат бумаги 60х90/16.
Тираж 130 экз.

Отпечатано в типографии ООО ЛПИ