

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»



Посвящается
95-летию санитарно-
эпидемиологической службы
Российской Федерации

ХОЛЕРА и патогенные для человека вибрионы

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

Выпуск № 30

Ростов-на-Дону
2017 г.



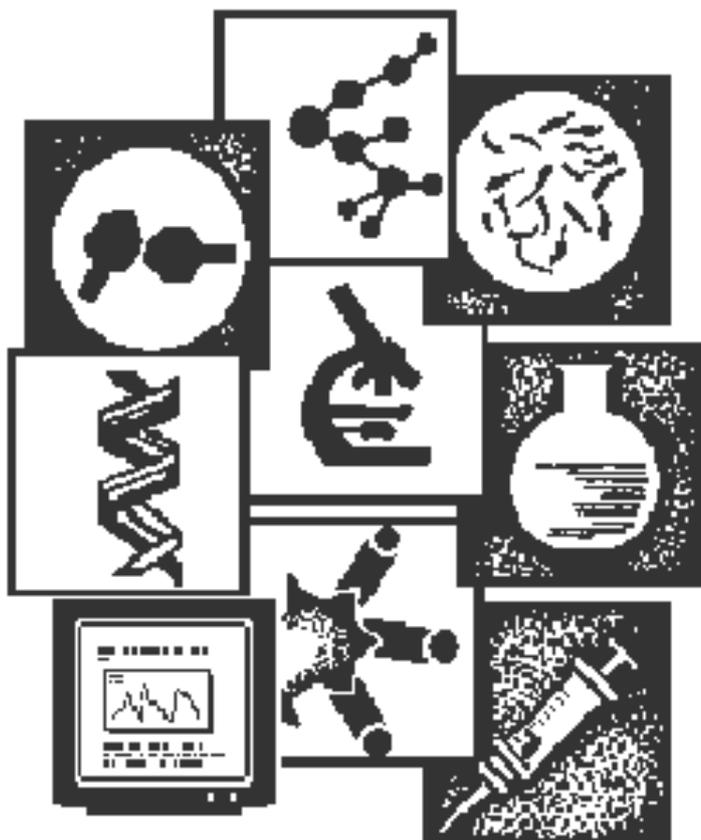
Посвящается
95-летию санитарно-
эпидемиологической
службы Российской
Федерации

ХОЛЕРА И
ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ
ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

СБОРНИК СТАТЕЙ
ПРОБЛЕМНОЙ
КОМИССИИ (48.04)
Координационного
научного совета по
санитарно-
эпидемиологической
охране территории
Российской Федерации



ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА



ВЫПУСК № 30

РОСТОВ-НА-ДОНУ
2017 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., Кругликов В.Д., Водопьянов С.О., Монахова Е.В., Сухостат Е.В., Емцова Л.И., 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: Издательство «Медиа-Полис», 2017, Вып. 30. - 232 с.

ISBN 978-5-9909773-6-5

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

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

ISBN 978-5-9909773-6-5

**© ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора**

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ 11

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТИВНОСТИ РАБОТЫ ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ РОСПОТРЕБНАДЗОРА КАК РЕФЕРЕНС-ЦЕНТРА ПО МОНИТОРИНГУ ХОЛЕРЫ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ..... 11

Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С.,
Чемисова О.С., Ежова М.И., Левченко Д.А., Пичурина Н.Л., Гаевская Н.Е., Черепахина И.Я., Тюленева Е.Г.,
Самородова А.В., Непомнящая Н.Б.

ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ВНЕШНИХ УГРОЗ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ИГР ЧМ-2018 В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ (НА ПРИМЕРЕ ХОЛЕРЫ)..... 19

Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Водопьянов А.С., Рыжков Ю.В., Титова С.В.

РАЗРАБОТКА ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ЗАВОЗОМ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ..... 23

Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Титова С.В., Водяницкая С.Ю., Олейников И.П., Водопьянов С.О.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНЕШНИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ УГРОЗ..... 27

Водопьянов А.С., Баташев В.В., Водопьянов С.О., Титова С.В., Пичурина Н.Л., Олейников И.П.,
Самородова А.В., Кругликов В.Д.

ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ МЕРОПРИЯТИЙ УПРАВЛЕНИЕМ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА ХОЛЕРОЙ И ДРУГИМИ ИНФЕКЦИЯМИ, ТРЕБУЮЩИМИ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ 30

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

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБНАРУЖЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА..... 37

Миронова Л.В.¹, Хунхеева Ж.Ю.¹, Пономарева А.С.¹, Басов Е.А.¹, Урбанович Л.Я.¹, Гладких А.С.¹, Бочалгин
Н.О.¹, Мошкин А.Б.², Капко Н.А.², Алленов А.В.³, Борзов В.П.³, Хоменко Т.В.³, Солодкая Н.С.³, Гриднева
Л.Г.⁴, Мусатов Ю.С.⁴, Иванов Л.И.⁴, Уткина О.М.⁴, Ковальский А.Г.⁴, Балахонов С.В.¹

ОПЕРАТИВНЫЙ И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ МОНИТОРИРОВАНИЯ ХОЛЕРЫ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ	43
Гальцева Г.В., Бойко Е.А., Малай В.И.	
ПРАВИЛА ОТБОРА СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ОСАДКОВ НА СУДАХ СМЕШАННОГО «РЕКА-МОРЕ» ПЛАВАНИЯ.....	48
Лях О.В., Водяницкая С.Ю.	
МИКРОБИОЛОГИЯ	51
НОВЫЙ СПОСОБ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДОЁМОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	51
Титова С.В., Веркина Л.М., Тришина А.В., Селянская Н.А., Головин С.Н., Полеева М.В.	
ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016 ГОДУ	54
Иванова С.М. ¹ , Иванников В.В. ¹ , Мискинова Т.А. ¹ , Титова С.В. ² , Кругликов В.Д. ² , Чемисова О.С. ² , Москвитина Э.А. ² , Монахова Е.В. ² , Архангельская И.В. ² , Гаевская Н.Е. ² , Непомнящая Н.Б. ² , Ежова М.И. ² , Левченко Д.А. ²	
СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O1 СТХА-ТСРА+, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	58
Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И.	
ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ.....	61
Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А., Тришина А.В.	
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ НА ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ В 2016 ГОДУ	65
Кругликов В.Д., Титова С.В., Ежова М.И., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б.	
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РЕКИ ВОЛГА С 1989 ПО 2016 ГОДЫ	68
Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Гаевская Н.Е.	
ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА	73
Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Полеева М.В., Рыковская О.А., Водопьянов С.О., Олейников И.П.	
СПОСОБНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ГИДРОЛИЗОВАТЬ СПАНЫ	76
Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н.	

L-АСПАРАГИНАЗА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ.....	78
Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Галичева А.Л.	
ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ И ДОМИНИРУЮЩИХ ВИДОВ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ.....	80
Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Архангельская И.В., Ежова М.И., Кругликов В.Д.	
О КУЛЬТУРАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ С 2012 ПО 2016 ГОДЫ.....	83
Калаева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Тюнникова В.Д.	
АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ТОЧКАХ МОНИТОРИНГА <i>VIBRIO CHOLERAE</i>, РАСПОЛОЖЕННЫХ НА ОЗЕРЕ КЕНОН ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ	86
Пономарева А.С., Миронова Л.В., Гладких А.С., Феранчук С.И., Балахонов С.В.	
СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/ НЕ O139 СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ МОНИТОРИНГА ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С 1999 ПО 2016 ГОДЫ.....	89
Архангельская И.В., Ежова М.И., Кругликов В.Д., Левченко Д.А.	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В 2016 ГОДУ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ	92
Чемисова О.С. ¹ , Рыковская О.А. ¹ , Полеева М.В. ¹ , Голенищева Е.Н. ¹ , Санамянц Е.М. ¹ , Алленов А.В. ²	
РОЛЬ ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ В СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ.....	95
Хунхеева Ж.Ю. ¹ , Миронова Л.В. ¹ , Воронок В.М. ² , Тарасенко Т.Т. ³ , Косенок Е.В. ³ , Алленов А.В. ⁴ , Хоменко Т.В. ⁴ , Солодкая Н.С. ⁴ , Балахонов С.В. ¹	
УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ	98
Березняк Е.А., Тришина А.В., Архангельская И.В., Симонова И.Р., Бареева А.Е., Веркина Л.М.	
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ / УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ	103
Тришина А.В., Березняк Е.А., Симонова И.Р., Полеева М.В., Веркина Л.М.	

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ НА СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА.....	106
Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Архангельская И.В., Ежова М.И., Полеева М.В.	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО СРЕДСТВА «БИОПАГ – Д» В ОТНОШЕНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ, РЕГЛАМЕНТИРОВАННЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД.....	110
Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Рыжова А.А., Сергиенко О.В., Судьина Л.В., Лях О.В., Баташев В.В.	
ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ И МОНИТОРИНГ СТОЧНЫХ ВОД В ЛАБОРАТОРИЯХ, РАБОТАЮЩИХ С ОПАСНЫМИ ВИБРИОНАМИ.....	113
Тюрин Е.А., Храмов М.В.	
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА.....	117
ВНУТРИВИДОВАЯ КОНКУРЕНЦИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬ ТОР БИОВАРОВ В БИОПЛЕНКЕ	117
Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Егиазарян Л.А., Титова С.В.	
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ SNP-ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	119
Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П.	
БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШТАММА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА Р-17917	123
Монахова Е.В., Омельчук Е.П., Ежова М.И., Писанов Р.В.	
КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН НЕЙРАМИНИДАЗЫ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> В <i>ESCHERICHIA COLI</i> ПОД КОНТРОЛЕМ T5 ПРОМОТОРА	127
Монахова Е.В., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Мишанькин Б.Н., Демидова Г.В., Шипко Е.С., Галичева А.Л.	
СТРУКТУРА ГЕНА <i>RTXA</i> – ЧЕТВЕРТЫЙ КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>.....	131
Монахова Е.В. ¹ , Писанов Р.В. ¹ , Титова С.В. ¹ , Кулешов К.В. ² , Weill F.-X. ³	
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> НА ОСНОВЕ INDEL-МАРКЕРОВ	138
Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.В.	

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ЛОКАЛИЗАЦИИ СТХ И RS1 ПРОФАГОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAE</i>, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЯХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА	141
Гладких А.С., Миронова Л.В., Балахонов С.В.	
ПЦР-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ	144
Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И.	
ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ.....	147
Погожова М. П., Романова Л. В., Гаевская Н. Е., Тюрина А. В.	
СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ/ПЕРСИСТЕНЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1 / НЕ O139 СЕРОГРУПП.....	150
Монахова Е.В., Омельчук Е.П., Архангельская И.В., Писанов Р.В.	
ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/ НЕ O139 СЕРОГРУПП И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ	155
Замарин А.А., Лопастейская Я.А., Шаров Т.Н., Захарова И.Б.	
ИММУНОЛОГИЯ	159
АЛЬФА-ЕНОЛАЗА И ВАКЦИНАЦИЯ ПРИ ХОЛЕРЕ	159
Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Иванова И.А.	
ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ.....	162
ПОЛИМЕРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ДИАГНОСТИКУМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА.....	162
Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Кочеткова А.П., Сорокин Р.А., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.	
ЭФФЕКТЫ КОМБИНАЦИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР	164
Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М.	
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ В ОТНОШЕНИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ У БЕЛЫХ МЫШЕЙ	169
Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Погожова М.П.	

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА БИОВАРА ЭЛЬ ТОР И РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ	172
Савельева И.В., Куличенко А.Н., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Савельев В.Н.	
ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСПОРТНЫХ СРЕД И СРЕД, СОДЕРЖАЩИХ ИНГИБИТОРЫ РОСТА ПОСТОРОННЕЙ МИКРОФЛОРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ	177
Ярымбаш Е.Г., Пидченко Н.Н., Зинич Л.С., Тихонов С.Н.	
ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ	180
АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2017 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»	180
Щипелева И.А., Марковская Е.И., Титова С.В., Чемисова О.С., Алексеева Л.П.	
ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ КООРДИНАЦИОННОГО НАУЧНОГО СОВЕТА ПО САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2017 ГОДУ	195
Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С.	
КРАТКИЕ ИТОГИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА С УЧРЕЖДЕНИЯМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И НАУКИ РОСПОТРЕБНАДЗОРА, А ТАКЖЕ СТРУКТУРАМИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМИ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ БЛАГОПОЛУЧИЕ НАСЕЛЕНИЯ ПО ХОЛЕРЕ ЗА I-II КВАРТАЛ 2017 ГОДА	201
Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С.	
РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	206
НАБОР РЕАГЕНТОВ «ИММУНОГЛОБУЛИНЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ, МЕЧЕННЫЕ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА, СУХИЕ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ <i>V. CHOLERAЕ</i> O1 И O139 (<i>IN VITRO</i>) МЕТОДОМ ИФА И ДОТ-ИФА» («ИГ - <i>V. CHOLERAЕ</i> O1/O139 – ИФА/ДОТ-ИФА»).....	206
Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Зюзина В.П., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Яговкин М.Э.	

**АННОТАЦИЯ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ
«ХОЛЕРА»..... 212**

**«АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ
ВИБРИОНОВ»..... 212**

Коршенко В.А.

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *VIBRIO PARAHAEEMOLYTICUS* И *VIBRIO
ALGINOLYTICUS*..... 214**

Рыковская О.А.

**ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ СПОСОБОВ
КОНТРОЛЯ И УПРАВЛЕНИЯ БАЛЛАСТНЫМИ ВОДАМИ НА
СУДАХ СМЕШАННОГО «РЕКА-МОРЕ» ПЛАВАНИЯ..... 215**

Лях О.В.

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ 217

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРАВИЛА РАБОТЫ С
БАКТЕРИОФАГАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ I-IV ГРУПП
ПАТОГЕННОСТИ» 217**

Гаевская Н.Е., Титова С.В., Чемисова О.С., Тюрина А.В., Романова Л.В.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «РАБОТА С
ГЕОИНФОРМАЦИОННЫМ ПОРТАЛОМ (ГИС-ПОРТАЛ)
РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА.
ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ПРИВЯЗКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ
ДАННЫХ» 218**

Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Пичурина Н.Л.¹, Савченко А.П.¹, Водопьянов С.О.¹, Олейников И.П.¹,
Баташев В.В.¹, Ковалёв Е.В.², Ненадская С.А.², Леоненко Н.В.², Гончарова О.В.², Слись С.С.², Махненко
Д.С.² Новикова А.И.², Швагер М.М.³, Богунов И.И.³, Поливенко В.А.³, Полонский А.В.³, Гончаров А.Ю.³,
Говорухина М.В.³, Киреев Ю.Г.⁴, Балахнова В.В.⁴, Берберов Г.А.⁴

**ЭПИДЕМИОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АТЛАС «РОССИЙСКО-
УКРАИНСКАЯ ГРАНИЦА» ЧАСТЬ I – РЕКИ (РОСТОВСКАЯ,
ВОРОНЕЖСКАЯ, БЕЛГОРОДСКАЯ, КУРСКАЯ, БРЯНСКАЯ
ОБЛАСТИ) 219**

Титова С.В., Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Олейников И.П.,
Водяницкая С.Ю., Баташев В.В.

**SEQANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ
ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAE* ... 219**

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Кулешов К.В., Керманов А.В.,
Олейникова К.В.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ
БИОПЛЁНКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ..... 220**

Титова С.В., Веркина Л.М., Селянская Н.А., Лысова Л.К., Егиазарян Л.А., Таркаева Ж.В., Корнеева Л.А.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПЦР-
ГЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ
ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ»..... 221**

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

**БАЗА ДАННЫХ «*VIBRIO CHOLERAE*. СИБИРЬ И ДАЛЬНИЙ
ВОСТОК – АМПЛИФИКАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ_MLVA-
ГЕНОТИП»..... 222**

Миронова Л.В., Балахонов С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Феранчук С.И.,
Миткеева С.К., Гольдапель Э.Г., Бочалгин Н.О.

**ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И
СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ
ДАННЫХ 223**
ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ 229

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ

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

Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В.,
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Чемисова О.С., Ежова М.И.,
Левченко Д.А., Пичурина Н.Л., Гаевская Н.Е., Черепахина И.Я.,
Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Непомнящая Н.Б.

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

В 2016г. деятельность референс-центра по мониторингу холеры в Российской Федерации осуществлялась в соответствии с действующими регламентированными, методическими и распорядительными документами (Приказ от 17 марта 2008 г. N 88 «О мерах по совершенствованию мониторинга за возбудителями инфекционных и паразитарных болезней», СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровня», и другими).

Основные направления деятельности референс-центра включали: оценку эпидемиологической обстановки по холере в мире, странах СНГ и России, идентификацию штаммов холерных вибрионов O1, выделенных на административных территориях России, совершенствование лабораторной диагностики холеры, оказание консультативно-методической и практической помощи органам и учреждениям Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения России, проводящих лабораторную диагностику холеры, научно-методическое обеспечение исследований, а также подготовку и усовершенствование специалистов, обеспечивающих осуществление эпидемиологического надзора за холерой в субъектах Российской Федерации.

За указанный период проведен анализ результатов мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов O1, показавший, что всего в Российской Федерации было выделено 54 штамма *V. cholerae* O1 El Tor на территориях 12-ти субъектов. На идентификацию поступило 53 штамма, т.е. 98,1%: Республика Калмыкия (19 штаммов),

Крым (1), Республика Бурятия (1), Республика Коми (1), Республика Татарстан (1), Забайкальский край (11), Приморский край (5), Хабаровский край (1), Ставропольский край (1), Ростовская область (7), Челябинская (1), Свердловская (4). Штаммы *V. cholerae* O139 серогруппы обнаружены не были. В то время как в течение 2015 года из поверхностных водоемов изолировано 127 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы биовара Эль Тор на территории 6-ти субъектов. Процент поступивших штаммов в референс-центр составил 60.

Поступившие в 2016 г. на подтверждение 53 штамма холерного вибриона были идентифицированы как нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, с внесением корректив в характеристику фенотипических свойств штаммов по признаку агглютинабельности (Свердловская область) и фагорезистентности. Следует отметить, что в 2016 г. из поверхностных водоёмов Республики Коми, Ростовской области и Хабаровского края было изолировано три штамма *V. cholerae* O1, идентифицированных, как штаммы, лишённые гена холерного токсина *ctxA*, но содержащие ген токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA* в составе острова патогенности *VPI*. Полученные данные по результатам фено- и генотипических характеристик выделенных штаммов холерных вибрионов были внесены в базу данных ГИС «Холера 1989- 2014». Все 53 штамма холерных вибрионов O1 были изучены с использованием мультилокусного VNTR-типирования по пяти локусам *VcA*, *VcB*, *VcC*, *VcD*, *VcG*. Анализ распределения штаммов на основе INDEL-маркеров и 3 наиболее стабильных VNTR-генотипов (*VcC*, *VcD* и *VcG*) позволил установить, что все штаммы 2016 года распределились между несколькими кластерами. Так, штаммы, выделенные в 2016 году в Забайкальском крае, попали в один кластер со штаммами, выделенными в этом же регионе ранее. В этот же кластер попал штамм, выделенный в Республике Татарстан в 2016 году. Обращает на себя внимание, что штаммы из Ростовской области и Республики Калмыкия распределились между несколькими кластерами, что подтверждает факт одновременной циркуляции в этих регионах штаммов нескольких независимых друг от друга кластеров.

Кроме того подтверждены 11 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированных от 9-ти больных ОКИ: 6 штаммов, выделенных от людей в Р. Крым (г. Керчь) и 5 штаммов от трех больных в г. Азове Ростовской области. Данная работа была продолжена в 2017 г. Так было идентифицировано 2 нетоксигенных штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от людей (г. Тамбов – занос из Таиланда: г. Магадан – занос из Вьетнама).

Разработанный в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора алгоритм эпидемиологического расследования при обнаружении нетоксигенных холерных вибрионов O1 из объектов окружающей среды апробирован в 2016 г. во взаимодействии с

Управлениями Роспотребнадзора по 12 субъектам. Установлены причины контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов. В основном это сбросы хозяйственно-бытовых сточных вод, в том числе несанкционированные (Ростовская область, Республика Калмыкия, Республика Крым, Приморский край, Республика Бурятия, Республика Коми, Свердловская область и другие), а также предшествующие выделению вибрионов ливни (Ростовская область, Ставропольский край). Не выявлены причины и условия (социальные или природные) выделения холерных вибрионов в Республике Татарстан, Забайкальском крае и Челябинской области.

Оказана консультативно-методическая помощь и практическая помощь по вопросам лабораторной диагностики холеры и порядка ее проведения в лабораториях различного территориального уровня, (в том числе в он-лайн режиме), учреждениям Роспотребнадзора семи субъектов РФ (Краснодарский край, Забайкальский край, Приморский край, Республика Бурятия, Республика Коми, Тамбовская область, Свердловская область). Оказана помощь в обеспечении дифференциально-диагностической средой (лактозо-сахарозная – 2 л) ФБУЗ «ЦГ и Э в Краснодарском крае.

В связи с выделением ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора штаммов *V. cholerae* El Tor, а также с осложнением эпидемической ситуации по острым кишечным инфекциям на Украине и неблагоприятными метеорологическими явлениями на территории г. Ростова-на-Дону и г. Батайска было проведено 01.07.2016 г. совещание при Главном государственном враче по Ростовской области. В соответствии с Протоколом совещания мониторинг проводился в усиленном режиме, и были проведены следующие мероприятия:

- Введен с 01.07.2016 г. ежедневный мониторинг эпидемиологически значимых водоемов Ростовской области, в т.ч. в г. Ростове-на-Дону, на приграничных территориях с Украиной. Согласован и утвержден руководителем Роспотребнадзора по Ростовской области перечень из 26 точек поверхностных водоемов для ежедневного мониторинга, в т. ч. 9 – на приграничных территориях с Украиной. О результатах исследования на наличие холерных вибрионов в пробах воды из стационарных и дополнительных точек институт ежедневно информировал Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области».

- Для усиления и оказания методической помощи при проведении исследований на холеру были направлены специалисты ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лабораторию особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и

эпидемиологии в Ростовской области» (с 04.07.2016г.) и в филиалы ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в г. Каменске-Шахтинском и в г. Миллерово с 06.07.2016 г. по 08.07.2016 г.

- По факту выделения из стационарных и дополнительной точек нетоксигенных штаммов холерного вибриона O1 E1 Tor Ogawa специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора совместно со специалистами Управления Роспотребнадзора по Ростовской области и филиала ФБУЗ «ЦГиЭ в Ростовской области» в г. Ростове-на-Дону проведено эпидемиологическое расследование по установлению и дачи рекомендаций по локализации источников контаминации.

Всего за эпидсезон 2016 г. было исследовано 425 проб воды, из них 255 проб из объектов окружающей среды на территории Ростова-на-Дону и 170 проб воды на территории Таганрога. Выделено 352 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, из них 195 штаммов из объектов окружающей среды в Ростове-на-Дону и 157 штаммов – в Таганроге.

Холерные вибрионы non O1/non O139 серогрупп, из водных объектов окружающей среды обнаруживали ежемесячно в период проведения мониторинга. При серологическом типировании данных штаммов были выявлены доминирующие серогруппы: O2, O16, O24, O76.

Таблица 1. Результаты мониторинга водных объектов в РО на наличие холерных вибрионов в 2016 г.

№ п/п	Водоем / Наименование точки	Кол-во проб	Выделено <i>V. cholerae</i> non O1/O139	Выделено <i>V. cholerae</i> O1
1	Р. Дон / Правый берег у Державинского спуска	43	34	0
2	Р. Темерник / Устье впадения в р. Дон	33	22	1
3	Р. Дон / У железнодорожного моста (правый берег) в Западном жилком массиве	44	34	1
4	Пр. Мертвый Донец / 1 км ниже автодорожного моста (Кумжинская роща)	31	18	0
5	р. Темерник / Ботанический сад, у моста	31	23	0
6	Р. Дон / Правый берег, Кировский спуск напротив здания экипажа № 2 РМК им. Седова	44	37	0
7 *	Р. Темерник / Волоколамская 2б	29	28	2
8	Р. Миус / с. Куйбышево, Куйбышевский район	34	33	0
9	Азовское море / Рыбцех №2 ПКРА «Красная звезда», с. Весело-Вознесенка, Неклиновский район	34	31	0
10	Азовское море / с. Петрушино, Неклиновский район, неорганизованный сброс сточных вод	34	32	0
11	Азовское море/ пляж Елисеевский, г. Таганрог	34	30	0
12	Азовское море /место сброса из балки М. Черепаха, г. Таганрог	34	30	0
Всего:		425	352	4

*- дополнительная точка отбора проб воды

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 восьми филиалов ФБУЗ ЦГиЭ в Ростовской области.

Всего было проверено 69 серий жидких и твёрдых питательных сред, из них одна серия 1% пептонной воды потребовала дополнительной варки, и к началу эпидсезона все лаборатории имели годные серии питательных сред для выявления холерных вибрионов.

Таблица 2. Результаты проверки качества питательных сред для лабораторной диагностики холеры, присланных во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в 2016 году

№№ п/п	Наименование учреждения	Щелочной агар	Основной раствор пептона	Теллурид калия	1% пептонная вода	Прогресс
1	МБУЗ 1 ГБ г. Таганрога	1	1	1	-	-
2	МБУЗ ГБ № 20 г. Ростова-на-Дону	4	2	1	-	1
3	«Первая городская больница» г. Азова	1	1	1	-	-
4	МБУЗ ЦГБ г. Каменск-Шахтинска	1	1	1	-	-
5	МБУЗ РБ г. Красного - Сулина	1	1	1	-	-
6	МБУЗ ЦРБ Азовского района	1	1	-	1	-
7	МБУЗ ГБ СМП г. Шахты	1	1	1		
8	МБУЗ ЦГБ г. Донецка	1	-	1	-	-
9	МБУЗ «Специализированная инфекционная больница г. Новочеркаска	1	1	1	-	-
10	МБУЗ ГБ №1 г. Ростова-на-Дону	1	1	1	-	-
11	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Таганроге	1	1	1	-	-
12	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Каменск-Шахтинске	5	2	3	-	-
13	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Зернограде пригот. в Азове	1	1	1	-	-
14	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Зернограде пригот. в г. Батайске	1	1	1	-	-
15	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Сальске	1	1	1	-	-
16	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в Аксайском р-не	2	2	2	-	-
17	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Миллерово	2	1	1	-	-
18	Филиал ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Волгодонске	1	1	1		
Всего		27	20	20	1	1
Всего анализов:		69				

С начала 2016 года были проведены: научно-практическая конференция по оценке противоэпидемической готовности лабораторной базы Ростовской области по диагностике холеры и 1 выездной семинар по оценке противоэпидемической готовности лабораторной базы (г. Каменск-

Шахтинск, Ростовская область); а также было осуществлено участие в проверке готовности 19-ти лабораторий к проведению лабораторной диагностики холеры на 8 приграничных с Украиной районах Ростовской области. Мероприятия по оценке противоэпидемической готовности лечебно-профилактических организаций (ЛПО) Ростовской области проводились: в МБУЗ ЦГБ г. Новошахтинск, МБУЗ ЦРБ Родионово-Несветайского района, МБУЗ ЦГБ г. Донецка РО, бактериологической лаборатории МБУЗ ЦГБ г. Донецка РО, МБУЗ ЦГБ г. Гуково, МБУЗ «РБ» г. Красного Сулина и Красносулинского района, МБУЗ ЦРБ Неклиновского района, МБУЗ ЦРБ Матвеево-Курганского района, МБУЗ ЦГБ г. Каменск-Шахтинска, МБУЗ ЦРБ Миллеровского района, а также в бактериологических лабораториях филиалов ФБУЗ «Центра гигиены и эпидемиологии в РО» в г. Каменск-Шахтинском и в г. Миллерово.

С использованием современных молекулярно-генетических методов изучены штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы, выделенные в 2016 г. из поверхностных водоемов на территории г. Ростова-на-Дону. Установлено, что штаммы относятся к следующим генотипам: 30 (штамм *V. cholerae* El Tor Ogawa Л-1), 31 (штамм *V. cholerae* El Tor Ogawa Л-9), 32 (штаммы *V. cholerae* El Tor Ogawa №№ 42, 43, 39), 33 (штамм *V. cholerae* El Tor Ogawa № 53), которые (генотипы) ранее на территории Ростовской области не регистрировали, что свидетельствовало об их заносе.

Кроме того, в плане совершенствования мониторинговых исследований был успешно апробирован на этапе забора проб разработанный в институте авторский метод с использованием устройства - «ловушек», а на этапе идентификации был внедрен метод определения родовой и видовой принадлежности холерных вибрионов с помощью – MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа, что сократило время проведения исследований на 6 - 8 часов. Разработан подход к актуализации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, связанный с установлением их генотипов (по 14 генам), то есть, выявлением сходств / различий со штаммами, как вновь выделенными, так и обнаруженными ранее, а также установление их происхождения (занос / переживание) и предположительное определение возможной степени вероятности этиологической роли в возникновении ОКИ. Внедрены в работу референс-центра наборы реагентов: «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РА» и «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РИФ», прошедшие государственную регистрацию. В 2017 г. зарегистрирована «Плотная питательная среда для выделения и культивирования холерных вибрионов, готовая к использованию после переплавки. Холерная дрожжевая среда ХДС-агар» (Рег. уд. № РЗН 2017/5435 от 27.02.17). В

ГКПБ «Микроб» депонированы штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139 P-19260 и P-912 (присвоены номера КМ 254 и КМ 255), содержащие гены cholix-токсина (chxA) соответственно I и III типов, (характерные для штаммов, выделенных из р. Агура, Краснодарский край в 2015 г.). Данные штаммы предназначены для использования в качестве положительных контролей при проведении ПЦР для выявления генов chxAI и chxAIII у холерных вибрионов. А также депонирован штамм *V. cholerae* nonO1/nonO139 P17449, содержащий аллель гена rstRenv, (присвоен номер КМ 256). Штамм предназначен для использования в качестве положительного контроля при проведении ПЦР для выявления гена rstRenv у холерных вибрионов. Кроме того депонирован тест-штамм *V cholerae* El Tor 19546 для размножения новых рас диагностических холерных бактериофагов.

Отдел профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов согласно плану курсовых мероприятий, ежегодно проводит профессиональную переподготовку врачей и лаборантов по специальности «Бактериология» для учреждений Роспотребнадзора и ЛПО, в 2015 году было обучено 77 специалистов, в 2016 году – 83.

В процессе работы проведено пополнение баз данных: «Штаммы *Vibrio cholerae*» и ГИС «Холера-штаммы-VNTR», «Холера 1989-2014», «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире» Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ, России» и «Холерные вибрионы. Россия», «Холерные штаммы VNTR». Составлено 10 аналитических справок по результатам идентификации, в том числе генотипирования (VNTR, INDEL-типирование и др.) штаммов, выделенных из объектов окружающей среды на территории России.

С целью совершенствования тактики эпидемиологического надзора в информационно-аналитической подсистеме эпидемиологического надзора Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Референс центр по мониторингу холеры в Российской Федерации, осуществляет эпидемиологический мониторинг ситуации по холере в мире и в стране с еженедельным представлением информации в Роспотребнадзор и на сайте института.

Ежегодно в журнале «Проблемы особо опасных инфекций» (с 2011 г.) публикуются статьи об эпидемиологической обстановке по холере в мире и прогнозу. Руководителю Роспотребнадзора ежегодно направляются информационные письма об эпидемиологической ситуации по холере в текущем году и прогнозе на последующий период. Данные письма Роспотребнадзором направляются в адреса Руководителей управлений Роспотребнадзора по субъектам РФ и железнодорожному транспорту, Руководителям ПЧУ, Руководителям органов исполнительной

власти в субъектах РФ в области охраны здоровья.

На основании определения сотрудниками института эпидемиологического потенциала по холере Республики Крым и отнесения к соответствующему типу по эпидемиологическим проявлениям внесено изменение N 1 в санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» (приложение), утв. Постановлением главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 17 мая 2016 г. N 65 «О внесении изменения N 1 в СП 3.1.1.2521-09».

Информационное сопровождение эпидемиологического надзора за холерой представлено:

1. Еженедельным выпуском информационных бюллетеней «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире» и передач в Роспотребнадзор. Еженедельной информацией по холере в мире на сайте Референс-центра: <http://antiplague.ru/informaciya-o-zabolevaemosti-xoleroj-v-mire-na-> (дата) (доступна для всех сотрудников Роспотребнадзора).

2. Разработкой ГИС-портала, содержащего различные электронные карты, доступные уже сегодня для всех сотрудников Роспотребнадзора в сети Интернет (на сайте Референс-центра Ростовского-на-Дону противочумного института).

3. ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» и пополняемой ГИС «Холерные вибрионы 1989-2014», а также проблемно-ориентированной базой данных «Холерные вибрионы. Россия», которые содержат данные о субъектах Российской Федерации, в которых выделены холерные вибрионы с учетом типов территорий по эпидемиологическим проявлениям холеры, климато-географических областей; точках отбора проб воды на холеру; комплексной характеристике выделенных штаммов; что используется в качестве инструмента при проведении эпидемиологических исследований, оценке эпидемиологической обстановки.

ОЦЕНКА ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ РИСКОВ ВНЕШНИХ УГРОЗ И ПОТЕНЦИАЛЬНОЙ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ОПАСНОСТИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ИГР ЧМ-2018 В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ (НА ПРИМЕРЕ ХОЛЕРЫ)

Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Водопьянов А.С., Рыжков Ю.В.,
Титова С.В.

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

К настоящему времени накоплены данные по эпидемиологической конъюнктуре, оказавшей негативное воздействие на здоровье населения в условиях массовых мероприятий (ММ) с международным участием [1,3,5,7,8]. Отсутствие серьезных эпидемиологических осложнений во время ММ до настоящего времени связано с заблаговременным и целенаправленным планированием мероприятий по предупреждению реализации эпидемиологических рисков. Разработано эпидемиологическое содержание обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в ходе проведения ММ. Определено понятие и разработана структура потенциальной эпидемической опасности (ПЭО) ММ, основанная на оценке эпидемиологических рисков по отношению к спектру определенных угроз, учитывающая место и время проведения ММ.

Каждый регион мира характеризуется определенным спектром внешних (заносных) и внутренних (эндемичных), независимых от ММ проявлений инфекционных болезней. Перечень инфекционных болезней, представляющих внешний и внутренний (региональный) биологические риски, нормативно закреплены в Международных медико-санитарных правилах (2005 г.). Значение инфекционных болезней, представляющих опасность для ММ, оценивается с точки зрения способности каждой болезни к эпидемическому распространению и возникновению чрезвычайной ситуации (ЧС), а также в связи с принадлежностью возбудителей болезней из перечня ММСП (2005 г.) к арсеналу средств биологической агрессии и способностью в случае биотеррористического акта создания ЧС.

На основе данных о заболеваемости инфекционными болезнями, предусмотренными ММСП (2005 г.), полученными из общедоступных источников, разработана ГИС «Внешний эпидемиологический риск - заболеваемость», отражающая инфекционную заболеваемость по странам мира, в том числе по холере. Принципиальной особенностью ГИС является графический интерфейс, позволяющий оперативно получать информацию по странам мира. ГИС доступна для сотрудников Роспотребнадзора на

ГИС-портале института по адресу gis.antiplague.ru/index.php

Еженедельно информация по холере представлена на сайте института: <http://antiplague.ru/informaciya-o-zabolevaemosti-xoleroj-v-mire-na-> (дата).

Для оценки внешнего риска и определения потенциальной эпидемической опасности ММ с международным участием (ПЭО ММ) использована методика количественной оценки [2,4].

В качестве основы использовали оценку риска заноса холеры приезжающими участниками ММ (РЗ) и степень риска ее дальнейшего распространения (РР). Оценка риска заноса (предварительная) определялась с учетом перечня стран-участниц ФИФА-18, вошедших в отборочные игры (Уганда, Нигерия, Камерун, Демократическая Республика Конго, Гана, Конго) [6], где отмечалось эпидемиологическое неблагополучие по холере, а также стран с высокими показателями заболеваемости в 2012-2016 гг. (табл. 1), из которых могут прибыть туристы.

Таблица 1. Заболеваемость холерой в возможных странах-участницах чемпионата мира по футболу-2018 (г. Ростов-на-Дону). 2012-2016 гг.

№ п/п	Наименование страны	Заболеваемость в абс./% ₀₀₀₀				
		2012 г.	2013 г.	2014 г.	2015г.	2016 г.
1	Индия	1171/0,112	6008/0,574	4031/0,385	889/0,085	167/0,016
2	Непал	34/0,143	0/0	933/3,9	80/0,3	132/0,556
3	Филиппины	1864/2,3	6/0,008	4547/5,7	0/0	10/0,013
4	Доминиканская Республика	7919/91,5	1954/22,6	603/6,97	546/6,31	1069/12,36
5	Гаити	116290/1530	60814/800	27753/365	36045/474	40753/536
6	Уганда*	6326/27,034	748/3,197	309/1,321	1461/6,244	3584/15,316
7	Кения	0/0	0/0	35/0,112	13291/42,46	1661/5,3
8	Нигерия*	597/0,498	6600/5,5	35996/29,9	5290/4,4	768/0,64
9	Йемен	0/0	0/0	0/0	0/0	12733/68,83
10	Южный Судан	16/0,19	0/0	6421/77,73	1818/22,0	3708/44,89
11	Танзания	286/0,817	321/0,917	0/0	11563/33,04	14117/40,33
12	Сомали	22576/282,2	6864/85,8	2820/35,3	7536/94,2	14938/186,7
13	Эфиопия	0/0	55/0,083	0/0	0/0	12000/18,21
14	ДРК*	33661/62,36	26944/49,92	22203/41,13	19182/35,54	28162/52,17
15	Камерун*	363/2,337	29/0,187	3355/21,603	124/0,798	77/0,496
16	Гана*	9548/48,101	50/0,252	28944/145,8 14	692/3,486	602/3,033
17	Конго*	1181/38,220	1624/52,557	0	0	18/0,583

* - выделены страны с высокими показателями заболеваемости холерой в 2012-2016 гг.

Величина риска заноса из каждой страны рассчитывалась по формуле, приведенной в работе М.А Пятяшиной (2015 г.) [4]. Риски заноса холеры из стран, взятых в исследование, составили: $R_{\text{Индия}} = 0,0002$; $R_{\text{Непал}} = 0,001$; $R_{\text{Филиппины}} = 0,002$; $R_{\text{Йемен}} = 0,07$; $R_{\text{Танзания}} = 0,03$; $R_{\text{Доминиканская Респ.}}$

$= 0,003$; $PZ_{\text{Гаити}} = 0,8$; $PZ_{\text{Уганда}} = 0,02$; $PZ_{\text{Кения}} = 0,03$; $PZ_{\text{Нигерия}} = 0,02$; $PZ_{\text{Южный.Судан}} = 0,07$; $PZ_{\text{Сомали}} = 0,2$; $PZ_{\text{Эфиопия}} = 0,01$; $PZ_{\text{ДРК}} = 0,2$; $PZ_{\text{Камерун}} = 0,01$; $PZ_{\text{Гана}} = 0,08$; $PZ_{\text{Конго}} = 0,06$.

Совокупная величина риска заноса холеры из взятых в исследование стран на территорию проведения ММ ($PZ = PZ_{\text{Индия}} + PZ_{\text{Непал}} + \dots + PZ_{\text{Сомали}}$) составила 1,6.

При анализе данных числовые значения риска заноса были преобразованы в баллы: интервал от 0,0 до 0,01 соответствовал эквиваленту в баллах от 1 до 5; от 0,011 до 0,1 – от 6 до 10 баллов, от 0,11 до 1,0 – от 1,09 до 25 баллов, от 1,1 до 7,0 и более – от 26 до 50 баллов. В целом PZ холеры, преобразованный в баллы, составил 28. Из стран Азии при риске заноса 0,074 – 9 баллов, из стран Карибского бассейна при PZ 0,803 – 21, из стран Африки при PZ 0,65 – 19 соответственно.

Оценка риска распространения (PP) холеры осуществлялась на основе выбора комплекса показателей и оценки их в баллах [4]. Нами введен показатель «С» (таб. 2).

Таблица 2. Показатели, определяющие риск распространения холеры в г. Ростове-на-Дону при проведении ФИФА-2018.

Показатель	Наименование показателя	Градации показателя, их балльная оценка	МАХ (балл)
A	Наличие заносов инфекционных болезней в место проведения ММ	С распространением – 8 Без распространения – 4	8
B	Ведущий механизм передачи инфекционной болезни	Фекально-оральный – 8	8
C	Путь распространения возбудителя инфекции	Водный - 10 Алиментарный - 6 Контактный - 4	10
D	Длительность выделения возбудителя из организма больного/носителя	Длительный – 6 Средний – 3 Короткий – 1	6
E	Природно-климатические факторы, способствующие распространению болезни при ее заносе	Есть – 8 Нет – 2	8
F	Наличие средств специфической профилактики/лечения	Есть – 1 Нет – 2	2
G	Уровень готовности медицинской и лабораторной службы	Низкий – 8 Средний – 4 Высокий – 2	8

Риск распространения холеры вычисляли по совокупности показателей A + ...G. Максимально возможный риск распространения (PP) холеры составил 50 баллов. Например, PP холеры с учетом показателей, определяющих риск распространения холеры при реализации алиментарного пути распространения возбудителя инфекции в г. Ростове-

на-Дону, составил 39 баллов. $PP_{\text{холеры}} = 8+8+6+6 +8+1+2 = 39$ баллов.

Величина потенциальной эпидемической опасности ПЭО ММ с международным участием по отношению к холере определена суммой показателей рисков заноса и распространения.

Исходя из максимально возможной величины ПЭО (100 баллов) [4] использованы четыре градации уровня потенциальной эпидемической опасности ММ с международным участием: высокий (51-100 баллов), средний (45-50 баллов), низкий (21-44 балла) и минимальный (1-20 баллов).

$ПЭО_{\text{холеры}} = 28+39 = 67$ баллов (высокая).

При определении ПЭО по континентам (Азия, регион Карибского бассейна, Африка) получены следующие значения:

$ПЭО_{\text{Азия}} = PZ_{\text{Азия}} (9 \text{ баллов}) + PP (39 \text{ баллов}) = 48$ (средняя).

$ПЭО_{\text{РКБ}} = PZ_{\text{РКБ}} (21 \text{ баллов}) + PP (39 \text{ баллов}) = 60$ (высокая).

$ПЭО_{\text{Африка}} = PZ_{\text{Африка}} (19 \text{ баллов}) + PP (39 \text{ баллов}) = 58$ (высокая).

Таким образом, потенциальная эпидемическая опасность массовых мероприятий с международным участием на примере холеры для города Ростова-на-Дону с учетом риска заноса из указанных 17 стран мира и возможного риска распространения холеры – высокая. Из стран Азии – средняя, Африки и стран Карибского бассейна – высокая. Это указывает на необходимость проведения комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по предотвращению заноса холеры всеми видами международного транспорта, контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп поверхностных водоемов, используемых в качестве источников водоснабжения и водопользования, и других мер, предусмотренных государственным санитарно-эпидемиологическим надзором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Балахонов, С.В. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012 / С.В. Балахонов, М.В. Чеснокова, Е.И. Андаев и др. Под. ред. акад. Онищенко Г.Г. – Новосибирск: Наука-Центр, 2013. – 419 с.

2. Онищенко, Г.Г. Количественная оценка потенциальной эпидемической опасности массовых мероприятий с международным участием и ее апробация в условиях Универсиады-2013 / Г.Г. Онищенко, М.А. Пятяшина, С.К. Удовиченко и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – Вып. 2. –С. 5–8.

3. Пятяшина, М.А. Проблемы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия массовых мероприятий с международным участием в современных условиях (обзор литературы) / М.А. Пятяшина, Л.А. Балабанова // Казанский медицинский журнал. –

2015. – № 1. – С. 90–95.

4. Пятяшина, М.А. Научные основы обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия международных массовых мероприятий и их реализация на примере XXVII Всемирной летней Универсиады в городе Казани: Автореф. дисс... д-ра мед. наук. – Саратов, 2015. – 42 с.

5. Outbreak of Escherichia coli O157 infection associated with a music festival / Crampin M., Willshaw G., Hancock R. *et al.* // *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* – 1999. – № 18. – P. 286–288.

6. <http://ru.fifa.com/worldcup/index.html> (дата обращения, 18.05.2017 г.).

7. Robson H.E. The special Olympic Games for the mentally handicapped – United Kingdom 1989 // *BR. J. Sports Med.* – 1990. – Vol. 24, № 4. – P. 225–230.

8. Schenkel K., Williams C., Echmanns T. *et al.* Enhanced surveillance of infectious diseases: the 2006 FIFA World Cup experience, Germany // *Euro Surveill.* – 2006. – Vol. 11, Issue 12. <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=670> (дата обращения 14.03.2017 г.)

РАЗРАБОТКА ИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ОЦЕНКИ РИСКОВ, СВЯЗАННЫХ С ЗАВОЗОМ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Титова С.В., Водяницкая С.Ю.,
Олейников И.П., Водопьянов С.О.

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

Предупреждение заноса и распространения на территории Российской Федерации инфекционных болезней, представляющих опасность для населения – одна из важнейших задач, стоящих перед учреждениями Роспотребнадзора. Эффективное выполнение мероприятий по санитарной охране территории требует как выявления, так и своевременной оценки факторов, способствующих формированию чрезвычайных ситуаций эпидемиологического характера [1].

Одним из факторов, способствующих заносу болезней, является воздушный транспорт, посредством которого возможно перемещение на дальние расстояния в короткое время. Этот вид транспорта является

важным при оценке рисков завоза холеры, так как его удельный вес в завозах на территорию нашей страны составил 78% [3]. Это объясняет интерес к анализу авиационного пассажиропотока в целях совершенствования эпидемиологического надзора [1]. Внедрение технологий контроля внешних угроз может являться одним из путей минимизации риска возникновения биологической опасности [2]. Интенсивное развитие геоинформационного картографирования, доступность подробных карт местности почти всей территории Земли дает возможность более детального изучения факторов риска завоза инфекционных болезней на дальние расстояния.

Цель настоящей работы состояла в разработке информационной системы оценки рисков, связанных с завозом инфекционных болезней на основе данных анализа мировых пассажиропотоков воздушного транспорта.

Материалы и методы. Для пространственного анализа применили бесплатную ГИС-систему с открытым исходным кодом QGIS версий 2.2-2.6. Картографические данные получали из проекта OpenStreetsMap (openstreetmap.org). В работе использовали данные о пассажиропотоках, полученные группой Huang [4].

Результаты и обсуждение. Основой для создания системы оценки рисков завоза инфекционных болезней послужила разработанная во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора географическая информационная система (ГИС) «Внешний эпидемиологический риск». При формировании ГИС были учтены как сведения о расположении гражданских аэропортов, так и данные о пассажиропотоке между ними, что может быть использовано для оценки и прогнозирования рисков, связанных с завозом инфекционных болезней.

Примером практического использования разработанной ГИС может служить анализ рисков, связанных со вспышкой холеры в округе Ганджам (штат Орисса, Индия), зарегистрированной в апреле 2017 года [5].

Первый этап анализа внешних рисков заключается в учете гражданских аэропортов, расположенных в непосредственной близости от места вспышки болезни. В рассматриваемом случае, в непосредственной близости (около 50 км) от места регистрации случаев холеры расположен только один аэропорт – Бхубанесвар. Остальные расположены более чем в 300 км от места возникновения вспышки, что уменьшает их эпидемиологическую значимость на момент вспышки.

Второй этап работы состоит в изучении расписания рейсов бортов, осуществляющих вылет из аэропорта Бхубанесвар. При этом анализ проводится с учетом прогнозируемого пассажиропотока, возможных пересадок и трансфера. Так, ГИС позволил установить, что прямые рейсы из аэропорта Бхубанесвар осуществляются только внутри страны. В Российскую Федерацию (при совершении авиарейса с одной пересадкой)

можно попасть только в Москву. В то же время пассажиропоток из исходной точки в остальные российские города (с учетом двух пересадок) крайне низок (рисунок 1). Ориентировочное число пассажиров, прибывающих в Россию из аэропорта Бхубанесвар, составляет около 300 человек в год.

Использование разработанной ГИС для анализа рисков вспышки холеры в штате Мадхья-Прадеш (Индия) в сентябре 2016 года [6] позволило выявить возможные внешние эпидемиологические риски.

Установлено, что в непосредственной близости от мест регистрации болезни расположены два аэропорта: Джайпур и Международный аэропорт имени Индиры Ганди. В данном случае риск завоза возбудителя холеры в Россию гораздо выше в связи с наличием прямого рейса в г. Москву и большим пассажиропотоком в ряд других городов Российской Федерации (рисунок 2). При этом ориентировочное число пассажиров из указанных аэропортов составляет около 100 тысяч человек в год, что более чем в 300 раз выше, чем из аэропорта Бхубанесвар. Сравнение результатов анализа вспышек в штате Мадхья-Прадеш и в округе Ганджам (штат Орисса) наглядно демонстрируют различную степень риска завоза холеры, что не было бы установлено при традиционном исследовании.

Таким образом, в ходе проведенной работы создана ГИС «Внешний эпидемиологический риск» и алгоритм ее использования, позволяющие проводить оценку рисков, связанных с завозом инфекционных болезней на территорию России и других стран. Проведенный сравнительный анализ двух вспышек холеры в Индии показал, что риск завоза опасных инфекционных болезней в Россию может существенно различаться в зависимости от непосредственного места локализации вспышки относительно крупных аэропортов. Так, внешний эпидемиологический риск завоза возбудителя в Россию из штата Мадхья-Прадеш почти в 300 раз выше, чем из округа Ганджам (штат Орисса).

Это позволяет рекомендовать разработанную систему оценки рисков при планировании мероприятий, направленных на минимизацию возможных рисков завоза холеры на территорию Российской Федерации.

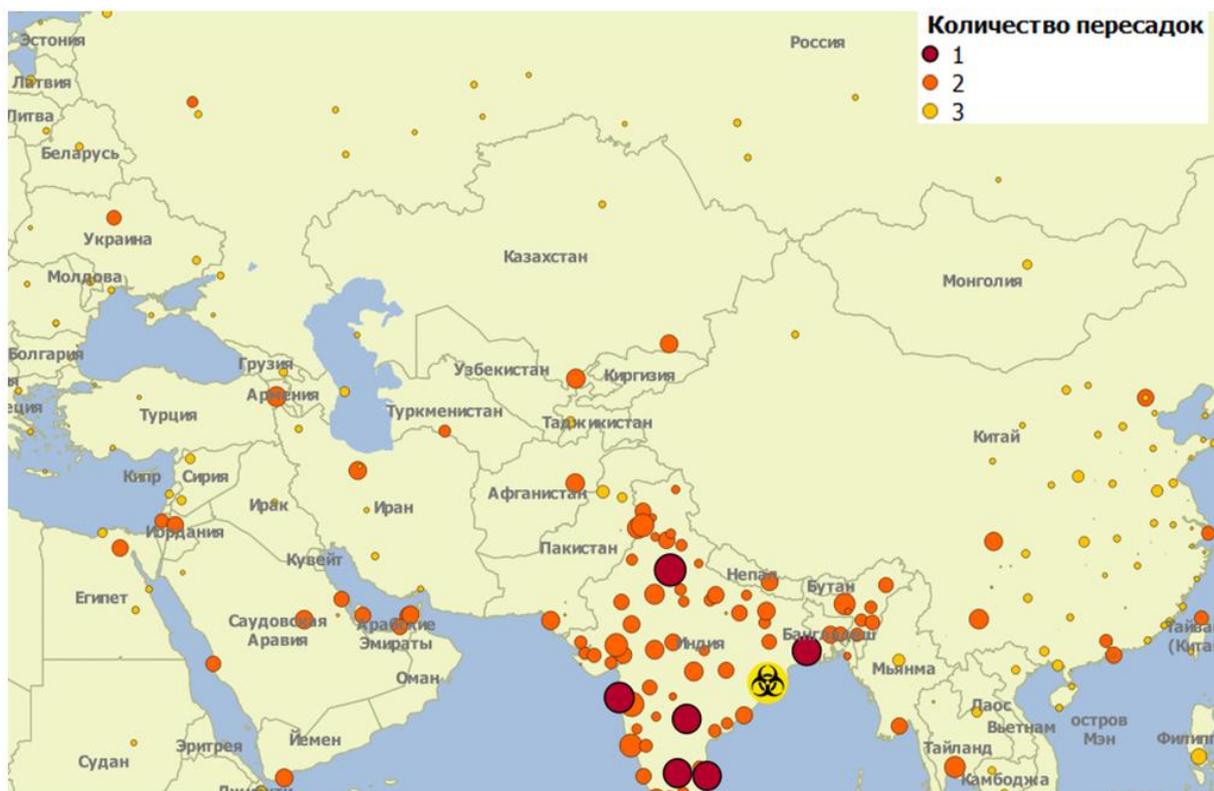


Рисунок 1. ГИС «Внешний эпидемиологический риск» - место регистрации вспышки холеры в округе Ганджам (Индия) и рейсы из аэропорта Бхубанесвар с учетом числа прилетевших пассажиров и пересадок. Темно-красным цветом обозначены прямые рейсы, оранжевым – с 1 пересадкой, желтым – с 2 пересадками. Размер маркера отражает ориентировочный объем пассажиропотока.

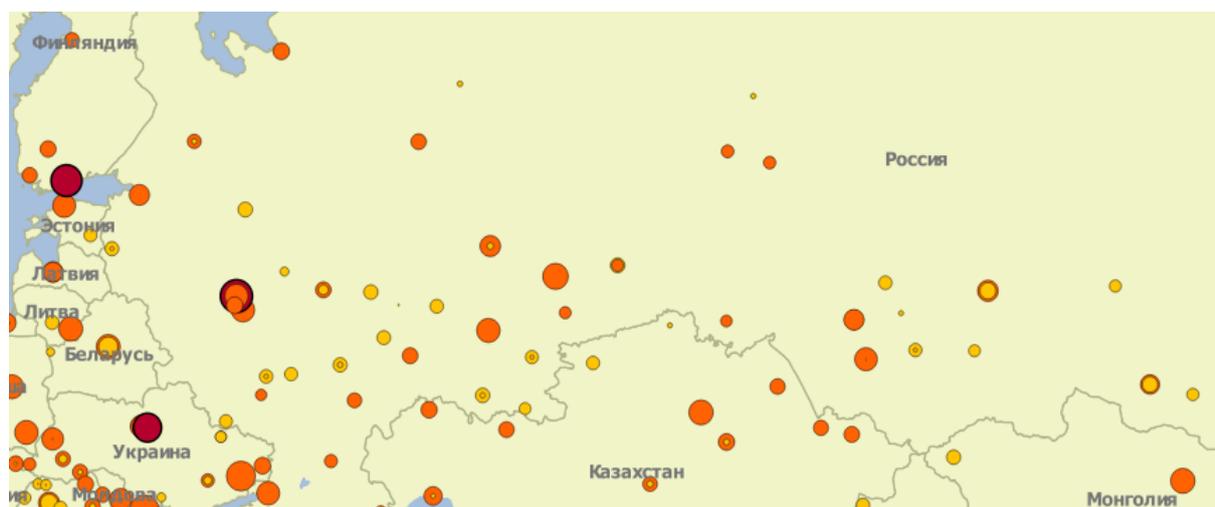


Рисунок 2. ГИС «Внешний эпидемиологический риск» - рейсы из аэропортов Джайпур и аэропорта имени Индиры Ганди с учетом числа прилетевших пассажиров и пересадок.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вишняков, В.А. Транспортная инфраструктура как внешний

риск формирования чрезвычайных ситуаций эпидемиологического характера в Забайкальском крае / В.А. Вишняков, А.К. Носков, М.В. Чеснокова, С.Э. Лапа, И.Г. Дампилова // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. - 2014. - № 24. - С. 124-126.

2. Пакскина, Н.Д. Эпидемиологическая обстановка и основные направления профилактики особо опасных и природно-очаговых болезней в Российской Федерации. Современные требования к организации санитарной охраны территории Российской Федерации в рамках реализации ММСП (2005 г.) // Дезинфекционное дело. - 2009. - № 3. - С. 23-29.

3. Удовиченко, С.К. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий / С.К. Удовиченко, А.В. Топорков, И.Г. Карнаухов, В.А. Сафронов, О.В. Кедрова, В.П. Топорков, В.В. Кутырев // Проблемы особо опасных инфекций. - 2013. - № 2. - С. 26-32.

4. Huang Z, Wu X, Garcia AJ, Fik TJ, Tatem AJ (2013) An Open-Access Modeled Passenger Flow Matrix for the Global Air Network in 2010. PLoS ONE 8(5): e64317. doi:10.1371/journal.pone.0064317

5. <http://odishatv.in/odisha/body-slider/cholera-detected-in-ganjam-village-209262/>

6. <http://timesofindia.indiatimes.com/city/bhopal/Cholera-outbreak-in-Sheopur-district-17-dead/articleshow/54002432.cms>

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГИС-ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ ВНЕШНИХ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ УГРОЗ

Водопьянов А.С., Баташев В.В., Водопьянов С.О., Титова С.В.,
Пичурина Н.Л., Олейников И.П., Самородова А.В., Кругликов В.Д.

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

Геоинформационные системы (ГИС) известны уже давно, но только в последние годы стали доступными специалистам учреждений Роспотребнадзора, органов здравоохранения и других учреждений, занимающихся проблемами профилактики инфекционных болезней. Геоинформационное картографирование по-новому раскрыло возможности комплексного исследования закономерностей, анализа факторов возникновения и существования инфекционных болезней

человека и оценки различных эпидемиологических рисков. При этом эпидемиологические осложнения, связанные с заносом возбудителя инфекции, определяются как «внешние» угрозы, а обусловленные активизацией местных нозологических форм как «внутренние» угрозы.

Как правило, пространственный анализ проводится на основе действующего административного деления территории. Так, например, действующие санитарные правила «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой» (СП 3.1.1.2521-09) предусматривают районирование территории по субъектам Российской Федерации. Вместе с тем, очевидно, что территория субъекта может являться неоднородной по степени эпидемиологического риска.

В связи с этим, цель настоящего исследования состояла в разработке методики выявления административно-независимых потенциальных территорий риска при реализации «внешних» эпидемиологических угроз.

Для оценки риска были сформированы четыре отдельные картограммы, отражающие пространственное распределение данных:

1. о расположении пунктов пропуска граждан из других стран на территорию Российской Федерации;
2. о расположении крупных населенных пунктов, в которые могут направляться больные;
3. об основных магистралях железнодорожного транспорта;
4. о крупных автодорогах федерального и регионального значения.

Для оценки интегративного риска была построена результирующая картограмма, при этом значение каждой точки рассчитывалось по формуле:

$$РИСК = (K_{авто} * R_{авто} + K_{жд} * R_{жд} + K_{нас} * R_{нас}) * K_{пп} * R_{пп},$$

где *РИСК* – интегративное выражение риска заноса в каждой точке результирующей картограммы,

R_{авто}, *R_{жд}*, *R_{нас}*, *R_{пп}* – уровень риска в каждой точке картограмм, рассчитанных на основе расположения автодорог, железнодорожных магистралей, населенных пунктов и пунктов пропуска;

K_{авто}, *K_{жд}*, *K_{нас}*, *K_{пп}* – коэффициенты для каждой из картограмм.

Для определения коэффициентов на карту были нанесены места заноса токсигенных штаммов холерного вибриона на территорию нашей страны за последние 10 лет. При этом подбор коэффициентов проведен таким образом, чтобы все места заноса холерных вибрионов имели максимальное значение РИСКА при минимальной сумме РИСКА всех точек карты.

Рассчитанные территории риска легли в основу ГИС, расположенной на геоинформационном портале Ростовского-на-Дону противочумного института по адресу http://gis.antiplague.ru/risk_inf.php.

При анализе территорий риска установлена неравномерность их распределения на картограмме Российской Федерации. Так, в Республике Крым площадь территорий риска составляет 47,21% от всей площади региона (рисунок 1), в Ростовской области – 8 % (рисунок 2), что объясняется более высокой частотой миграционных потоков въезжающих на полуостров различными видами транспорта.

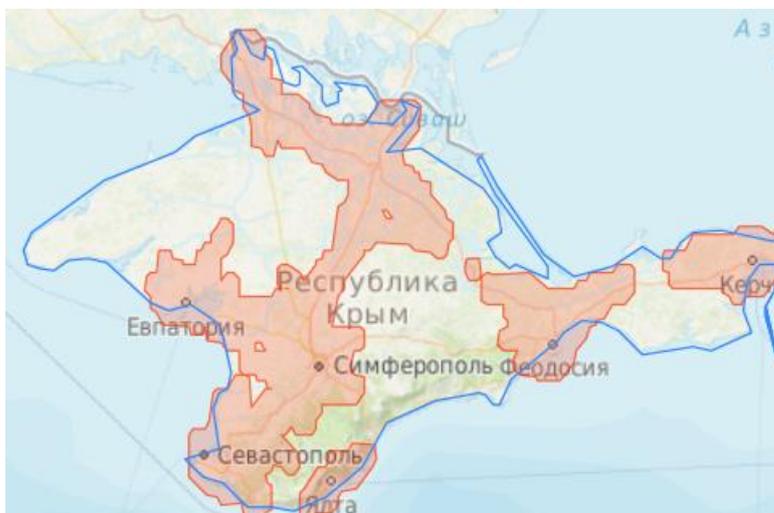


Рисунок 1. Зоны риска в Республике Крым.

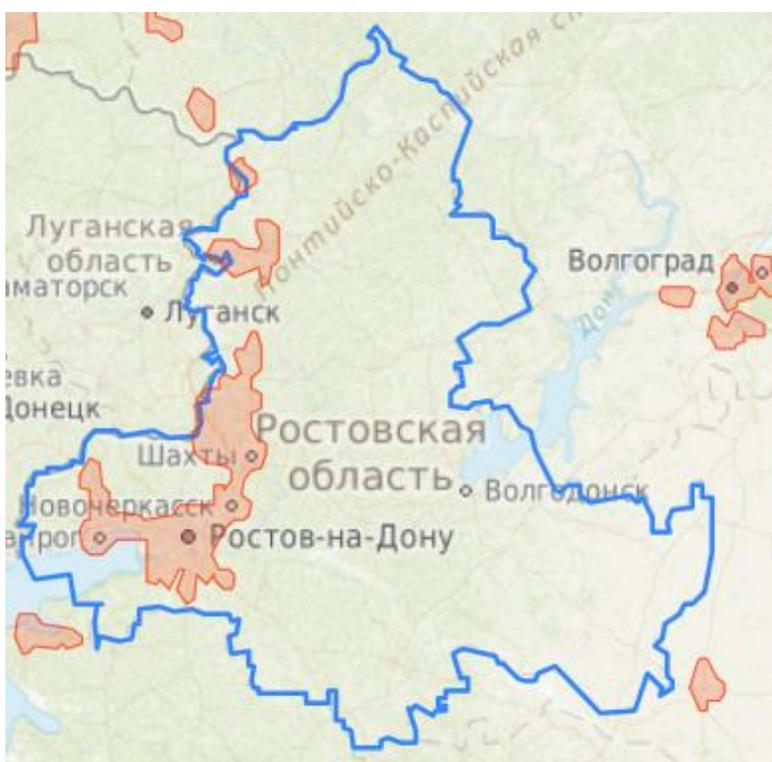


Рисунок 2. Зоны риска в Ростовской области.

Таким образом, в ходе проведенного исследования разработана методика выявления территорий риска при реализации «внешних»

эпидемиологических угроз. Рассчитанные зоны риска доступны для заинтересованных лиц на ГИС-портале Ростовского-на-Дону противочумного института.

**ОРГАНИЗАЦИЯ И ПРОВЕДЕНИЕ МЕРОПРИЯТИЙ
УПРАВЛЕНИЕМ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО РОСТОВСКОЙ
ОБЛАСТИ ПО ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОМУ НАДЗОРУ ЗА
ХОЛЕРОЙ И ДРУГИМИ ИНФЕКЦИЯМИ, ТРЕБУЮЩИМИ
ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ
ТЕРРИТОРИИ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В 2016 ГОДУ**

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

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

Предотвращение завоза инфекционных болезней и обеспечение санитарной охраны территории является одним из приоритетных направлений деятельности Управления Роспотребнадзора по Ростовской области (далее по тексту Управление).

В Ростовской области специалисты Управления обеспечивают санитарно-карантинный контроль в 13-ти пунктах пропуска через Государственную границу Российской Федерации, в том числе 2-х воздушных, 3-х морских и 8-ми автомобильных. В морских, воздушных, автомобильных пунктах пропуска через Государственную границу на территории Ростовской области в 2016 году санитарно-карантинному контролю, в соответствии с имеющимися рисками для санитарно-эпидемиологического благополучия населения, было подвергнуто более 48 тыс. (в 2016 – 48 550, в 2015 – 35 937) транспортных средств. Досмотрено на наличие инфекционных заболеваний 1 млн. 100 тыс. лиц (в 2016 - 1 152 347 , в 2015 – 1 027 212), перемещающихся через госграницу Российской Федерации, среди которых выявлено 668 (560 в 2015) больных или подозрительных на инфекционное заболевание. По направлению таможенных органов осуществлен санитарно-карантинный контроль 467 партий грузов и товаров. Проведена оценка 23 партий подконтрольных товаров (продукции), в т.ч. с проведением необходимых лабораторных исследований. Запрещен ввоз 9 партий (в 2015 не запрещался).

По фактам выявленных нарушений при санитарно-карантинном контроле специалистами Управления составлено 412 (375 в 2015)

протоколов об административных правонарушениях, при этом использовались следующие составы КоАП РФ: 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.24 ч. 1, 8.2, 8.5, 19.7.

Для отработки взаимодействия с государственными контрольными органами пунктов пропуска, администрацией и медработниками здравпунктов (муниципальной сети здравоохранения в случае с МАПП) обеспечено проведение тактико-специальных учений по локализации и ликвидации очагов инфекционных болезней, выявленных на транспортных средствах. Проведены учения: МАПП: Новошахтинск - 16.06.2016; Донецк - 20.05.2016; Волошино – 28.04.2016; М.-Курган - 27.04.2016; Куйбышево (Мариновка) – 29.04.2016; В.-Вознесенка – 01.06.2016; Гуково - 26.05.2016; ДАПП Чертково - 22.04.2016; МПП: Таганрог -16.06.2016; Ростов-на-Дону – 26.05.2016; Азов - 18.05.2016; ВПП: Аэропорт Ростов-на-Дону – 15.06.2016; Аэропорт Таганрог (Южный) - 20.05.2016.

В рамках проведения подготовки специалистов государственных контрольных органов, сотрудников служб хозяйствующих субъектов пунктов пропуска, экипажей транспортных предприятий – потенциальных перевозчиков участников и гостей ЧМ 2018 по вопросам симптоматики проявления и мерам профилактики опасных и других инфекционных болезней, а также другим рискам, представляющим опасность для санитарно-эпидемиологического благополучия населения, обязанностям в соответствии с Оперативными планами пунктов пропуска проведена подготовка:

- 5 638 чел. специалистов государственных контрольных органов (КПП погранвойск таможенных постов, Россельхознадзора);

- проинструктировано и обучено 48 454 человек из состава экипажей транспортных средств и работников транспортных предприятий по вопросам симптоматики проявления и мерам профилактики опасных и других инфекционных болезней, а также другим рискам, представляющим опасность для санитарно-эпидемиологического благополучия населения, обязанностям в соответствии с Оперативными планами пунктов пропуска.

При осуществлении мероприятий по контролю за судами внутреннего и смешанного (река - море) плавания в 2016 году осмотрено свыше 1 тыс. судов. В соответствии с Международными медико-санитарными правилами выдано 439 свидетельств об освобождении судна от санитарного контроля и 27 свидетельств о прохождении судном санитарного контроля. До устранения нарушений санитарного законодательства приостановлен выход в рейс 206 судов.

В период массового заезда (летне-осенний период) организованных групп детей на отдых в Ростовскую область и другие субъекты Российской Федерации из приграничных территорий, Управлением в автомобильных пунктах пропуска организован мониторинг выявления лиц с симптомами опасных и других инфекционных и паразитарных болезней у детей и

сопровождающих их лиц. Проведена термометрия 13 151 детей и взрослых, выявлено с симптомами, не исключаящими проявления инфекционных и паразитарных заболеваний 467 человек. Не допущены к въезду в Российскую Федерацию 41 человек.

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

По указанию Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (далее – Роспотребнадзор) специалисты Управления оказывали практическую помощь, в том числе были задействованы в проведении семинаров и лекций для специалистов Республики Киргизия по применению санитарных мер в Евразийском экономическом союзе.

Управлением организован комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий.

Ростовская область относится к территории первого типа эпидемических проявлений холеры. Мероприятия проводятся комплексно всеми службами и референс-центром по холере – ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора» (далее – ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора) [2].

Вопросы готовности заинтересованных служб и ведомств к проведению комплекса мероприятий заслушивались на заседании комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения при Правительстве Ростовской области, в том числе в 2016 году «О мероприятиях по санитарной охране территорий от заноса и распространения инфекций, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, в т.ч. холеры, чумы, лихорадки Зика, контагиозных вирусных геморрагических лихорадок (КВГЛ) и других особо опасных инфекций в Ростовской области» (протокол № 5 от 01.04.2016); «О готовности к проведению мероприятий по профилактике острых кишечных инфекций, ВГА, холеры и «риску» заноса инфекционных заболеваний на территорию Ростовской области» (протокол № 7 от 01.07.2016) и «О состоянии водоснабжения и качестве питьевой воды, подаваемой населению Ростовской области» (протокол № 8 от 01.07.2016), аналогичные комиссии проведены во всех территориальных округах.

Откорректирован 29.02.2016 комплексный план противохолерных мероприятий на территории Ростовской области на период 2013 – 2017 гг. (утвержденный 22.02.2013), переутверждены составы, структура и функции городских и районных медицинских штабов на случай выявления особо опасных инфекционных заболеваний, оперативные планы проведения противоэпидемических мероприятий при выделении из

объектов окружающей среды токсигенных холерных вибрионов O1 или O139 групп и проведения первичных противоэпидемических мероприятий при выявлении больного (трупа) с подозрением на холеру на территории области [2].

Управлением в адрес Министерства здравоохранения по Ростовской области был направлен запрос (от 01.07.2016 № 08-97/10610) о готовности госпитальных баз, в т.ч. по холере, ЛПО области; главам муниципальных районов и городских округов области (от 25.07.2016 № 08-98.14/12031) «О мерах по предупреждению кишечных инфекций и энтеровирусной инфекции», с последующим информированием о принимаемых мерах в установленные сроки.

Согласно утвержденного Руководителем Управления плана-графика членами СПЭБ ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора проведена оценка противоэпидемической готовности лечебно-профилактических организаций и бактериологических лабораторий ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в РО» (далее – ФБУЗ ЦГиЭ в РО). ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора оказана методическая помощь при проведении исследований на холеру в филиалах ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Каменске-Шахтинском и в г. Миллерово и усиление лаборатории особо опасных инфекций в филиале ФБУЗ ЦГиЭ в РО в г. Ростове-на-Дону с 06.07.2016 по 08.08.2016, а также при проведении мониторинговых исследований (из 5 точек) воды открытых водоемов акватории г. Таганрога, Неклиновского района. Кроме того, ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» оказана практическая помощь в исследовании воды открытых водоемов акватории г. Азова, Азовского района (из 3 точек).

Все специалисты с высшим и 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 МЗРО, ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора и ГБОУ ВПО Ростовским государственным медицинским университетом проведены областные и кустовые семинары-совещания (11.03.2016, 15.03.2016 и 18.03.2016) со специалистами территориальных отделов Управления, филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» и медицинскими работниками ЛПО (в том числе ССП) по вопросам: «Профилактика инфекционных заболеваний и «сигнальные признаки» особо опасных болезней и другие актуальные инфекции, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории».

В Ростовской области во всех территориях предусмотрены ЛПО, перепрофилируемые под учреждения специального назначения, развертываемые в очаге холеры, в т.ч. спецгоспитали на 788 коек, провизорные госпитали - 1 955, изоляторы для контактных - 2088.

Во исполнение приказа Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 26.09.2016 № 984 «О проведении проверок инфекционных стационаров в регионах с высоким уровнем заболеваемости инфекционными болезнями в летний сезон 2016 года» подготовлен приказ Управления от 28.09.2016 № 559 о проведении в период с 30.09.2016 по 12.10.2016 внеплановых проверок медицинских стационаров инфекционного профиля по соблюдению требований санитарного законодательства, проверки которых не предусмотрены сводным планом проведения плановых проверок на 2016 год.

Проверки ЛПО выявили нарушения требований санитарного законодательства: режима текущей дезинфекции и стерилизации медицинского инструментария, проведения текущей и генеральной уборки, санитарно-технического состояния в инфекционных отделениях и клиничко-диагностических лабораториях, не полную укомплектованность укладок забора материала от больных на особо опасные инфекционные болезни, сроков проведения производственного контроля, нарушения прохождения медицинских осмотров, отсутствие иммунизации сотрудников и прочие. По итогам проверок ЛПО составлено 69 протоколов об административных правонарушениях по ст. 6.3, 6.4, 14.4 ч.1 КоАП РФ, из них на юридическое лицо 29 протоколов (12 – по ст. 6.3 и 17 – по ст. 6.4, в том числе 4 материала переданы в суд на приостановление деятельности) и на должностных лиц 40 протоколов (22 – по ст. 6.3, 7 – по ст. 6.4 и 11 – по ст. 14.4 ч.1). Вынесено 23 предписания об устранении выявленных нарушений. Подготовлено постановление об отстранении 12 сотрудников инфекционного отделения от работы и проведения профилактических прививок.

В современных условиях существует риск заноса и распространения на территорию Российской Федерации, Ростовской области инфекционных заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории.

Важным аспектом для здравоохранения нашей области является угроза для здоровья, которую несут мигранты. Иностранцы граждане и лица без гражданства прибывают с собственными «эпидемическими особенностями», уровнем контакта с инфекционными агентами, факторами риска, определенными образом жизни и низким уровнем гигиенической грамотности. Причиной распространения инфекционных болезней на территории области является отсутствие надлежащих санитарно-гигиенических условий проживания, осуществления трудового процесса и питания мигрантов [1].

В Управлении работает Межведомственная комиссия для подготовки и представления в Роспотребнадзор материалов для принятия решения о нежелательности пребывания (проживания) иностранного гражданина или

лица без гражданства, выявленного на территории Ростовской области в соответствии Приказа Управления от 29.12.2012 № 669. Проведено 2 заседания МК с участием лечебно-профилактических организаций (далее – ЛПО), уполномоченных проводить медицинское освидетельствование иностранных граждан.

Выдача медицинского заключения о состоянии здоровья иностранных граждан и лиц без гражданства для получения разрешения на временное проживание, вида на жительство осуществляется 4 государственными медицинскими учреждениями здравоохранения, утвержденными Постановлением Правительства РО от 18.12.2014 № 853: ГБУ Ростовской области «Кожно-венерологический диспансер», ГБУ РО «Противотуберкулезный клинический диспансер», ГБУ РО «Центр по профилактике и борьбе со СПИД» и ГБУ РО «Наркологический диспансер». Отчетные формы по медосвидетельствованию иностранных граждан поступают и из Южного окружного центра Роспотребнадзора по профилактике и борьбе со СПИДом и ИЗ.

Также медицинское освидетельствование иностранных граждан проводят коммерческие ЛПО: ООО медицинский центр «Гиппократ», ООО НПФ «Макси», медицинский центр «Здоровье» (г. Азов), ООО «Симплекс», ООО «Авиценна» (г. Ростов-на-Дону).

В 2016 году в соответствии с Приказом МЗ РФ № 384н от 29.06.2015 «Об утверждении перечня инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих и являющихся основанием для отказа в выдаче либо аннулирования разрешения на временное проживание иностранных граждан и лиц без гражданства, или вида на жительство, или патента, или разрешения на работу в Российской Федерации, а также порядка подтверждения их наличия или отсутствия, а также формы медицинского заключения о наличии (об отсутствии) указанных заболеваний», Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 14 декабря 2007 № 86 «Об организации медицинского освидетельствования иностранных граждан и лиц без гражданства», прошли медицинское освидетельствование 33 783 иностранных граждан. По официальным статистическим данным за 2016 год зарегистрировано 94 случая инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих (за 2015 год - 101), в том числе ВИЧ-инфекцией – 20 (24), туберкулезом – 7 (27), инфекциями, передающимися преимущественно половым путем – 67 (50) [2].

По данным статистической формы учета заболеваемости среди граждан, прибывших в Российскую Федерацию в связи с гуманитарной ситуацией на Украине (введена с июля месяца 2014 года), за 2016 год зарегистрировано 36 случаев инфекционных заболеваний, представляющих опасность для окружающих, в том числе ВИЧ-инфекцией – 23, туберкулезом – 13, сифилисом - 0. Медицинское

освидетельствование прошли 11 352 гражданина Украины.

Подготовлено и направлено в Роспотребнадзор 93 проекта решений о нежелательности пребывания с проживанием иностранных граждан или лиц без гражданства на территории РФ, принято 52 решения.

По данным Управления по вопросам миграции (УВМ) ГУ МВД России по Ростовской области в 2016 году покинули территорию Российской Федерации 35 иностранных граждан, у которых выявлены опасные инфекционные заболевания (ВИЧ-инфекция, туберкулез и сифилис).

Управлением проводится постоянный информационный мониторинг эпидемиологической ситуации в мире по опасным инфекционным болезням, направляются письма в адрес Департамента развития малого и среднего предпринимательства и туризма Правительства Ростовской области для информирования фирм и агентств, занимающихся туроператорской и турагентской деятельностью.

Проводилась разъяснительная работа среди населения по профилактике острых кишечных инфекций, холеры. Информация «О профилактике острых кишечных инфекций» выставлялась на сайте Управления.

Учитывая административное расположение Ростовской области, относящейся к I типу по эпидемическим проявлениям холеры, наличие портов, открытых для международных связей, не исключается возможность заноса и распространения холеры на территории области. Это диктует необходимость постоянной организации и проведения эпидемиологического надзора за холерой и обеспечения готовности всех заинтересованных учреждений к проведению регламентированных противохолерных мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Соловьев, М.Ю. Современные особенности санитарной охраны территории Ростовской области от заноса и распространения холеры / М.Ю. Соловьев, Е.В. Ковалев, В.Ю. Рыжков, и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2010. – Вып 23. - С. 16 – 18.

2. Соловьев, М.Ю. 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. Соловьев, Е.В. Ковалев, С.А. Ненадская, и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2016. – Вып 29. С. 45 – 51.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТИ ОБНАРУЖЕНИЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Миронова Л.В.¹, Хунхеева Ж.Ю.¹, Пономарева А.С.¹, Басов Е.А.¹,
Урбанович Л.Я.¹, Гладких А.С.¹, Бочалгин Н.О.¹, Мошкин А.Б.²,
Капко Н.А.², Алленов А.В.³, Борзов В.П.³, Хоменко Т.В.³, Солодкая Н.С.³,
Гриднева Л.Г.⁴, Мусатов Ю.С.⁴, Иванов Л.И.⁴, Уткина О.М.⁴,
Ковальский А.Г.⁴, Балахонов С.В.¹

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора;

²ФКУЗ Читинская противочумная станция Роспотребнадзора;

³ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора;

⁴ФКУЗ Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора

Высокая экологическая пластичность холерного вибриона Эль Тор и сформировавшийся в процессе эволюции широкий диапазон адаптационных возможностей микроорганизма обеспечивают его существование и функционирование, как в организме человека, так и в водной окружающей среде. Стратегия выживания в водных экосистемах обусловлена способностью *Vibrio cholerae* взаимодействовать с водными организмами, формировать сложные сообщества микробных клеток – биопленки, а при неблагоприятных условиях среды переходить в «персистирующий» фенотип или прекращать размножаться, сводя при этом к минимуму свою метаболическую активность (жизнеспособное, но некультивируемое состояние) [6, 8, 9, 11, 13, 14]. Возможность и продолжительность пребывания вибриона Эль Тор в поверхностных водоемах определяется целым рядом природно-климатических и экологических факторов, а также биологическими свойствами микроорганизма.

В поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока токсигенные варианты вибриона Эль Тор обнаруживаются только в период острых вспышек холеры, ассоциированных с завозом возбудителя из неблагополучных по инфекции стран. При этом показано, что пусковым механизмом развития вспышек на территории является накопление в благоприятных для жизнедеятельности холерного вибриона участках поверхностных водоемов патогенного клона до критической концентрации, в результате чего становится возможным инфицирование людей при водопользовании [1, 3, 4, 5]. В благополучный по холере период в водоемах обнаруживаются эпидемически неопасные вибрионы Эль Тор (лишенные генетических детерминант патогенности) и в редких случаях –

ctxABtcpA⁺ (потенциально эпидемически опасные) *V. cholerae* El Tor.

Всего на территории Сибири и Дальнего Востока с 1972 по 2016 гг. изолировано 2707 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и 21 штамм *V. cholerae* O139 серогруппы. Максимальное число штаммов *V. cholerae* O1 в 1995-2016 гг. выделено на относящейся ко II типу по эпидемическим проявлениям холеры территории Приморского края – 49,1 % от общего числа вибрионов. Значительное количество изолятов холерного вибриона приходится на Иркутскую область (17,5 %), Забайкальский край (14,6 %), Хабаровский край (5,3 %). Наряду с *V. cholerae* O1 серогруппы, в поверхностных водоемах региона ежегодно обнаруживаются штаммы *V. cholerae* non O1/ non O139.

Выборочный ретроспективный анализ закономерностей обнаружения холерного вибриона в объектах окружающей среды на основании данных о высеваемости микроорганизмов рода *Vibrio* в 2011-2015 гг. на территориях с многолетней изоляцией вибрионов показал существование так называемых «участков риска» водных объектов, где холерный вибрион обнаруживается ежегодно или практически ежегодно на протяжении анализируемого периода. В частности, в Приморском крае по данным ФКУЗ Приморская противочумная станция из 74 стационарных точек холерный вибрион обнаруживался в 61, в т.ч. ежегодно – в 13, а в течение четырех лет – в 24 точках. Необходимо отметить, что к числу точек, в которых холерный вибрион обнаруживался ежегодно, относятся ручей Горностаи и р. Первая речка, где в период вспышки холеры в 1999 г. выделялись токсигенные штаммы *V. cholerae* O1. В Забайкальском крае в 2011-2015 гг. холерный вибрион выделялся в 36 точках из 69, в т.ч. в 24 точках – ежегодно, в шести – на протяжении четырех лет. Большая часть из них расположена на водных объектах в зоне рекреации (17 точек), в зонах санитарной охраны – пять точек, в местах сброса сточных вод – восемь. В г. Иркутске ежегодно на протяжении анализируемого периода холерный вибрион выделялся в пяти стационарных точках, четыре из которых относятся к объектам рекреации и одна – к зоне сброса сточных вод. В шести точках вибрион обнаруживался на протяжении четырех лет из пяти. В Хабаровском крае мониторинг поверхностных водоемов в 2011-2015 гг. осуществлялся в 53 стационарных точках и в 11 – дополнительных, исследованных в паводковый (2013 г.) и послепаводковый (2014-2015 гг.) периоды. В 13 стационарных точках края холерный вибрион обнаруживался ежегодно на протяжении периода исследования, в одной точке – четыре года из пяти. Значительная часть стационарных точек с ежегодной изоляцией *V. cholerae* относится к категории мест сброса сточных вод (шесть точек) и рекреационного водопользования (пять точек).

При комплексном анализе причин персистенции вибрионов в окружающей среде исследователями установлена взаимосвязь

обнаружения *V. cholerae* с физико-химическими, санитарно-микробиологическими показателями качества воды, гидрологическими характеристиками водоема. Вместе с тем известно, что в адаптационных процессах *V. cholerae* в водной окружающей среде могут участвовать и представители микробного сообщества [10, 12]. Метагеномный анализ структуры микробного сообщества в одной из стационарных точек р. Ангары г. Иркутска показал, что в весенний и летний периоды идентифицировано 22 общих таксона, 16 из которых относятся к филуму Proteobacteria. В структуре Proteobacteria 14-19 % составляет класс Gammaproteobacteria, в состав которого входят представители рода *Vibrio*.

Молекулярно-генетический анализ популяций холерного вибриона в объектах окружающей среды в благополучный по холере период выявил определенные закономерности их структуры и динамики. Установлено, что популяции вибриона Эль Тор характеризуются строгой эпидемиологической структурированностью, поскольку при молекулярном типировании вибрионы Эль Тор распределяются на дистанцированные группы в зависимости от эпидемической значимости. Что касается изолированных из объектов окружающей среды в отсутствие эпидемических осложнений нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, то при мультилокусном анализе вариабельных тандемных повторов (MLVA) на дендрограмме они формируют самостоятельный поликлональный комплекс с территориально сгруппированными в отдельных случаях кластерными генотипами. Однако наблюдается и объединение в один генотип выделенных на разных территориях из разных водных объектов штаммов.

Установлены территориальные особенности MLVA-профиля популяций *V. cholerae* в водных объектах. Так, штаммы из поверхностных водоемов г. Иркутска кластеризуются в генотипы в зависимости от объекта и года изоляции. Установлено обнаружение в водных объектах города *V. cholerae* O1 El Tor идентичного или сходного генотипа на протяжении не более 2-3 лет. В частности, из проб воды р. Сарафановки в 2009 г. изолирован вибрион Эль Тор с MLVA-генотипом 15_0_10_3_2, а в 2010 г. в этом же водоеме обнаружен *V. cholerae* O1 El Tor с таким же генотипом и его однолокусный вариант – 16_0_10_3_2, который выявлялся в расположенном рядом озере у Храма Михаила Архангела. Однако в ряде случаев штаммы с уникальным аллельным профилем обнаруживаются в водных объектах города однократно. Так, в 2014 г. и 2015 г. при исследовании проб воды р. Ангары выделены штаммы *V. cholerae* O1 El Tor с отличающимся от изолированных ранее в водоемах г. Иркутска штаммов (генотип выделенного в 2014 г. штамма 16_0_7_6_2, в 2015 г. – 12_0_11_6_2).

В поверхностных водоемах Забайкальского края штаммы с идентичным MLVA-профилем или их однолокусные варианты

обнаруживались на протяжении длительного периода в одном или разных водных объектах края. Например, крупный кластерный генотип с аллельным профилем 11_0_10_3_2 был установлен у изолированных из водоемов Забайкальского края (р. Борзя, оз. Харанор) штаммов в 2006-2008 гг. Позднее, в 2012 г., в р. Борзя идентифицированы два однолокусных варианта этого генотипа с пятнадцатью и восьмью повторами в локусе VcA с сохранением копийности по остальным локусам. Вариант *V. cholerae* O1 El Tor с аллельным профилем 16_0_11_3_2 выделялся из водоемов края с 2009 г. по 2015 г. В этот же период были выявлены варианты с незначительной вариабельностью числа повторов по локусу VcA. В 2016 г. из р. Борзя на протяжении всего периода мониторинга выделялись однолокусные варианты генотипа X_0_11_3_2 с различным числом повторов по локусу VcA, большая часть штаммов имела аллельный профиль 18_0_11_3_2. Следует отметить, что факт длительного существования вибриона Эль Тор идентичного MLVA профиля показан при генотипировании изолированных в Ростовской области штаммов [2].

В Приморском крае прослеживается существенная клональная гетерогенность популяций холерного вибриона в водных объектах. Кластерные или сходные генотипы объединены чаще годом выделения штаммов, в отдельных случаях – водным объектом. Так, два кластерных сходных генотипа образованы штаммами 2007 г. изоляции. Генотипы, включающие четыре, три и два штамма, идентифицированы в 2010 г., 2011 г. и 2014 г. Однако в один и тот же год в одном водоеме Приморского края обнаруживаются, как штаммы идентичных генотипов, так и их однолокусные или генетически не связанные варианты с полиморфизмом по трем локусам. В 2016 г. из проб воды озера Соленое в г. Находка с интервалом в неделю изолированы четыре штамма *V. cholerae* R-варианта, отличающиеся друг от друга при MLVA-типировании только по числу повторов в локусе VcA. На дендрограмме *V. cholerae* R-варианта сформировали отдельную, дистанцированную от других штаммов, группу. Выделенный позднее из того же водоема (спустя 20 дней после изоляции последнего штамма *V. cholerae* R-варианта) штамм *V. cholerae* O1 сероварианта Огава характеризуется уникальным MLVA генотипом 21_0_8_3_2, отличающимся от изолятов R-варианта по четырем локусам. Сходство PFGE-профиля этих штаммов составило лишь 70,1 %, тогда как внутри группы *V. cholerae* R-варианта этот показатель составляет – 96,0 %.

В Хабаровском крае особый интерес представляли изолированные в 2013 г. (в месте сброса сточных вод) и 2016 г. (из сточных вод) *ctxA*⁺*tcpA*⁺ штаммы *V. cholerae* O1 El Tor. MLVA-профили указанных штаммов определены как 18_30_11_8_5 (2013 г.) и 17_22_10_6_5 (2016 г.). При кластерном анализе изолированные в 2013 г. штаммы входили отдельной ветвью в группу эпидемически опасных, а штамм 2016 г. формировал

самостоятельную ветвь. Вместе с тем, при PFGE типировании уровень гомологии макрорестрикционного профиля *ctxA⁻tcpA⁺* изолятов *V. cholerae* O1 оказался выше с эпидемическими опасными штаммами (87 %), чем с неопасными (не более 70 %). Интерес представляют данные анализа структуры комплекса генов «домашнего хозяйства» *ctxA⁻tcpA⁺* *V. cholerae* O1 El Tor, в результате которого установлена идентичность их последовательности с таковой токсигенных вибрионов на уровне 99,3-99,6 %, тогда как нуклеотидная последовательность этих генов у спонтанного мутанта токсигенного вибриона Эль Тор идентична с таковой полноценных эпидемически опасных штаммов. При кластерном анализе *ctxA⁻tcpA⁺* штаммы из поверхностных водоемов демонстрировали генетическое родство с эпидемически опасными *V. cholerae* и на дендрограмме группировались с вибрионами классического биовара. Следует сказать, что Н.И. Смирновой с соавт. [7] на основании анализа полных геномов указанных *ctxA⁻tcpA⁺* штаммов показана дистанцированность нетоксигенных *tcpA⁺* вариантов холерного вибриона, лишенных дополнительных детерминант патогенности и пандемичности, как от токсигенных штаммов, так и от *ctxAB⁻tcpA⁺VSP⁺* вибрионов Эль Тор. Установленные особенности генетической организации этой группы штаммов позволяют полагать, что они являются самостоятельной линией, происхождение и роль в эволюции вибриона Эль Тор которой предстоит установить.

В целом, проведенный анализ позволил заключить, что в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока на фоне эпидемиологического благополучия возможно кратковременное закрепление (2-3 года) или длительная персистенция отдельных клонов нетоксигенного вибриона Эль Тор с территориальными особенностями динамики популяций. Идентификация же *V. cholerae* El Tor уникальных генотипов и кратковременность их обнаружения может свидетельствовать о заносе микроорганизма в водные экосистемы. Выявленные закономерности обнаружения холерного вибриона определяют необходимость проведения оперативного генотипирования штаммов *V. cholerae* при их изоляции, сравнительного анализа установленных генотипов с базами данных и корректировку с учетом полученных результатов комплекса профилактических мероприятий, проводимых при изоляции холерного вибриона.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы эпидемиологии инфекционных болезней в Сибири / под ред. член-корр. РАМН, проф. Г.Г. Онищенко. – М.: ВУНЦ МЗ РФ, 1999. – 213 с.
2. Водопьянов, А.С. VNTR-генотипирование штаммов *V. cholerae*, выделенных из объектов окружающей среды на территории

Российской Федерации в 2012 году / А.С. Водопьянов, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунобиол. – 2014. – № 2. – С. 46–51.

3. Марамович, А.С. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры / А.С. Марамович, Л.Я. Урбанович, Е.С. Куликалова, Т.Т. Шкаруба // Эпидемиол. и инфекц. бол. – 2009. – № 2. – С. 21–26.

4. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Владивосток / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. – 2000. – № 5. – С. 26–31.

5. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Южно-Сахалинск / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский и др. // Журн. микробиол., эпидемиол., иммунол. – 2000. – № 5. – С. 31–35.

6. Смирнова, Н.И. Биопленка: структура, функция, ПЦР-диагностика / Н.И. Смирнова, Ю.В. Лозовский // Современные технологии в диагностике особо опасных инфекционных болезней: Матер. 4-й Межгосударств. науч.-практ. конф. государств-участников СНГ. – Саратов, 2003. – С. 175-177.

7. Смирнова, Н.И. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью / Н.И. Смирнова, Т.А. Кульшань, Е.Ю. Баранихина и др. // Генетика. – 2016. – Т. 52, № 9. – С. 1029–1041

8. Alam, M. Viable but nonculturable *Vibrio cholerae* O1 in biofilms in the aquatic environment and their role in cholera transmission / M. Alam, M. Sultana, G.B. Nair et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2007. – Vol. 104, № 45. – P. 17801–17806.

9. Jubair, M. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel "persister" phenotype [Электронный ресурс] / M. Jubair, J.G.Jr. Morris, A. Ali // PLoS One. – 2012. – Vol. 7, № 9. – e45187. – URL: 10.1371/journal.pone.0045187.

10. Metzger, L.C. Composition of the DNA-uptake complex of *Vibrio cholerae* / L.C. Metzger, M. Blokesch // Mob. Genet. Elements. – 2014. – Vol. 4, № 1. –e28142.

11. Seper, A. Identification of genes induced in *Vibrio cholerae* in a dynamic biofilm system / A. Seper, K. Pressler, A. Kariisa et al. // Int. J. Med. Microbiol. – 2014. – Vol. 304, № 5–6. – P. 749–763.

12. Sun, Y. Competence and natural transformation in vibrios / Y. Sun, E.E. Bernardy, B.K. Hammer, T. Miyashiro // Mol. Microbiol. – 2013. – Vol. 89, № 4. – P. 583–595.

13. Teschler, J.K. Living in the matrix: assembly and control of *Vibrio*

cholerae biofilms / J.K. Teschler, D. Zamorano-Sánchez, A.S. Utada et al. // Nat. Rev. Microbiol. – 2015. – Vol. 13, № 5. – P. 255–268.

14. Wu, B. Growth Phase, Oxygen, Temperature, and Starvation Affect the Development of Viable but Non-culturable State of *Vibrio cholerae* / B. Wu, W. Liang, B. Kan [Электронный ресурс] // Front Microbiol. – 2016. – Vol. 7. – P. 404. – URL: <http://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00404>.

ОПЕРАТИВНЫЙ И РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ МОНИТОРИРОВАНИЯ ХОЛЕРЫ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Гальцева Г.В., Бойко Е.А., Малай В.И.

*ФКУЗ Причерноморская противочумная станция Роспотребнадзора,
г. Новороссийск*

Холера продолжает оставаться приоритетной проблемой мирового здравоохранения в связи с существованием угрозы возникновения чрезвычайных ситуаций биолого-социального характера, имеющих международное значение и проявляющихся в виде интенсивных и масштабных эпидемий и вспышек на различных континентах мира. Это определяет необходимость постоянного мониторинга за проявлениями холеры как одного из основных компонентов эпидемиологического надзора на глобальном и территориальном уровнях.

Напряженная и нестабильная ситуация в мире по холере диктует необходимость учета факторов риска завоза инфекции на территорию Российской Федерации, в том числе, и на территорию Краснодарского края. Профилактические и противоэпидемические мероприятия (ст. 33 Федерального закона «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения» от 30.03.99г.) проводятся в соответствии с нормативными документами по санитарной охране территории Российской Федерации от завоза и распространения инфекционных болезней (ММСП, 2005; СП 3.4.2318-08; СП 3.1.1.2521-09; МУ 3.4.2552-09; МУ 3.4.1030-01) и Приказами, Постановлениями Главного государственного санитарного врача РФ и Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю.

Приграничное положение Краснодарского края, его интенсивные международные транспортные связи, активизация миграционных процессов и экономических связей обуславливают опасность завоза инфекции в настоящее время, так как в последние годы активно продолжают развиваться курортно-рекреационные зоны, туристические маршруты Черноморского и Азовского побережья. Ежегодно в край для

лечения, отдыха и туризма прибывает более 10 млн. человек. Регион стал местом проведения крупных спортивных, общественно-политических и культурных мероприятий с международным участием, требующих контроля биологической безопасности для участников и населения. Во время Олимпиады 2014, в пунктах пропуска через Государственную границу в крае, прошли санитарно-карантинный контроль 9067 воздушных транспортных единиц, через морские пункты пропуска - 7996 транспортных средств, через автодорожные (МАПП) - 23023. Из разных стран прибыло 11 млн. 869 тысяч человек.

В 2017г. в г.-к. Сочи планируется проведение Кубка конфедераций FIFA 2017, Гран-При Формула-1, фестивали молодежи и студентов и др.

В крае Управлением Роспотребнадзора осуществлялся санитарно-карантинный контроль в пунктах пропуска через Государственную границу в СКП: 3 на воздушном транспорте («Международный аэропорт «Краснодар», «Международный аэропорт Сочи», «Международный аэропорт Анапа»), 10 на водном транспорте («Морской порт Ейск», «Морской порт Темрюк», «Морской порт Кавказ», «Морской порт Тамань», «Морской порт Анапа», «Морской порт Геленджик», «Морской порт Новороссийск», «Морской порт ЗАО «КТК-Р», «Морской порт Сочи», «Морской порт Туапсе»); один автомобильный МАПП – «Адлер-Псоу». По итогам 2016 года санитарно-карантинному контролю подверглось 11022451 человек и 63830 транспортных средств; в г.-к. Сочи в Международном аэропорту Сочи - 1455 воздушных судов и 132303 пассажиров, членов экипажей; в морском порту Сочи - 182 транспортных средства и 9963 пассажиров; в МАПП «Адлер-Псоу» - 56641 транспортное средство и 10 515 850 человек. Усилен санитарно-карантинный контроль за транспортными средствами, лицами и грузами (товарами), прибывающими из стран, эндемичных по особо опасным инфекциям.

Заболевания холерой в Краснодарском крае, который относится ко II типу эпидпроявлений инфекции, регистрировались в период 1970, 1974-1976, 1978, 1981, 1983, 1987, 1990, 1993, 1994-1995, 1999, 2004 годы. Холера была подтверждена у 72 больных (Новороссийск, Сочи, Анапа, Ейск, Туапсе, Темрюк, Армавир, Краснодар, Кропоткин, Северский район), из них 4 летальных исхода (Новороссийск, Сочи, Армавир). Холеру завозили на территорию края до 1999г. из Астрахани, Поволжья, Украины, Сирии, Турции, Дагестана, Ставропольского края. В 1999 г. и в 2004 г. источник заражения больных в Сочи не выявлен [1].

При эпиднадзоре за холерой исследовались пробы воды из открытых водоемов, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод, независимо от степени их очистки, в местах организованного рекреационного пользования. Плановые диагностические исследования на холеру - материал от больных ОКИ, пробы из объектов окружающей среды

(ООС) - проводили лаборатории ФБУЗ «ЦГиЭ», МО, ФКУЗ «ППЧС» и СПЧО. Основная цель – выяснить взаимосвязь биологических, природных и социальных факторов при выделении холерных вибрионов от людей или из ООС.

В период 1970-1988 гг. выделено более 800 штаммов *V. cholerae* El Tor Inaba и / или Ogawa. Из них 181 штамм из морской воды на протяжении 11 лет. Из р. Мацеста – 87 штаммов (1975, 1977, 1979, 1980, 1986, 2001, 2007 гг.). Из р. Агура – 417 штаммов в 1975 г., 1979-1981 гг. и в 2007 г. Остальные штаммы выделены из других рек, ручьев, минеральной воды, мидий, озерных лягушек, бычков, сточной воды [2]. В г. Новороссийске холерные вибрионы выделяли в 1970, 1971, 1974 гг. из сточной воды, из проб воды Цемесской бухты Черного моря. И в 2013г. из протоки, соединяющей лиман на Суджукской косе с морем, выделен штамм *V. cholerae* El Tor, Ogawa, атоксигенный. Увеличение точек и кратности отбора дополнительных проб не дало положительных результатов. Анализ причин контаминации морской воды холерными вибрионами позволяет считать - человеческий фактор. Берег пляжа - рекреационная зона и отдыхают там взрослые с детьми.

В 2015г. отмечалось эпидемиологическое неблагополучие по холере в курортной зоне г. Сочи. В Хостинском районе после 8 лет отрицательных результатов исследования воды р. Агура второго сентября выделены *V. cholerae* El Tor, но серотипа Inaba, тогда как в 2007 г. выделяли *V. cholerae* El Tor серотипа Ogawa. Река Агура – типично горная река длиной 10 км, протекает по территории Хостинского района г. Сочи в южном направлении параллельно реке Мацеста. Средняя скорость течения 5м/сек. Питание реки преимущественно дождевое и за счет таяния горных снегов. Водный режим – паводковый, характеризуется высокими резкими подъемами уровня воды во время сильных осадков, таяния снегов весной. Летом практически полностью пересыхает, в некоторых заводях температура воды может нагреваться до температуры воздуха. В среднем река прогревается от 18 до 30 градусов. Данный водный объект не является источником водоснабжения ввиду низкого дебита водоносного слоя в летний период. Река Агура разделяется на левый и правый рукава, которые затем сливаются, образуя широкое устье, с последующим выходом в Черное море. Особенностью характеристики реки Агура является тот факт, что на уровне территории ресторана «Кавказский аул» в ее воды поступают сульфидные воды из подземного горизонта со стороны р. Мацеста, которые благоприятно влияют на выживаемость и размножение холерных вибрионов.

При выделении первых штаммов холерных вибрионов Управлением Роспотребнадзора в Краснодарском крае в г.-к. Сочи определены мероприятия по предотвращению распространения холерных вибрионов и профилактике возможных эпидемических осложнений. С учетом данных

ретроспективного анализа и требований СП 3.1.1.2521-09 определены эпидемиологически обоснованные дополнительные точки и календарь отбора проб воды с целью уточнения зоны распространения вибрионов по течению реки.

В соответствии с Постановлением главы города «Об усилении мероприятий по профилактике инфекционных заболеваний, связанных с водным путем передачи» от 11.08.15г. проведены мероприятия по недопущению людей в зону Агурского ущелья и к р. Агура, установлены аншлаги с предупреждением о запрете купания, проводились проверки по выполнению распоряжений. В ФГБУ «Сочинский национальный парк» направлено письмо с рекомендациями об ограничении доступа экскурсионных групп по маршруту р. Агура.

В период с 29.07.15г. по 11.10.15г. из 3-х стационарных и 24 дополнительных точек отобрано 188 проб воды и 4 пробы сточных вод из централизованной системы канализации в Агурском ущелье. В 83 пробах обнаружены *V. cholerae* El Tor, Inaba. Из 83 штаммов, из проб в местах организованного рекреационного водопользования выделено 7 штаммов и 76 из р. Агура: 22 штамма из реки у моста ниже кафе «Салхино» - левый рукав р. Агура, а 10 штаммов из реки ниже на 70 м от кафе «Салхино», где расположен стихийный пляж, 11 (р. Агура слева) напротив минерального источника, где используются лечебные грязи приезжими из разных регионов страны, и 21 штамм - устье р. Агура (слияние левого и правого рукавов реки) с последующим выходом в воды побережья Черного моря - рекреационная зона - пляж АО СОК «Спутник», буна № 6 со стороны устья реки. АО «СОК «Спутник» подключены к городским сетям водоснабжения и канализации. Из баклаборатории ФБУЗ «ЦГиЭ» г. Сочи на подтверждение в СПЧО поступило дополнительно девять штаммов холерных вибрионов, также выделенных из проб р. Агура (итого 92 штамма).

Особенность выделения холерных вибрионов из р. Агура в 2015 г. - взрывной характер размножения холерных вибрионов, выделение вибрионов в различных точках левого и правого рукавов. Существует мнение, что в р. Агура наличие холерных вибрионов природогенного происхождения, что они попали в реку с сульфидной водой со стороны р. Мацеста. Ретроспективный анализ показывает, что из р. Мацеста в 1986-2001 гг. выделяли штаммы серотипа Инаба, а в 2007 г. - Огава. Из р. Агура только в 1993г.- Инаба, а в 1996, 1999 и 2007гг. - Огава. В течение 8 лет холерные вибрионы в р. Агура и р. Мацеста не были обнаружены. И только через 22 года (с 1993 г.) в 2015 г. вновь из проб воды р. Агура выделили холерные вибрионы эльтор, но серотипа Инаба. А в р. Мацеста в течение 10 лет холерные вибрионы не обнаружены. Источник появления холерных вибрионов в р. Агура выявить не удалось. Но нет места, где бы персистировали все эти годы холерные вибрионы.

Нельзя исключить человеческий фактор и контаминирование воды р. Агура возбудителями холеры рядом со стихийной грязелечебницей, где выделили 11 штаммов, из р. Агура ниже на 70 м от кафе «Салхино», где стихийный пляж, и выделено 10 штаммов, в устье реки Агура (слияние левого и правого рукавов реки) - 21 штамм или в результате просачивания хозяйственно-бытовых сточных вод от ресторана или кафе, что, благодаря климато-экологическим условиям, могло способствовать быстрому размножению вибрионов и распространению по течению до Черноморского пляжа.

Выделенные штаммы холерных вибрионов эльтор переданы в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ для проведения полногеномного типирования холерных вибрионов. Факт выделения атоксигенных штаммов холерных вибрионов из реки Агура указывает на потенциальную эпидемическую опасность реализации основного - водного пути распространения возбудителей холерной инфекции.

Дополнительно к проведенным мероприятиям следует проводить серологические исследования методом РВА сывороток крови (сотрудники ресторана «Кавказский аул» и кафе «Салхино», приезжие рабочие-строители, которые работали у правого рукава р. Агура и купались в реке). При отрицательных бактериологических исследованиях материала от людей на наличие холерных вибрионов вибриоцидные антитела позволяют выявлять переболевших скрытой формой холеры, вибрионосителей, что нами было доказано в 70-е годы при вспышках холеры в Дагестане и в 1994 году в Анапе. Следует сделать невозможным пользование минеральным источником около левого рукава реки, расчистить и ликвидировать стихийную грязелечебницу.

Деятельность ФКУЗ «ППЧС» направлена на проведение эпидемиологического надзора за холерой, предупреждение случаев завоза инфекции, подготовке кадров по диагностике холеры, проведение мониторинга циркуляции холерных вибрионов в объектах окружающей среды с учетом данных картографирования - точек сброса канализационных вод, с учетом сброса в море балластных вод транспортными средствами и совместно с отделом эпиднадзора Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю развертывание полного комплекса противоэпидемических мероприятий при возникновении или подозрении на заболевание холерой.

В 2015 – 2017 гг. проведено 6 семинаров по лабораторной диагностике холеры по 30-часовой программе. Подготовлено 77 врачей и лаборантов баклабораторий ФБУЗ «ЦГиЭ» Краснодарского края, республики Адыгея и баклабораторий инфекционных больниц и отделений. В 2016 г. проведено 12 семинаров по эпидемиологии, клинике, профилактике холеры и противоэпидемическим мероприятиям, 36 лекций

для специалистов МО (924 человека), тренировочных занятий по холере в МО – 36.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гальцева, Г.В. Эпидемиологический надзор за холерой в Краснодарском крае / Г.В. Гальцева, О.М. Пиликова, В.И. Малай с соавт. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2009. – Вып. 22. - С. 36-39.

2. Справочник-Кадастр. Распространение вибрионов эльтор в поверхностных водоемах и сточных водах на территории СССР во время 7-й пандемии холеры. - г. Ростов-на-Дону, 1991. – 171 с.

ПРАВИЛА ОТБОРА СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ОСАДКОВ НА СУДАХ СМЕШАННОГО «РЕКА-МОРЕ» ПЛАВАНИЯ

Лях О.В., Водяницкая С.Ю.

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

Международная морская организация в 2004 году приняла Международную конвенцию о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками. В 2016 г. специалистами института впервые отобраны и исследованы судовые осадки.

Отбор проб донных осадков является важным элементом при оценке качества сбрасываемых балластных вод, при оценке риска вселения чужеродных организмов, и, естественно, при проведении академических исследований.

Отбор проб судовых осадков могут осуществлять специалисты санитарно-карантинных пунктов, центров или филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, прошедшие инструктаж по технике безопасности работы в замкнутых пространствах, в присутствии члена экипажа судна.

Отбор проб судовых осадков проводится в балластном танке через специальные смотровые люки, в которые опускается пробоотборщик после:

- полного осушения балластного танка от забортной воды;
- проведения специального инструктажа на судне о мерах безопасности;
- при соблюдении «Правил безопасности труда на судах речного

флота» № 242 от 25.12.1987 г.;

- в СИЗ, дополненным предохранительным поясом со страховочным концом, резиновыми сапогами и одноразовыми резиновыми перчатками.

Время нахождения пробоотборщика в балластной цистерне не должно превышать 45 минут. Количество проб и места отбора определяется после осмотра балластной цистерны.

Отбор судовых осадков следует проводить в доступных местах балластной цистерны. Места скопления осадков обычно бывают в днищевых частях цистерны и местах соединения бортового стрингера и шпангоута на различных высотах корпуса судна, образующего балластную цистерну (рисунки 1, 2).



Рисунок 1. Нижняя часть балластного танка (теплоход «Волга 4004»).

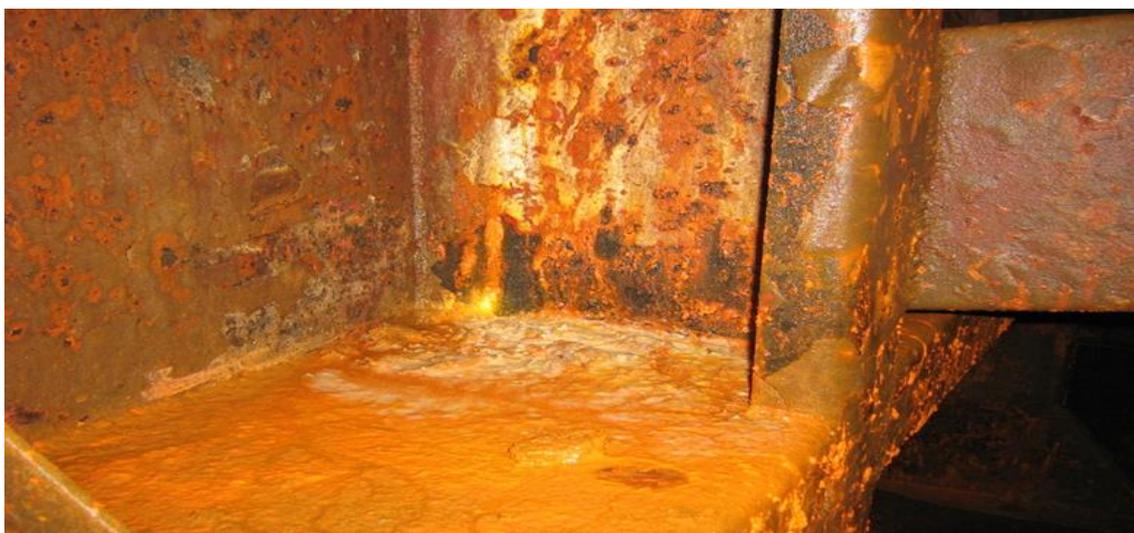


Рисунок 2. Угол соединения шпангоута и стрингера (теплоход «А. Кадыров»).

Специалист, работающий в замкнутом пространстве, должен пользоваться предохранительным поясом со страховочным концом. Для обеспечения безопасности специалистов, работающих в замкнутом

пространстве, и оказания при необходимости им помощи, должен выделяться член экипажа, наблюдающий за выполняемыми работами, который обязан поддерживать постоянную связь с работающим.

Для отбора проб осадков применяют чистые стерильные емкости со встроенной ложечкой, изготовленные из полимерных материалов, не оказывающих влияние на жизнедеятельность микроорганизмов. Доставка проб осуществляется в контейнерах-холодильниках при температуре 4-10⁰С. Срок начала исследований от момента отбора проб не должен превышать 6 часов. Если пробы нельзя охладить, их анализ следует проводить в течение 2 часов после отбора.

МИКРОБИОЛОГИЯ

НОВЫЙ СПОСОБ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ С ПОВЕРХНОСТИ ВОДОЁМОВ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Титова С.В., Веркина Л.М., Тришина А.В., Селянская Н.А., Головин С.Н.,
Полеева М.В.

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

Эпидемиологический надзор за холерой, реализуемый в Российской Федерации, включает систему мер, направленных на своевременное выявление и локализацию завозных и местных случаев холеры [1]. При этом одним из важнейших звеньев эпидемиологического надзора являются целенаправленные исследования проб воды поверхностных водоемов на контаминацию *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139 для предупреждения реализации водного пути распространения возбудителя холеры. За последние десятилетия на некоторых территориях Российской Федерации в пробах воды поверхностных водоемов регулярно обнаруживают нетоксигенные штаммы холерных вибрионов, что указывает на возможность их циркуляции в окружающей среде [2]. Особую настороженность вызывает обнаружение патогенных вариантов возбудителя холеры, выделенных при мониторинге вибриофлоры поверхностных водоемов в 2001-2016 гг. [3].

В настоящее время в период эпидемических сезонов ежегодно (май – октябрь), в зависимости от типа территории по эпид. проявлениям холеры [4], вручную отбирают пробы воды в объектах окружающей среды (ОЭС) (моря, реки, озера, пруды), которые проводят один раз в неделю в литровые емкости с помощью батометра. Последние собирают со всех стационарных точек в тару для перемещения патогенного материала и привозят в лабораторию для последующего бактериологического исследования жидкостей на наличие холерных вибрионов. Технология отбора представляет собой рутинный, громоздкий и трудоемкий процесс. Существует мнение об относительно низкой эффективности классического микробиологического мониторинга для выделения холерных вибрионов из поверхностных водоемов по сравнению с материальными затратами на его проведение [5]. Эта проблема может быть решена путем оптимизации микробиологического мониторинга. Принимая во внимание тот факт, что значительная часть популяции холерных вибрионов может длительно персистировать в водоемах не только в свободноживущем («планктонном») состоянии, но и в ассоциации с биотическими и

абиотическими объектами за счет способности к образованию биопленок, исследования, касающиеся разработки и внедрения новых экономически конкурентных методов и устройств, основанных на феномене биопленкообразования, можно считать актуальными и перспективными.

Цель работы. Разработать и апробировать новый способ отбора проб воды поверхностных водоемов, основанный на феномене образования биопленки. Материалы и методы. Было сконструировано устройство, состоящее из основания в виде стержня и двух дисков, выполняющих функции дна и крышки. Между двух дисков пробоотборники крепятся специальным способом в вертикальном положении. Последние представляют собой стеклянные трубки длиной 7 см и диаметром 5 мм. Конструкция сверху снабжена поплавком, который выполнен из пористого материала (пробки, губки, дерева и любых материалов с удельным весом меньше воды). Поплавок зафиксирован колпачком – держателем с отверстием под трос. Работа устройства осуществляется следующим образом: устройство с размещенными в нем пробоотборниками в количестве 6 штук с помощью троса опускают в водоем на глубину, достаточную для забора проб. Благодаря поплавку устройство под своей тяжестью не опускается на дно, а удерживается в верхнем слое водной поверхности, где наблюдается наиболее высокая температура воды. Кроме того, трос позволяет регулировать необходимую глубину от поверхности водоема и фиксировать устройство в стационарном положении. Затем закрепленное посредством троса устройство оставляют на определенное время (от нескольких часов до нескольких дней), в постоянно отведенных местах. Таким образом, забор проб производят, как минимум, один раз в день/неделю. Для этого поднимают трос и с помощью пинцета изымают пробоотборники, укладывая каждый из них в отдельную пробирку с 1% пептонной водой, и закрывают крышкой. Затем на место взятых для исследования пробоотборников устанавливают пробоотборники новые. На это устройство получен патент от 03.03.2017г по заявке № 2016111504. Для удобства устройство было названо «ловушкой».

Для ускоренной идентификации выделенных культур использовали масс-спектрометр Autofix фирмы «Bruker Daltonics». Образец наносили на две ячейки планшета, снятие спектров проводили в автоматическом режиме, идентификацию проводили с использованием базы спектров и программы Biolyser (Bruker Daltonics, Германия).

Результаты. В период с мая по октябрь 2015-2016 гг. апробирован новый способ отбора воды из ООС. В лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были исследованы 124 пробы воды, отобранных в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», и столько же проб с использованием нового способа – «ловушка». Благодаря адгезии микроорганизмов на стенках

пробоотборника и формированию биопленки на его поверхности, возможно изучение качественного и количественного состава микробного сообщества водоема, биопленкообразования и фагового состава. Результаты апробации нового способа отбора показали, что при бактериологическом исследовании общее количество микроорганизмов в КОЕ, накопленное в «ловушках», значительно превышало КОЕ в пробах воды, отобранных общепринятым способом. Тенденция сохранялась и в отношении холерных вибрионов. Если в «ловушках» микроорганизмы рода *Vibrio* накапливались до 50-70% от общего числа оксидазоположительной микрофлоры, то в пробах из воды – 20-35% соответственно. В июле 2015 г. из стационарных точек р. Дон наряду с выявлением вибрионов, принадлежащих к не O1/не O139 серогруппам, в пробе воды, отобранной рутинным способом, был обнаружен холерный вибрион, отнесённый к O1 серогруппе, серовару Огава. Аналогичный микроорганизм был изолирован и из пробоотборника. Особый интерес представляют данные, полученные в ходе мониторинга 2016 г. Установлено, что наиболее полно вибриопейзаж представлен в «ловушках», что дало возможность исследования большего количества колоний и повысило вероятность выделения холерных вибрионов в исследуемой стационарной точке. Использование нового способа отбора воды позволило обнаружить в пробах воды из точки № 7 р. Темерник три штамма *V. cholerae* O1 серогруппы *ctxA⁻tcpA⁻*, серовара Огава.

Заключение. В отличие от рутинного метода забора больших объемов воды, рекомендованного МУК 4.2.2870-11, лабораторному анализу подвергаются мультивидовые пленки, образованные на поверхности пробоотборника, в состав которых могут входить и холерные вибрионы. Практическое использование «ловушки» повышает эффективность мониторинга холеры, о чем свидетельствует выделение большего числа культур новым способом в сравнении с традиционным.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина, Э.А. Современные тенденции в развитии седьмой пандемии холеры / Э.А. Москвитина // Проблемы особо опасных инфекций. - 2008. - Вып. 1(95). - С. 22-26.
2. Ежова, М.И. Холерные вибрионы O1 серогруппы, выделенные из водных объектов Ростова-на-Дону в ходе мониторинга в 2008-2012 гг./ М.И. Ежова, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. - 2013. - Вып. 4. - С. 56-59.
3. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. - 2016. - №1. - С. 89-101.
4. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07.

5. Балахонов, С.В. Эпидемиологический надзор за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке на текущем этапе VII пандемии / С.В. Балахонов, Л.Я. Урбанович, Л.В. Миронова и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2012. - Вып. 25. - С. 55-63.

ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2016 ГОДУ

Иванова С.М.¹, Иванников В.В.¹, Мискинова Т.А.¹, Титова С.В.²,
Кругликов В.Д.², Чемисова О.С.², Москвитина Э.А.², Монахова Е.В.²,
Архангельская И.В.², Гаевская Н.Е.², Непомнящая Н.Б.², Ежова М.И.²,
Левченко Д.А.²

¹*ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора;*

²*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В течение 2016 года на территории 12-ти субъектов Российской Федерации из поверхностных водоемов изолировано 54 гемолизположительных нетоксигенных штамма холерных вибрионов О1 серогруппы биовара Эль Тор сероваров Огава и Инаба, R-вариант:

- Республика Калмыкия – 19 штаммов (г. Элиста – р. Элистинка, пруд Заячий, пруд Колонский; с. Вознесенка – пруд);
- Республика Крым – 1 штамм (г. Ялта – р. Водопадная);
- Республика Бурятия – 1 штамм (Иволгинский р-н, п. Сотниково – р. Селенга);
- Республика Коми – 1 штамм (г. Сыктывкар – р. Вычегда);
- Республика Татарстан – 1 штамм (Муслимовский район – река Ик);
- Забайкальский край – 12 штаммов (г. Борзя – р. Борзя, оз. Харанор; г. Чита – р. Чита);
- Приморский край – 5 штаммов (г. Находка – оз. Соленое);
- Хабаровский край – 1 штамм (г. Хабаровск – стационарная точка «КНС-3»);
- Ставропольский край – 1 штамм (г. Железноводск – оз. курортного парка);
- Ростовская область – 7 штаммов (г. Ростов-на-Дону – р. Дон и р. Темерник);

- Челябинская область – 1 штамм (Октябрьский р-н, с. Октябрьское – озеро Жостки);

- Свердловская область – 4 штамма (г. Екатеринбург – карьер Калиновские разрезы).

В референс-центре по холере – Ростовском-на-Дону НИПЧИ изучено 53 штамма.

В лабораториях противочумных учреждений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора изолировано 36 (66,6%) и 18 (33,3 %) штаммов соответственно.

Культуры изолированы из проб воды (52) и иловых отложений (1) поверхностных водоемов, из стоков (1). Из проб речной воды изолировано 23 штамма (42,6%), прудовой – 18 (33,3%), озерной – 7 (13,0 %), воды карьера – 4 (7,4%).

Наибольшая частота изоляции холерных вибрионов O1 Эль Тор отмечена в июле – 18 штаммов (33,3%) и августе – 29 (53,7%). В июне и сентябре изолировано 6 (11,1%) и 1 (1,9%) штаммов соответственно. Первый и последний штаммы были выделены в Республике Калмыкия – в пробах от 20 июня и 12 сентября.

подавляющее большинство штаммов, как при выделении, так и при последующей идентификации в НИПЧИ, агглютинировались до титра или $\frac{1}{2}$ титра O1 холерной диагностической сывороткой и одной из серовароспецифических сывороток. За исключением 2-х штаммов, изолированных в г. Ростове-на-Дону из проб воды рек Дон и Темерник, которые агглютинировались сыворотками O1 и Инаба до $\frac{1}{2}$ и $\frac{1}{4}$ ДРТ соответственно.

В числе изученных штаммов серовар Огава составил 55,6% (30 штаммов), Инаба – 37,0% (20), R-вариант – 7,4% (4). При этом отмечено выделение на территориях отдельных субъектов Российской Федерации холерных вибрионов одного серовара: Огава – на территории 6-ти субъектов (в Приморском крае в сочетании с R-вариантом), Инаба – на территории других 6-ти субъектов.

По результатам MALDI-ToF масс-спектрометрии все исследованные культуры относились к виду *V. cholerae* с показателем Score выше 2,300 (достоверная идентификация вида).

Все штаммы протестированы в ПЦР, не содержали гена *ctxA* и большинство – гена *tcr A* (за исключением 3-х, выделенных в Республике Коми, Хабаровском крае и Ростовской области), а также лизировали эритроциты барана в пробе Грейга, как при выделении, так и при последующем изучении в НИПЧИ.

Доля атипичных по биологическим свойствам культур составила 79,6% (в 2015 г. – 94,5%). Типичными по основным тестам при выделении или при последующей идентификации в НИПЧИ были штаммы, изолированные в Республике Коми, Республике Татарстан,

Приморском крае, Ставропольском крае (по 1) и Забайкальском крае (6 из воды и 1 из ила).

Выделение атипичных культур регистрировалось на протяжении всего периода и отмечено в водоемах всех видов, показатель изменчивости для сероваров Огава и Инаба составил соответственно 93,3 и 60,0%.

Среди атипичных (43) фоновыми были культуры, в различной степени резистентные к диагностическому фагу эльтор – 83,7% (по результатам окончательного исследования в Ростовском-на-Дону НИПЧИ). Показатель культур, атипичных по агглютинации холерными диагностическими сыворотками, составил 14%, по протеолитической активности – 20,9%, на долю измененных по комплексу признаков пришлось 14%.

В отношении к общему числу выделенных культур (54) эти показатели составили соответственно 79,6 – 11,1 – 16,7 – 11,1%.

Изоляты 2016 года не лизировались фагами stx+ и stx- в 100% случаев.

По результатам типирования фагами Дрожевкиной-Арутюнова в Ростовском-на-Дону НИПЧИ принадлежность к фаговару определена для 19-ти штаммов: Республика Бурятия – река Селенга (11 фаготип), Республика Коми – река Вычегда (16 фаготип), Забайкальский край – реки Борзя и Чита (11 фаготип), Приморский край – озеро Соленое (15 фаготип), Хабаровский край - стоки КНС (8 фаготип), Ростовская область – река Темерник (16 фаготип), Свердловская область – карьер Калиновские разрезы (11 и 12 фаготипы). При тестировании штаммов, изолированных на территории других субъектов, фаготип определен не был.

При изучении чувствительности культур холерных вибрионов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом не зарегистрировано устойчивых к хлорамфениколу, минимальная резистентность отмечена к ципрофлоксацину и рифампицину, максимальная – к ампициллину.

Случаев инфицирования людей возбудителем холеры в Российской Федерации в 2016 году не зарегистрировано.

Таблица. Характеристика культур холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Российской Федерации в 2016 году

№	Административная территория	Источник выделения	Всего изучено культур	В том числе по тестам идентификации*											В том числе атипичных*											
				O1 серовар				гемолиз*		эпидемическая значимость					Всего**	по сероварам**			по тестам**							
				Огава	Инаба	R-вариант	Гикошима	O139	-	+	ПЦР		Комплексный метод			Огава	Инаба	R-вариант	фаг эльтор	агломинация O1 сыворотк.	желатина	Фогес-Проскауэр				
											ctx ⁺	ctx ⁻	tcp	изучено									лизис фагами			
1.	Республика Бурятия	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	
2.	Республика Калмыкия	вода	19	19	-	-	-	-	-	19	-	19	-	19	19	-	-	19	19	-	-	-	19	-	-	-
3.	Республика Коми	вода	1	1	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4.	Республика Крым	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
5.	Республика Татарстан	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.	Забайкальский край	вода	11	-	11	-	-	-	-	11	-	11	-	11	10	-	-	5	-	5	-	-	-	5	-	-
		ил	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.	Приморский край	вода	5	1	-	4	-	-	-	5	-	5	-	5	5	-	-	4(4)	1	-	4(4)	4(4)	4(4)	2(2)	-	-
8.	Ставропольский край	вода	1	1	-	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9.	Хабаровский край	стоки	1	1	-	-	-	-	-	1	-	1	1	1	-	-	1	1	-	-	-	-	1	-	-	-
10.	Ростовская обл.	вода	7	7	-	-	-	-	-	7	-	7	1	6	7	-	-	7(2)	7(2)	-	-	7(2)	2(2)	-	-	-
11.	Свердловская обл.	вода	4	-	4	-	-	-	-	4	-	4	-	4	4	-	-	4	-	4	-	-	-	-	-	-
12.	Челябинская обл.	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-
ИТОГО по Российской Федерации			Всего	54	30	20	4	-	-	54	-	54	4	50	53	-	-	43(6)	28(2)	12	4(4)	36(6)	6(6)	9(2)	-	
			% 2016 г.	55,6	37,0	7,4	-	-	100,0	-	100,0	7,4	92,6	-	-	-	-	79,6	93,3	60,0	100,0	66,7	11,1	16,7	-	
			% 2015 г.	7,9	92,1	-	-	-	100,0	-	100,0	2,4	97,6	-	-	-	-	94,5	50,0	98,3	-	94,5	-	0,8	1,6	
Отношение 2016 г. / 2015 г.				+7р.	-2,5р.				=		=						-1,2р.	+1,9р.	-1,6р.		-1,4р.					

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

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 CTXA-TCPA+, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ежова М.И.
ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проводит работу в соответствии с задачами Референс-центра по мониторингу холеры на территории Российской Федерации, на основе действующей нормативно-регламентирующей документации.

Наряду с эпизодическими заносами в нашу страну холеры (без распространения), определенное значение имеют спорадические случаи заболеваний ОКИ, вызванные нетоксигенными штаммами холерных вибрионов O1, не содержащими ген холерного токсина, но имеющими ген, детерминирующий токсин - корегулируемые пили (TCP), известные как ключевой фактор адгезии *Vibrio cholerae* [1, 2]. Данные штаммы с большей вероятностью могут колонизировать кишечник и, как следствие, способны вызывать спорадические случаи заболевания у людей и вспышки диарейных заболеваний [3]. Обращает на себя внимание то, что культуры *V. cholerae* O1 *ctxA-tcpA+* выделялись от 2 больных и 30 носителей в Ростовской области (2005 г.) и одного больного в Республике Калмыкия (2011 г.) одновременно с выделением таких культур из водных экосистем [4-6].

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ штаммов *V. cholerae* O1 (*ctxA-tcpA+*), выделенных из водных объектов окружающей среды (ООС) в период эпидосложнений в Каменском районе Ростовской области (2005г.) и изолированных в 2016г. на территориях других субъектов России.

В работе использовано 13 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (*ctxA-tcpA+*), изолированных в 2005 году из сточных вод (№№ 18803, 18782, 18783/1, 106, 18800, 18801 – Ростовская область, Каменский район) и поверхностного водоема (№№ 18792, 18788, 18790, 18791 – Ростовская область, Каменский район, Ветровский карьер), а также изоляты, выделенные в 2016 г. в ходе мониторинга холеры на территории России (№ 53 – Ростовская область, р. Дон; № 200 – Хабаровский край, стоки КНС № 3; № 29 – Республика Коми, пр. Вычегда) (рис.).

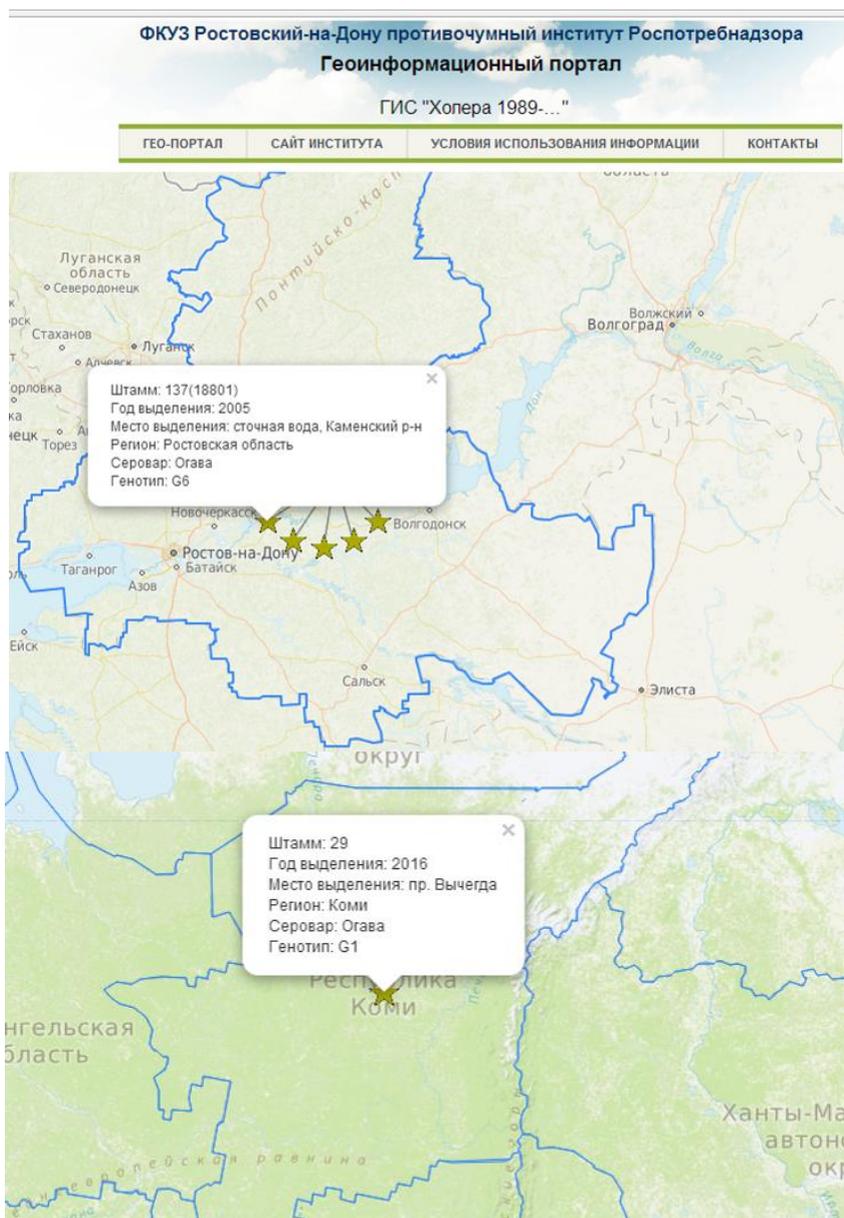


Рисунок. Работа ГИС «Холера 1989 -...», интегрированной в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (http://gis.antiplague.ru/s_cholera-genes.php) на примере Ростовской области (2005 г.) и Республики Коми (2016 г.).

Изучаемые штаммы были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим признакам и относились к серовару Огава. Исследование культур с помощью ПЦР – типирования по минимально оптимальному набору генов (14) позволило выделить изоляты с разными генотипами среди одинаковых по фенотипическому признаку. Исходя из данных генотипирования, на момент исследования, все изучаемые штаммы относились к одному кластеру - G, но к разным генотипам (G1-G3, G6). В соответствии с результатами исследования было установлено, что ни один из изолятов не содержал генов RS1, RS2 - элементов, а также генов T3SS, но содержали

гены острова патогенности VPI, RTX – элемента, гены T6SS, а также ген маннозочувствительных пилей адгезии – *mshA*. Остальные гены (острова патогенности VPI-2, термостабильного токсина *stn/sto*) присутствовали в различных сочетаниях.

Изоляты, послужившие причиной эпидосложнений в Каменском районе в 2005 г., относились к генотипу G6 (имели неполный остров патогенности VPI-2, но не содержали ген термостабильного токсина). Стоит отметить, что штаммы, выделенные в 2016 г., относились к генотипам G1-G3. Необходимо обратить внимание на факт отсутствия генов острова патогенности VPI-2 и термостабильного токсина *stn/sto* у изолятов, принадлежащих к генотипу G3. В то же время штаммы с генотипами G1 и G2 содержали ген термостабильного токсина, однако гены острова патогенности VPI-2 присутствовали не в полном объеме (установлено наличие генов *nanH* и *int* соответственно).

В итоге проведенного исследования можно заключить, что выделенные в разные годы из объектов окружающей среды на территории России нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы (*ctxA-tcpA+*), принадлежащие к одному фенотипу, но различающиеся по набору дополнительных генетических детерминант факторов патогенности, имели заносное происхождение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 г. Прогноз на 2015 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.М. Иванова, Г.Б. Анисимова // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – №1. – С. 18-25.
2. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, Н.И. Смирнова, С.А. Щербакова, Э.А. Москвитина, С.В. Титова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 89-101.
3. Титова, С.В. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности / С.В. Титова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – №5. – С. 45-47.
4. Зубкова, Д.А. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA-tcpA+*, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы / Д.А. Зубкова, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, С.О. Водопьянов // Здоровье населения и среда обитания. – 2014.–№9.–С. 32-34.
5. Костромитина, Е.А. Молекулярно – генетические свойства штаммов холерного вибриона Эльтор с различной эпидемической

значимостью: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Костромитина Елена Александровна. – Саратов, 2004.- 22 с.

6. Осина, Н.А. Результаты мониторинга холерных вибрионов в водных экосистемах на территории Республики Калмыкия / Н.А. Осина, Т.Б. Каляева, Т.В. Бугоркова, И.А. Касьян, Н.Ф. Оброткина // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - № 2(239). - С. 28-30.

ИЗУЧЕНИЕ БИОПЛЕНОК *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ

Головин С.Н., Симонова И.Р., Титова С.В., Веркина Л.М., Березняк Е.А.,
Тришина А.В.

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

Холера продолжает оставаться одной из приоритетных проблем мирового здравоохранения, что определяет необходимость ее постоянного мониторинга, а также дальнейшее изучение этой инфекции в микробиологическом и экологическом аспектах. Существенную роль среди механизмов, позволяющих холерным вибрионам сохранять свою экологическую нишу в различных водоемах, играет феномен биопленкообразования [1].

В настоящее время известно, что в естественной среде обитания до 99 % всех микроорганизмов существуют в виде биопленок – организованных сообществ бактерий, представляющих собой динамически изменяющуюся в пространстве и времени структуру. Состоит она из активно функционирующих клеток и покоящихся форм, заключенных в экстрацеллюлярный матрикс, а местом формирования является граница раздела твердой и жидкой или твердой и газообразной фаз [2,3].

Важнейшую роль в изучении процесса биопленкообразования сыграло применение методов электронной микроскопии. Трансмиссионная электронная микроскопия (ТЭМ) имеет ряд существенных преимуществ, однако исследование биопленок данным методом имеет определенные ограничения и особенности, сказывающиеся на получаемых результатах. Исследуемые объекты должны иметь толщину не более 100 нанометров, в связи с чем основной проблемой, возникающей при исследовании биопленок, является необходимость отделения пленки от субстрата и перенос на опорные сетки, что неизбежно приводит к нарушению ее первоначальной структуры и невозможности изучения характера

взаимодействия с субстратом.

Цель данного исследования – моделирование биопленок холерных вибрионов с использованием новой оригинальной методики и изучение их методом ТЭМ.

Материалы и методы. В исследовании были использованы бактерии *Vibrio cholerae* El Tor штамм 5879 и *Vibrio cholerae* El Tor штамм 19667 из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Холерные вибрионы культивировали на агаре Мартена (рН 7,2 - 7,4). Через 24 часа инкубации при 37 °С бактериальную массу суспендировали в стерильной водопроводной воде до концентрации 10⁶ КОЕ/мл холерных вибрионов. Далее путем двукратного разведения из нее получали маточную суспензию для моделирования биопленок, содержащую 10³ КОЕ/мл холерных вибрионов.

Для подготовки образцов к исследованию методом ТЭМ необходимо было исключить этап отделения биопленки от субстрата и минимизировать механическое и химическое воздействия на нее во время осуществления различных манипуляций.

Для удобства осуществления пробоподготовки к ТЭМ нами было сконструировано оригинальное приспособление, представляющее собой субстрат для культивирования биопленок холерных вибрионов, состоящий из стекла, на котором размещены медные сеточки, покрытые формваровой пленкой-подложкой.

После стерилизации субстрата методом тиндализации, маточную суспензию холерных вибрионов в количестве 50 мл вносили в емкость с субстратом и культивировали при комнатной температуре в статичных условиях без дополнительной аэрации. Сроки культивирования определялись задачами конкретного эксперимента.

Фиксацию биопленок осуществляли 3,6 % глутаровым альдегидом, постфиксацию – 2% водным раствором тетраоксида осмия (VIII). Контрастирование образцов осуществляли по методу Luft J.H. [5,6] и тетраоксидом осмия (VIII) [7].

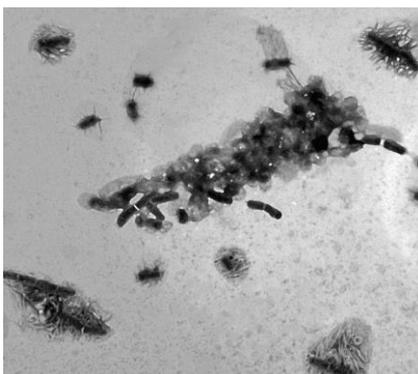
После высушивания образцы биопленок исследовали методом ТЭМ в электронном микроскопе JEM-1011 (Jeol, Япония) при ускоряющем напряжении 80 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

Результаты и обсуждение. Предложенный способ культивирования позволил получить полноценную биопленку холерных вибрионов, полностью сохранившую связь с субстратом и обладающую характерными морфологическими признаками.

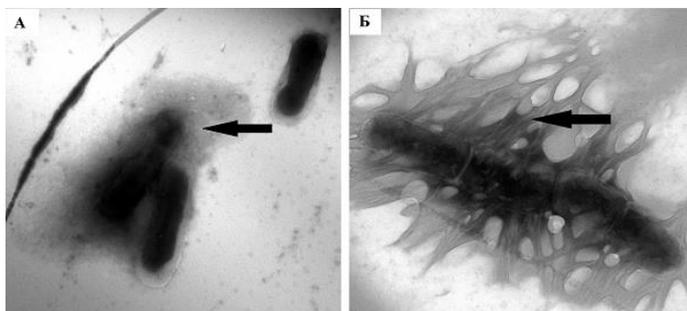
Общий вид биопленки *Vibrio cholerae* El Tor (штамм 5879) представлен на фотографии № 1.

На фотографии № 2 представлены два фрагмента биопленки с визуализацией белкового (А) и углеводного (Б) компонентов матрикса биопленки.

Как видно, основная структура экстрацеллюлярного матрикса представлена углеводным компонентом – экзополисахаридом, что подтверждают различные исследования. Он же формирует и архитектуру матрикса, образуя нитевидные выросты, отходящие от клеток и прикрепляющиеся вторым концом к субстрату.



Фотография № 1. Биопленка *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия, контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), увеличение x8 000.



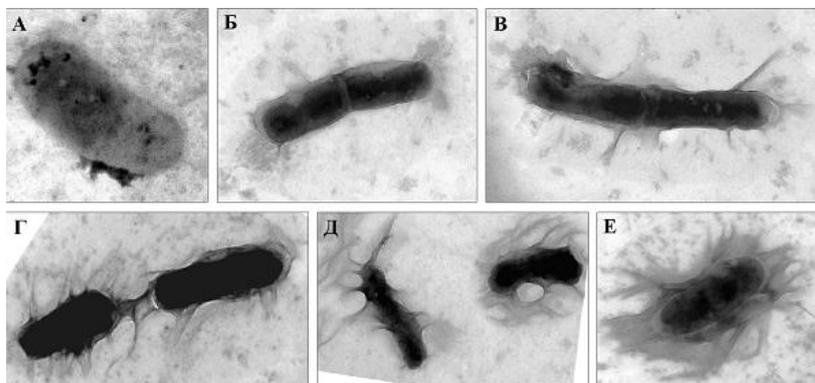
Фотография № 2. Визуализация белкового (А) и углеводного (Б) компонентов матрикса биопленки холерных вибрионов (стрелками указано вещество матрикса). А - биопленочная форма *V. cholerae* El Tor 19667, 10-е сутки, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), увеличение x30 000; Б - биопленочная форма *V. cholerae* El Tor 5879, 20-е сутки, трансмиссионная электронная микроскопия, контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия (VIII), увеличение x40 000.

Согласно последним данным, процесс биопленкообразования можно разделить на следующие этапы [8]:

- 1) обратимая адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата;
- 2) необратимая адгезия бактерий к субстрату;
- 3) созревание биопленки;

- 4) стадия зрелой биопленки;
- 5) дисперсия.

Полученные нами результаты соответствуют данной морфо-стадийной характеристике (фотография № 3).



Фотография № 3. Клетки *V. cholerae* El Tor 5879 на разных этапах формирования биопленки, трансмиссионная электронная микроскопия, контрастирование рутениевым красным и тетраоксидом осмия. А – планктонная форма; Б – В - адгезия планктонных клеток к поверхности субстрата; Г – Д - созревание биопленки; Е – зрелая биопленка.

У клеток, находящихся в составе биопленки, наблюдаются изменения размеров, формы и субмикроскопической организации клеточных компонентов.

В некоторых участках биопленки клетки расположены цепочками, что нехарактерно для планктонных клеток. Образование цепочек в плоскости деления объясняется, по видимому, адгезией материнских клеток к субстрату и удерживанием дочерних клеток веществом матрикса. Также биопленочные формы лишены жгутиков, окружены электроннопрозрачной капсулой и заключены в экстрацеллюлярный матрикс с филаментоподобными образованиями.

Эти особенности мы предлагаем считать электронно-микроскопическими признаками биопленочных форм холерных вибрионов.

Таким образом, разработанный нами новый метод культивирования биопленок, адаптированный для исследования методом ТЭМ, многократно упрощает процесс пробоподготовки и позволяет максимально сохранять нативную структуру биопленок, а при комбинировании вариантов контрастирования позволяет определять роль различных составляющих в процессе биопленкообразования. Все это поможет оптимизировать изучение биопленок методом ТЭМ и позволит лучше понять феномен биопленкообразования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan, J. Environmental fluctuation governs selection for plasticity in biofilm production / J. Yan, C.D. Nadell, B.L. Bassler // ISME J. 2017 Mar 24.
2. Ghannoum, M. Microbial Biofilms / M. Ghannoum, M. Parsek, M. Whiteley, P.K. Mukherjee // 2nd Ed ASM Press; Washington, DC. - 2015.
3. Николаев, Ю. А. Биопленка — «город микробов» или аналог многоклеточного организма? / Ю. А. Николаев, В. К. Плакунов // Микробиология. – 2007. – Т. 76 № 2. - С. 149 - 163.
4. Pease, D.C. In Histological Techniques for Electron Microscopy / D.C. Pease // New York and London, Academic Press, 1964. – P. 51-52, 198, 215.
5. Luft, J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. - 1966.
6. Luft, J.H. Fine structure of capillary and endocapillary layer as revealed by ruthenium red // Feder. Proc. 1967. – Vol. 25. – P. 1733-1783.
7. Bahr, G.F. Osmium tetroxide and ruthenium tetroxide and their reactions with biologically important substances // Exp. Cell. Res. – 1954. - Vol. 24. – P. 457-479.
8. Харсеева, Г.Г. Биопленки патогенных бактерий: биологические свойства и роль в хронизации инфекционного процесса / Г.Г. Харсеева, Я. Н. Фролова, А. Ю. Миронов // Успехи современной биологии. – 2015. – Т. 135, № 4. - С. 346-354.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ НА ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ В 2016 ГОДУ

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

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

В настоящее время остается реальным занос холеры в Россию. Неблагоприятный эпидемиологический прогноз по этой инфекции на 2016 г. оправдался: из водных объектов окружающей среды на территории 12 субъектов Российской Федерации были выделены 53 нетоксигенных штамма *Vibrio cholerae*. Не исключена и возможность реализации водного пути распространения холеры. В этих условиях мониторинг вибриофлоры на наличие холерных вибрионов в водных экосистемах продолжает оставаться неотъемлемой составляющей лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой [2,5].

В ходе усиленных исследований водных объектов окружающей среды (с 16 мая по 27 июня и с 19 по 26 сентября забор проб проводили один раз в неделю, с 18 июля по 14 сентября – два раза в неделю и с 30 июня по 16 июля – ежедневно), проводимых Референс-центром по мониторингу холеры на территории Российской Федерации (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) [3,4] по шести стационарным и одной дополнительной точке г. Ростова-на-Дону, а также по пяти стационарным точкам г. Таганрога в период с мая по сентябрь было исследовано 425 проб пресной и морской воды из поверхностных водоемов.

В результате были выделены четыре нетоксигенных штамма *V. cholerae* O1 El Tor: из р. Дон – один (№ 39), из р. Темерник – три (№№ Л-1, Л-9 – с использованием авторских «ловушек» и № 278). Кроме того, были изолированы 352 штамма *V. cholerae* non O1/non O139. Из них - 195 штаммов из пресных водоемов и 157 – из проб морской воды. Холерные вибрионы O139 серогруппы обнаружены не были (таблица). Все культуры *V. cholerae* O1 обладали типичными культурально - морфологическими, серологическими и биохимическими свойствами и относились к серовару Огава. Принадлежность к фаготипу удалось установить лишь у одного штамма № Л-1 - 11 фаготип. Генотипическая характеристика по расширенному набору генов патогенности/персистенции показала, что все без исключения штаммы содержали гены *hapA*, *cef*, *toxR*, *tolQRA*, *mshA*, *vps*, гены кластеров T3SS, T6SS и RTX, но не содержали профаги CTX, RS1, RS2, остров патогенности VPI-1, а также гены *stn/sto*, *slt1*, *tdh* и *trh*. Гены острова патогенности VPI-2 присутствовали в различных сочетаниях.

Таблица. Результаты мониторинга водных объектов в Ростовской области (РО) на наличие холерных вибрионов в 2016г.

№ п/п	Водоем / Наименование точки	Кол-во проб	Выделено <i>V. cholerae</i> non O1/ O139	Выделено <i>V. cholerae</i> O1
1	р. Дон / Правый берег у Державинского спуска	43	34	0
2	р. Темерник / Устье впадения в р. Дон	33	22	1
3	р. Дон / У железнодорожного моста (правый берег) в Западном жилом массиве	44	34	1
4	Пр. Мертвый Донец / 1 км ниже автодорожного моста (Кумжинская роща)	31	18	0
5	р. Темерник / Ботанический сад, у моста	31	23	0
6	р. Дон / Правый берег, Кировский спуск напротив здания экипажа № 2 РМК им. Седова	44	37	0
7 *	р. Темерник / Волоколамская 2б	29	28	2
8	р. Миус / с. Куйбышево, Куйбышевский район	34	33	0
9	Азовское море / Рыбцех № 2 ПКРА	34	31	0

	«Красная звезда», с. Весело - Вознесенка, Неклиновский район			
10	Азовское море / с. Петрушино, Неклиновский район, неорганизованный сброс сточных вод	34	32	0
11	Азовское море/ пляж Елисеевский, г. Таганрог	34	30	0
12	Азовское море /место сброса из балки М. Черепаха, г. Таганрог	34	30	0
Всего:		425	352	4

*- дополнительная точка отбора проб воды

Что касается холерных вибрионов non O1/non O139 серогрупп, то из водных объектов окружающей среды их обнаруживали ежемесячно в период проведения мониторинга. Культуры были изолированы из всех водоемов, но наибольшее их количество было обнаружено в пробах воды из р. Дон и Таганрогского залива Азовского моря. Токсигенные культуры среди них обнаружены не были. При серологическом типировании данных штаммов были выявлены доминирующие серогруппы: O2, O16, O24, O76.

Анализ результатов мониторинга наличия холерных вибрионов показал, что динамика выделения и количественное распределение изолированных штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139 по стационарным точкам отбора не находились в прямом соответствии с данными по обнаружению культур *V. cholerae* O1 El Tor. Вместе с тем, необходимо подчеркнуть, что на территории РО практически ежегодно регистрировались острые кишечные инфекции, этиологическим фактором которых являлись *V. cholerae* non O1/non O139 [1]. Так, в 2016 г. на территории РО от трех больных было выделено пять культур вышеуказанных микроорганизмов, а с 2000 г. по 2015 г. в инфекционные отделения стационаров Ростовской области поступило 34 больных, от которых были выделены *V. cholerae* non O1/non O139.

Таким образом, результаты проведенного анализа по итогам мониторинга в 2016 г. являются базисной основой для дальнейшего динамического слежения за наличием холерных вибрионов в объектах окружающей среды для оптимизации профилактических, а в случае необходимости, и противоэпидемических мероприятий в ключе задач эпиднадзора за холерой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская, И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп как возбудители кишечных инфекций в Ростовской области и Республике Калмыкия / И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова и др. // Актуальные вопросы инфекционной патологии. Материалы международного форума специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» МЗ

РФ. Краснодар, 2016. – С. 25-27.

2. Москвитина, Э.А. Холера и холерные вибрионы: состояние проблемы, 2016 год / Э.А. Москвитина, С.В. Титова, В.Д. Кругликов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. спец-в Роспотребнадзора и пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2016. – С. 29-33.

3. Лабораторная диагностика холеры. МУК 4.2.2218-07: Методические указания. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. - 87 с.

4. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания МУК 4.2.2870-11. - М. – Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 г. – 83 с.

5. Титова, С.В. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов и др. // Проблемы особо опасных инфекций. - 2016. – № 1. – С. 20-27.

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ РЕКИ ВОЛГА С 1989 ПО 2016 ГОДЫ

Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И.,
Гаевская Н.Е.

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

Современный этап развития седьмой пандемии холеры в мире характеризуется тенденцией к широкому распространению, регистрацией вспышек, эпидемий и спорадических случаев заболеваний, связанных с заносами, в том числе на территорию России [1]. Отмечаются единичные (без определенной периодичности) выделения из водных экосистем на территории субъектов Российской Федерации токсигенных штаммов холерных вибрионов O1 на фоне ежегодного обнаружения нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, в том числе и атипичных - P-вариантов [2,3].

В связи с тем, что река Волга является центральной водной артерией России и протекает по территории 15 субъектов РФ, расположенных в 3-х федеральных округах (Центральный, Приволжский и Южный) [4], изучение динамики выделения штаммов холерных вибрионов O1 из вышеуказанного водоема и биологических свойств этих микроорганизмов, по нашему мнению, представляет научно-практический интерес.

При анализе данных мониторинговых исследований реки Волга, а также ее притоков и рукавов, было установлено, что штаммы *V. cholerae* выделялись только на территориях ПФО (Республики Чувашия, Татарстан, Саратовская область) и ЮФО (Волгоградская и Астраханская области). Стоит отметить, что на территории Астраханской области Волга не принимает ни одного притока, от нее отделяется правый проток – Енотаевка, у города Волжского крупный рукав – река Ахтуба, к северу от города - рукав Бузан. В городе Астрахань с левого берега ответвляется рукав - Кутум, однако, самыми крупными рукавами дельты являются реки Кизань и Прямая Болда [5].

Выявлены два периода (с 1989 по 2004 гг. и с 2008 по 2012 гг.) выделения штаммов холерных вибрионов O1 из Волги с пиками в 1999 и 2012 гг. (рис.1).

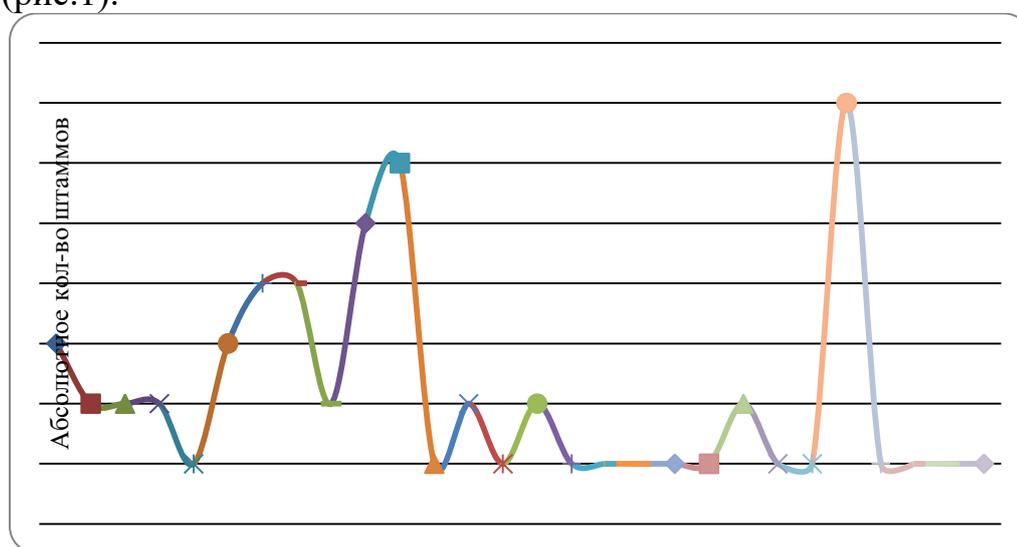


Рисунок 1. Динамика выделения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов из р. Волга с 1989 по 2016 гг.

Выделенные с 1989 по 2016 гг. культуры холерных вибрионов были типичны по культурально-морфологическим, серологическим, биохимическим свойствам, а также на среде с полимиксином давали рост и образовывали ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра, т.е. относились к биовару Эль Тор. Все изоляты являлись нетоксигенными (гемолизположительными и не содержали генов холерного токсина). Штаммы холерных вибрионов серовара Огава были изолированы в 40,7% случаев, Инаба – в 56,2%, Гикошима – в 3,1%. Большая часть культур (84,4%), выделенных из реки Волга, не типировалась фагами. Что касается фагов «Эль Тор» и «С», то процент чувствительных изолятов составил 21,9% и 6,6% соответственно. Стоит отметить, что из р. Волга (притоков / рукавов) были выделены культуры *V. cholerae* с фаготипами: 10 (1990 г.), 16 (1989, 1991 гг.), 15 (1994 г.). 16 фаготип был установлен у холерных вибрионов, изолированных из р. Волга и р. Кизань (1989 г.) в

Астраханской и Волгоградской областях (1991 г.), однако культуры относились к разным сероварам [6-9].

Результаты статистической обработки данных позволили распределить 32 нетоксигенных штамма *V. cholerae* O1 в 3 объединенные группы, условно обозначенные как O, I, G по критерию отличительных фенотипических признаков штаммов, таких как: серовар, чувствительность к фагам «Эль Тор» и «С», а также принадлежность к фаготипу.

В структуре указанных групп по различному сочетанию вышеназванных биологических параметров определили 8 «фенотипов», считая последний термин также условным рабочим наименованием (табл.).

Таблица. Характеристика нетоксигенных штаммов *V. cholerae* по критерию различий фенотипических признаков, выделенных из р. Волга на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 гг.

№ п/п	Группы штаммов	Наименования фенотипов	Характеристика фенотипов, входящих в группы штаммов				Кол-во штаммов
			Серовар	Чувствительность к фагам		Фаготип	
				«Эль Тор»	«С»		
1	O	O1	Огава	отр.	отр.	н/т*	11
2		O2		ДРТ	отр.	н/т	3
3		O3		ДРТ	отр.	16	2
4		O4		ДРТ	отр.	10	1
5		O5		отр.	ДРТ	15	1
6	I	I1	Инаба	отр.	отр.	н/т	11
7		I11		отр.	отр.	16	1
8	G	G1	Гикошима	отр.	отр.	н/т	1
Итого							32

*- н/т – не типифицируется

Нами выявлено преобладание штаммов *V. cholerae* с двумя фенотипами O1 и I1 (по 34,4% соответственно). При этом фенотип O1 установлен только на территории Астраханской области, а фенотип I1 – в Астраханской, Волгоградской, Саратовской областях и Республике Татарстан.

В то же время, изоляты холерных вибрионов, принадлежащие к другим фенотипам, были обнаружены в единичных случаях. Данные отражены в ГИС «Холера 1989-...», разработанной в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (рис. 2).

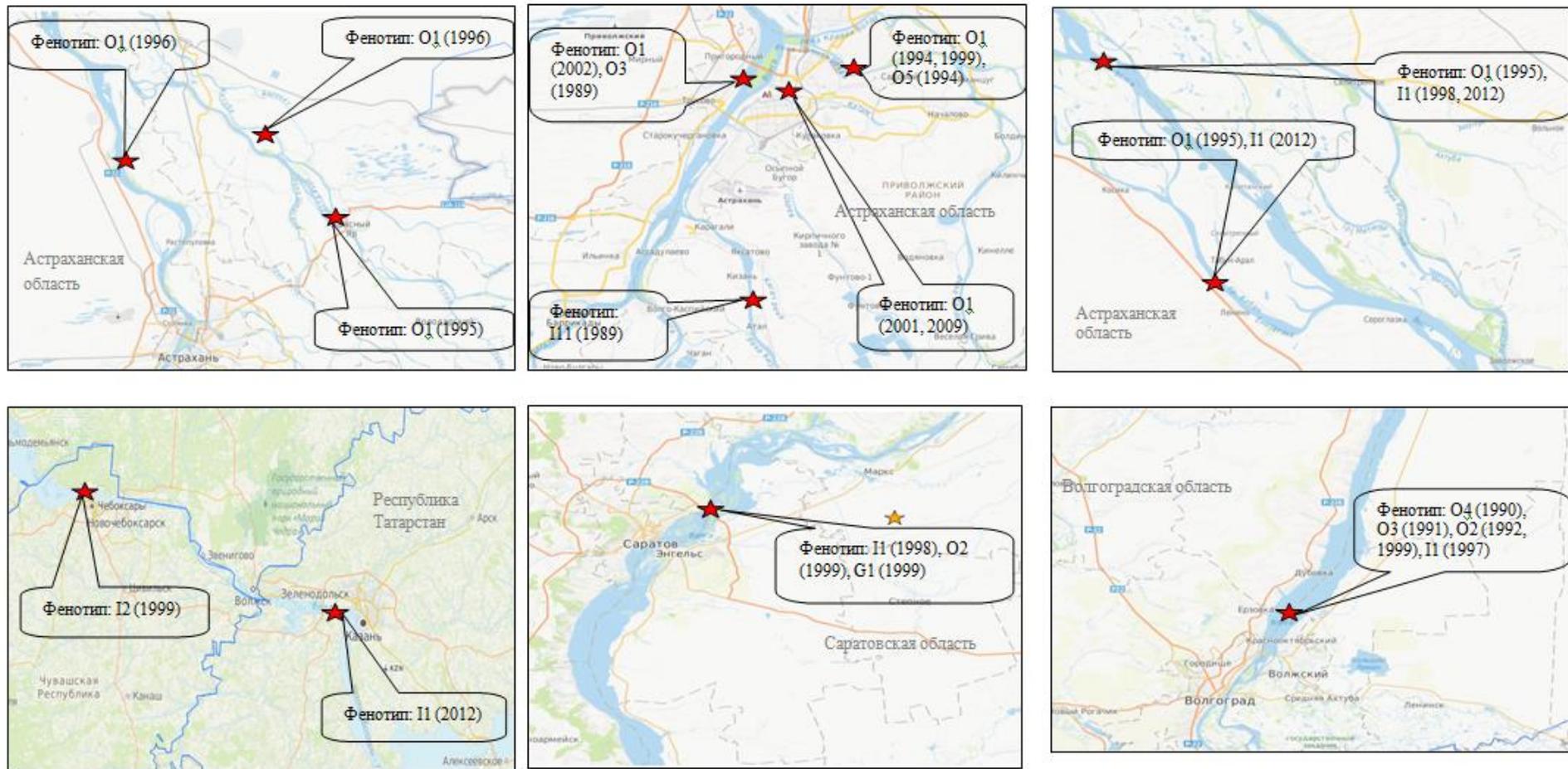


Рисунок 2. Места выделения и биологические свойства нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O₁, изолированных из реки Волга (притоков / рукавов) с 1989 по 2016 гг.

Проведенный сравнительный анализ многолетних данных показал, что наибольшее количество нетоксигенных штаммов холерных вибрионов было выделено из р. Волга на территории Астраханской области, что, вероятнее всего, связано с благоприятными климатогеографическими условиями и способствует возможному переживанию таких культур на протяжении ряда лет. Использование компьютерных технологий (ГИС) для анализа динамики выделения штаммов *V. cholerae* с разными фенотипическими свойствами, как в пространственном, так и временном форматах, способствует своевременному определению направленности и объема профилактических мероприятий на каждой конкретной административной территории страны и имеет реальные перспективы дальнейшего использования в рамках эпиднадзора за холерой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина, Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире в 2013 г., прогноз на 2014 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, И.В. Дворцова, В.Д. Кругликов, С.М. Иванова, Д. А. Козина // Пробл. особо опасных инф. - 2014. - № 2. - С. 19-26.
2. Москвитина, Э.А. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007-2016 гг., прогноз на 2017г. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Тюленева, А.В. Самородова, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, С.М. Иванова, Т.В. Ковалева, Г.Б. Анисимова // Пробл. особо опасных инф. - 2017. - № 1. - С. 13-23.
3. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 г. Прогноз на 2015 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.М. Иванова, Г.Б. Анисимова // Пробл. особо опасных инф. - 2015. - № 1. - С. 18-25.
4. Поздняк, Г.В. Атлас России географический. - 2009. – 300 с.
5. Волга // Большая Российская энциклопедия. – М., 2006. – С. 614 – 617.
6. Безсмертный, В.Е. Характеристика культур холерных вибрионов О1 и О139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2002 году / В.Е. Безсмертный, С.М. Иванова, Б.Л. Мазрухо, Л.М. Смоликова, Л.С. Подосинникова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2003. - Вып. 16. - С. 13-17.
7. Иванова, С.М. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов О1 серогруппы, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2012 году / С.М. Иванова, Г.В. Титов, В.Е. Безсмертный, Б.Л. Мазрухо, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина, И.С. Шестиалтынова, И.В. Архангельская, Т.А. Кудрякова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2013. - Вып. 26. - С.

21-25.

8. Кюрегян, А.А. Характеристика культур холерных вибрионов O1 и O139, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2001 году / А.А. Кюрегян, С.М. Иванова, Б.Л. Мазрухо, Л.М. Смоликова, Т.А. Кудрякова, Г.В. Титов, И.С. Шестиалтынова, С.О. Водопьянов, Л.С. Подосинникова, В.В. Лобанов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2002. – Вып. 15. - С. 34-39.

9. Кюрегян, А.А. Характеристика культур холерных вибрионов O1, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 1999 году / А.А. Кюрегян, С.М. Иванова, Г.В. Титов, Л.С. Подосинникова, Б.Л. Мазрухо, Т.А. Кудрякова, Е.В. Монахова, Л.М. Смоликова, И.С. Шестиалтынова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2000. – Вып. 13. - С. 23-27.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ИСКУССТВЕННЫХ НЕЙРОННЫХ СЕТЕЙ ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Чемисова О.С., Водопьянов А.С., Полеева М.В., Рыковская О.А.,
Водопьянов С.О., Олейников И.П.

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

Несмотря на затрачиваемые мировым сообществом усилия, холера продолжает представлять угрозу для мирового здравоохранения – только за 2015 год в мире зарегистрировано 98808 случаев холеры [4]. Это обуславливает необходимость постоянного мониторинга возбудителя холеры в объектах окружающей среды [3]. При этом ключевыми моментами являются серогруппа выделяемых штаммов и наличие у них холерного токсина – именно это определяет объем противоэпидемических мероприятий.

Особенно актуальным это представляется в свете постоянного выделения из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации атоксигенных холерных вибрионов [1].

Одним из перспективных методов исследования является времяпролетная масс-спектрометрия (MALDI-ToF), ввиду обеспечения высокой скорости исследования и низкой себестоимости выполняемых

анализов. Однако было показано, что холерный токсин может формировать несколько разных пиков при масс-спектрометрии с большим разбросом значения массы-заряда [2]. Важно отметить, что коммерческое программное обеспечение не позволяет дифференцировать токсигенные и атоксигенные штаммы холерного вибриона.

Одним из универсальных методов анализа данных является метод искусственных нейронных сетей (ИНН).

В связи с этим цель настоящего исследования состояла в разработке искусственной нейронной сети для дифференцирования токсигенных и атоксигенных штаммов холерного вибриона.

Материалы и методы. Программное обеспечение разрабатывали на языках программирования Java [oracle.com] с использованием пакета FANN [5]. Масс-спектрометрию проводили на приборе Autoflex (Bruker Daltonics, Германия) с использованием метода экстракции этанолом/муравьиной кислотой, в качестве матрицы применяли α -циано-4-гидроксикоричную кислоту. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для отображения построенной дендрограммы использовали программу MEGA 5 [6]. Идентификацию пиков проводили в среде R с помощью пакета MaldiQuant.

Результаты и обсуждение. Для реализации поставленной цели нами был создан программный комплекс «Гоша версия 1.0», состоящий из собственно нейронной сети, программы для её обучения и программы для работы с уже обученной нейросетью. При этом сама нейросеть состоит из несколько слоев нейронов: первый (входной) слой – на него подаются исходные данные; слой промежуточных или «скрытых» нейронов, ответственный за проведение анализа, и слой выходных нейронов, в данном случае, состоящий из одного нейрона.

В исследовании была использована коллекция пик-листов 39 штаммов холерного вибриона, включающая токсигенные (эпидемиологически значимые) и атоксигенные штаммы O1 и O139 серогруппы. Из них случайным образом были отобраны 6 штаммов для последующей проверки.

Обучение нейросети проводилось на оставшихся 33 штаммах с помощью разработанного нами программного обеспечения. При этом на входной слой нейросети подавались данные пик-листов, а на выходной нейрон - наличие (100) или отсутствие токсина (0) у данного штамма. Обучение проводилось до достижения суммарной ошибки 0.001.

Аналогично было проведено обучение нейросети с целью определения принадлежности к O1 и O139 серогруппе. В результате данного этапа работы были получены три независимые искусственные нейронные сети, каждая из которых была предназначена для выявления отдельного признака.

Проверка проводилась на 6 штаммах, не участвовавших в этапе обучения. При этом серогруппа была определена правильно у всех 6 штаммов (3 проверяемых штамма имели серогруппу O1, а три – O139).

Из трех токсигенных штаммов два штамма были распознаны нейросетью как эпидемиологически значимые (ctx+) и один штамм – как «сомнительный». Три атоксигенных штамма были правильно определены, как лишенные токсина.

Таким образом, в ходе проведенного исследования создан программный комплекс «Гоша», позволяющий проводить анализ данных масс-спектрометрии штаммов холерного вибриона на основе искусственной нейронной сети. Показана возможность дифференцировки штаммов O1 и O139 серогруппы и эпидемиологической значимости штаммов холерного вибриона на основе нейросетевого анализа данных масс-спектрометрии. Разработанная методика в настоящее время проходит испытание с использованием большего количества штаммов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов, А.С. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году / А.С. Водопьянов, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, И.П. Олейников, Д.А. Зубкова, Е.В. Монахова, Л.В. Григоренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. - № 2. – С. 46-51.
2. Германчук, В.Г. Индикация холерного токсина с помощью *malDI* масс-спектрометрии / В.Г. Германчук, Д.В. Уткин, А.Н. Спицын, М.Н. Киреев, Н.Е. Щербакова // Здоровье населения и среда обитания. - 2015, 3 (264): 27-31.
3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой в Российской Федерации. СП 3.1.1.2521-09. М., 2009.
4. Титова, С.В. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в Мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, А.В. Самородова, Е.Г. Тюленева, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, И.В. Архангельская, С.М. Иванова, Т.В. Ковалева, С.О. Водопьянов // Проблемы особо опасных инфекций. - 2016. - № 1. – С. 20-27.
5. Nissen S. Implementation of a Fast Artificial Neural Network Library (FANN). Department of Computer Science University of Copenhagen (DIKU). 2003.
6. Tamura, K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson et al. // Mol. Biol. and

СПОСОБНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ГИДРОЛИЗОВАТЬ СПАНЫ

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н.

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

В современном мире человечество увеличивает использование для своих целей и нужд различных химических веществ, включая пищевые добавки, такие как спан-20 и -80 и др. Спаны представляют собой неполные эфиры жирных кислот и шестиатомного спирта гексита - производного сорбита. Являясь неионогенными поверхностно-активными веществами, они используются в пищевой/непищевой промышленности в качестве стабилизаторов, загустителей, текстураторов, пеногасителей, глазирователей. В настоящее время известно, что холерный вибрион обладает способностью гидролизовать твины [1,4], первичные алкилсульфаты (SDS) [2] и другие поверхностно-активные вещества (ПАВ). Гидролиз многих ПАВ осуществляют ферменты эстеразы /липазы [3]. В настоящее время показана роль ферментов, участвующих в деструкции ПАВ, в метаболизме. Более того, эти ферменты используют для дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы [2]. Принимая во внимание существование у холерного вибриона группы ферментов, участвующих в утилизации ПАВ, постоянно присутствующих в объектах окружающей среды в связи с возрастающим антропогенным воздействием, представляет интерес оценка способности холерных вибрионов гидролизовать спаны для последующего выяснения роли этих ферментов в биологии возбудителя холеры.

Цель исследования состояла в конструировании простой и информативной среды, позволяющей проводить анализ способности штаммов холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx АВ* и *tcrA*), гидролизовать спаны.

Материалы и методы. При выполнении исследований использовали разные группы штаммов: 6 штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор (*ctx+* *tcr+*); 6 дефектных по синтезу токсина и токсинкорегулируемых пилей штаммов ($\Delta ctx \Delta tcr$), выделенных из воды поверхностных водоемов; 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (*ctx+* *tcr+*) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных ($\Delta ctx \Delta tcr$) - из проб воды

поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, где их хранили в лиофилизированном состоянии. Способность штаммов гидролизовать спаны выявляли на сконструированной среде на основе агара Мартена рН 7.7 и агара Хоттингера рН 7.2 [1], используя в качестве субстратов 0.1% спан -20 и -80 (Serva). Для выяснения способности холерных вибрионов использовать спаны в качестве единственного источника углерода использовали среду Бхаскарана с 0.1% спан-20, -80. Для контроля в среду добавляли в качестве единственного источника углерода 0,1% глюкозы (Россия).

В результате было обнаружено, что все взятые в работу штаммы холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx АВ* и *tcpA*), хорошо росли на сконструированных средах и обладали способностью гидролизовать предложенные субстраты, что проявлялось в образовании вокруг макроколоний вибрионов характерных непрозрачных зон с металлическим блеском через 24-48 ч инкубации при 37°C. Оказалось, что среда на основе агара Мартена позволяла регистрировать способность штаммов гидролизовать как спан-20, так и спан-80, в то время как среда на основе агара Хоттингера позволяла выявлять способность только к гидролизу спан-20. Следовательно, состав сред может влиять на проявление исследуемой ферментативной активности. Известно, что холерный вибрион может использовать твины в качестве единственного источника углерода [4]. Мы обнаружили, что спаны также могут использоваться холерными вибрионами в качестве единственного источника углерода. Не исключено, что данная способность наделяет холерные вибрионы определенными дополнительными преимуществами в выживании в различных экосистемах.

Таким образом, в результате проведенного исследования удалось сконструировать питательную среду на основе агара Мартена, позволяющую выявлять способность штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп гидролизовать спан-20 и-80. Анализ полученных результатов показал отсутствие различий в способности гидролизовать изучаемые субстраты у штаммов разных серогрупп, выделенных из различных источников, и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx АВ* и *tcpA*). В дальнейшем представляет большой интерес изучение возможного участия этого фермента в персистенции холерных вибрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуванова, О.В. Твиназная активность у *Vibrio cholerae* O139 серовара «Бенгал», выделенных из различных источников / О.В. Дуванова, Н.Я. Шиманюк., Т.Г. Мордвинцева, Б.Н. Мишанькин // Холера и

патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону. - 1999. - Вып. 12. - С. 78.

2. Дуванова, О.В. Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы по алкилсульфатазной активности / О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин., С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов // Патент на изобретение 2473697 от 27.04.2011.

3. Козлов, С.Н. Зимографический анализ липолитических ферментов субклеточных фракций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп / С.Н. Козлов, В.Б. Николаев, Е.Ю.Марков и др. // Бюллетень Восточно-Сибирского науч. центра Сибирского отделения Рос. акад. мед. наук. - 2016. - Вып. 2 (108). - С. 55-59.

4. Кузьмиченко, И.А. Деструктивная активность и рост холерного вибриона в присутствии твинов / И.А. Кузьмиченко, И.В. Грачева, О.П. Плотникова // Проблемы особо опасных инфекций. – Саратов, 2001. - № 1(81). - С. 101-105.

L-АСПАРАГИНАЗА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Галичева А.Л.

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

L-аспарагиназа (L-амидогидролаза, К.Ф.3.5.1.1) - это фермент, катализирующий гидролиз L-аспарагина с образованием L-аспартата и аммиака. Аспартат, являясь глюконогенной аминокислотой, конвертируется трансаминазой в оксалоацетат, который может быть далее использован в цикле трикарбоновых кислот или глюконеогенезе. Фермент обнаружен в различных растениях, бактериях, включая *Shigella flexneri*, *Helicobacter pylori*, *Streptococcus GroupA*, *Erwinia carotovora*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Pyrococcus furiosus*, *Acinetobacter baumannii* и др. Показана роль этого фермента в метаболизме и патогенезе некоторых микроорганизмов [2,3,4,5], в плейотропном эффекте на экспрессию ряда генов, способность подавлять формирование биопленок многих патогенных микроорганизмов [4]. Данных о L-аспарагиназе у холерных вибрионов в литературе мы не встретили. Учитывая это, цель исследования состояла в обнаружении L-аспарагиназы у холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных из различных источников, и с разной эпидемической значимостью (наличие / отсутствие генов *ctx AB* и *tcpA*).

В работе использовали разные группы штаммов: 4 штамма *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор (ctx+ tcp+); 4 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов (Δ ctx Δ tcp), выделенных из воды поверхностных водоемов; 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (ctx+ tcp+) были выделены из клинического материала, а 6 атоксигенных (Δ ctx Δ tcp) - из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, где их хранили в лиофилизированном состоянии. Активность L-аспарагиназы определяли качественно у холерных вибрионов, выращенных на агаре LB при 37°C, согласно описанному методу [1], основанному на образовании красных комплексов меди с анионом гексацианоферрата при ферментативном разрушении комплексов меди с аспарагином. Красный цвет колоний и образующийся вокруг них красный ореол указывали на способность исследуемого микроорганизма разрушать аспарагиновые комплексы, что характерно для штаммов, продуцирующих искомый фермент, в то время как неактивные - цвет дифференциальной среды не изменяли.

Таким образом, проведенное исследование показало, что с помощью описанного [1] методического приема удалось легко обнаружить L-аспарагиназу у ряда штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп независимо от источника выделения и эпидемической значимости (ctx+ tcp+ Δ ctx Δ tcp+). Метод может оказаться полезным при осуществлении первичного отбора клонов в экспериментах по получению рекомбинантных вариантов - продуцентов фермента.

Учитывая значимость L-аспарагиназы для многих микроорганизмов, перспективным представляется детальное изучение этого фермента с последующим выяснением его роли в патогенезе и персистенции холерных вибрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Покровская, М.В. Дифференциальная среда для выявления штаммов бактерий продуцентов L-аспарагиназ / М.В. Покровская, В.С. Покровский, Н.Н. Соколов // Прикладная биохимия и микробиология. - 2011. - Т. 47, № 2. - С. 183-186.
2. Baruch, M. An extracellular bacterial pathogen modulates host metabolism to regulate its own sensing and proliferation / M. Baruch, I. Belotserkovsky, B.B. Hertzog, M. Ravins, E. Dov et al. // Cell. - 2014. - doi: 10.1016/j.cell.2013.12.007.
3. George, D.T. The periplasmic enzyme, Ans B, of *Shigella flexneri* modulates bacterial adherence to host epithelial cells / D.T. George, U. Mathesius, C.A. Behm, N.K. Verma // PLoS One. - 2014. - Vol. 9, № 4. - e94954.
4. Muslim, S.N. Extraction and purification of L-asparaginase

produced by *Acinetobacter baumannii* and their antibiofilm activity against some pathogenic bacteria / S.N. Muslim, I.M.S. Al Kadmy, A.N.M. Ali, N.H. Hussein, A.S. Dwaish et al. // The international journal of biotechnology. - 2016. - Vol. 5, № 1. - P. 7-14.

5. Scotti, C. Cell-cycle inhibition by *Helicobacter pylori* L-asparaginase / C. Scotti, P. Sommi, M.V. Pasquetto, D. Cappelletti, S. Stivala, P. Mignosi et al. // PLoS One. - 2010. - Vol. 5, Issue 11. – e 13892.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ И ДОМИНИРУЮЩИХ ВИДОВ БАКТЕРИОПЛАНКТОНА ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ТЕМПЕРАТУРАХ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Архангельская И.В., Ежова М.И.,
Кругликов В.Д.

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

Холерные вибрионы можно обнаружить повсеместно в прибрежных зонах водоемов средних широт, особенно в эндемичных очагах, в течение всего летне-осеннего периода. Холерные вибрионы вместе с другими представителями флоры и фауны заселяют морские и речные водоемы, как в экваториальных странах, так и в северных – вплоть до Ледовитого океана [7].

Выживание холерных вибрионов в экологических нишах, основано на симбиотическом взаимоотношении с различными биологическими объектами, что, возможно, позволяет им сохраняться в межэпидемические периоды. Множество исследований посвящено ассоциативному симбиозу холерных вибрионов с фито- и зоопланктоном [1,6,8]. Однако практически нет данных о характере взаимоотношений между *Vibrio cholerae* и микрофлорой поверхностных водоемов, хотя микробное сообщество является первичным звеном любых биоценозов и экосистем. Межмикробные симбиотические ассоциации - одна из загадок природы. Эволюционная древность микроорганизмов объясняет возникшее многообразие их симбиотических связей, как между собой, так и практически со всеми живыми существами [2].

В результате мониторинговых исследований бактериопланктона воды поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону (2016 год) установили, что в мае - июне при температуре воды 16-23⁰С в стационарных точках

реки Дон и реки Темерник доминировал род *Aeromonas* (99%), представленный видами *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. media*, и только 1% приходился на *Acinetobacter schindleri*, *Enterobacter asburiae* и *Enterobacter cloacae* [3]. Параллельно методами с использованием среды обогащения [4,5] только из проб воды реки Дон выделяли *Vibrio cholerae non O1/ non O139*. Выделенные штаммы не агглютинировались видоспецифическими сыворотками O1, O139 и PO.

При повышении температуры воды до 24-28⁰С произошла смена доминирующих видов бактериального сообщества. Процентное соотношение представителей рода *Aeromonas* снизилось до 50% -24% и ниже. В июле-августе месяце доминировал род *Acinetobacter*, представленный видами *A. schindleri*, *A. johnsonii* и *A. lwoffii*, которые составляли от 20 до 85%. В это же время из исследуемых точек процент выделения *V. cholerae non O1/non O139* составил от 10 (река Дон) до 30% (река Темерник), причем как на средах обогащения, так и без. Остальной бактериопланктон состоял из *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter asburiae*, *Exiguobacterium aurantiacum* в реке Дон и *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* в реке Темерник, процент выделения этих микроорганизмов колебался от 6 до 20% от общего числа бактерий.

В сентябре месяце при понижении температуры воды до 19⁰С в реках Дон и Темерник микробный пейзаж существенно менялся. В пробах воды в этих точках снова доминировал род *Aeromonas*. Процентная концентрация представителей рода составила от 58,3 до 75%. Холерные вибрионы *non O1/non O139* выделяли только на средах обогащения. В это же время в реке Дон в равных количествах (16%) выделяли виды *Enterobacter cloacae* и *Raoultella ornithinolytica*, в реке Темерник - по 20% *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*. При дальнейшем понижении температуры воды до 16⁰С и ниже в исследуемых стационарных точках по-прежнему доминировали представители рода *Aeromonas*, а *Vibrio cholerae non O1/non O139* перестали высеваться, как на средах обогащения, так и при посеве нативного материала.

Для изучения влияния температуры на взаимоотношение *Vibrio cholerae* и доминирующих видов аутохтонной микрофлоры водных объектов г. Ростова-на-Дону в эксперименте использовали штаммы *Vibrio cholerae El Tor*: P-19613 *ctxAB*⁺ *tcpA*⁺, 278 *ctxAB*⁻ *tcpA*⁻ и *Vibrio cholerae non O1/ non O139 ctxAB*⁻ *tcpA*⁻ 398, изолированные из реки Темерник г. Ростова-на-Дону в 2014 и 2016 годах соответственно. Характер взаимоотношений холерных вибрионов с доминирующими видами бактериопланктона изучали при совместном культивировании. Суточные культуры холерных вибрионов и представителей доминирующей микрофлоры (*Aeromonas hydrophila* и *Acinetobacter schindleri*) попарно засеивали в 30 мл автоклавированной речной воды до конечной

концентрации 10^4 микробных единиц/мл в равных количествах. В качестве контроля использовали стерильную речную воду, куда засеивали исследуемые штаммы, каждый отдельно. Опытные и контрольные пробы культивировали при температуре, соответствующей условиям окружающей среды (10°C – осень - зима и 28°C – лето). Высевы проводили ежедневно в течение 7 дней, затем один раз в неделю в течение 1 месяца, затем 1 раз в месяц.

При изучении характера взаимоотношений *Vibrio El Tor: P-19613, 278* и *Vibrio cholerae non O1/ non O139 398* в сочетании с *Aeromonas hydrophila* при 10°C была отмечена тенденция к уменьшению концентрации холерных вибрионов и отсутствие роста на 7 сутки культивирования. В контрольных пробах при этой же температуре холерные вибрионы высевались до 14 суток. Эти же штаммы в этих же условиях, но в сочетании с *Acinetobacter schindleri*, как в опытных, так и контрольных пробах, высевались до 14 суток инкубации.

При температуре 28°C холерные вибрионы на 21 день инкубации практически полностью подавили рост *Aeromonas hydrophila*. В контрольных пробах концентрация *Aeromonas hydrophila* сохранялась на одном уровне с незначительными изменениями ($10^6 - 10^7$ мк/мл) весь период наблюдения. Совсем другой характер взаимоотношений наблюдали при совместном культивировании холерных вибрионов с *Acinetobacter schindleri*. Весь срок наблюдения концентрация *Vibrio cholerae* независимо от серогруппы и наличия *stx* гена и *Acinetobacter schindleri* сохранялась практически на одном уровне с незначительными колебаниями и составляла в среднем 6×10^5 и 7×10^5 соответственно.

Таким образом, повышение температуры воды влияло на количественный и качественный состав бактериопланктона, что приводило к смене доминирующих видов микроорганизмов и увеличению концентрации *Vibrio cholerae non O1/ non O139* в воде поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону. Возможно, при повышении температуры воды скорость размножения холерных вибрионов возрастает или происходит синтез биологически активных веществ, что дает им селективные преимущества в экологической нише. Полученные экспериментальные данные при совместном культивировании холерных вибрионов различных серогрупп и токсигенности свидетельствуют о том, что температура влияет не только на концентрацию микроорганизмов, но и на взаимоотношения в межмикробных ассоциациях, что, возможно, объясняется особенностью метаболизма этих микроорганизмов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрусенко, И.Т. Гидробионтный фактор в эпидемиологии холеры / И.Т. Андрусенко, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, М.В. Акулова, Э.А. Москвитина // ЗНИСО. - 2009. - № 3. - С. 11-19.

2. Бухарин, О.В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен / О.В. Бухарин // Вестн. Моск. ун-та. Сер.16. Биология. - 2008. - № 1. - С. 6-13.
3. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: МУК 4.2.1884-04.
4. Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07.
5. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2870-11. 4.2.
6. Dalisay, D.S. A mannose sensitive haemagglutinin (MSHA) like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva abstralis* / D.S. Dalisay, J.S. Webb, A. Scheffel et al. // Microbiology. - 2006. - Vol. 152, Pt. 10. - P. 2875-2883.
7. Emmett, A. Pollution in the time of cholera / A. Emmett // Technol. Rev. - 1993. - Vol. 96, № 4. - P. 13-14.
8. Escobar, L. A global map of suitability for coastal *Vibrio cholerae* under current and future climate conditions / L. Escobar, S.J. Ryan A.M., Stewart-Ibarra, J.L. Finkelstein, C.A. King, H. Qiao et al. // Acta Trop. - 2015. – Vol. 149. – P. 202 – 211.

О КУЛЬТУРАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ С 2012 ПО 2016 ГОДЫ

Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Тюнникова В.Д.

*ФКУЗ «Элистинская противочумная станция» Роспотребнадзора,
г. Элиста, РК*

По данным ВОЗ эпидемиологическая ситуация по холере в мире продолжает оставаться напряжённой. В 2016 году холерой в мире заболело 54 тысячи человек, наибольшее количество заболевших - в странах Африки и Карибского бассейна. Один случай заболевания был зарегистрирован на территории Украины.

Республика Калмыкия относится к территориям II типа по эпидемическим проявлениям холеры. Исследование проб воды в фиксированных стационарных «точках» проводится с 1 июня по 30 сентября. Эпидемиологический мониторинг поверхностных водоёмов на наличие возбудителя холеры на территории Республики Калмыкия

осуществляется лабораториями ООБИ ФБУЗ «ЦГиЭ в РК», его филиалами в районах и бактериологической лабораторией ФКУЗ «Элистинская противочумная станция». Исследование материала от населения, госпитализированного в БУРК «Республиканский центр специализированных видов медицинской помощи», осуществляется бактериологической лабораторией этого стационара.

За последние 5 лет из воды открытых водоёмов было изолировано 107 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы и 1 RO вариант.



Культуры холерных вибрионов были изолированы лабораториями ООБИ ФБУЗ «ЦГиЭ в РК» и ФКУЗ «Элистинская противочумная станция» из проб воды, отобранных в стационарных точках двух водоёмов в черте города Элиста (р. Элистинка и пр. Колонский), и двух водоёмов в его окрестностях (пр. «Заячий» и пруд с. Вознесенка).

Наибольшее количество штаммов изолировано из пруда «Заячий», расположенного на юго-востоке от г. Элиста, который представляет собой перегороженную плотиной часть р. Элистинка, куда попадают сточные воды частного сектора, и из р. Элистинка, которая пересекает г. Элиста с запада на восток (в общей сложности 83 штамма). Из пруда Колонский, где расположен городской пляж, была изолирована 21 культура; 4 штамма были изолированы из воды пруда с. Вознесенка.

Выделенные культуры представляли собой подвижные полиморфные Грам-отрицательные палочки, прямые и изогнутые. При выращивании на жидких и плотных средах имели типичную морфологию. Биохимическая активность соответствовала виду холерного вибриона: ферментировали до кислоты без газа сахарозу, маннозу, маннит и глюкозу.

Ферментация глюкозы происходила как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Все выделенные штаммы не расщепляли арабинозу, инозит, лактозу. Обладали протеолитической активностью, имели декарбоксилазу лизина и орнитина и не имели дигидролазы аргинина.

Выделенные культуры O1 серогруппы относились к серовару Огава (97,2%); к серовару Инаба (2,8%); один штамм - R- вариант.

Чувствительность к диагностическим холерным фагам (лизировались до ДРТ фагом эльтор) проявили 21,5% выделенных штаммов. При типировании выделенных культур монофагами типизирующими диагностическими холерными для проведения научно-исследовательских работ по мониторингу холеры на территории РФ был определён 13 фаготип в 14 % случаев, 15 фаготип в 1,87%, 16 фаготип в 0,93% и 17 фаготип в 0,93%.

Чувствительность к антибиотикам определялась дискодиффузионным методом на агаре АГВ. Чувствительными к доксициклину, ампициллину и ципрофлоксацину были 86% штаммов, к тетрациклину и рифампицину – 87-88%, левомицетину и офлоксацину – 94-96% и цефотаксиму – 62% культур.

Определение токсигенности выделенных штаммов холерных вибрионов проводилось комплексным методом с использованием пробы Грейга и в ПЦР, что имело важное эпидемиологическое значение. Все выделенные штаммы были нетоксигенны (гемолизположительны и не имели гена холерного токсина *ctx A*), но в 5,56% случаев содержали ген *tcrA*.

Все описанные штаммы были отправлены в Референс-центр по мониторингу холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт и подтверждены. По данным кластерного анализа, проведенного в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, штаммы, изолированные в 2016г. в Республике Калмыкия, оказались наиболее близки к выделенным в г. Ростове-на-Дону в 2014 и 2016 годам, а также к штаммам, изолированным в Республике Калмыкия ранее. Проведённый анализ позволяет предположить, что упомянутые штаммы циркулируют на территории Калмыкии и Ростовской области в течение нескольких лет.

Проведённый эпидемиологический мониторинг вибриофлоры открытых водоёмов Республики Калмыкия показал, что количество циркулирующих нетоксигенных штаммов холерных вибрионов на протяжении ряда лет находится примерно на одном уровне. Это подтверждает наличие в открытых, хорошо прогреваемых водоёмах на территории Республики условий, достаточных для поддержания жизнеспособности и размножения, и токсигенных штаммов, при возможном их заносе из неблагополучных по холере территорий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Голубев, Б.П. Экологические аспекты распространения

вибрионов Эльтор в объектах окружающей среды: Автореф. дис. канд. мед. наук. Саратов. - 1993. 20 с.

2. Хайтович, А.Б., Михайлова А.Е. Факторы сохранения холерных вибрионов в водоемах / А.Б. Хайтович, А.Е. Михайлова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2000. - №6. - С. 99-104.

3. Онищенко, Г.Г. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырев. - М., 2013 г.

4. Лабораторная диагностика холеры. МУК 4.2.2218-07. - М., 2007г.

5. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой. СП 3.1.1.2521-09. - М., 2010 г.

АНАЛИЗ МИКРОБНЫХ СООБЩЕСТВ В ТОЧКАХ МОНИТОРИНГА *VIBRIO CHOLERAЕ*, РАСПОЛОЖЕННЫХ НА ОЗЕРЕ КЕНОН ЗАБАЙКАЛЬСКОГО КРАЯ

Пономарева А.С., Миронова Л.В., Гладких А.С., Феранчук С.И.,
Балахонов С.В.

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

Семейство *Vibrionaceae* включает генетически и метаболически разнообразную группу гетеротрофных бактерий, встречающихся, в основном, в водной среде [1,2]. Микробиологический мониторинг холеры проводится в РФ в соответствии СП 3.1.1.2521-09 "Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации", МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» и МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровня». В Забайкальском крае мониторинговые исследования вибриофлоры поверхностных водоемов ведутся с 40-х годов прошлого столетия. По результатам ежегодного наблюдения за 2011-2015 гг. в точке рекреационного водопользования на оз. Кенон (пляж КСК) высеваемость *V. cholerae* в среднем составила 35,5 %, а в месте сброса технических вод ГРЭС в оз. Кенон – 34,4 %. При этом в точке – пляж КСК из 32 выделенных штаммов *V. cholerae* изолировано пять *V. cholerae* El Tor O1 Inaba и 27 *V. cholerae non O1/non O139*. В месте сброса технических вод

ГРЭС вклад в высеваемость внесли лишь вибрионы не O1/O139 серогрупп, был выделен 31 штамм. MLVA-типирование штаммов *V. cholerae* El Tor O1, выделенных из оз. Кенон в период с 2011 по 2015 гг., показало, что штаммы принадлежат к одному клоновому комплексу с числом повторов по пяти локусам тандемных повторов VcA16(17)VcB0VcC11(12)VcD3VcG2. Таким образом, ежегодное выделение штаммов в данных точках предполагает наличие условий, способствующих нахождению и сохранению холерного вибриона в водоеме в течение продолжительного времени [3].

Один из физических факторов, способствующих выживанию вибриона в данном водоеме – высокая температура воды в месте сброса технических вод ГРЭС, не позволяющая промерзнуть участку водоема в зоне их впадения. Более высокая среднегодовая температура воды способствует бурному развитию целого ряда микроорганизмов, а также увеличению биомассы представителей флоры и фауны водоема, что создает особые условия существования и для холерного вибриона в различных симбиотических отношениях с микроорганизмами.

С целью определения качественного состава микроорганизмов, обитающих в точках мониторинга холеры озера Кенон, проведен метагеномный анализ проб воды в двух точках: «пляж КСК» и «место сброса технических вод ГРЭС» [4].

Материалы и методы. Отбор проб воды из озера Кенон осуществляли 15 и 17 июля 2015 г. с поверхности в стерильные бутылки в объеме один литр. Материал концентрировали на стерильные поликарбонатные кассетные фильтры диаметром пор 0,22 мкм. Фильтрацию проводили через нитроцеллюлозные и поликарбонатные фильтры диаметром пор 1,2 и 5 мкм соответственно. Выделяли тотальную ДНК с каждого фильтра и проводили амплификацию V4-V6 переменных участков 16SrRNA бактерий.

В соответствии с протоколом компании Roche готовили библиотеки ампликонов, секвенирование производили на пиросеквенаторе Roche GS Junior. Данные обрабатывали с помощью программы Mothur v.1.39. Аннотацию полученных чтений осуществляли путем выравнивания на референсную базу последовательностей 16SrRNA Silva. Кластеризацию в OTU (оперативные таксономические единицы) и оценку видового разнообразия проводили на уровне сходства 97 %. Также был произведен расчет коэффициентов видового богатства и разнообразия микроорганизмов (ACE, Chao и Shannon index).

Результаты. Анализ полученных данных показал наибольшее видовое разнообразие микроорганизмов в месте сброса технических вод ГРЭС по сравнению с точкой пляж КСК. Наибольшее количество уникальных OTU (199) содержится в пробе с места сброса технических вод ГРЭС, при этом расчетное значение OTU (коэффициент Chao) составил

287, число OTU в пробе в районе пляжа составило 156 при расчетном 198. Коэффициент Шеннона, уровень разнообразия в точках был примерно одинаков (3,8-4,01). Доминирующими филумами в обеих точках - *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria* – были характерны для пресноводных экосистем. Представители филума *Proteobacteria* составляли 36 % и 21 %, *Bacteroidetes* 36 % и 23 %, *Actinobacteria*; *Actinobacteridae* 15 % и 37 %, *Verrucomicrobia* по 5 %, *Cyanobacteria* по 5 %, *Firmicutes* 1 % и 1,6 %, *Planctomycetes* 0,7 % и 3,1 % в точках: пляж КСК и место сброса технических вод ГРЭС, соответственно. Представители других филумов *SM2F11*, *BD1-5* *Chloroflexi*, *Chlamydiae*, *Spirochaetes*, *TM6*, *Acidobacteria*, *Parcubacteria*, *Actinobacteria*; *Acidimicrobidae* составляли менее одного процента в сообществах. В точке сброса технических вод ГРЭС встречались филумы, представители которых не содержались в пробе воды пляжа КСК: *Gemmatimonadetes*, *NPL-UPA2*, *Nitrospirae*, *Lentisphaerae*, *Chlorobi*, *Candidate division BRC1*, *Candidate division SR1*, *Armatimonadetes*. Определены уникальные представители в точке пляж КСК – *Bacteroidetes* (*BD2-2*, *VC2.1 Bac22*) и *Proteobacteria TA18*.

Род *Vibrio* входит в класс *Gamma proteobacteria*, представители которого составили 6,3 % и 2,3 %, соответственно, в исследуемых пробах. Последовательностей гена 16SrRNA, относящихся к *Vibrio cholerae*, не обнаружено, что может быть связано с избирательностью амплификации при наличии большого числа бактериальных видов в сочетании с очень низким содержанием *V. cholerae* в начале сезона отбора проб. Бактериологическими методами в данных пробах *V. cholerae* не детектировался.

Заключение. С помощью пиросеквенирования участка гена 16SrRNA получены данные о составе микробных сообществ, развивающихся в местах ежегодного обнаружения холерного вибриона в оз. Кенон. Определено соотношение доминирующих бактериальных филумов, а также наличие уникальных.

В месте сброса технических вод ГРЭС сформировалось уникальное, разнообразное в отношении представленности видов сообщество, что не исключает влияния его на экологию всего озера. Изучение микробного сообщества, как единой взаимодействующей системы, позволит раскрыть особенности длительного существования холерного вибриона в экологических нишах и возможные механизмы взаимодействия с представителями различных таксономических групп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takemura, A.F. Associations and dynamics of Vibrionaceae in the environment, from the genus to the population level. / A.F. Takemura, D.M. Chien, M.F. Polz // *Frontiers in microbiology*. – 2014. – Vol. 5. – P. 38.

2. Thompson, F.L. Biodiversity of vibrios. / F.L. Thompson, T. Iida, J. Swings // Microbiology and molecular biology reviews : MMBR. – 2004. – Vol. 68. – № 3. – P. 403 - 431, table of contents.

3. Гладких, А.С. /Анализ бактериального сообщества двух эндемичных видов губок из озера Байкал / Гладких А.С., Калюжная О.В., Белых О.И., Ан Т.С., Парфенова В.В. // Микробиология. - 2014. - Т. 83., № 6. - С. 682 - 693.

4. Smith, R. J. / Metagenomic comparison of microbial communities inhabiting confined and unconfined aquifer ecosystems / R.J. Smith, T.C. Jeffries, B. Roudnew, A.J. Fitch, J.R. Seymour, M.W. Delpin, K. Newton, M.H. Brown, J.G. Mitchell // Environmental Microbiology. – 2012. - Vol. 14, P. 240 - 253.

СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ О1/ НЕ О139 СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ МОНИТОРИНГА ВОДНЫХ ЭКОСИСТЕМ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ С 1999 ПО 2016 ГОДЫ

Архангельская И.В., Ежова М.И., Кругликов В.Д., Левченко Д.А.

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

Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп известны как естественные обитатели открытых водоемов и как возможные возбудители вспышек и спорадических диарейных заболеваний человека [3].

Цель данной работы заключалась в анализе динамики выделения и в характеристике культур неО1/неО139, обнаруженных в ходе мониторинга в поверхностных водоемах и хозяйственно – бытовых стоках г. Ростова-на-Дону в период 1999-2016гг.

Всего за указанный период нами из стационарных точек (с.т.), закрепленных за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, было изолировано 1500 штаммов. Все изолированные штаммы обладали типичными для рода *Vibrio* и вида *V. cholerae* морфологическими, культуральными и биохимическими свойствами [2]. Из поверхностных водоемов было выделено 1445 штаммов, из сточных вод – 55. Причем в среднем из поверхностных водоемов ежегодно из 143±5,6 проб выделяли 80,27±7,048 штаммов, а из 17,5±1,26 проб сточных вод – 3,05±0,69 штаммов.

Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов неО1/ не О139 серогрупп за изучаемый период свидетельствовал о количественном

увеличении изолированных штаммов в 2005г., 2012г., 2014г., 2016г. и о снижении их числа в 2000 и 2011 гг. Вместе с тем, за последние 18 лет наблюдалась общая тенденция роста числа выделяемых из проб водных объектов окружающей среды г. Ростова-на-Дону штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139.

В пробах из реки Дон было выделено 872 штамма (с.т. №№ 1, 4, 7, 8), а из реки Темерник - 370 штаммов (с.т. №№ 2, 6), причем наибольшее количество штаммов выделялось из с.т. №№ 1, 4 и 8. Сезонность обнаружения холерных вибрионов не O1/ не O139 серогрупп при проведении ежегодных обследований водных объектов, т.е. с мая по сентябрь включительно, отмечалось преимущественно в июле (27%) и августе (25%), а меньше всего в мае (9%) месяце. За изучаемый период в сентябре культуры обнаружены не были.

Серологическую идентификацию проводили полученными нами диагностическими кроличьими моноспецифическими сыворотками против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп в реакции слайд – агглютинации [1]. Из 1115-и штаммов было типировано 929 (82,1%), среди которых были определены представители 64 серогрупп, что свидетельствовало о многообразии антигенных вариантов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, циркулирующих в воде поверхностных водоемов и стоках в г. Ростове-на-Дону (таблица).

Среди культур с определённой серологической принадлежностью доминировали представители 5-и серогрупп: O67 (26,0 %), O76 (14,38 %), O75 (9,36 %), O53 (8,67 %) и O16 (11,0%). При этом представители O16, O53, O67, O75, O76 серогрупп были обнаружены в пробах воды из всех стационарных точек. Проводя сравнительный анализ полученных результатов серологической идентификации с данными 70-х годов [4], были отмечены изменения в составе доминирующих серогрупп вибрионов, циркулирующих в воде поверхностных водоемов в г. Ростове-на-Дону. По результатам серотипирования, полученным Л.М. Смоликовой с соавт. (1979г.), среди штаммов холерных вибрионов не O1/ не O139 преобладали представители O6, O8, O41, O50, O53 серогрупп, а среди штаммов, выделенных в период с 1999 по 2016 гг., вибрионы этих серогрупп встречались лишь в единичных случаях. Вибрионы только O53 серогруппы, по-прежнему, оставались в числе преобладающих.

Таким образом, полученные нами результаты сравнительной серологической идентификации культур холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных из водных объектов г. Ростова-на-Дону с 1999 по 2016 гг., дают возможность использовать полученные данные при изучении циркуляции этих микроорганизмов в поверхностных водоемах и стоках, а также обеспечивать динамическое слежение за вибриопейзажем водных экосистем на данной территории.

Таблица. Результаты серотипирования холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных из воды поверхностных водоемов и сточных вод г. Ростова-на-Дону с 1999 по 2016 гг.

№ стационарной точки, объект выделения	Количество штаммов из них:		Определены:	
	выделено / изучено	выявлена серогруппа (абс./%)	серогруппы:	из них доминирующие:
1. Р. Дон. Правый берег (Державинский спуск)	230/155	124/ 80,0%	O2, O6, O8, O9, O16, O17, O24, O28, O34, O41, O44, O46, O47 O50, O53, O57, O62, O63, O65, O67, O71, O75, O76	O16, O67, O75, O76
2. Р. Темерник. Устье впадения в реку Дон	173/130	103 / 79,2%	O2, O3, O5, O6, O7, O8, O9, O14, O15, O16, O19, O21, O24, O27, O30, O39, O46, O50, O52, O53, O55, O56, O62, O65, O67, O69, O73, O75, O76, O81, O83	O16, O67, O73, O76
3. Городские очистные сооружения, приемная камера КНС №4	55/55	38/ 69,09 %	O4, O7, O16, O29, O32, O34, O37, O39, O46, O53, O54, O58, O62, O67, O69, O75, O76	O67
4. Р. Дон. Правый берег у железнодорожно-автомобильного моста «Западный обход»	229/155	131 / 84,5%	O2, O4, O6, O7, O9, O16, O17, O18, O24, O28, O30, O35, O39, O41, O44, O50, O53, O56, O58, O66, O67, O69, O72, O75, O76	O16, O53, O67, O76
5. Пр. М. Донец. Левый берег, 500м ниже автомобильного моста (на Кумжинскую рощу)	203/155	141 /91,0 %	O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O24, O28, O29, O34, O36, O38, O39, O41, O44, O46, O53, O56, O57, O63, O65, O66, O67, O69, O72, O75, O76, O82	O16, O67, O76
6. Р. Темерник, Ботанический сад (у моста)	197/155	110 / 71,0%	O2, O4, O7, O8, O16, O29, O32, O33, O34, O36, O39, O41, O42, O44, O50, O52, O53, O62, O64, O65, O67, O69, O72, O73, O75, O76, O78, O80, O81, O82, O83	O8, O16, O67, O75, O76,
7. Р. Дон. Правый берег, 500м ниже впадения р. Темерник (у железнодорожного моста)	188/155	143 / 92,25%	O2, O6, O7, O8, O9, O16, O17, O21, O29, O32, O34, O37, O39, O41, O42, O46, O49, O50, O53, O55, O56, O57, O62, O63, O65, O67, O68, O69, O71 O75, O76, O80, O82, O83	O53, O67, O76
8. Р. Дон. Правый берег, Кировский спуск, напротив здания экипажа №2 РМК им. Г. Я. Седова	225/155	139 /89,67 %	O2, O4, O5, O6, O11, O14, O16, O28, O29, O34, O36, O39, O41, O42, O49, O53, O56, O57, O63, O65, O67, O69, O72, O73, O75, O76, O77	O16, O53, O67, O76
Всего	1500/1115	929 / 82,1%	Идентифицирована принадлежность к 64 серогруппам	O16, O53, O67, O75, O76

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.П. Оценка метода серологической идентификации *Vibrio cholerae* не O1 / Е.П. Авдеева, Б.Л. Мазрухо, Е.В. Ишина и др. // Журн. микробиол. – 2011. - №4. - С.75-78.
2. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания МУК 4.2.2870-11. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011г. - 83с.
3. Онищенко, Г.Г. Холерные вибрионы серогрупп не O1, выделенные в Узбекистане в 1987- 1990 гг.: ретроспективный VNTR-анализ / Г.Г. Онищенко, Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов, С.О. Водопьянов, Л.Г. Воронежская, И.Ю. Сучков, И.Я. Черепяхина, О.В. Дуванова, М.В. Шишияну // Эпидемиол. и инф. бол. – 2003. № 6. – С. 25 – 29.
4. Смоликова, Л.М. Серовары НАГ – вибрионов, выделенные из воды открытых водоемов / Л.М. Смоликова, А.Г. Сомова, Г.М. Мединский и др. // Журн. микробиол. – 1979.-№ 3. - С. 42 - 45.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ В 2016 ГОДУ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Чемисова О.С.¹, Рыковская О.А.¹, Полеева М.В.¹, Голенищева Е.Н.¹,
Санамянц Е.М.¹, Алленов А.В.²

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

²*ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора,
г. Владивосток*

В Приморском крае Российской Федерации в теплое время года постоянно регистрируются пищевые токсикоинфекции, вызванные галофильными вибрионами. Отмечаются как спорадические, так и групповые заболевания, что обосновывает необходимость мониторинга заболеваемости и внешней среды в Дальневосточном регионе РФ.

Ежегодно в рамках плановой научной тематики во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора поступают штаммы галофильных вибрионов, выделенные из различных источников на территории Приморского края. Подтверждение видовой

принадлежности штаммов с учетом требований современной систематики и углубленное изучение биологических свойств с целью отбора штаммов в коллекцию является одним из важных направлений деятельности коллекций микроорганизмов [1, 2].

В связи с вышеизложенным целью данной работы явилось подтверждение видовой принадлежности и типирование штаммов парагемолитических вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды (ООС) в 2016 году на территории Приморского края с применением MALDI-ToF масс-спектрометрии, с последующим отбором штаммов в коллекцию.

В работу было взято 27 штаммов галофильных вибрионов, выделенных из ООС г. Владивостока и г. Находка Приморского края в 2016 году. Из них 26 штаммов, выделенных из ООС, поступили как *V. parahaemolyticus* и один клинический штамм как *V. vulnificus*.

Для подтверждения их видовой принадлежности были использованы традиционные биохимические тесты [3]. Идентификацию исследованных культур методом MALDI-TOF масс-спектрометрии проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex-speed Bruker Daltonics (Германия) с программным обеспечением Biotyper. Патогенность штаммов оценивали комплексным методом [4].

При изучении культур по таксономическим признакам и методом MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа у подавляющего большинства штаммов подтверждена их видовая принадлежность. Исключение составил один штамм *V. vulnificus*, выделенный от человека, который был отнесен к роду *Aeromonas hydrophila* (показатель Score2.331). Вероятно, это обусловлено их общими биохимическими и патогенетическими свойствами. *Aeromonas hydrophila* также как и галофильные вибрионы является гетеротрофной грамотрицательной палочковидной бактерией, обитающей в основном в районах с тёплым климатом, как в пресной, так и в солёной воде. Из-за своей структуры бактерия очень токсична для многих организмов. При попадании в организм, она через кровоток попадает в первый доступный орган. При этом она синтезирует цитотоксический энтеротоксин аэролизин, который может привести к повреждению тканей. Патогенность *Aeromonas hydrophila* для человека уже несколько десятилетий является доказанным фактом [5]. Патогенность аэромонад связана с большим количеством внеклеточных белков, таких как липаза, хитиназа, амилаза, желатиназа, гемолизин и цитотоксический энтеротоксин аэролизин. Патогенный механизм их действия основан на использовании особой системы секреции белка, которая экспортирует факторы вирулентности непосредственно в клетки хозяина.

По результатам оценки патогенности парагемолитических вибрионов комплексным методом, которая включает гемолитическую активность в

тесте Канагава (KP), уреазную активность (Ure) и потенциальную способность вибрионов к продукции гемолизинов (наличие генов *tdh* и *trh*) штаммы парагемолитических вибрионов, выделенные из ООС, были оценены как авирулентные.

Для типирования поступивших штаммов с целью отбора штаммов парагемолитических вибрионов в коллекцию также был использован метод MALDI масс-спектрометрии. На рисунке 1 представлена дендрограмма, построенная на основе масс-спектрометрических профилей штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае в 2016 году.



Рисунок 1. Кластеризация штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в 2016 году на территории Приморского края РФ

Штаммы были разделены на кластеры преимущественно по территориальному признаку и источнику выделения (морская и речная вода).

Таким образом, с помощью масс-спектрометра Autoflex-speed Bruker Daltonics проведено подтверждение видовой принадлежности штаммов свежевыделенных галофильных вибрионов, поступивших из Приморской ПЧС в 2016 году. При этом установлено, что один из них *V. vulnificus* не соответствовал своим паспортным данным, был идентифицирован как *Aeromonas hydrophila*. Типирование с использованием метода масс-

спектрометрического анализа и углубленное изучение биохимических свойств поступивших параземолитических вибрионов позволило выявить кластеры штаммов сходных по свойствам и отобрать в коллекцию, представляющие интерес для научной работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Guidance for the operation of biological research Centers (BRC) // OECD. – 2004. – Part 1. – P. 1–16.
2. Smith, D. Culture Collections/D. Smith// Microbiology. – 2012. – Vol. 79. – P. 73–118.
3. Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology. The Gammaproteobacteria / George M. Garrity. New York: Springer. – 2005, 2B. – 1108 p.
4. Рыковская, О.А. Комплексный метод оценки вирулентности параземолитических вибрионов/ О.А. Рыковская., О.А. Шалу, Е.В. Монахова и др. // Клиническая и лабораторная диагностика. – 2013. – № 2. – С. 38-41.
5. Agger, W.A. Clinical and microbiological features of *Aeromonas hydrophila*-associated diarrhea/ W. A. Agger, J. D. McCormick, M. J. Gurwith //J. of Clin. Microbiology. – 1985. – Vol. 21, № 6. – P. 909–913.

РОЛЬ ГАЛОФИЛЬНЫХ ВИБРИОНОВ В СТРУКТУРЕ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Хунхеева Ж.Ю.¹, Миронова Л.В.¹, Воронок В.М.², Тарасенко Т.Т.³,
Косенок Е.В.³, Алленов А.В.⁴, Хоменко Т.В.⁴, Солодкая Н.С.⁴,
Балахонов С.В.¹

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

²Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, г. Владивосток;

³ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае,
г. Владивосток;

⁴ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора,
г. Уссурийск

Острые кишечные инфекции (ОКИ) остаются самыми распространенными заболеваниями, регистрируемыми во многих странах мира. В России ОКИ занимают одно из ведущих мест в структуре

инфекционной заболеваемости и экономической значимости [3]. Среди микроорганизмов рода *Vibrio* после возбудителя холеры важную роль в развитии ОКИ играют галофильные вибрионы (в т.ч. *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*), широко распространенные в морских прибрежных зонах и эстуариях [1,6,7,8]. На территории России галофильные вибрионы обнаруживаются в водах Азовского, Каспийского, Балтийского, Черного, Японского морей [2]. Вызываемые галофильными вибрионами кишечные инфекции характеризуются острым началом с диарейным синдромом и интоксикацией [2].

Цель работы заключалась в ретроспективном анализе заболеваемости галофилезами на территории Приморского края в период с 1997-2016 гг. и выявлении эпидемиологических особенностей проявления инфекции.

В структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края значимое место занимают прочие кишечные инфекции – гастроэнтериты, пищевые токсикоинфекции, вызванные бактериальными и вирусными агентами, а также возбудителями, таксономическую принадлежность которых установить не удалось. Последние преобладают в структуре прочих острых кишечных инфекций, удельный вес их составляет от 64,8 % (в 2016 г.) до 80,6 % (в 1997 г.). Среди острых кишечных инфекций с установленным возбудителем до 2014 г. преобладали возбудители бактериальной природы. За анализируемый период в регионе зарегистрировано 83969 случаев острых кишечных инфекций с установленным этиологическим агентом, из которых в 67,3 % случаях болезнь обусловлена бактериальными патогенами. В 370 случаях (0,65 %) возбудителем инфекции были широко распространенные в водоемах Приморского края микроорганизмы рода *Vibrio*, в т.ч. галофильные вибрионы.

В структуре возбудителей, изолированных от больных галофилезом, доминировал *V. parahaemolyticus* (90,2 %), в 30 случаях (8,9 %) выделен *V. alginolyticus*. В 2005 и 2010 гг. отмечены единичные случаи ОКИ у людей, из клинического материала от которых изолированы *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. hollisae* и *V. metschnikovii*.

Галофилезы регистрировалось практически ежегодно за исключением 1999, 2015 гг. и характеризовались как единичными, так и групповыми случаями. Крупные вспышки заболевания зарегистрированы в 1997 г. – 63 случая (2,84 на 100 тыс. населения); 2001 г. – 31 случай (1,46 на 100 тыс. населения); 2002 г. – 24 случая (1,16 на 100 тыс. населения); 2005 г. – 37 случаев (1,82 на 100 тыс. населения); 2007 г. - 39 случаев (1,90 на 100 тыс. населения); 2009 г. – 43 случая (2,23 на 100 тыс. населения); 2012 г. – 54 случая (2,76 на 100 тыс. населения). Во всех случаях показатель заболеваемости превышал среднемноголетний уровень заболеваемости по Приморскому краю (0,92 на 100 тыс. населения).

Сезонный подъем заболеваемости галофилезами пришелся на летне-осенний период, что связано с активным отдыхом и купальным сезоном жителей Приморского края. Наибольшее число заболевших (265 случаев) зарегистрировано в августе месяце. Что касается территориальной приуроченности галофилеза, вызванного *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, то максимальное число случаев приходится на г. Владивосток (341 случай, 93,7 %) и Хасанский район (23 случая, 6,3%) в возрастной категории от 20 до 30 лет (313 случаев). В 87,3 % случаев инфицирование парагемолитическими и алгинолитическими вибрионами было связано с употреблением в пищу морепродуктов. Так, по данным Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю, в 2007, 2009 гг. (22 и 5 случаев, соответственно) заболевания были связаны с употреблением варено-мороженных креветок, реализуемых без соблюдения температурного режима в зонах отдыха населения [5]. При вспышке галофилеза в 2012 г. в Хасанском районе с регистрацией 22 больных фактором передачи инфекции послужили крабы, креветки, реализуемые частниками в местах отдыха. Несмотря на очевидное значение морепродуктов в инфицировании людей *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, в 14,5 % случаях в эпиданамнезе больных установлены факты купания в морской воде. В дополнении необходимо отметить, что по результатам углубленного анализа изолированные в ходе данной вспышки штаммы парагемолитического вибриона отнесены к ОЗ:К6 серогруппе [4].

Таким образом, проведенный ретроспективный эпидемиологический анализ показал, что заболеваемость галофилезом на территории Приморского края носит спорадический и вспышечный характер с подъемом в летне-осенний период, доминирующим пищевым путем передачи инфекции и вовлечением в эпидемический процесс преимущественно лиц возрастной категории 20-30 лет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алленов, А.В. Микробиологическая и эколого-эпидемиологическая характеристика вибринозов в Приморском крае: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Владивосток, 2000. – 27 с.
2. МУК 4.2.1793-03 Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания. М.: – Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2003. – 39 с.
3. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2015 г.: Государственный доклад – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2016. – 200 с.
4. Рыковская, О.А. *Vibrio parahaemolyticus* серогруппы ОЗ:К6 – возбудитель вспышек пищевой токсикоинфекции в Приморском крае

Российской Федерации / О.А. Рыковская, А.Б. Мазрухо, Л.М. Смоликова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2013. – №4. – С. 57–61.

5. Тарасенко, Т.Т. Заболеваемость прочими кишечными инфекциями в Приморском крае / Т.Т. Тарасенко, Е.В. Косенок, В.А. Кривоногова, Ф.Н. Шевердина // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2016. – №3 (66) – С. 127–134.

6. Boyd, E.F. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* / E.F. Boyd, A.L. Cohen, L.M. Naughton et al. // BMC Microbiol. – 2008. – Vol. 8, №110 – P. 1 – 14.

7. Mercogliano, F. *Vibrio* spp. infections of clinical significance and implication for public health / F. Mercogliano, M. Vitullo, M. Tamburro, M.L. Sammarco et al. // Ann Ig. – 2012. – Vol. 24, №1. – P. 85 –102.

8. Nair, G.B. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants / G.B. Nair, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, B. Dutta et al. // Clin. Microbiol. Rev. – 2007. – Vol.20, №1. – P. 39 – 48.

УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ МИКРООРГАНИЗМОВ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ

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

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

Все большее внимание в мире обращается на факторы, которые потенциально способствуют распространению устойчивости к антибиотикам вне клинической сферы. Экологические места обитания, особенно водоемы, являются идеальной средой для передачи маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам (АБП) среди микроорганизмов. Взаимодействие устойчивых к АБП бактерий с автохтонной микрофлорой способствует селекции антибиотикорезистентных штаммов и преобладанию устойчивых бактерий, приводящему к глобальному нарушению экосистемы [1, 2].

Санитарно-гигиенический мониторинг, проводимый в разных регионах, показывает широкое распространение в водоемах различных микроорганизмов – это аэромонады, вибрионы, псевдомонады, многие виды энтеробактерий и др. [3, 4, 5]. Отмечается тенденция к повышению

уровня заболеваний, этиологическими агентами которых являются ассоциации грамотрицательных микроорганизмов - аэромонад, псевдомонад, энтеробактерий и др. [6]. Растет число случаев заражения *V. cholerae* не O1 / O139, они обнаруживаются во всем мире во всех типах вод: пресной, соленой, сточных водах. Водные условия помогают обеспечить идеальные условия для приобретения и распространения устойчивости к антибиотикам [7, 8].

Внимание, уделяемое исследованию видового разнообразия и антибиотикорезистентности микроорганизмов в окружающей среде, обусловлено необходимостью прогнозировать риск появления и распространения новых мультirezистентных штаммов. С эпидемиологической точки зрения наиболее опасна передача детерминант устойчивости от одного вида микроорганизмов к другому [9].

В связи с этим актуальным является сбор, накопление и анализ информации о состоянии антибиотикорезистентности микрофлоры в окружающей среде в данном конкретном регионе.

Цель исследования - изучение видового разнообразия и чувствительности/устойчивости к АБП микроорганизмов, выделенных из поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону.

Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь 2016 г. в водоемах города Ростова-на-Дону.

Идентификацию микроорганизмов начинали с изучения морфологии выросших колоний на агаре Хоттингера, Мартена и селективных средах: Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агаре.

Определение родовой и видовой принадлежности микроорганизмов осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов. Лабораторную диагностику вибриофлоры проводили в соответствии с МУК 4.2. 2870-11.

Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений на агаре Mueller-Hinton. Интерпретацию результатов чувствительности / устойчивости сем. Enterobacteriaceae и неферментирующих микроорганизмов (НФМ) проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04, сем. Vibrionaceae - МУК 4.2.2495-09, сем. Aeromonadaceae - по рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (CLSI) [10]. Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel».

Всего за период наблюдения выделено 710 штаммов микроорганизмов, идентифицировано 70 различных видов. Все изоляты принадлежали к семействам: Moraxellaceae, Pseudomonaceae, Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Brucellaceae, Enterobacteriaceae, Aeromonadaceae, Vibrionaceae, Campylobacteraceae, Rhodobacteraceae, Enterococcaceae, Streptococcaceae, Shewanellaceae.

За исследуемый период нами выделен 221 штамм

неферментирующих микроорганизмов, состоящий из представителей семейств Moraxellaceae, Pseudomonaceae, Alcaligenaceae, Comamonadaceae, Brucellaceae, 145 представителей семейства Enterobacteriaceae и 122 Aeromonadaceae. В ходе мониторинга поверхностных водоемов выделено 197 культур *V. cholerae* не O1 / O139.

Все микроорганизмы, выделенные в процессе мониторинга из водоемов, были проанализированы на чувствительность/устойчивость к противомикробным препаратам.

НФМ в настоящем исследовании составляют одну из доминирующих групп микроорганизмов. Чувствительными ко всем АБП в этой группе были 37,5 % штаммов, монорезистентными - 43,4 %, полирезистентными (три и более маркера устойчивости) - 6,3 % (табл. 1).

Таблица 1. Чувствительность доминирующих групп микроорганизмов к АБП

	НФМ	Энтеробактерии	Аэромонады	Вибрионы
Чувствительные	37,5 %	0	0,8 %	0
Монорезистентные	43,4 %	9,6 %	9 %	29,9 %
Резистентные к 2 АБП	12,6 %	10,3 %	18 %	46,1 %
Резистентные к 3 и более АБП	6,3 %	80 %	72 %	23,9 %

Среди монорезистентных НФМ - 79,1 % резистентны к ко-тримоксазолу и 11,4 % к левомецетину. При оценке устойчивости к двум препаратам, прежде всего, следует отметить высокую частоту устойчивости (67,8 % случаев) к ко-тримоксазолу и доксициклину. Штаммы с фенотипом резистентности к трем и более АБП в большинстве своем показали резистентность к доксициклину, левомецетину и ко-тримоксазолу.

Среди представителей сем. *Enterobacteriaceae* чувствительных ко всем АБП микроорганизмов не обнаружено (табл. 1). Монорезистентных штаммов зафиксировано 9,6 %, среди которых больше всего резистентных к ко-тримоксазолу – 43 %. Из 10 штаммов, резистентных к 2 АБП, 9 были резистентны к ко-тримоксазолу и ампициллину. Все фенотипы штаммов, резистентных к 3 АБП, отличались разнообразием.

Полирезистентные энтеробактерии имели маркеры устойчивости преимущественно к 4 (30 %) и 5 (28,4 %) АБП. Из 35 полирезистентных штаммов, устойчивых к 4 препаратам, 48,6 % принадлежали к группе с фенотипом резистентности: ампициллин, налидиксовая кислота, фурагин, ко-тримоксазол. Резистентность к 5 АБП имели 33 штамма, из них 51,5 % имели фенотип резистентности: ампициллин - налидиксовая кислота – левомецетин – фурагин - ко-тримоксазол. Обнаруженный нами штамм *Escherichia coli*, помимо этих пяти АБП, проявлял резистентность еще и к гентамицину и цефтриаксону.

Изучение антимикробной чувствительности семейства

Aeromonadaceae показало, что чувствительным ко всем АБП был один штамм *Aeromonas media*, монорезистентных – 9 %, к двум АБП 18 %, значительное количество штаммов - 72 % обладали множественной антибиотикорезистентностью (табл.1). Среди штаммов, резистентных к двум АБП, 77 % показали устойчивость одновременно к ампициллину и ко-тримоксазолу.

Чувствительных ко всем АБП штаммов семейства *Vibrionaceae* в нашем исследовании не выявлено, доля монорезистентных изолятов составила 29,9 %, большинство штаммов этого семейства были устойчивы к двум АБП (46,1 %), а именно, профиль резистентности фурагин - ко-тримоксазол был зафиксирован у 32,4 % штаммов, а к ампициллину и фурагину были устойчивы 25 % изолятов. Множественная резистентность зафиксирована у 23,9 % штаммов *V. cholerae* не O1 – не O139 (табл.1). Сорок четыре штамма (22,3 %) имели фенотип ампициллин - фурагин - ко-тримоксазол.

Анализ спектра антибиотикорезистентности изученных штаммов выявил, что наиболее распространенными маркерами являются устойчивость к ампициллину, налидиксовой кислоте, фурагину, ко-тримоксазолу. Такой профиль имели 37,5 % штаммов, входящие в группу энтеробактерий и аэромонад. У 38 из них также наблюдалась резистентность к левомецетину. В целом к ко-тримоксазолу были устойчивы 62,9 % изученных нами микроорганизмов, входящих в разные группы.

Оценка результатов изучения антибиотикорезистентности водных штаммов показала, что в 2016 г. чувствительных ко всем АБП энтеробактерий и вибрионов обнаружено не было. Только один представитель аэромонад - *Aeromonas media* - был чувствителен ко всем антибиотикам. Монорезистентные фенотипы в этих группах выявлялись в 9-29,9 % случаев. Встречаемость чувствительных и монорезистентных штаммов среди НФМ оказалась значительно выше и составила 37,5 % и 43,4 % соответственно.

Среди энтеробактерий, аэромонад и вибрионов часто встречались изоляты, несущие маркеры устойчивости к ампициллину, налидиксовой кислоте, фурагину, ко-тримоксазолу.

Штаммы энтеробактерий, аэромонад и вибрионов, имеющие множественную антибиотикорезистентность (к 3 и более АБП), выделялись в 80; 72 и 23,9 процентов случаев соответственно. Следует отметить, что среди НФМ доля полирезистентных вариантов оказалась значительно ниже, по сравнению с другими анализируемыми группами, и составила 18,9 %.

Таким образом, проведенное исследование микробных сообществ водоемов города Ростова-на-Дону позволило обнаружить в тестируемых объектах доминирующие группы микроорганизмов, дать оценку их

антибиотикорезистентности с целью определения степени потенциальной опасности для здоровья человека.

Все это подчеркивает необходимость продолжения рутинного мониторинга для предоставления базовых данных, которые позволят в дальнейшем ретроспективно анализировать состояние чувствительности/резистентности микроорганизмов нашего региона и оценивать вероятность появления и распространения новых мультирезистентных штаммов в окружающей среде.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Aminov, R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes / R.I. Aminov, R.I. Mackie // *FEMS Microbiology Letters*. – 2007. – Vol. 271. – P. 147 - 161.
2. Baquero, F. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments / F. Baquero, J.L. Martinez, R. Canton // *Biotechnol.* 2008. Vol. 19. – P. 260 - 265.
3. Обухова, О.В. Санитарно-микробиологическая оценка гидроэкосистемы дельты Волги при антропогенном загрязнении / О.В. Обухова // *Гигиена и санитария*. - 2009. - № 1. - С. 23 - 25.
4. Журавлев, П.В. Мониторинг бактериального загрязнения водоемов Ростовской области / П.В. Журавлев // *Гигиена и санитария*. - 2010. - № 5.-С. 33 - 36.
5. Cantas L., Shah S.Q.A., Cavaco L.M., et al. A brief multidisciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota / L. Cantas, S.Q.A. Shah, L.M. Cavaco et al. // *Front Microbiol.* - 2013. - № 4. - P. 96.
6. Юхименко, Л.Н. Этиологическая структура возбудителей бактериальной геморрагической септицемии рыб / Л.Н. Юхименко, Л.И. Бычкова // *Проблемы иммунологии, патологии и охраны здоровья рыб и других гидробионтов: Расширенные матер. Международной науч.-практ. конф.* - М., 2007. - С. 95 - 97.
7. Baker-Austin, C. *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming / C. Baker-Austin, J. A. Trinanes, N. G. H. Taylor, et al. // *Nat. Clim. Chang.* - 2013.- № 3.- P. 73-77.
8. Marti, E. The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance / E. Marti, E. Variatza, J.L. Balcazar // *Trends Microbiol.* - 2014. - № 22. - P. 36-41.
9. Кулмагамбетов, И.Р. Современные подходы к контролю и сдерживанию антибиотикорезистентности в мире / И.Р. Кулмагамбетов // *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. - 2015. - № 9. - С. 54 - 59.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 21st informational supplement.

ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ / УСТОЙЧИВОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ

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

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

Вода рек, протекающих в районе больших населенных пунктов, вбирает в себя массу стоков, содержащих органические вещества, которые способствуют интенсивному размножению микроорганизмов. В водоёмах, загрязненных стоками, увеличивается концентрация условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) семейства *Enterobacteriaceae*, что может значительно повысить риск распространения инфекционных заболеваний, передаваемых водным путем [1].

Актуальным в настоящее время является изучение водных биотопов с целью получение базовой информации о составе и разнообразии патогенных и условно-патогенных энтеробактерий с выявлением доминирующей микрофлоры, ее сезонных колебаний [2, 3]. Появление антибиотикорезистентных штаммов в водоёмах является естественным биологическим ответом на использование антимикробных препаратов не только в медицине, но и в других отраслях. При этом приобретение микроорганизмами множественной устойчивости к антибиотикам рассматривается в качестве показателя негативного влияния деятельности человека на природные экосистемы [4, 5].

Материалы и методы. Мониторинг поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону проводили ежемесячно (с мая по сентябрь) в течение 2014 – 2016 гг. Определение родовой и видовой принадлежности условно-патогенных бактерий осуществляли по результатам совокупности биохимических тестов производства bioMérieux (Франция). Для быстрой выборочной идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Чувствительность к антимикробным препаратам определяли методом серийных разведений в агаре Мюллер-Хинтона (рН 7,3±0,2). Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.1890-04.

Результаты. За время исследования было выделено 468 штаммов

условно-патогенных и патогенных энтеробактерий. Идентифицированы представители 20 родов, 33 видов микроорганизмов. Среди представителей сем. *Enterobacteriaceae* были выделены микроорганизмы, относящиеся к родам: *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Salmonella*, *Pantoea*, *Proteus*, *Raoultella*, *Rahnella*, *Kluuyvera*, *Providencia*, *Serratia*, *Yersinia*, *Leclercia*, *Morganella*, *Ewingella*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Plesiomonas*. Проведенный микробиологический мониторинг поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону показал, что в видовом составе в целом, в течение 3 лет, и по годам доминирующими микроорганизмами были *Escherichia spp.* (37 %), *Enterobacter spp.* (23 %), *Klebsiella spp.* (13,2 %), *Citrobacter spp.* (8 %), хотя в отдельные месяцы мы наблюдали разнообразные сочетания между ними.

Род *Escherichia* был представлен видом *E. coli*, среди рода *Enterobacter* идентифицировано 9 видов микроорганизмов, часто встречаемыми были представители *E. cloacae* и *E. asburiae*. Выделено 3 вида клебсиелл, чаще всего выделялись *K. pneumoniae* и *K. oxytoca*. Наиболее распространенными среди рода *Citrobacter* были 2 вида *C. freundii* и *C. braakii*.

Все выделенные в течение мониторинга энтеробактерии были протестированы на чувствительность / устойчивость к антибактериальным препаратам (АБП).

В 2014 г. чувствительными ко всем АБП были 8,5 % штаммов, в 2015 г. их число составило 5,2 %. В 2016 г. микроорганизмов, чувствительных ко всем тестируемым АБП, в нашем исследовании не обнаружено.

В 2014 и 2015 гг. число монорезистентных изолятов УПМ составило 23,9 % и 14 % соответственно, в 2016 г. их доля снизилось до 9,7 %. За время наблюдения снижается число энтеробактерий, устойчивых к 2 АБП. Так, в 2014 г. их доля составила 26,9 %, в 2015 г. - 20,7 %, в 2016 г. - 10,3 %.

Количество полирезистентных штаммов нарастало: в 2014 г. нами выделено 40,7 % штаммов, в 2015 г. – 60,1 %, в 2016 г. – 80,0 % энтеробактерий.

Проведенные исследования показали, что на протяжении трех лет наибольшей активностью в отношении УПМ обладали цефтриаксон, гентамицин и ципрофлоксацин.

Высокий уровень устойчивости среди УПМ регистрировали к ампициллину. Так, в 2014 и 2015 гг. количество штаммов, устойчивых к этому антибиотику, составило 73 % и 72 % соответственно. В 2016 г. число ампициллинрезистентных штаммов увеличилось до 89 %.

Нечувствительные к ко-тримоксазолу штаммы встречались на протяжении всего времени исследования: в 2014 г. регистрировали 69,2 % таких изолятов, в 2015 г – 67,9 %, в 2016 г. их доля увеличилась до 84,2 %.

Устойчивость к нитрофурантоину варьировала от 33,8 % (2014 г.),

56,5 % (2015 г.), до 75,2 % (2016 г.).

За время наблюдения регистрировали нарастание устойчивости водных изолятов энтеробактерий к налидиксовой кислоте. Так, в 2014 г. число таких штаммов составило 23,0 %, в 2015 г. - 45,6 %, а в 2016 г. - 52,5%.

Устойчивость к доксициклину варьировала от 6,9 % до 17,2 %. Наименьшее число штаммов, устойчивых к левомицетину, регистрировали в 2015 г – 13,5 %, в 2014 г. и 2016 г. количество резистентных штаммов распределилось примерно одинаково и составило 25,4 % и 24,8 % соответственно. Энтеробактерии, устойчивые к гентамицину, выделяли в 2014 г. - 0,2 % штаммов, в 2015 г. - 3,1% и в 2016 г. - 4,8 %.

Заключение. Получены данные о видовом разнообразии условно-патогенных и патогенных энтеробактерий поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону в течение трех лет мониторинга.

За период наблюдения доля чувствительных, резистентных к 1 и 2 АБП штаммов снижается и нарастает число полирезистентных энтеробактерий. Сохраняется высокая активность цефтриаксона, гентамицина и ципрофлоксацина в отношении УПМ.

Проведение дальнейшего динамического наблюдения за циркуляцией УПМ позволит перевести биологический контроль в системе обеспечения биологической безопасности из режима «устранение последствий» в режим «предупреждения», а полученные результаты могут быть использованы при разработке стратегии, позволяющей эффективно планировать применение антибактериальных препаратов в регионе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Арсентьева, Н.Ю. Микробиологическая характеристика экологического состояния реки Миасс и её водохранилищ / Н.Ю. Арсентьева, Д.Ю. Нохрин, Ю.Г. Грибовский // Вестник Челябинского государственного университета. - 2010. - № 8 (189). - Экология. Природопользование. Вып. 4. - С. 52–58.
2. Загайнова, А.В. Разработка подходов к оценке риска возникновения бактериальных кишечных инфекций, распространяемых водным путем / А.В. Загайнова // Автореф. дис. ... канд. биол. наук. М., 2010.
3. Рыбальченко, О.В. Ультраструктура биопленок при внутривидовом и межвидовом взаимодействии условно патогенных бактерий / О.В. Рыбальченко, В.М. Бондаренко, О.Г. Орлова // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). - 2014. № 1.
4. Czekalski, N. Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland / N. Czekalski, T. Berthold, S. Caucci, et al. // Front.

Microbiol. - 2012. - № 3. – Р. 1-17.

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

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ВОДЫ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ НА СОСТАВ МИКРОБИОЦЕНОЗА

Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Архангельская И.В., Ежова М.И.,
Полеева М.В.

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

Несмотря на широкое распространение холерных вибрионов по всему миру, только в некоторых регионах, в основном в тропиках и субтропиках, холера является эндемичным заболеванием, но и на этих территориях случаи заболевания носят сезонный характер, когда высокая численность *Vibrio cholerae* в водоемах совпадает с периодами повышения температуры воды.

Выживание холерных вибрионов в экологических нишах основано на симбиотическом взаимоотношении с различными биологическими объектами, что, возможно, позволяет им сохраняться в межэпидемические периоды. Множество исследований посвящено ассоциативному симбиозу холерных вибрионов с фито- и зоопланктоном [1,2,4,9,10,5,11]. Однако практически нет данных о характере взаимоотношений между *V. cholerae* и микрофлорой поверхностных водоемов, хотя микробное сообщество является первичным звеном любых биоценозов и экосистем. Межмикробные симбиотические ассоциации – одна из загадок природы. Эволюционная древность микроорганизмов объясняет возникшее многообразие их симбиотических связей, как между собой, так и практически со всеми живыми существами [3].

Цель работы: изучение влияния температуры на микробиоценоз водоемов г. Ростова - на - Дону в весенне - осенний период.

Материалы и методы. Исследование микробиоценоза проводили с мая по сентябрь в двух стационарных точках, охватывающих два водоема - реки Дон (стационарная точка № 1, Державинский спуск, место аварийного сброса стоков) и Темерник (стационарная точка № 5, Ботанический сад у моста, неорганизованное рекреационное

водопользование), в которых осуществляется эпидемиологический мониторинг за холерными вибрионами O1 серогруппы. Мониторинг окружающей среды за контаминацией холерными вибрионами проводили в соответствии с нормативными документами [7,8]. Микробиоценоз поверхностных водоемов изучали в соответствии с общепринятыми методиками [6].

Для родовой и видовой идентификации микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper. Масс-спектрометрический анализ проводили с использованием MALDI-TOF масс-спектрометра Microflex («Bruker Daltonics», Германия). Для записи, обработки и анализа масс-спектров использовали программное обеспечение фирмы «Bruker Daltonics» (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11).

Результаты и обсуждения. В результате мониторинговых исследований речной воды поверхностных водоемов г. Ростова - на - Дону в весенне - осенний период (2016 год) установили, что при температуре воды 16-23⁰С в мае - июне в исследованных точках общее микробное число (ОМЧ) составляло от 300 мк/мл в пробе воды реки Дон до 400-1300 мк/мл в реке Темерник. В это время в водоемах доминировал род *Aeromonas* (99%), представленный видами *A. caviae*, *A. hydrophila*, *A. media* и 1 % приходился на *Acinetobacter schindleri*, *Enterobacter asburiae* и *Enterobacter cloacae*. Параллельно методами, регламентированными для проведения лабораторной диагностики холеры (далее среда накопления) [7, 8], только из пробы воды реки Дон выделяли *V. cholerae non O1 / non O139*. Выделенные штаммы не агглютинировались видоспецифическими сыворотками O1, O139 и PO (таб. 1, 2).

Таблица 1. Микробиологические характеристики реки Дон г. Ростова-на-Дону за весенне-осенний период 2016 года

Стационарная точка №1 (аварийный сброс стоков)	Дата забора (месяц)	Температура воды (С ⁰)	РН воды	Общее микробное число (мк/мл)	Наименование выделенных микроорганизмов из нативного материала	Средние данные содержания микроорганизмов в %
Правый Берег, Державинский спуск	Май-Июнь	16-24	6,8	300	<i>Aeromonas (caviae, hydrophila, media)</i>	99
	Июль	24- 25	7,0	5500	<i>Aeromonas caviae</i>	25
					<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	8.3
					<i>Aeromonas caviae</i>	6,34
					<i>Acinetobacter lwoffii</i>	20,63
	Август	25-26	7.2	3800	<i>Acinetobacter (lwoffii, junii)</i>	40
					<i>Aeromonas (veronii, caviae)</i>	20
					<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	30
	Сентябрь	23	7,2	1560	<i>Aeromonas (caviae)</i>	45

					<i>baumannii, towneri, lwoffii</i>)	
					<i>Acinetobacter (lwoffii, junii)</i>	45
					<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	9.1
		21-19	6,8-7,0	1400	<i>Aeromonas (veronii, hydrophila)</i>	75
		19-16	6,8-7,0	1300	<i>Aeromonas veronii</i>	67

Таблица 2. Микробиологические характеристики реки Темерник г. Ростова-на-Дону за весенне-осенний период 2016 года

Стационарная точка № 5 (сброс сточных вод)	Дата забора (месяц)	Температура воды (С ⁰)	РН воды	Общее микробное число (мк/мл)	Наименование выделенных микроорганизмов из нативного материала	Средние данные содержания микроорганизмов в %				
Ботанический сад у моста	Май Июнь	16	6,8-7,0	400	<i>Aeromonas (caviae, hydrophila, media)</i>	99				
		28	6,8-7,0	1300	<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i> <i>Aeromonas veronii</i>	5,8 41,2				
	Июль	24	7,0-7,2	400	<i>Aeromonas caviae</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i>	40 40				
		27	7,0-7,2	1800	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	64				
					<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i> <i>Aeromonas (media, ichthiosmia)</i>	14 22				
		28	7,0-7,2	2900	<i>Aeromonas salmonicida</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i>	3,6 85,7 3,6				
	Август	25	7,0-7,2	2450	<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i> <i>Acinetobacter (lwoffii, junii)</i> <i>Aeromonas (veronii, jandaei, hydrophila, caviae)</i>	10.5 60 15				
					Сентябрь	23	7,5	2900	<i>Vibrio cholerae non O1/non O139</i> <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Aeromonas hydrophila</i>	16 31.5 5.3
									21	7,5
	18	7,2	1450	<i>Aeromonas hydrophila</i>	58.3					
	16	7,0	1080	<i>Aeromonas (caviae, hydrophila)</i>	60					

При повышении температуры воды до 24 – 28 °С в исследованных точках изменился состав бактериального сообщества. В реке Дон

концентрация представителей рода *Aeromonas* снизилась до 20 % и ниже (таб. 1), в реке Темерник до 15 % и ниже (таб. 2). В это время в обеих исследованных точках доминировал род *Acinetobacter*, представленный видами *A. schindleri*, *A. johnsonii* и *A. lwoffii*, которые составляли от 20 до 85 %. Одновременно со сменой доминирующих видов вырос процент выделения *V. cholerae non O1 / non O139* от 10 % (река Темерник) (таб. 2) до 30 % (река Дон) (таб. 1). Остальной бактериопланктон состоял из *E. coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter asburiae*, *Exiguobacterium aurantiacum* в реке Дон и *Exiguobacterium aurantiacum*, *Bacillus pumilus*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterobacter cloacae* в реке Темерник. Процент выделения этих микроорганизмов колебался от 6 до 20 % от общего числа бактерий.

В сентябре месяце при понижении температуры воды до 19⁰С в реках Дон и Темерник микробный пейзаж существенно изменился. В пробах воды доминировал род *Aeromonas*. Концентрация представителей рода составила от 58,3 до 75 %. Холерные вибрионы *non O1 / non O139* выделяли только на среде накопления. В это же время в реке Дон в равных количествах (16 %) выделяли виды *Enterobacter cloacae* и *Raoultella ornithinolytica*, в реке Темерник – по 20 % *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae*. При дальнейшем понижении температуры воды до 16⁰С и ниже в исследуемых стационарных точках по-прежнему доминировали представители рода *Aeromonas*; *Vibrio cholerae non O1 / non O139* перестали высеваться, как при посеве нативного материала, так и на средах накопления (таб. 1, 2).

Таким образом, по результатам исследования микробного пейзажа поверхностных водоемов г. Ростова - на - Дону установлено, что повышение температуры воды приводит к количественным и качественным изменениям в микробиоценозе, который быстрее других организмов реагирует и приспосабливается к изменениям окружающей среды. Смена доминирующих видов в популяции микробного сообщества под воздействием температуры может также вызывать изменения экологии холерных вибрионов, аутохтонных обитателей поверхностных водоемов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авцин, А.П. Дафнии как биологические антагонисты НАГ вибрионов / А.П. Авцин, В.А. Шахламов, Р.С. Трагер, Т.И. Петрова // Бюл. эксперим. биологии и медицины. - 1982. - № 1. - С. 48-50.
2. Андрусенко, И.Т. Гидробионтный фактор в эпидемиологии холеры / И.Т. Андрусенко, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, М.В. Акулова, Э.А. Москвитина // ЗНИСО. – 2009, № 3. - С. 11-19.
3. Бухарин, О.В. Персистенция бактериальных патогенов как физиологический феномен / О.В. Бухарин // Вестн. Моск. ун-та. Сер. 16. Биология. -2008. - № 1. - С. 6-13
4. Жукова, Е.А. Экологические особенности взаимоотношений

холерных вибрионов с другими представителями водной биоты / Е.А. Жукова // Автореф. дис. ... канд. мед. наук. - Волгоград, 2000. - 14 с.

5. Кривошей, М.И. Водоросли и болезни человека / М.И. Кривошей - С.Пб., 1999. - 116 с.

6. Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов. МУК 4.2.1884-04.

7. МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»

8. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. МУК 4.2.2870-11. 4.2 (утв. Главным государственным санитарным врачом РФ 25.05.2011).

9. Bhowmick, R. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae* / R. Bhowmick, A. Ghosal, N.S. Chatterjee // J. Appl. Microbiol. – 2007. - Vol. 103, № 2. - P. 97-108.

10. Dalisay, D.S. A mannose sensitive haemagglutinin (MSHA) like pilus promotes attachment of *Pseudoalteromonas tunicata* cells to the surface of the green alga *Ulva abstralis* / D.S. Dalisay, J.S. Webb, A. Scheffel et al. // Microbiology. - 2006. - Vol. 152, Pt. 10. - P. 2875-2883.

11. Prusso, C. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin / C. Prusso, L. Vezulli, R.R. Colwell // Environ. Microbiol. - 2008. - Vol. 10, № 6. - P. 1400-1410.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ
ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО СРЕДСТВА «БИОПАГ – Д»
В ОТНОШЕНИИ МИКРООРГАНИЗМОВ,
РЕГЛАМЕНТИРОВАННЫХ ДЛЯ ОЦЕНКИ КАЧЕСТВА
СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД**

Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Рыжова А.А., Сергиенко О.В.,
Судьина Л.В., Лях О.В., Баташев В.В.

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

Объектом исследования явилось дезинфекционное средство (ДС) «Биопаг–Д», разработанное в РОО – «Институт эколого-технологических проблем» (Москва).

В опытах использовали токсигенные штаммы *V. cholerae* № 19613, *V. cholerae* O1 № 569, *V. cholerae* O139 № 16064, *V. cholerae* El Tor № 19191, а также *E. coli* № 1015, *S. aureus* № 12617, полученные из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Микроорганизмы этих родов и видов выбраны нами в качестве санитарно – показательных в соответствии со Стандартом качества D-2 Конвенции (*V. cholerae*, *E. coli*) [1] и Руководства Р 4.2.2643-10 (*E. coli*, *S. aureus*) [2].

Для экспериментальной оценки антибактериальных свойств «Биопаг – Д» использовали два метода: суспензионный и суспензионный с нейтрализатором лаурилсаркозилем натрия (ЛСН) для исключения пролонгации бактериостатического действия «Биопага –Д» на бактерии при посеве на питательные среды [2].

К раствору «Биопаг-Д» (в концентрациях 0,0001 % - 0,001 % - 0,01 % - 0,1 %) добавляли бактериальные суспензии изучаемых культур: 0,5 мл взвеси (10^9 м.кл./мл по оптическому стандарту мутности) добавляли к 4,5 мл раствора «Биопаг-Д» и инкубировали 5 мин, 15 мин, 30 мин. Затем разбавляли суспензии в 100 раз (0,1 мл вносили в 9,9 мл физиологического раствора для *V. cholerae* или в 9,9 мл водопроводной воды для *E. coli* и *S. aureus*) и производили высев по 0,1 мл на чашки Петри с соответствующими плотными питательными средами (штаммы *V. cholerae* – на агар Мартена; штаммы *E. coli* и *S. aureus* – на МПА). Через 24-48 часов инкубации при 37 °С подсчитывали число выросших колоний и определяли концентрацию жизнеспособных клеток (КОЕ/см³).

Для определения эффективности действия «Биопага – Д» в эксперименте в отношении используемых в работе культур применяли также суспензионный метод с нейтрализацией дезинфектанта. В качестве нейтрализатора использовали ЛСН в концентрациях 0,1-1,0 %, рекомендованных Руководством Р 4.2.2643-10 для гуанидинов.

В предварительных экспериментах была определена чувствительность изучаемых штаммов к действию различных концентраций ЛСН. Для этого по 0,5 мл бактериальных суспензий (10^9 м.кл./мл) штаммов *V. cholerae*, *E. coli*, *S. aureus* добавляли к 4,5 мл нейтрализатора (в концентрации 0,1-1%). Через 5 мин по 0,5 мл суспензий вносили в 4,5 мл питьевой воды (для *V. cholerae* - физиологического раствора) для разбавления нейтрализатора и по 0,1 мл из соответствующих разведений засеивали на плотные питательные среды с последующим подсчетом КОЕ.

Для контроля нейтрализации «Биопаг-Д» с помощью ЛСН составляли различные композиции дезинфектанта (0,001%- 0,01%- 0,1%) и нейтрализатора (0,1-0,25-0,5-1%), в которые вносили культуру *E. coli* (0,5 мл в концентрации 10^9 м.кл./мл) в 4,5 мл композиционного раствора. После 5-минутной экспозиции производили высев из разных разведений на

плотные питательные среды для подсчета КОЕ.

Для оценки бактерицидной активности ДС бактериальную взвесь (10^9 м.кл/мл) в количестве 0,5 мл вносили в 4,5 мл раствора «Биопага – Д» фиксированной концентрации. После экспозиции (5, 15, 30 мин) 0,5 мл из опытных образцов переносили в 4,5 мл раствора нейтрализатора в концентрациях, обеспечивающих полную нейтрализацию ДС. Через 5 мин пробы разбавляли в 10 раз в питьевой воде, пробы содержащие *V. cholerae* – в физиологическом растворе, и производили высев по 0,1 мл из соответствующих разведений на чашки с питательными средами для подсчета КОЕ. В качестве контроля использовали пробы без контакта бактерий с дезсредством (посев в раствор нейтрализатора).

Критерием активности ДС являлась 100 % гибель изучаемых микроорганизмов – *S. aureus*, *E. coli* и *V. cholerae* (отсутствие роста в опытных пробах) при экспозиции не более 30 мин.

Антимикробный препарат «Биопаг – Д» разрешен Минздравом РФ для очистки и обеззараживания питьевой воды, воды плавательных бассейнов, оборотных систем технического и питьевого водоснабжения, а также для обеззараживания и очистки сточных вод. Препарат апробирован на: МГУП «Мосводоканал», ГУП «Водоканал Санкт-Петербурга», МУП «Орехово-Зуевский городской водоканал».

В соответствии с Руководством Р 4.2.2643-10 исследования дезинфектантов в отношении тест-микроорганизмов (*E. coli*, *S. aureus*) рекомендуется проводить с использованием стерильной /нестерильной питьевой воды. Однако результаты проведенных нами предварительных экспериментов показали, что данный методический подход является мало пригодным для исследования холерного вибриона как индикаторного штамма согласно стандарту качества Конвенции [1].

При исследовании действия различных концентраций «Биопага – Д» на культуры штаммов с помощью суспензионного метода установлено, что дезинфектант обладает выраженным антибактериальным действием при концентрациях 0,001 – 0,1 % и времени экспозиции 5, 15, 30 минут. Проведенное исследование показало, что «Биопаг – Д» в интервале концентраций 0,001 – 0,1% приводит к быстрой гибели всех взятых в исследование микроорганизмов в регламентированное время (не более 30 мин) [2].

Следующий этап работы включал подтверждение полученных результатов с помощью более информативного метода - суспензионного метода с нейтрализацией дезинфектанта. При этом методе исключается возможность пролонгированного воздействия ДС на бактерии при их высеве на плотные питательные среды.

В предварительных экспериментах была изучена чувствительность штаммов к различным концентрациям нейтрализатора. Как оказалось, ЛСН не оказывает существенного влияния на жизнеспособность культур

при их инкубации в течение 5 мин. Тем не менее, отмечено, что по показателям КОЕ наибольшей чувствительностью к действию нейтрализатора характеризовался штамм *S. aureus* № 12617.

Была оценена эффективность нейтрализации ЛСН с используемыми штаммами *E. coli* и *S. aureus*. Как установлено, минимальная концентрация ЛСН, обеспечивающая полную нейтрализацию «Биопага – Д», для 0,001 % и 0,01 % – составляет 0,1% ЛСН, для концентрации «Биопага – Д» 0,1% – 0,25 % ЛСН.

Полученные данные подтверждают, что зарегистрированная активность «Биопага - Д обусловлена бактерицидным эффектом дезсредства. Таким образом, препарат «Биопаг - Д» в концентрациях 0,01 - 0,1 % обладает антибактериальным действием в отношении всех исследованных штаммов и может рассматриваться как перспективный препарат для деконтаминации судовых балластных вод.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. – СПб.: ЗАО ЦНИИМФ, 2005. – 120 с.
2. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство Р 4.2.2543-10. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 615 с.

ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЕ И МОНИТОРИНГ СТОЧНЫХ ВОД В ЛАБОРАТОРИЯХ, РАБОТАЮЩИХ С ОПАСНЫМИ ВИБРИОНАМИ

Тюрин Е.А., Храмов М.В.

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболенск, Московская обл.

Сточные воды, удаляемые из лабораторий, где работают с микроорганизмами, могут быть потенциально или напрямую заражены ими и перед сбросом в систему городской канализации должны в обязательном порядке обеззараживаться на специальных системах или установках [1-5]. Особенно это касается лабораторий, где проводят исследования с патогенными вибрионами, для которых основная среда обитания - вода.

В соответствии с классификацией микроорганизмов, патогенных для

человека и животных, принятой в России, возбудитель холеры (*Vibrio cholerae*) относится ко второй группе патогенности (опасности) [1], что соответствует третьему уровню биологической безопасности (УББ/BSL 3) по международной классификации [6].

Имеется риск сброса в канализацию «рабочих» или «музейных» культур микроорганизмов в стоках из учреждений здравоохранения, проводящих исследования с материалом, подозрительным на наличие патогенных вибрионов. Это может послужить причиной заражения населения, проживающего вблизи объекта, а также персонала, обслуживающего коммунальные системы канализации населенного пункта, где находится учреждение. Такие сточные воды необходимо очищать, обеззараживать и контролировать перед сбросом в общую канализационную сеть с контролем процесса [1, 7-9]. Для изолированных лабораторий (УББ/BSL 3) устанавливаются локальные барьерные системы обеззараживания сточных вод, которые проектируют, монтируют, валидируют и эксплуатируют в строгом соответствии с требованиями биологической и экологической безопасности [4, 9]. Соответственно, сточные воды, инфицированные ПБА, перед сбросом в систему городской канализации собирают по лабораторным сетям канализации с обеззараживанием на объектовых очистных сооружениях [1, 9-11].

Анализ материалов, определяющих современный подход к технологиям обеззараживания стоков, потенциально содержащих ПБА, а также методы контроля и оценки эффективности и безопасности существующих способов обеззараживания для обеспечения биологической безопасности окружающей среды является целью данной работы.

Для сбора и последующей обработки сточных вод из «заразных» зон помещений лаборатории система канализации должна быть герметичной, замкнутой, сообщаемой с воздухом через воздушные линии, снабженные фильтрами тонкой очистки и безнапорной. Непосредственное присоединение к самотечной сети оборудования, работающего под давлением или вакуумом - не допускается. На каждый приемник сточных вод, присоединенный к сети канализации, устанавливают гидрозатвор без возможности его опорожнения при появлении давления или разрежения в канализационной сети [4].

Оценка эффективности химических методов обеззараживания (хлорирование, йодирование) жидких отходов свидетельствует о том, что:

- при химической дезинфекции у обслуживающего персонала часто возникают раздражение кожных покровов и аллергические реакции;
- полное уничтожение микроорганизмов не гарантируется из-за неравномерности проникновения дезинфектанта в клеточную стенку и различной чувствительности микроорганизмов к ним;
- при сбросе в канализационную сеть возникает риск загрязнения окружающей среды соединениями, главным образом хлора, так как для

дезинфекции чаще применяют хлорсодержащие препараты;

- имеется необходимость строительства хлораторной станции;
- удельные затраты дезинфицирующих средств, а также затраты на предотвращение экологического ущерба, существенно превышают аналогичные затраты при других способах обеззараживания.

Однако использование химической обработки стоков из лабораторий продолжает оставаться одним из основных способов для центров гигиены и эпидемиологии регионального и территориального уровней, а также для некоторых лечебно-профилактических учреждений и инфекционных больниц.

На наш взгляд, наиболее эффективным методом обеззараживания стоков из лабораторий, работающих с ПБА, является физический (термический), который может быть осуществлен двумя способами: циклическим и непрерывным [6]. При циклическом способе стоки собирают в емкости до определенного заданного объема. Затем стоки нагревают, выдерживают с последующим охлаждением и сбрасывают в канализационную сеть при постепенном включении одной из стадий процесса. При непрерывном способе весь процесс начинается автоматически, то есть заполнение емкостей, перекачка в установку, термическое пропаривание, охлаждение и сброс идут независимо, так как пар в системе циркулирует постоянно.

Установка непрерывной обработки стоков располагается в одном из корпусов ФБУН ГНЦ ПМБ и эксплуатируется более 30 лет. Её технологическая концепция является эффективной и надежной, а реализованные технические решения - актуальными. Весь процесс оценки эффективности обеззараживания стоков делится на две большие стадии. Во-первых, это инженерная физическая оценка, выполняемая службой эксплуатации и ремонта. Во-вторых, это бактериологическая оценка обеззараживания, выполняемая службой биологической безопасности, ответственной за бактериологический мониторинг эффективности работы инженерных систем биологической безопасности, что позволяет оценить их общее состояние и готовность к проведению процесса. Отбор проб для проведения бактериологического анализа выполняют в соответствии со стандартной методикой. Отсутствие «рабочих» культур микроорганизмов в отобранных пробах по результатам бактериологического анализа свидетельствует об эффективности работы системы обеззараживания стоков.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Санитарно-эпидемиологические правила. «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности) М. 2014. СП 1.3.3118-13.
2. Система стандартов безопасности труда. «Опасные и вредные производственные факторы. Классификация». ГОСТ 12.0.003-74.

3. Инструкция по санитарно-противоэпидемическому режиму и охране труда персонала инфекционных больниц (отделений). Приложение № 1 к приказу Минздрава СССР от 08.08.83 № 916.
4. Инструкция. Ведомственные строительные нормы инструкция по строительному проектированию предприятий медицинской и микробиологической промышленности: ВСН 64-064-88.
5. Временные рекомендации по очистке и обеззараживанию сточных вод инфекционных больниц и отделений (утв. Минздравом СССР 09.08.78).
6. Практическое руководство по биологической безопасности в лабораторных условиях, 3-е изд. - ВОЗ. Женева, 2004. - 190 с.
7. Тюрин, Е.А. Обеспечение требований биологической безопасности на биологически опасном объекте / Е.А. Тюрин // «Биозащита и биобезопасность». ВЭЛТ. – 2013, № 2. - С. 34-42.
8. Чекан, Л.В. Эффективная очистка сточных вод - залог эпидемиологического благополучия и экологической чистоты / Л.В. Чекан, О.Б. Шишкина, Е.А. Тюрин // Матер. XII Межгос. науч.-практ. конф. Вклад государств-участников содружеств независимых государств в обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения в современных условиях // Саратов, 2014. - С. 203-205.
9. Строительные нормы и правила. Внутренний водопровод и канализация зданий: СНиП 2.04.01-85. - М., 1997.
10. Найденов, А.Я. Безопасность работ в микробиологических лабораториях. Защитная эффективность инженерных систем безопасности // М.: ДеЛи плюс.2013. - 224 с.
11. Дроздов, С.Г. Основы техники безопасности в микробиологических и вирусологических лабораториях / С.Г. Дроздов, Н.С. Гарин, Л.С. Джиндоян, В.М. Тарасенко М.: Медицина, 1987. – 256 с.

ВНУТРИВИДОВАЯ КОНКУРЕНЦИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬ ТОР БИОВАРОВ В БИОПЛЕНКЕ

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

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

Шесть первых известных пандемий холеры были вызваны вибрионами классического биовара. С 1961 г. началась седьмая пандемия холеры, вызванная новым возбудителем Эль Тор. Причина смены возбудителя заболевания до настоящего времени не установлена.

Недавно с помощью анализа распределения INDEL-маркеров при совместной инкубации показано, что токсигенные вибрионы Эль Тор обладают различной устойчивостью к внутривидовой конкуренции с атоксигенными вибрионами, выделяемыми из объектов внешней среды [1,2]. Однако анализ внутривидовой конкуренции на биопленке между токсигенными вибрионами классического и Эль Тор биоваров не проводился. Возможно, что исследование этого свойства вибрионов может отчасти объяснить известный факт смены возбудителя. Аналогичное предположение о доминировании было недавно высказано на основании изучения взаимодействия в планктонной фазе геновариантов и типичных штаммов биовара Эль Тор [3].

Целью настоящей работы была оценка внутривидовой конкуренции токсигенных вибрионов классического и Эль Тор биоваров на основе INDEL-маркеров.

Первым этапом работы был подбор INDEL-маркера позволяющего дискриминировать токсигенные штаммы двух биоваров. При анализе INDEL-маркеров, входящих в состав зарегистрированной базы данных «Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование» [4], отобран INDEL-маркер sigE, позволяющий однозначно дифференцировать оба вида токсигенных штаммов холерного вибриона с использованием пары праймеров. Классические штаммы формировали продукт амплификации размером 56 п.о., а штаммы Эль Тор из-за вставки участка в 15 нуклеотидов давали ампликон размером 71 п.о. При этом различия в молекулярной массе ампликонов наглядны и легко позволяют надежно детектировать даже минорное количество каждого INDEL-аллеля в

смешанных пробах.

В работе использовали токсигенный штамм *V. cholerae* Эль Тор 19613, выделенный из воды р. Дон, и семь токсигенных штаммов классического биовара (1381, 1761, 796, 776, 251/0, 1763 и 438), выделенных в период 1888-1950 г.г. из коллекции музея живых культур института. Формирование биопленки, выделение ДНК и анализ распределения INDEL-аллелей в ПЦР проводили, как описано ранее [1,2].

Полученный результат изучения взаимодействия свидетельствовал о гетерогенности штаммов классического биовара по способности конкурировать с токсигенным штаммом Эль Тор. Два изученных штамма классического биотипа (1381 и 1763) успешно сосуществовали с токсигенным вибрионом Эль Тор, в отношении пяти остальных (1761, 796, 776, 251/0 и 438) был зарегистрирован выраженный ингибирующий эффект, что проявлялось в исчезновении соответствующего INDEL-аллеля на 5-7 сутки инкубации (Рисунок 1). При этом ингибирующий эффект вибрионов Эль Тор проявлялся как для обеих фаз (планктонной и фазы биопленки).

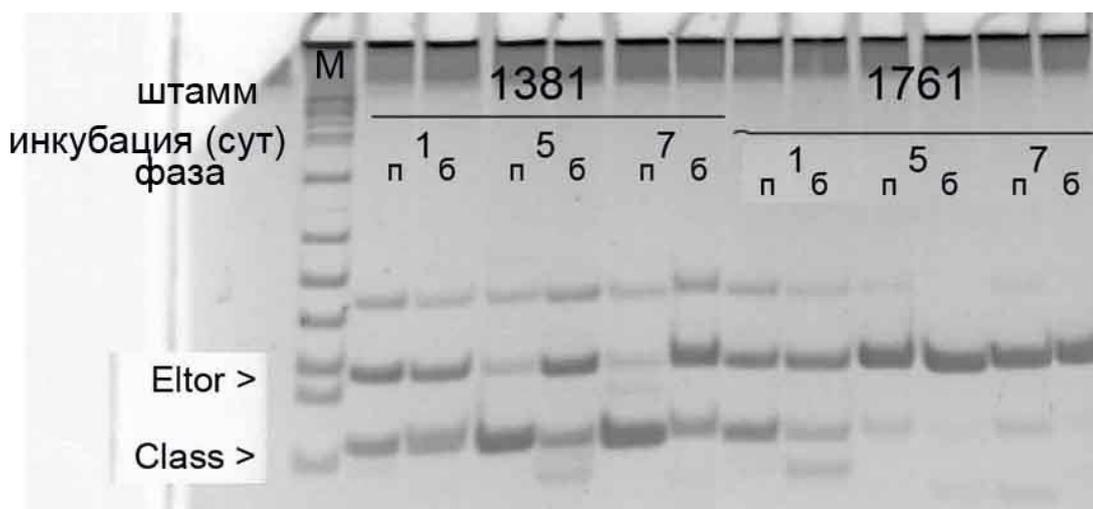


Рисунок 1. Результат электрофореза в 10 % геле полиакриламида продуктов амплификации образцов ДНК со специфическими праймерами к INDEL-маркеру sigE. Положение специфических ампликонов характерных для токсигенных штаммов Эль Тор и классического биовара указано стрелками. Слева на рисунке указаны номера штаммов (1381 и 1761), срок инкубации пробы (сут), исследуемая фаза (п- планктонная, б- биопленка). М- маркеры молекулярного веса.

Полученные результаты свидетельствовали, что популяция штаммов *V. cholerae* классического биовара является гетерогенной по устойчивости к ингибирующему эффекту вибрионов Эль Тор. Поскольку использованный в данном исследовании токсигенный штамм Эль Тор

относится к геновариантам, максимально приспособленным к выживанию в объектах внешней среды [3], природа выявленной «устойчивости» штаммов классического биовара нуждается в серьезном изучении. Дальнейший анализ «устойчивых» штаммов с использованием методов секвенирования и биоинформационного анализа позволит идентифицировать механизм этого явления.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов, С.О. Анализ внутривидовой конкуренции штаммов *Vibrio cholerae* с помощью INDEL-маркеров / С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Л.К. Лысова, С.В. Титова // Здоровье населения и среда обитания. - 2016. - № 4. - С. 35-38.

2. Водопьянов, С.О. Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках статья / С.О. Водопьянов, С.В. Титова, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Л.К. Лысова // Известия ВУЗов. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. - 2016. - № 1. - С.49-53.

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

4. Водопьянов, А.С. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014620308. Гены, позволяющие дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* и проводить внутривидовое типирование // А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников. - 2014.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ SNP-ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* НА ОСНОВЕ АНАЛИЗА ПЕРВИЧНЫХ ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П.
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Широкое внедрение методов полногеномного секвенирования открывает широкие возможности для генотипирования возбудителей опасных инфекционных болезней на основе анализа распределения

единичных нуклеотидных замен (Single nucleotide polymorphism, SNP). Однако, как показывают данные литературы, для анализа разными исследователями используется различный набор SNP-маркеров, что может приводить к расхождению результатов даже при изучении одного и того же набора штаммов. Так, например, ранее изучение данных полногеномного секвенирования позволило выявить, что изоляты *V. cholerae* O1 №№ 19187 и 19188, выделенные в 2010 году в Москве, относятся к штаммам «гаитянской группы» [1]. Однако при анализе с использованием другого набора SNP указанные штаммы попали в группу «непальских штаммов», дистанцированную от штаммов, вызвавших вспышку на острове Гаити [2]. Это подчеркивает актуальность работ по совершенствованию методик анализа данных полногеномного секвенирования и отбору SNP-маркеров, используемых для генотипирования.

В связи с этим цель работы состояла в оценке качества SNP, используемых для анализа, на основе данных об их распределении в первичных ридов.

Материалы и методы. Программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 [3].

Результаты и обсуждение. В работе нами был использован набор SNP-маркеров, выявленный ранее при анализе данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона [1]. Для этого нами было разработано программное обеспечение, позволяющее оценивать встречаемость каждого SNP непосредственно в наборе ридов (таблица). При этом очевидно, что SNP в гене VC0275 представлена именно тиминот (Т), который обнаружен в 79 ридов, в то время как наличие ридов с аденином (1 рид) и цитозином (2 ридов) является ошибкой секвенирования.

Таблица 1. Оценка встречаемости единичных нуклеотидных замен в наборе ридов штаммов *V. cholerae* 81 и *V. cholerae* HC-72 (фрагмент). Указано количество ридов, в которых встречается тот или иной нуклеотид.

N	Ген	Позиция	<i>V. cholerae</i> 81				<i>V. cholerae</i> HC-72			
			A	T	G	C	A	T	G	C
1	VC0275	316	1	79	0	2	0	126	0	0
2	VC0289	564	36	0	0	0	134	1	0	0
3	VC0321	334	0	0	0	207	0	0	0	443
4	VC0345	1047	0	0	1	116	0	0	0	176
5	VC0362	833	148	0	154	1	268	1	241	0
6	VC0362	944	0	133	1	133	0	226	0	206

В противовес этому, для гена VC0362 почти половина ридов у

штамма *V. cholerae* №81 в позиции 833 содержала аденин (148 ридов), а половина (154 рида) – гуанин. Такое распределение не позволяет рассматривать это как ошибку секвенирования, тем более что аналогичное распределение наблюдается у штамма *V. cholerae* НС-72, сиквенс которого проведен другой группой исследователей. Причиной такой «нестабильности» нуклеотидов может являться существование в геноме нескольких копий гена, содержащих замены, однако это требует дальнейшего изучения. Вне зависимости от причины, при сборке контигов выбор «итогового» нуклеотида может быть практически случайным и зависеть от незначительного преобладания ридов с тем или иным нуклеотидом. Ярким примером может служить вышеописанный SNP в гене VC0362: так у штамма *V. cholerae* №81 преобладают риды, содержащие в позиции 833 гуанин, а у *V. cholerae* НС-72 - аденин. В связи с этим нами предлагается исключать из дальнейшего анализа подобные «нестабильные» SNP.

Ранее нами было предложено использовать в качестве «контрольных образцов» при проведении биоинформационного анализа геномы штаммов, генетическая близость которых не вызывает сомнения. При этом критерием корректности проведения анализа является попадание «контрольных геномов» в один кластер [1]. В данной работе в качестве таких контролей нами использован штамм *V. cholerae* O1 №81, сиквенс которого проведен дважды: на платформе MiSeq (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) и платформе IonTorrent (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора). При проведении анализа по всем SNP оба контрольных штамма попадают в один кластер, однако находятся на некотором удалении друг от друга (рисунок 1 – А). Однако при удалении из анализа «нестабильных» нуклеотидов, указанные геномы оказываются идентичными (рисунок 1 – В). Это позволяет сделать вывод о том, что выбор SNP для проведения анализа должен проводиться исключительно на основе первичных данных полногеномного секвенирования (ридов) и, соответственно, проведение анализа исключительно по «стабильным» SNP существенно повышает достоверность получаемых результатов.

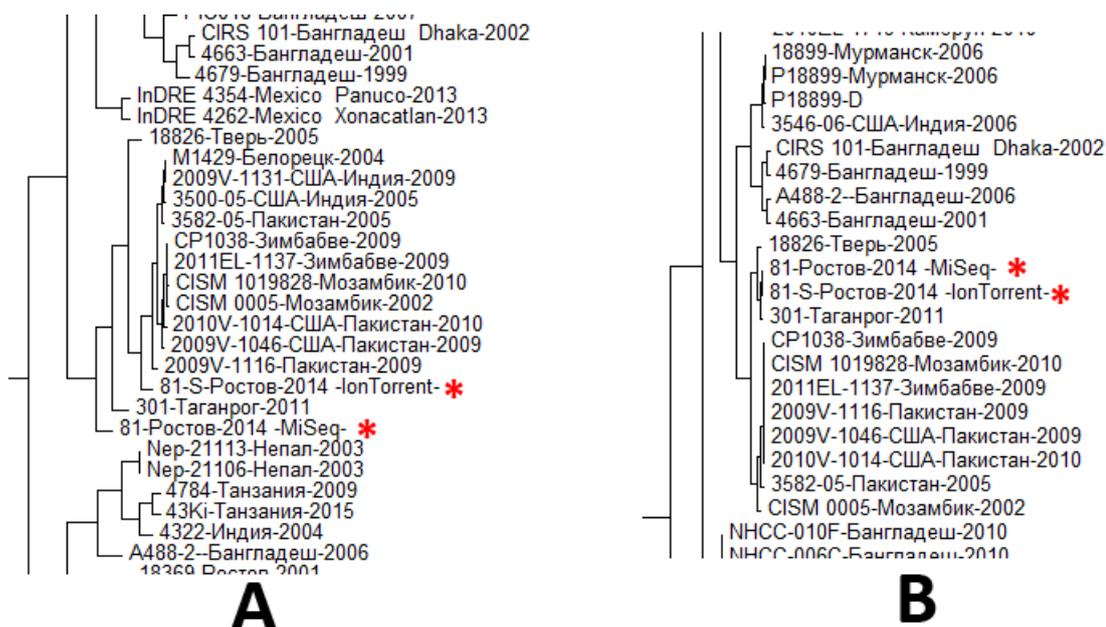


Рисунок 1. Фрагменты дендрограмм, построенных на основе распределения SNP 91 штамма *V. cholerae*: А – по всем SNP, включая «нестабильные»; В – только по стабильным SNP. Контрольные геномы отмечены звездочкой.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов, А.С. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* - разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования / А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников, В.Д. Кругликов, С.В. Титова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2016. - Т. 21., № 3. - С. 146-152.
2. Kuleshov, K.V. Travel-Associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia / K.V. Kuleshov, S.O. Vodop'ianov, V.G. Dedkov, M.L. Markelov, A.A. Deviatkin, V.D. Kruglikov, A.S. Vodop'ianov, R.V. Pisanov, A.B. Mazrukho, S.V. Titova, V.V. Maleev, G.A. Shipulin // Emerg. Infect. Dis. - 2016 Nov;22(11):2006-2008. doi: 10.3201/eid2211.151727.
3. Tamura, K. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods / K. Tamura, D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПОЛНОГЕНОМНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА P-17917

Монахова Е.В., Омельчук Е.П., Ежова М.И., Писанов Р.В.

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

Несмотря на то, что в период седьмой пандемии холерные вибрионы классического биовара были практически вытеснены штаммами биовара Эль Тор, в 1980-90е годы в странах Юго-Восточной Азии отмечалось «возрождение» классических штаммов, а в Бангладеш они на некоторое время даже заняли доминирующую позицию в этиологии холеры [7-9]. В это же время произошли заносы на территорию России трех штаммов, которые по результатам ПЦР- и VNTR-типирования были отнесены к классическому биовару [1]. Все они были выделены из открытых водоемов (Ростов-на-Дону, 1981, 1999; Сочи, 1996), и их появление не сопровождалось эпидемиологическими осложнениями. Тем не менее, мы не можем полностью исключить возможности их сохранения в эндемичных странах и новых заносов в будущем. Известно, например, что в 2012 г. в Иране 1 из 11 клинических «вспышечных» штаммов оказался классическим [4]. Поэтому изучение структуры их геномов не утратило своей актуальности.

Целью настоящего исследования явился анализ структуры ряда генов, связанных с патогенностью и/или персистенцией, в составе генома *V.cholerae* P-17917, выделенного из воды в Ростове-на-Дону в 1999 г.

Отдельные гены и их кластеры идентифицировали on-line с помощью программы BLASTN 2.2.29 в полном геноме, секвенированном нами на платформе MiSeq (Illumina), для анализа генов и их продуктов использовали эту же программу и AlignX (Vector NTI 11). В анализ были также включены геномы референс-штаммов обоих биоваров – O395 (NC_012582, NC_012583) и N16961 (NC_002505, NC_002506).

Интегрированный в геном СТХ (рис.1) был типичным классическим профагом: он содержал аллели генов *rstR* и *ctxB1* классического типа и 8 повторов TTTTGAT в промоторной области гена *ctxA*. Все его гены оказались полностью идентичными таковым штамма O395, но последний содержал не 8, а 7 повторов TTTTGAT. Профаг RS1 в геномах обоих штаммов отсутствовал.

Ген *tcpA* также относился к классическому типу и ничем не отличался от *tcpA* штамма O395, как и входящий в состав острова VPI регуляторный ген *toxT*. Острова пандемичности VSP-1 и VSP-2 в геноме отсутствовали.

Типичной для классических штаммов была и структура RTX-

кластера (рис.2), содержащего протяженную делецию (более 7,8 т.п.н.), что делает невозможным продукцию высокомолекулярного цитотоксина MARTX [6]. Она затрагивает проксимальные участки генов *rtxA*, *rtxB* и расположенные между ними *rtxC* и *chp*.

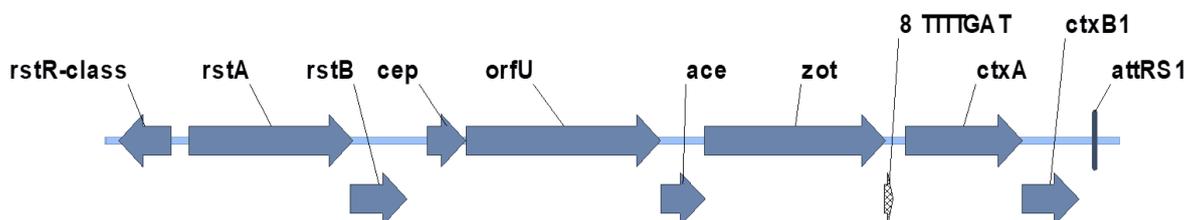


Рисунок 1. Структура профага СТХ штамма P-17917.

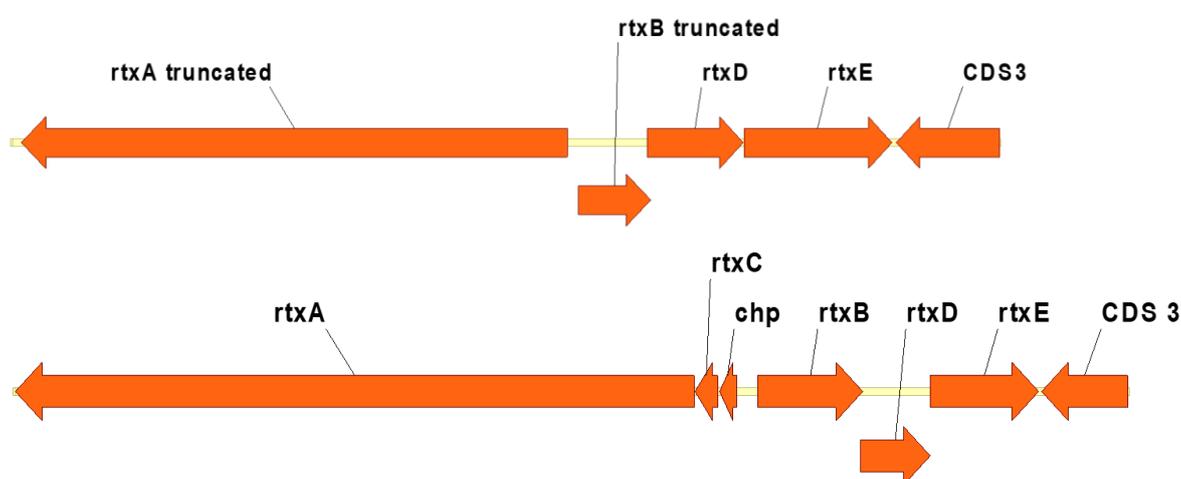


Рисунок 2. Структура RTX-кластера классического штамма P-17917 (вверху) в сравнении с прототипом N16961(AF119150).

Интересно, что усеченные гены *rtxA* и *rtxB* все же образуют ORF. Первая имеет длину 7947 п.н. (у Эль Тор – 13677 п.н.), ее гипотетический 2648 аа-продукт лишен N-концевых повторов, но сохраняет C-концевые, а также активные домены ACD (66-522), RID (655-1202) и CPD(1523-1629), имеющие 100% идентичности с таковыми MARTX вибрионов Эль Тор. Вторая имеет длину 1056 п.н. (у Эль Тор – 2109 п.н.), продукт – 351 аа. Однако их способность к экспрессии сомнительна, т.к. вместе с проксимальными участками этих генов были делетированы и промоторные области. Весь RTX-кластер P-17517 абсолютно (100%) идентичен таковому референс-штамма O395.

100% идентичностью обладали также гены нейраминидазы (*nanH*), сериновой протеазы (VC1649), коллагеназы (VC1650), глобального регулятора ToxR, гемагглютинин/протеазы (*hapA*), цитотонического токсина Cef, маннозочувствительных пилей (*mshA*), белков наружной мембраны OmpW и OmpU, гемолизина HlyA. При этом гены *nanH*, *mshA* и VC1649 были идентичны генам Эль Тор, остальные имели SNP, по-

видимому, характерные для классического биовара, однако только в гене *ompU* все 4 замены были миссенс-мутациями, тогда как в *ompW* – всего 3 из 6, в *hapA* – 5 из 12, в *toxR* – 3 из 14. Ген *cef* содержал единственную миссенс-мутацию, не повлиявшую, однако, на активность продукта [2].

У обоих штаммов классического биовара в видоспецифичном гене коллагеназы VC1650 выявлена делеция C751, которая привела к сдвигу рамки считывания и образованию «преждевременного» стоп-кодона.

Ген *hlyA* содержал характерную для классических штаммов делецию 733-743 п.н., вызвавшую укорочение ORF до 735 п.н.

Входящий в состав *hly*-локуса ген металлопротеазы *prtV* штамма P-17917 отличался от идентичных друг другу генов *prtV* референс-штаммов обоих биоваров наличием SNP C/A 1523, которая привела к образованию «преждевременного» стоп-кодона, и продукт усеченной ORF укоротился до 507 аа, по всей видимости, необратимо утратив функциональность.

В гене *hapR* штамма P-17917 делеция G448 привела к сдвигу рамки и образованию стоп-кодона, ген укоротился до 434 п.н. Аналогичное, но не идентичное укорочение этого гена за счет однонуклеотидных делеций имеет место и у O395 (ΔA200, 207 п.н.), и у N16961(ΔT219, 237 п.н.), тогда как у большинства штаммов Эль Тор он не содержит делеций и имеет длину 612 п.н. Ранее Челдышова Н.Б. с соавт. [4] предполагали, что 2 SNP в *hapR* другого изученного ими классического штамма могли повредить этот регуляторный ген, следствием чего могли стать повышение экспрессии *ctxAB* и блокирование продукции НА/Р. В нашем случае повреждение *hapR* очевидно, что может указывать на высокую вирулентность P-17917, но неспособность к диссеминации, достаточно эффективной для эпидемического распространения. Возможно, этим отчасти объясняется отсутствие случаев холеры во время его обнаружения.

Таким образом, результаты биоинформационного анализа подтвердили принадлежность штамма P-17917 к классическому биовару. По большинству изученных сиквенсов он был близок референс-штамму O395, выделенному от больного в Индии в 1965 г. Ранее Dolores J., Sachell K.J.F. [5] полагали, что способность к продукции холерного токсина классического типа делает излишним синтез биологически активного MARTX. По-видимому, это предположение можно распространить и на некоторые другие факторы (коллагеназу, PrtV, HlyA), гены которых у классических вибрионов повреждены необратимо, а влияние SNP в других генах (*hapA*, *ompU*, *ompW*) на активность их продуктов пока неизвестна.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Монахова, Е.В. О случаях завоза возбудителей классической холеры на территорию России во время седьмой пандемии / Е.В. Монахова, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, Л.М. Смоликова, Н.В. Божко // Перспективы сотрудничества государств-членов

ШОС в противодействии угрозе инф. болезней: Международ. науч.-практ. конф.: Тез. докл. – Новосибирск, 2009. – С. 146-149.

2. Монахова, Е.В. Клонирование гена цитотонического фактора Cef (СНО-cell elongating factor) *Vibrio cholerae* в *Escherichia coli* и его экспрессия под контролем P_{BAD}-промотора / Е.В. Монахова, Ю.М. Ломов, Р.В. Писанов, Л.П. Алексеева, О.В. Маркина, А.В. Миронова, Л.М. Веркина, Н.К. Михась, Л.Е. Асеева, В.С. Каграманов // Биотехнология. – 2005. – № 6. – Р. 12-18.

3. Челдышова, Н.Б. Биоинформационный анализ полногеномной последовательности атипичного штамма *Vibrio cholerae* классического биовара М-29 87-90 / Н.Б. Челдышова, А.А. Крицкий, А.В. Черкасов, Н.И. Смирнова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. совещ. специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпид. надзора за холерой. – Ростов-на-Дону, 2014. – № 27. – С. 87-90.

4. Bakhshi, B. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran / B. Bakhshi, M. Boustanshenas, A. Mahmoudi-aznaveh // Lett. Appl. Microbiol. – 2014. – Vol. 58, No 2. – P. 145-149.

5. Dolores, J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates / J. Dolores, K.J.F. Satchell // mBio. – 2013. – Vol. 4, No 2. – e00624-12.

6. Lin, W. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage / W. Lin, K.J. Fullner, R. Clayton, J.A. Sexton, M.B. Rogers, K.E. Calia, S.B. Calderwood, C. Fraser, J.J. Mekalanos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96. – P. 1071-1076.

7. Nair, G.B. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh / G.B. Nair, S.M. Faruque, N.A. Bhuiyan, M. Kamruzzaman, A.K. Siddique, D.A. Sack // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40, No 9. – P. 3296-3299.

8. Samadi, A.R. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces El Tor in Bangladesh / A.R. Samadi, M.I. Huq, N. Shahid, M.U. Khan, A. Eusof, A.S. Rahman, M. Yunus, A.S. Faruque // Lancet. – 1983. – Vol. 1, No 8328. – P. 805-807.

9. Siddique, A.K. Survival of classic cholera in Bangladesh / A.K. Siddique, A.H. Baqui, A. Eusof, K. Haider, M.A. Hossain, I. Bashir, K. Zaman // Lancet. – 1991. – Vol. 337, No 8750. – P. 1125-1127.

КОНСТРУИРОВАНИЕ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПЛАЗМИДЫ, ЭКСПРЕССИРУЮЩЕЙ ГЕН НЕЙРАМИНИДАЗЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* В *ESCHERICHIA COLI* ПОД КОНТРОЛЕМ T5 ПРОМОТОРА

Монахова Е.В., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Мишанькин Б.Н.,
Демидова Г.В., Шипко Е.С., Галичева А.Л.

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

Нейраминидаза (NanH) является одним из факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов, повышающим чувствительность клеток кишечника к действию холерного токсина [3,6,7], а также участвующим в утилизации ганглиозидов высшего порядка в качестве источника питания [7]. Некоторые авторы не исключают, что продукция NanH может играть определенную роль в развитии легкой формы инфекции или кратковременного носительства [1,5]. Однако ее роль в патогенезе холеры и биологии возбудителя остается не до конца изученной. Это обуславливает актуальность проведения дальнейших исследований свойств данного фактора, что требует наличия его препаратов, наиболее эффективным способом получения которых является использование лабораторных штаммов *E.coli* – эффективных продуцентов рекомбинантных белков. Ранее нами был сконструирован такой штамм *E.coli* HB101pRD39, содержащий в составе рекомбинантной плазмиды фрагмент ДНК *V.cholerae* длиной ~7,3 т.п.н. с геном *nanH*, экспрессирующимся под контролем собственного промотора [2,3]. Однако на сегодняшний день выход искомого продукта представляется недостаточным для выделения его в препаративных количествах. Поэтому целью настоящей работы явилось клонирование гена *nanH* в составе плазмидного вектора pQE30, обеспечивающего экспрессию чужеродных генов под контролем мощного T5-промотора, и создание штамма *E.coli* – продуцента рекомбинантного белка NanH *V.cholerae*.

На основе анализа нуклеотидной последовательности гена VC1784 в составе большой хромосомы *V.cholerae* N16961 нами были сконструированы специфические праймеры для ПЦР-синтеза гена *nanH*, содержащие на 5'-конце сайты рестрикции эндонуклеаз, образующих липкие концы: BamHI для прямого праймера и PstI – для обратного в соответствии с порядком расположения сайтов рестрикции в полилинкере векторной плазмиды pQE30, с целью встраивания амплификата в вектор в ориентации, обеспечивающей направление транскрипции под контролем T5-промотора.

Донором ДНК служил штамм *V.cholerae* P-5879 (Инаба),

нуклеотидная последовательность гена *nanH* которого (KU215667) полностью идентична таковой N16961. Полученный ПЦР-амплификат длиной 2484 п.н. и плазида рQE30 были обработаны указанными эндонуклеазами и лигированы. Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* Jm103. Рекомбинантные клоны отбирали по результатам ПЦР с праймерами для детекции искомого гена. Для проверки способности к синтезу NanH клоны культивировали в бульоне LB, содержащем 50 мг/мл ампициллина, при 37°C с шуттелированием при 120 об/мин в течение 3-4 ч с последующей индукцией ИПТГ в конечной концентрации 1 мМ в течение 1 ч. Затем 20 мкл каждой культуры смешивали на стекле с равным объемом раствора субстрата 4-метилумбеллиферил-N-ацетилнейраминовой кислоты (1 мг/мл) и спустя 20 мин просматривали в УФ свете [4] и наблюдали флюоресценцию проб рекомбинантов, которая отсутствовала у контрольных штаммов (рис.1).

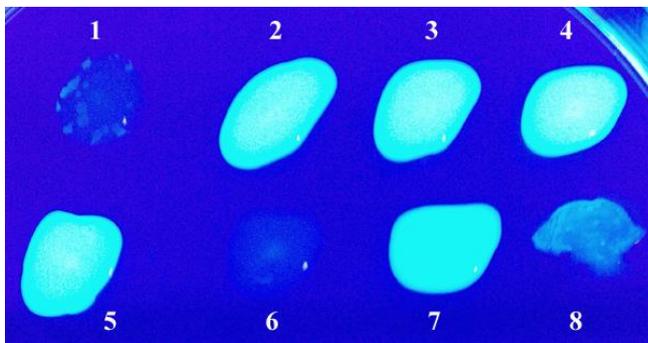


Рисунок 1. Продукция NanH рекомбинантными клонами *E.coli* Jm103pNanH: свечение в УФ свете после инкубации с субстратом.

1 - контрольный штамм *E.coli* Jm103, содержащий векторную плазмиду рQE30 без вставки, 6 - *nanH*-негативный клон, 2-5, 7 - *nanH*-позитивные клоны, 8 - культура *V.cholerae* P-5879.

Выделенная из штамма *E.coli* Jm103 рекомбинантная плазида размером в 5905 п.н. была обозначена как рNanH (рис.2) и дополнительно трансформирована в штамм *E.coli* M15[pREP4].

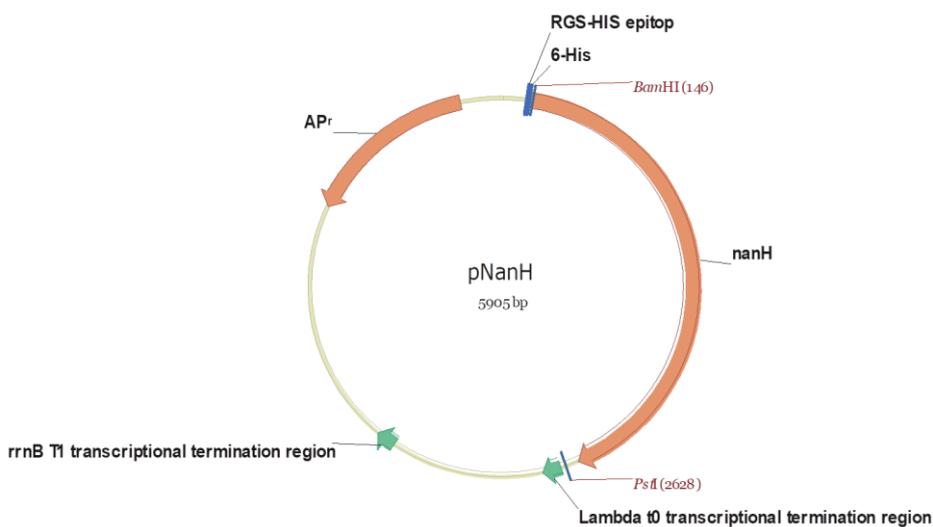
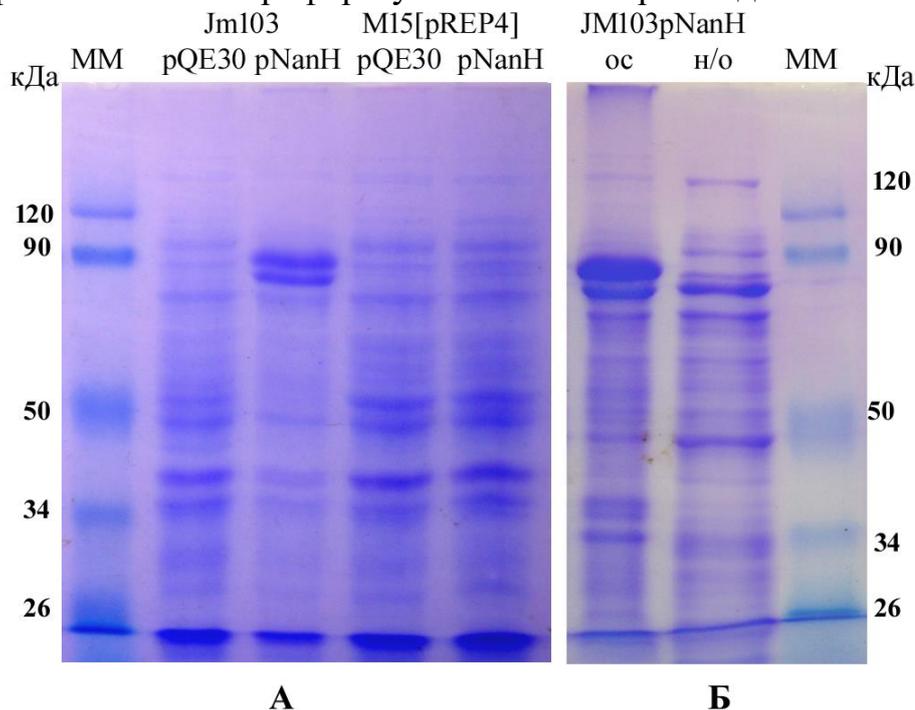


Рисунок 2. Рекомбинантная плазида рNanH.

Для оценки уровней экспрессии гена в этих штаммах их выращивали

с индукцией ИПТГ как описано выше, затем клетки осаждали центрифугированием, растворяли осадок в лизис-буфере при 100°C и подвергали SDS-электрофорезу в 10% полиакриамидном геле.



А – лизаты целых клеток, Б – нерастворимая (ос) и растворимая (н/о) фракции ультразвуковых дезинтеграторов Jm103pNanH. Присутствие зрелой формы белка в нерастворимой фракции, вероятно, объясняется попаданием ее туда из периплазмы клеток, оставшихся неразрушенными при озвучивании.

Рисунок 3. Продукция NanH рекомбинантными штаммами *E.coli*, выращенными с индукцией ИПТГ (SDS-электрофорез в 10% ПААГ).

Как видно из рисунка 3А, только в лизате клеток *E.coli* Jm103pNanH, наблюдалось значительное увеличение количества белков с ММ ~83 и 89.5 кДа (что соответствовало ММ двух форм NanH), в отличие от лизатов M15pNanH и обоих контрольных штаммов, содержащих векторную плазмиду без вставки. По данным программы Quantity One, их общий удельный вес составлял приблизительно 9-10% суммарных клеточных белков. Поэтому именно Jm103pNanH был выбран в качестве продуцента. Для определения локализации рекомбинантного белка клетки этого штамма разрушали ультразвуком на дезинтеграторе QSonica Q700 в течение 10 мин (40 импульсов по 5 сек, 357 Дж с перерывами в 10 сек; амплитуда 50) и подвергали электрофорезу растворимую (н/о) и нерастворимую (ос) фракции клеток, разделенных центрифугированием. Оказалось, что продукт действительно накапливается в двух формах (рис. 3Б). Первая представляет собой непротессированный белок с гексагистиридиновым блоком (6His-tag) на N-конце, имеющий ММ ~89,5 кДа, и остается в нерастворимой фракции клеток в виде телец включения. Его удельный вес составляет 5,6-6,6% суммарных клеточных белков.

Вторая обнаруживается в основном в растворимой фракции (супернатанте ультразвукового дезинтеграта), т.е., по-видимому, в периплазматическом пространстве клеток. Ее ММ ~83 кДа соответствует зрелой форме NanH, образующейся вследствие удаления сигнальной последовательности вместе с 6His-tag, общей длиной 58 аа. Удельный вес зрелой формы составил 3,4-3,8% суммарных белков. Это согласуется с данными Vimr E.R. *et al.* [8], которые показали, что в рекомбинантном штамме *E.coli* HB101 транспорт продукта клонированного гена *nanH* в периплазму сопровождается отщеплением сигнального пептида.

Таким образом, нами сконструирован штамм *E.coli* Jm103pNanH – суперпродуцент нейраминидазы *V.cholerae* Эль Тор, который может быть использован для выделения целевого продукта в препаративных количествах. В зависимости от задач дальнейших исследований, можно получать исходный продукт (6His-NanH) из телец включения с помощью специфического сорбента типа Ni-NTA (никель-нитрилацетилированной) сефарозы либо зрелый белок NanH из осветленных ультразвуковых дезинтеграторов клеток с использованием других методов очистки.

Преимуществами полученного продуцента по сравнению с холерными вибрионами является высокий выход искомого белка, 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 *E.coli* [2,7,8] – непродолжительный период наращивания биомассы (4-6 часов, включая индукцию), что обеспечит возможность ускоренного получения препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронова, Л.В. Некоторые «дополнительные» гены вирулентности штаммов холерного вибриона различного происхождения / Л.В. Миронова, С.В. Балахонов, Е.П. Голубинский, А.С. Марамович, Л.Я. Урбанович, В.С. Ганин, Е.С. Куликалова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2004. – Вып. 17. – С. 62-65.
2. Мишанькин, Б.Н. Штамм *E.coli* HB101pRD39 – продуцент нейраминидазы холерного вибриона / Б.Н. Мишанькин, Н.Я. Шиманюк, О.Ю. Рябухина, В.П. Власов. А.с. №1210278 от 08.10.1985 г.
3. Мишанькин, Б.Н. Молекулярное клонирование генов нейраминидазы *Vibrio cholerae* El Tor: перспективы использования / Б.Н. Мишанькин, Н.Я. Шиманюк, О.Ю. Рябухина, В.П. Власов, О.Н. Подладчикова, В.Ф. Рачицкая, Л.Г. Воронежская, Л.Г. Иванова, А.Н. Гриценко // Вестник Всес. микробиол. общества (Ростовское отд.). – 1989. – № 1. – С. 149-156.
4. Рябухина, О.Ю. Определение нейраминидазы у вибрионов O1

и не O1 групп / О.Ю. Рябухина, Н.Я. Шиманюк, Б.Н. Мишанькин // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С. 63-65.

5. Figueiredo, S.C. The neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains / S.C. Figueiredo, A.C. Neves-Borges, A. Coelho // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2005. – Vol. 100, No 6. – P. 563-569.

6. Galen, J.E. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin / J.E. Galen, J.M. Ketley, A. Fasano, S.H. Richardson, S.S. Wasserman, J.B. Kaper // Infect. Immun. – 1992. – Vol. 60, No 2. – P. 406-415.

7. Jermyn, W.S. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates / W.S. Jermyn, E.F. Boyd // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 3681–3693.

8. Vimr, E.R. Cloning and expression of the *Vibrio cholerae* neuraminidase gene *nanH* in *Escherichia coli* / E.R. Vimr, L. Lawrisuk, J. Galen, J.B. Kaper // J. Bacteriol. – 1988. – Vol. 170. – P. 1495-1504.

СТРУКТУРА ГЕНА *RTXA* – ЧЕТВЕРТЫЙ КРИТЕРИЙ ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА *VIBRIO CHOLERAЕ*

Монахова Е.В.¹, Писанов Р.В.¹, Титова С.В.¹, Кулешов К.В.², Weill F.-X.³

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

²ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва;

³Institute Pasteur, Paris, France

На фоне стремительного глобального распространения генетически измененных штаммов холерных вибрионов возрастают риски их проникновения на территорию Российской Федерации (РФ). Известно, что эпидемии холеры 1994 г. (Дагестан) и 2001 г. (Казань) были обусловлены такими геновариантами [3]. В текущем столетии были неоднократно зарегистрированы спорадические случаи их завоза [4,7], хотя диссеминации возбудителей удавалось избежать благодаря своевременному проведению соответствующих мероприятий при выявлении больных либо обнаружении токсигенных вибрионов в объектах окружающей среды (ООС). Вместе с тем, для предотвращения возможных эпидосложнений в будущем необходимо определение эпидемического потенциала каждого свежевыделенного штамма. На сегодняшний день при оценке последнего используются следующие критерии:

1) Аллели гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу холерного

токсина (СТ), характеризующиеся специфическими однонуклеотидными заменами (SNP), которые приводят к соответствующим заменам аминокислотных остатков (aa) в их продуктах. У геновариантов *V. cholerae* O1 *ctxB3* типа Эль Тор замещен *ctxB* классического типа *ctxB1* либо *ctxB7*, впервые обнаруженным у клинических штаммов из Индии (2003-2006), а затем и у вызвавших эпидемию на Гаити (2010) [9]. ПЦР-тест-система для дифференциации *ctxB3* и *ctxB1* успешно используется сотрудниками Ставропольского НИПЧИ [6], однако Naha A. et al. [14] уже разработана DMAMA-PCR, позволяющая выявлять все три аллеля, включая *ctxB7*.

2) структура острова пандемичности VSP-II. Идея о повышенном эпидемическом потенциале штаммов, содержащих в нем протяженные делеции, была высказана Nusrin S. et al. [16] и в дальнейшем развита сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб», которые на основе изучения структуры VSP-II разработали ПЦР тест-систему для дифференциации геновариантов с низким и высоким эпидемическим потенциалом [1] и впоследствии расширили ее за счет включения праймеров, позволяющих одновременно с делецией в этом острове определять серогруппу (O1 или O139), биовар и токсигенность анализируемых штаммов [5].

3) аллели гена структурной единицы пилей TCP (*tcpA*). Основные аллели *tcpA* – канонические классического типа (*tcpA^{class}*) и типа Эль Тор (*tcpA^{ET}*), их используют для дифференциации двух биоваров. Кроме того, известен аллель *tcpA^{CIRS101}*, впервые обнаруженный у возбудителя холеры в Бангладеш, и отличающийся от *tcpA^{ET}* наличием дополнительной SNP в позиции 266, он также характерен для гаитянских штаммов [9,12,17,19,20]. Ghosh P. et al. [9] были сконструированы праймеры, позволяющие выявлять эту мутацию в МАМА-ПЦР.

Кроме того, в 2004 г. в Индии появились геноварианты, содержащие SNP G/A-13602 в гене *rtxA*, кодирующем синтез многофункционального цитотоксина MARTX. Эта SNP привела к образованию стоп-кодона, «преждевременно» завершающего синтез белка, С-конец которого укорочен на 12 aa. Dolores J., Sachell K.J.F. [8] было экспериментально доказано, что такой «укороченный» токсин, продукт аллеля *rtxA4*, утрачивает биологическую активность по отношению к эукариотическим клеткам. Ими также было установлено, что данная null-мутация встречается только у геновариантов вибрионов Эль Тор, несущих аллель *ctxB1* либо *ctxB7*, и высказано предположение о том, что приобретенная способность к продукции СТ классического типа делает излишним энергоемкое функционирование высокомолекулярного MARTX, поэтому новые геноварианты «специально» выводят его из строя в пользу сохранения энергии для обеспечения быстрого размножения клеток и успешной диссеминации. Ghosh P. et al. [10] сконструировали праймеры, позволяющие выявлять эту null-мутацию в МАМА-ПЦР, и показали, что к настоящему моменту канонический *rtxA1* у геновариантов замещен *rtxA4*

(называемым также *rtxA*^o). Всего же известно 9 аллелей *rtxA* (таблица 1), из которых у токсигенных штаммов O1 серогруппы было выявлено 7 (кроме 8 и 9), причем SNP G/A-12639 в *rtxA4/5* оказалась молчащей мутацией и не привела к замене aa 4031, поэтому белки RtxA4 и RtxA5 идентичны [8].

Таблица 1. Сравнительная характеристика продуктов разных аллелей *rtxA*

Аллель <i>rtxA</i> *	Позиции aa в белке										
	1024	1026	1249	1745	1851	2301	2911	3726	3803	4031	4534
1	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Trp
2	Ala	Phe	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Trp
2a	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Val	Glu	Trp
3	Leu	Val	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	Trp
4, 4a [#] , 5	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Ser	Asn	Val	Glu	-
6	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Val	Glu	Trp
7	Ala	Phe	Gly	Ser	Ala	Gly	Gly	Asn	Val	Glu	Trp
8	Ala	Phe	Gly	Ser	Ser	Arg	Gly	Asn	Val	Glu	Trp
9	Ala	Phe	Gly	Ala	Ser	Gly	Gly	Asn	Ala	Asp	Trp

*аллели *rtxA* приведены согласно классификации Dolores J., Sachell K.J.F. [8]; aa последовательности RtxA2 и 3 реконструированы нами по данным Mutreja A. *et al.* [14], на которые ссылаются названные авторы, т.к. в NCBI они отсутствуют.

[#]*rtxA4a* отличается от *rtxA4* наличием делеции 60 п.н. в проксимальной части гена и соответствующей делеции 20 aa в белке. Красным шрифтом обозначены аллели, впервые выявленные нами в рамках настоящего исследования.

В целях более подробной характеристики токсигенных вибрионов, выделенных в разные годы на территориях РФ от больных и из ООС, мы провели сравнительный анализ структуры названных генетических детерминант, присутствующих в их геномах. Отдельные гены и их кластеры идентифицировали в полных геномах, секвенированных нами на платформе MiSeq (Illumina), в режиме on-line с помощью программы BLASTN 2.2.29, для анализа генов и их продуктов использовали программу AlignX (Vector NTI 11). В анализ были также включены последовательности, найденные в базах NCBI GenBank.

Результаты показаны в таблице 2, из которой видно, что сочетания канонических аллелей *ctxB3* и *tcpA^{ET}*, *ctxB1* и *tcpA^{class}* были выявлены только у штаммов, выделенных в прошлом столетии, последний из них (18252) – в 2000 г. Все они содержали интактный VSP-II и *rtxA1* (кроме штамма 5879, у которого нами идентифицирован ранее не описанный аллель *rtxA2a*, сходный с *rtxA2*, но отличающийся от *rtxA1* другой SNP), т.е. представляли собой прототипные штаммы, считающиеся в настоящее время обладателями низкого эпидемического потенциала. Однако прежде ими были вызваны крупные эпидемические вспышки в Ростовской области, Крыму и Ставрополе (соответственно в 1970-х и 1990 гг.). На наш взгляд, их непричастность к эпидосложнениям в нынешнем столетии скорее связана с тем, что во всем мире они практически вытеснены геновариантами. Типичный классический штамм (17917) 1999 года выделения, по-видимому, также является последним обнаруженным в

России, ранее 2 таких штамма были выделены из воды в Ростове в 1981 и в Сочи в 1996 г. [2], но случаев инфицирования людей выявлено не было. Как и все классические вибрионы, он не имел VSP-II и содержал обширную делецию в RTX-кластере, включающую проксимальные участки генов *rtxA*, *rtxB* и расположенные между ними *rtxC* и *chp*.

Эпидемии холеры в Дагестане (1994) и Казани (2001) связаны с заносами из Азии возбудителей, отличающихся от прототипа только присутствием аллеля *ctxB1* [3]. Параллельно в 2001 г. из ООС выделяются *ctxB1tcpA^{ET}rtxA1* штаммы с протяженной делецией ($\Delta 0495-0512$) в VSP-II, а у штамма 2003 г. выявлена «промежуточная» делеция $\Delta 0502-0512$, отличающаяся как от вышеприведенной, так и от описанной для сибирских штаммов 1997 г. короткой делеции $\Delta 0495-0498$ [1]. По-видимому, это отражает постепенный процесс утраты острова, однако корреляция с эпидемическим потенциалом пока неясна.

Все остальные штаммы, выделенные с 2005 по 2011 гг., содержали не только VSP-II с протяженной делецией, но и *tcpA^{CIRS101}* и *rtxA4* в сочетании с *ctxB1* либо *ctxB7*. Наконец, у двух клинических штаммов, завезенных в Москву из Индии в 2012 и 2014 гг., выявлен ранее не описанный аллель *rtxA4a* с делецией 60 п.н. в проксимальной части гена и соответствующей делецией 20 aa (582-601) в белке.

Таблица 2. Распределение генетических маркеров среди штаммов *V.cholerae*

Аллели генов			VSP-II	штамм	Место и время выделения штаммов
<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>			
3	ET	1	prototype	8228	Керчь, 1974
3	ET	1	prototype	14450, 14451	Ставрополь, 1990
3	ET	1	prototype	18252	Ростов, 2000
3	ET	2a	prototype	5879	Таганрог, 1972
1	ET	2 ^{DS}	prototype	B-33 (AAWE01)	Мозамбик, 2004
1	ET	1	prototype	17261, 17290, 17296	Дагестан, 1994
1	ET	1	prototype	18329	Казань, 2001
1	ET	1	$\Delta 0495-0512$	18367, 18368, 18369	Ростов, 2001
1	ET	1	$\Delta 0502-0512$	18588	Ростов, 2003
1	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	CIRS101 (ACVW01)	Бангладеш, 2002
1	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	18826	Тверь-05
1	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	18899	Мурманск-06
1	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	301	Таганрог, 2011
1	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	81	Ростов, 2014
7	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512$	19187, 19188, 19889 18191	Москва, 2010
7 ^S	CIRS101	4	$\Delta 0495-0512^S$	3226 (PRJNA237111)	Москва, 2010
7 ^K	CIRS101 ^K	4	$\Delta 0495-0512^K$	39 (LJFG01000002), 76 (MPVL01000053)	Мариуполь, 2011
7	CIRS101	4a	$\Delta 0495-0512$	6878	Москва, 2012
7	CIRS101	4a	$\Delta 0495-0512$	3265	Москва, 2014
1	Class	$\Delta 5,7$ kb	-	17917-class	Ростов, 1999

Красным шрифтом обозначены клинические штаммы, зеленым – выделенные из ООС; желтым фоном выделены штаммы, геномы которых секвенированы в РостНИПЧИ, серым – в ЦНИИ эпидемиологии, коричневым – в Institute Pasteur; остальные геномы получены из GenBank (ID приведены в скобках); ^{DS} Данные Dolores J., Sachell K.J.F. [8]; ^S Smirnova N.I. et al. [18]; ^K Kuleshov K.V. et al. [13].

Несмотря на наличие SNP C/T-2256 в гене штамма 6878, мы отнесли гены обоих штаммов к одному аллелю, т.к. данная мутация оказалась молчащей. По всей вероятности, новые геноварианты постепенно продолжают «выводить из строя» MARTX в целях энергосбережения. Усеченная ORF *rtxA4* все же экспрессируется с образованием утратившего активность высокомолекулярного RtxA4, что требует немалых энергетических затрат. Делеция 60 п.н. в *rtxA4a*, возможно, еще сильнее угнетает биологическую активность продукта, но вряд ли влияет на экспрессию гена. Делеция 20 аа в RtxA4a приходится на область N-концевых повторов, функция которых для MARTX *V.cholerae* точно не установлена, однако у сходного с ним MARTX *V.vulnificus* элиминация этой области полностью подавляла не только биологическую активность, но и транслокацию токсина в эукариотические клетки [11]. Поэтому представляют интерес дальнейшие исследования структуры генов *rtxA* у новых свежeweделенных геновариантов холерных вибрионов и ее связей с вирулентностью. Не исключено дальнейшее укорочение этого гена либо блокирование его синтеза.

Таким образом, изученные маркеры образовали в небольшой группе токсигенных штаммов 9 разных сочетаний (не считая типичного классического штамма), что позволяет предположительно рассмотреть формирование высоковирулентных клонов во временном аспекте. Скорее всего, вначале прототипные штаммы Эль Тор приобрели *ctxB1*, затем произошли делеции в VSP-II и параллельно с ними – мутации в генах *rtxA* и *tcpA* (*rtxA4*, *tcpA^{CIRS}*). Dolores J., Sachell K.J.F. [8] полагали, что *rtxA4* возник раньше, чем *ctxB7*, т.е. дополнительная SNP в *ctxB7* образовалась именно у штаммов с *rtxA4*. Результаты проведенного нами анализа свидетельствуют о том, что в дальнейшем у таких геновариантов произошла делеция в этом гене с образованием *rtxA4a*.

Влияние большинства SNP (миссенс-мутаций), приводящих к заменам аа в белках, на их свойства до настоящего времени неизвестно. Тем не менее, все 4 описанных признака, по-видимому, могут служить в качестве маркеров для оценки эпидемического потенциала возбудителей холеры. Поэтому нам представляется целесообразным расширение отечественных ПЦР-тест-систем для оценки эпидемического потенциала холерных вибрионов за счет включения в них праймеров, специфически узнающих все аллели генов *ctxB* (*ctxB3*, *ctxB1*, *ctxB3*), *tcpA* (*tcpA^{class}*, *tcpA^{ET}*, *tcpA^{CIRS101}*) и *rtxA* (*rtxA1*, *rtxA4*, *rtxA4a*).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агафонов, Д.А. Конструирование ПЦР тест-системы для дифференциации генетически измененных токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом / Д.А.

Агафонов, С.П. Заднова, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опасных инф. – 2014. – Вып. 2. – С. 85-88.

2. Монахова, Е.В. О случаях завоза возбудителей классической холеры на территорию России во время седьмой пандемии / Е.В. Монахова, С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, Л.М. Смоликова, Н.В. Божко // Перспективы сотрудничества государств-членов ШОС в противодействии угрозе инф. болезней: Международ. науч.-практ. конф.: Тез. докл. – Новосибирск, 2009. – С.146-149.

3. Онищенко, Г.Г. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, О.С. Чемисова, В.Д. Кругликов, С.В. Титова // Пробл. особо опасных инф. – 2016. – Вып. 4. – С. 31-41.

4. 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 // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – Вып. 2. – С. 63-67.

5. Плеханов, Н.А. Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу / Н.А. Плеханов, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 82-90.

6. Савельев, В.Н. Биологические свойства возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры эльтор / В.Н. Савельев, И.В. Савельева, Б.В. Бабенышев, А.Д. Антоненко, А.Н. Куличенко // Холера и патогенные для человека вибрионы: Мат. пробл. комиссии – Ростов-на-Дону, 2012. – Вып. 25. – С. 63-72.

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

8. Dolores, J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates / J. Dolores, K.J.F. Satchell // mBio. – 2013. – Vol. 4, No.2. – e00624-12.

9. Ghosh, P. Haitian variant *tcpA* in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in Kolkata, India / P. Ghosh, A. Naha, S. Basak, S. Ghosh, T. Ramamurthy, H. Koley, R.K. Nandy, S. Shinoda, H. Watanabe, A.K. Mukhopadhyay // J. Clin. Microbiol. 2014. – Vol. 52, No.3. – P. 1020-1021.

10. Ghosh, P. Genetic traits of *Vibrio cholerae* O1 Haitian isolates that are absent in contemporary strains from Kolkata, India / P. Ghosh, A. Naha,

G.P. Pazhani, T. Ramamurthy, A.K. Mukhopadhyay // PLoS One. – 2014. – Vol. 9. – e112973.

11. Kim, B.S. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin / B.S. Kim, H.E. Gavin, K.J. Satchell // MBio. – 2015. – Vol. 6. – e00324–15.

12. Kumar, D. Haitian variant *tcpA* in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in National Capital Region (India) / D. Kumar, N.C. Sharma, T. Ramamurthy, S.K. Gupta, D.K. Seth // Indian. J. Med. Res. – 2016. – Vol. 144. – P. 293-296.

13. Kuleshov, K.V. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011 / K.V. Kuleshov, A. Kostikova, S.V. Pisarenko, D.A. Kovalev, S.N. Tikhonov, I.V. Savelieva, V.N. Saveliev, O.V. Vasilieva, L.S. Zinich, N.N. Pidchenko, A.N. Kulichenko, G.A. Shipulin // Infect. Genet. Evol. – 2016. – Vol. 44. – P. 471-478.

14. Mutreja, A. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic / A. Mutreja, D.W. Kim, N.R. Thomson, T.R. Connor, J.H. Lee, S. Kariuki, N.J. Croucher, S.Y. Choi, S.R. Harris, M. Lebens, S.K. Niyogi, E.J. Kim, T. Ramamurthy, J. Chun, J.L. Wood, J.D. Clemens, C. Czerkinsky, G.B. Nair, J. Holmgren, J. Parkhill, G. Dougan // Nature. – 2011. – Vol. 477. – P. 462-465.

15. Naha, A. Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India / A. Naha, G.P. Pazhani, M. Ganguly, S. Ghosh, T. Ramamurthy, R.K. Nandy, G.B. Nair, Y. Takeda, A.K. Mukhopadhyay // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50. – P. 1733–1736.

16. Nusrin, S. Peruvian *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains possess a distinct region in the *Vibrio* seventh pandemic island-II that differentiates them from the prototype seventh pandemic El Tor strains / S. Nusrin, A.I. Gil, N.A. Bhuiyan, A. Safa, M. Asakura, C.F. Lanata, E. Hall, H. Miranda, B. Huapaya, C.G. Vargas, M.A. Luna, D.A. Sack, S. Yamasaki, G.B. Nair // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58, No.3. – P.342-354.

17. Satchell, K.J. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain / K.J. Satchell, C.J. Jones, J. Wong, J. Queen, S. Agarwal, F.H. Yildiz // Infect. Immun. – 2016. – Vol. 84, No. 9. – P. 2473-2481.

18. Smirnova, N.I. Draft whole-genome sequence of a new variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain isolated from a cholera patient in Russia / N.I. Smirnova, A.V. Cherkasov, Y.M. Krasnov, D.A. Agafonov, V.V. Kutyrev // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2, No. 3. – e00432-14.

19. Son, M.S. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes / M.S. Son, C.J. Megli, G. Kovacikova, F.

Qadri, R.K. Taylor // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 3739–3749.

20. Talkington, D. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010-2011 / D. Talkington, C. Bopp, C. Tarr, M.B. Parsons, G. Dahourou, M. Freeman, K. Joyce, M. Turnsek, N. Garrett, M. Humphrys, G. Gomez, S. Stroika, J. Boncy, B. Ochieng, J. Oundo, J. Klena, A. Smith, K. Keddy, P. Gerner-Smidt // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17, No. 11. – P. 2122-2129.

ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* НА ОСНОВЕ INDEL-МАРКЕРОВ

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Кругликов В.Д.,
Архангельская И.В., Левченко Д.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.В.

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

Методы молекулярного типирования с использованием различных маркеров являются признанным методом анализа штаммов холерного вибриона, выделенных от людей во время эпидемических вспышек и из объектов окружающей среды.

Одним из универсальных методов генотипирования штаммов самых различных возбудителей инфекционных заболеваний, включая возбудитель холеры, является INDEL-анализ, основанный на выявлении вставок / делеций нескольких нуклеотидов (INsertion-DELetion). Ранее было проведено изучение INDEL-маркеров у штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных из окружающей среды, однако в данном исследовании использовались исключительно нетоксигенные штаммы, лишенные гена холерного токсина [3].

В связи с этим, цель настоящей работы заключалась в изучении возможности генотипирования на основе INDEL-маркеров на модели коллекции штаммов токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae*.

Материалы и методы. В работе использовали 14 stx+tcp+ штаммов *V. cholerae* классического биовара, выделенных, начиная с 1927 года, и 22 stx+tcp+ штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных в период 1981-2014 годов, шесть stx+tcp+ штаммов серовара O139, а также 181 штамм серовара O1, выделенных в 2014-2016 г.г. на территории Российской Федерации из объектов внешней среды при проведении мониторинга холеры.

Для проведения INDEL-типирования были отобраны девять INDEL-маркеров, к которым были сконструированы специфические праймеры,

фланкирующей область инсерции-делеции. Постановку ПЦР и учет результатов проводили, как описано ранее [3]. Вариабельность оценивали с помощью индекса разнообразия Симпсона [5]

Результаты и обсуждение. На основе распределения аллелей INDEL-локусов все штаммы холерного вибриона распределились между 29 генотипами, которые по результатам кластерного анализа были сгруппированы между 8 кластерами, обозначенными буквами латинского алфавита с «А» по «I». При этом все токсигенные классические штаммы серовара O1 были представлены одним INDEL-генотипом А5. В то время как все токсигенные штаммы биовара Эль Тор и O139 были представлены другим INDEL-генотипом - А1.

Вошедшие в этот же кластер восемь *ctx-tcp+* штаммов, выделенных на территории РФ в 2015-2016 годах, сформировали три INDEL-генотипа А2-А4, отличаясь от токсигенных (эпидемически значимых) штаммов по ряду INDEL-маркеров. Используемые нами INDEL-маркеры не входят в состав острова патогенности VPI-1, кодирующего продукцию токсин корегулируемых пилей, что позволяет предположить, что *ctx-tcp+* штаммы холерного вибриона составляют обособленную популяцию, существенно отличающуюся от *ctx-tcp-* штаммов. Это так же подтверждается обнаружением вариабельного тандемного повтора VcB только у *tcp+* штаммов [2]. Таким образом, результаты INDEL-типирования могут косвенно свидетельствовать об эпидемиологической значимости штаммов холерного вибриона.

Остальные 173 *ctx-tcp-* штамма, выделенные в 2014-2016 годах на территории Российской Федерации из объектов внешней среды, вошли в кластеры с «В» по «I». Обращает на себя внимание территориальная приуроченность некоторых кластеров. Так, штаммы, выделенные в Забайкальском крае и Иркутской области, были представлены исключительно кластером D. Штаммы кластера В выделялись преимущественно на территории Ростовской области и Республики Калмыкия (рисунок 1).

Забайкальский край	D2 D3 D4
Иркутская область	D3 D4
Калининградская область	D4
Краснодарский край	F1
Приморский край	D2 D4 F3
Псковская область	D4
Республика Бурятия	D3
Республика Калмыкия	D1 D2 D3 A3 B1 B2 B3 B4 B5 C2 C3 G1 G2 G4 G5 H1 H2 H3 I1
Республика Коми	A2
Республика Крым	F2 C1
Ростовская область	D2 E1 A4 B4 B5
Рязанская область	D5
Свердловская область	G3
Татарстан	D3
Хабаровский край	A2
Челябинская область	F1 B4

Рисунок 1. Распределение INDEL-генотипов штаммов холерного вибриона, выделенных в 2014-16 годах, по субъектам РФ.

При этом особый интерес представляет собой изучение генетической variability выделяемых штаммов холерного вибриона. Так, для ряда регионов индекс разнообразия составил 0 (генетическое разнообразие отсутствует). На наш взгляд, отсутствие генетического разнообразия среди выявляемых вибрионов может свидетельствовать, что это является следствием однократного попадания единственного клона *V. cholerae* в водные объекты. Подтверждением этому служит тот факт, что для таких регионов зарегистрировано выделение вибрионов только в одном году. И, наоборот, для регионов с ежегодным выделением штаммов, характерен высокий индекс разнообразия популяции (таблица). Более того, связь между внутривидовым разнообразием и эпидемиологической опасностью уже подмечена на примере ряда других возбудителей [1; 4]. На наш взгляд, циркуляция в водном объекте большого числа клонов может свидетельствовать о благоприятных условиях для штаммов холерного вибриона. Это позволяет использовать индекс разнообразия в качестве одного из критериев для оценки эпидемиологического риска.

Выводы. Показана высокая стабильность изученных INDEL-маркеров. Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод о малой информативности INDEL-типирования с использованием выбранных нами маркеров для токсигенных (ctx+tcp+) и высокой дискриминирующей силы для ctx-tcp- штаммов *V. cholerae*. При этом индекс разнообразия, рассчитываемый на основе изученных локусов, может использоваться в качестве одного из критериев эпидемиологического риска.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анисимов, А.П. Внутривидовое разнообразие *Yersinia pestis* / А.П. Анисимов // Успехи современного естествознания. – 2003. – № 10. – С. 50-52.
2. Водопьянов, А.С. Корреляция области варибельного тандемного повтора VcB (VNTR VcB) и гена токсин-корегулируемых пилей (*tcpA*) у возбудителя холеры: компьютерный анализ / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, И.П. Олейников // Здоровье населения и среда обитания. - 2014. - № 4 (253). - С. 14-16.
3. Водопьянов, А.С. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.А. Зубкова, М.И. Ежова // Здоровье населения и среда обитания. - 2015. № 5 (266). - С. 41-44.
4. Маркова, Ю.А. Использование показателей разнообразия возбудителя для оценки состояния эпидемического процесса / Ю.А. Маркова, Е.Д. Савилов // Журн. инфекционной патологии. - 1999. - № 2-3. - С. 10-15.
5. Simpson, E.H. Measurement of diversity / E.H. Simpson // Nature (London). – 1949. - Vol. 163, № 4148. – P. 668.

ИЗУЧЕНИЕ СТРУКТУРЫ И ЛОКАЛИЗАЦИИ СТХ И RS1 ПРОФАГОВ В ГЕНОМАХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ ОСЛОЖНЕНИЯХ НА ТЕРРИТОРИИ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА

Гладких А.С., Миронова Л.В., Балахонов С.В.

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

Холера – тяжелое инфекционное заболевание, носящее масштаб пандемии, этиологическим агентом которого служат токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Так, в 2016 г. было зарегистрировано более 136 тысяч больных холерой в 37 странах мира. Начиная с 1990-х гг. появились новые варианты холерного вибриона биовара El Tor с признаками классического биовара, продуцирующие токсин классического типа и отличающиеся более тяжелым течением вызываемой ими инфекции

[1, 2]. Классический биовар *V. cholerae* характеризуется наличием тандемного повтора СТХ^{cla} на первой хромосоме и идентичного СТХ^{cla} на второй хромосоме, кроме того, на первой хромосоме присутствует TLC-элемент [3]. Для штаммов биовара Эль Тор характерно наличие TLC-элемента, сателлитного фага RS1 в связке с СТХ^{ET} на первой хромосоме и отсутствие указанных профагов на второй [4]. Согласно последней классификации [3] описано восемь различных типов СТХ профага и различные варианты локализации профага в составе хромосом.

Цель работы – изучение структуры и локализации профагов RS1 и СТХ в геномах измененных штаммов *V. cholerae* El Tor, выделенных при эпидемических осложнениях на территории Сибири и Дальнего Востока.

В работу были взяты штаммы *V. cholerae* El Tor, изолированные от людей в завозных очагах и в период вспышки холеры. Штаммы И-1181, И-1187 изолированы в 1994 г. в г. Новосибирске (завоз из Турции) и г. Барнауле (завоз из Индии), штамм И-1263 изолирован в 1997 г. в г. Иркутске в завозном очаге (завоз из Казахстана), штамм И-1300 изолирован от больного в период вспышки холеры в г. Южно-Сахалинске в 1999 г.

Локализацию СТХ профага и RS1 области определяли с помощью набора праймеров Ch1F/rstAR, Ch2F/rstAR, ctxBF/Ch1R и ctxBF/Ch2R. Наличие тандемного повтора СТХ-профага определяли с помощью набора ctxBF/serR [5]. Наличие тандемного повтора RS1 области выявляли парой праймеров rstCF4/rstCR4. Отсутствие вставок на второй хромосоме проверяли парой праймеров Ch2F/Ch2R, получая фрагмент приблизительно 900 нуклеотидов, как и у референсного штамма *V. cholerae* El Tor N16961. Наличие TLC области определяли с помощью ПЦР со специфичными праймерами.

Применение выбранных наборов праймеров позволило установить, что у штаммов *V. cholerae* El Tor И-1181 и И-1300 СТХ-профаг отсутствовал на первой хромосоме, тогда как на второй хромосоме у данных штаммов присутствовал его тандемный повтор. RS1 область была локализована на первой хромосоме и представлена двумя копиями. Для штаммов *V. cholerae* El Tor И-1187 и И-1263 показано наличие СТХ-профага и RS1 области на первой хромосоме и отсутствие дубликации как СТХ, так и RS1, вторая хромосома была свободна от данных генетических элементов (табл. 1).

Наличие TLC области подтверждено в структуре генома штаммов *V. cholerae* El Tor И-1181, 1187, 1263, в то время как у штамма И-1300 TLC область элиминирована. У всех изучаемых штаммов присутствовал ген холерного токсина классического типа ctxB1.

Таблица 1. Локализация СТХ профага и RS1 области в геномах исследуемых штаммов

штамм	хромосома 1	хромосома 2	тип ctxB	тип СТХ профага	волна распространения холеры
И-1181	RS1:RS1	CTX:CTX	ctxB1	CTX-2a	2
И-1300	RS1:RS1	CTX:CTX	ctxB1	CTX-2a	2
И-1187	RS1:CTX	-	ctxB1	CTX-3	3
И-1263	RS1:CTX	-	ctxB1	CTX-3	3

При изучении структуры генов *rstA* и *rstB* в составе RS2 области СТХ исследуемых штаммов обнаружено, что у штаммов И-1263 и И-1187 характер замен в гене *rstA* соответствует СТХ-3 типу, в то время как *rstB* ген идентичен СТХ-1 типу, что характерно для СТХ-3 типа профага. Данный тип профага, а также тип хромосомной локализации СТХ и RS1, позволяют отнести их к третьей волне пандемии согласно классификации Kim et al. [3].

Два других штамма (И-1181 и И-1300) имеют структуру замен в гене *rstA*, характерную для профага СТХ-2, в то время как *rstB* ген несет замены, типичные для СТХ-1 варианта профага. Подобный характер замен определен и у других штаммов второй волны пандемии, как, например, *V. cholerae* MG116926 и E1781, выделенных в Бангладеш. Выявленный характер замен позволил нам предположить возможность наличия варианта СТХ-2 профага, СТХ-2а.

Таким образом, проведенные исследования показывают, что завезенные на территорию Сибири и Дальнего Востока штаммы относятся к измененным вариантам биовара Эль Тор и соответствуют второй и ранней третьей волнам распространения холеры, регистрируемым с начала 90-х годов XX века. Два штамма имеют специфическую структуру СТХ профага, что позволяет предположить существование определенного его подтипа –СТХ-2а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nair, G.B. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh / G.B. Nair, F. Qadri, J. Holmgren et al. // *J. Clin. Microbiol.* – 2006. – Vol. 44, № 11. – P. 4211–4213.
2. Safa, A. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes / A. Safa, N.A. Bhuyian, S. Nusrin et al. // *J. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 55, № 11. – P. 1563–1569.
3. Kim, E.J. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1 / E.J. Kim, C.H. Lee, G.B. Nair, D.W. Kim // *Trends Microbiol.* – 2015. – Vol. 23, № 8. – P. 479–489.
4. Heidelberg, J.F. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* / J.F. Heidelberg, J.A. Eisen, W.C. Nelson et al. // *Nature.* – 2000. – Vol. 406, № 6795. – P. 477–483.

5. Nguyen, B.M. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008 / B.M. Nguyen, J.H. Lee, N.T. Cuong et al. // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47, № 5. – P. 1568–1571.

ПЦР-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И.

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

На территории Российской Федерации отмечается ежегодное обнаружение нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 в водных объектах окружающей среды (ООС) (в среднем за период 2000-2016 гг. по 53 штамма в год), однако встречаются изоляты и из клинического материала [1, 2].

Изучение нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных из водных экосистем, на молекулярно-биологическом уровне обосновано установленной их ролью в этиологии спорадических случаев и вспышек диарейных заболеваний [3, 4]. Ранее нами была показана целесообразность и практическая значимость изучения выделенных из ООС нетоксигенных культур *V. cholerae* O1 методом ПЦР генотипирования по оптимальному набору из 14 структурных генов [5].

Целью настоящей работы явилось установление доминирующего ПЦР – генотипа нетоксигенных культур холерных вибрионов, изолированных из водных экосистем субъектов Российской Федерации с помощью ГИС «Холера 1989-...» [6].

В работе использовано 408 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, сгруппированных при помощи кластерного анализа по методу UPGMA, в 81 генотип (10 кластеров). Наибольшее количество нетоксигенных штаммов холерных вибрионов вошло в кластер D – 121 штамм (29,7%), составивший 11 генотипов. Кластер E состоял из 99 (24,3%) нетоксигенных изолятов *V. cholerae* и включал 20 генотипов. Что касается культур холерных вибрионов, отнесенных к кластеру B, то их количество составило 73 штамма (17,9%), образовавших 15 генотипов. Остальные кластеры состояли из различного количества генотипов: так кластер A – из 8 генотипов (47 штаммов – 11,5%); G -10 генотипов (25

штаммов – 6,1%); Н – 5 генотипов (17 штаммов – 4,2%); F – 2 генотипа (13 штаммов – 3,2%); I – 8 генотипов (10 штаммов – 2,5%).

Особый интерес представляют культуры, принадлежащие к генотипу В8, которые были изолированы из водных экосистем 20 административных территорий России. В тоже время вышеуказанные штаммы не встречались на территориях Ростовской области и Республики Калмыкия (рис.).

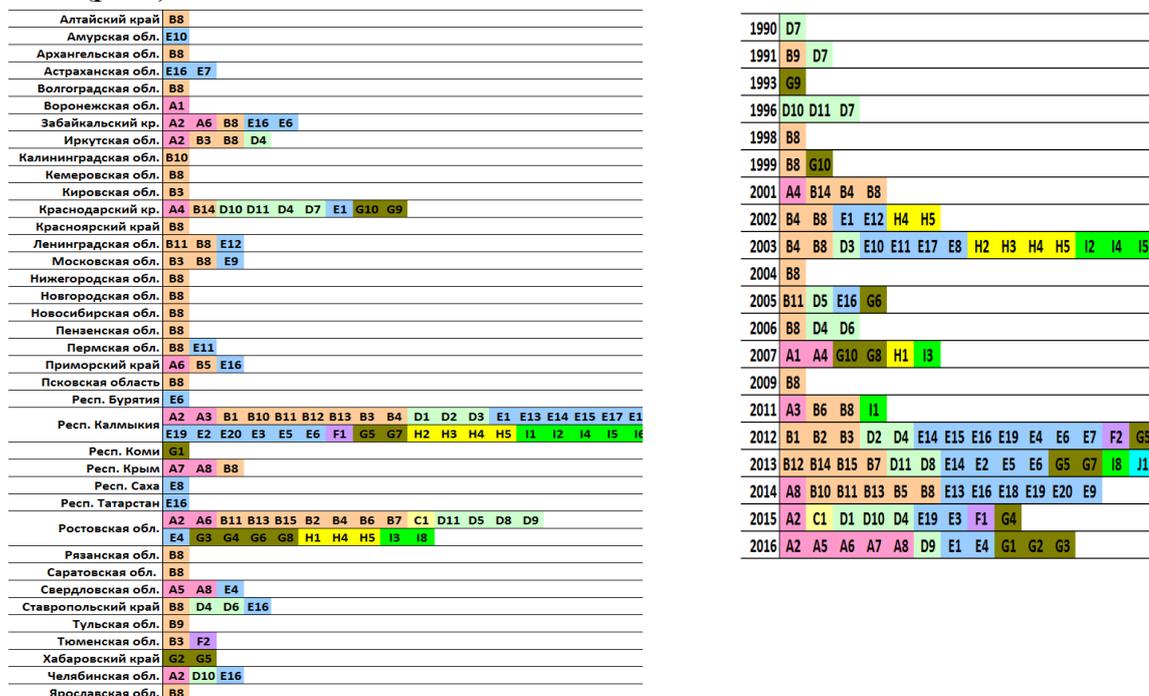


Рисунок. Распределение ПЦР - генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов по субъектам России (1990-2016 гг.).

Прежде всего, необходимо отметить, что штаммы *V. cholerae* с вышеуказанным генотипом имели следующую генетическую характеристику: не содержали генов RS1, RS2 – элементов, острова патогенности VPI-1, а также гена термостабильного токсина *stn/sto*, но имели полный набор генов кластера RTX и T3SS, а также ген маннозочувствительных пилей адгезии – *mshA*. Что касается острова патогенности VPI-2 и T6SS, то эти кластеры были представлены не полным набором генов, а именно: отсутствовали гены *vce*, а также *pbd-vgrG3* и *acd-vgrG1*. При анализе динамики распространения нетоксигенных изолятов холерных вибрионов с генотипом В8 (с 1990 по 2016 гг.) нами было установлено выделение таких культур на протяжении от одного года до шести лет в водоемах России.

Таким образом, полученные данные являются косвенным свидетельством того, что нетоксигенные штаммы холерных вибрионов с генотипом В8 могут переживать в пресноводных водоемах России от одного года до нескольких лет. Персистенции таких культур может

способствовать наличие сочетания генов T3SS и маннозочувствительных пилей адгезии – *mshA*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 г. Прогноз на 2015 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.М. Иванова, Г.Б. Анисимова // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – № 1. – С. 18-25.

2. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев, Н.И. Смирнова, С.А. Щербакова, Э.А. Москвитина, С.В. Титова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С. 89-101.

3. Зубкова, Д.А. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA-tcpA+*, выделенных из водных объектов РФ, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы / Д.А. Зубкова, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, С.О. Водопьянов // Здоровье население и среда обитания. – 2014. – № 9. – С. 32-35.

4. Кругликов, В.Д. Генотипическая и фенотипическая характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды во время эпидемии по холере в Каменском районе Ростовской области в 2005 году / В.Д. Кругликов, Б.Л. Мазрухо, Е.П. Авдеева, Е.В. Монахова, И.С. Шестиалтынова, Н.К. Михась, В.В. Сухарь, Т.А. Кудрякова, Г.В. Качкина, А.Б. Мазрухо, Э.Г. Цедова, Д.И. Каминский // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2006. – Вып. 19. – С. 37-39.

5. Левченко, Д.А. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, С.В. Титова, И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, М.И. Ежова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2016. - № 6. – С. 19-25.

6. 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.

ВЫДЕЛЕНИЕ, ОЧИСТКА И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДНК ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ

Погожова М. П., Романова Л. В., Гаевская Н. Е., Тюрина А. В.

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

Одним из ведущих направлений современной микробиологии и биотехнологии является исследование бактериофагов. Это связано с возрастающим интересом к бактериофагам с точки зрения их практического применения в целях диагностики, профилактики и лечения инфекционных заболеваний в различных отраслях медицины, сельского хозяйства и промышленности [1].

Мишенью для каждого вида фагов является определенная группа бактерий. Благодаря своей специфичности, а также способности к длительному сохранению в окружающей среде и быстрому размножению при наличии подходящих хозяев, бактериофаги вносят существенный вклад в поддержание динамического равновесия и биологического разнообразия популяции бактерий в естественных экосистемах [2]. Легкость выделения и культивирования бактериофагов в лабораторных условиях, сравнительно небольшие размеры геномов сделали их излюбленными объектами исследований генетиков и молекулярных биологов еще в первой половине 20 века.

Холера продолжает оставаться приоритетной проблемой мирового здравоохранения в связи с эпидемиями на различных континентах, выявлением вибрионов с измененным геномом и повышением уровня антибиотикорезистентности холерных вибрионов [3]. Бактериофаги, активные в отношении холеры, вызывают интерес не только как способ деконтаминации различных объектов, но и как средства типирования различных штаммов, выделенных из окружающей среды, в том числе и от человека [4]. Поэтому конструирование диагностических препаратов для диагностики патогенных для человека вибрионов сохраняет свою актуальность. Исследование структуры генома бактериофагов – это трудоемкий и дорогостоящий процесс, требующий особых условий культивирования фагов, высокой чистоты фаговой ДНК без примесей бактериальной. Наиболее информативным методом может быть только прямое секвенирование фаговой ДНК – метод высокотехнологичный, но дорогой.

Целью исследования являлось выделение, очистка и генотипическая характеристика ДНК бактериофагов *V. cholerae*.

В работе использовали 4 диагностических фага холерных вибрионов,

отобранных из коллекции литических холерных фагов лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, лизирующие холерные вибрионы и устойчивые к коммерческим диагностическим фагам. (табл. 1).

Таблица 1. Характеристика использованных фагов холерных вибрионов

Фаг	Бактериальный штамм-хозяин	Источник выделения	Морфогруппа	Серотип
1	<i>V. cholerae</i>	Внешняя среда (вода)	III	7
6			III	2
7			V	7
M3			III	3

ДНК фагов изолировали согласно методике [5, 6]. Для того, чтобы избавиться от бактериальной ДНК, проводили обработку протеинкиназой К (Serva, Германия).

Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофорезом в 0.7 % агарозном геле или 5 %-ном полиакриломидном геле в аппарате для электрофореза типа «Midget» (Hoefer Scientific Instrument, США) в присутствии маркеров, представляющих собой смесь MspI-гидролизата плазмидной ДНК pUC19 и BglII-гидролизатов ДНК фага λ. Визуализацию ДНК проводили после окрашивания в течение 20 мин в растворе (1 мг/мл) бромистого этидия и фотографировали (фотокамера Кодак).

Количество полученной ДНК рассчитывали путем сравнения с коммерческим препаратом ДНК фага λ известной концентрации (Helicon, США).

Качество полученных препаратов ДНК холерных бактериофагов проверяли в RAPD-анализе (амплификация с универсальными праймерами (табл. 2), в ПЦР со специфическими праймерами (на ompT и ompU – ген холерных вибрионов) и путем характеристики их генома при обработке рестрикционными эндонуклеазами (PstI, Sall, Hind III и др.) (Helicon, США). Амплификацию и гидролиз эндонуклеазами осуществляли согласно рекомендациям фирмы.

Таблица 2. Использованные универсальные праймеры

Праймеры	Структура (нуклеотидная последовательность)	Источник
p1	ACC TCG AGC A	[7]
p21	GGA TCC GAG GGT GGC GGT TCT	[8]
p45	TGA CCG GCA GCA AAA TG	[8]
Ap7	GTG GAT GCG A	[9]
D9A	CTT TCT CCA CGG ATG GGA TGC CAC	[10]

Исследования показали отсутствие бактериальной ДНК штамма-хозяина в полученных препаратах (отсутствие сигнала со специфическими

праймерами). Концентрация препарата ДНК была сопоставлена с коммерческими препаратами ДНК фага λ. При проведении RAPD-анализа все четыре препарата работают с универсальными праймерами, что проявлялось в виде полос различного размера и интенсивности свечения. Информативнее всех оказались праймеры p45 и Ap7. Все препараты ДНК бактериофагов имели индивидуальную картину распределения амплификатов.

Таким образом, отобраны 4 препарата диагностических фагов, выделена и очищена их ДНК. Проведена генотипическая характеристика (паспортизация) каждого из изученных изолятов. Препараты подготовлены для дальнейшего исследования (полногеномного секвенирования).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gaevskaya, N. E. Bacteriophages of pathogenic vibrios, identification, differentiation / N. E. Gaevskaya, T. A. Kudryakova, L. D. Makedonskaya // Bacteriophages an overview and synthesis of a re-emerging field – New York, 2017. – С. 1-30.
2. Каттер, Э. Бактериофаги: Биология и практическое применение Э. Каттер – М.: Научный мир, 2012. – 640 с.
3. Титова, С. В. Современные подходы к мониторингу холеры / С. В. Титова, Э. А. Московина, Е. В. Монахова и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы. - Ростов-на-Дону, - 2015. – Вып. 28. – С. 10-16.
4. Гаевская Н. Е. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры / Н. Е. Гаевская, Л. Д. Македонова // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. - № 12. – С. 849-852.
5. Yamamoto, K.R. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification / K.R. Yamamoto, B.M. Alberts, R. Benzinger, L. Lawhorne, G. Treiber // Virology / - 1970. - Vol. 40, N. 3. – P.734-744.
6. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук - М., 1984. - 458 с.
7. Berche, P. The novel epidemic strain O139 is closely related to the pandemic strain O1 of *Vibrio cholerae* / P. Berche, C. Poyart, E. Abachin et al. // J. Infect. Dis. - 1994. - Vol. 170. - N. 3. - P. 701-704.
8. Булат, С.А. Полимеразная цепная реакция с универсальными праймерами для изучения геномов / С.А. Булат, О.К. Кабоев, Н.В. Мироненко // Генетика. - 1992. -Т. 28, № 5. - С. 19-28.
9. Martiocian, G. PCR ribotyping and arbitrarily primed PCR for the comparison of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis* strains from two Polish university hospital / G. Martiocian A., van Belkum W., van Lecuwen et al. // Clinic. Microbiol. Infect. - 1997. - Vol. 3, № 1. - P. 102-106.
10. Деренко, М. В. Однопраймерный вариант ПЦР-амплификации участков главной некодирующей области митохондриальной ДНК

СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ ГЕНОВ ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ/ПЕРСИСТЕНЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1 / НЕ O139 СЕРОГРУПП

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

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

Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионы) отличаются крайней генетической гетерогенностью, которая выявляется уже на уровне ПЦР-детекции отдельных генов. Однако все изученные нами ранее штаммы, несмотря на существенные различия ПЦР-генотипов, явились возбудителями кишечных инфекций со сходной симптоматикой. Это указывало на «взаимозаменяемость» факторов патогенности [1-3], но не позволяло понять, какие из выявленных у каждого конкретного штамма детерминант являются наиболее вероятными участниками патологических процессов. В связи с высокой пластичностью генома эти детерминанты могли присутствовать, но не узнаваться специфическими праймерами. И наоборот, могли узнаваться поврежденные гены, продукты которых утратили биологическую активность. Поэтому целью настоящей работы явился сравнительный биоинформационный анализ структуры некоторых генов факторов патогенности/персистенции и их продуктов.

Гены идентифицировали с помощью программы BLASTN 2.2.29 в полных геномах, секвенированных нами на платформе MiSeq (Illumina); для анализа генов и их продуктов использовали эту же программу и AlignX (Vector NTI 11). Всего было получено 25 сиквенсов клинических штаммов, наименование и происхождение которых представлены ниже в таблице. В анализ были включены только те гены, для которых удалось определить полные последовательности. Поскольку имеющиеся в базах NCBI геномы НАГ-вибрионов значительно различаются и не могут служить в качестве прототипов, мы использовали детерминанты из генома *V. cholerae* O1 N16961 (NC_002505, NC_002506), и только для анализа гена *chxA* (cholix-токсина) – все полные гены, депонированные в NCBI Awasthi S.P. *et al.* [7].

В рамках данного исследования было проанализировано 10 генов и их продуктов. Результаты суммированы в таблице, из которой видно, что только у токсигенного штамма 16150 9 из 10 генов были полностью

идентичны таковым референс-штамма. Исключение составлял вполне функциональный ген *rtxA*, относящийся, как было показано нами ранее [6], к аллелю 6 (согласно классификации Dolores J., Sachell K.J.F. [8]).

Все остальные, нетоксигенные, обладали различными аллелями изученных генов, в подавляющем большинстве отличными от прототипных. Они содержали множество однонуклеотидных замен (SNP), однако далеко не все оказались миссенс-мутациями, некоторые гены имели также делеции и вставки, приводящие к изменению их длины либо сдвигу рамки считывания и образованию «преждевременных» стоп-кодонов. Поэтому дендрограммы, построенные по результатам AlignX-анализа нуклеотидных последовательностей генов и аминокислотных (aa) последовательностей их продуктов, могли различаться по степени удаленности друг от друга. Учитывая эти обстоятельства, при составлении итоговой таблицы мы ориентировались на белки.

Таблица. Варианты продуктов аллелей 10 генов НАГ-вибрионов

штамм	с/гр	Место и время выделения	RtxA	RtxC	ChxA	«MshA»	PrtV	Cef	HA/P	HapR	ToxR	OmpW
9798	O8	Азовский р-н-69	D		II	nd			nd			nd
6	O5	Батайск-68	D		II							
16	O5	Батайск-68	D		I							
930	н/г	Ростов-68	D		I							
19260	н/г	Таганрог-11	D		I							
912	O45	Веселый-68	D	D	III D						nd	
950	н/г	Ростов-68			I							
9507	O47	Ростов-74			nd						D	nd
12935	O47	Ростов-75	D		I							
9767	O47	Ростов-75			I						D	
9699	O6	Ростов-75			I						D	
9705	O6	Таганрог-75			I						D	
9786	O2	Таганрог-75			I						D	
9771	O2	Ростов-78			nd							
17751*	O8	Ростов-81	D		-							
19063	O27	Таганрог-08			I	D						
19261	н/г	Таганрог-11	D		I		nd					
18470	O82	Элиста-01			I							
9760	O47	Ростов-75	nd		nd	nd		nd	nd			D
19093	O81	Азовский р-н-09	D		nd			nd				
12250	nd	Донецк. обл.-78			-							
18362*	н/г	Узбекистан-87			ID							
18363*	н/г	Узбекистан-87			I							
17449*	O13	Узбекистан-87	nd		-				nd			
16150 [#]	O	Узбекистан-87			-							
N16961	O1	референс			-							
Всего идентифицировано генов			21	25	18	23	24	23	23	25	24	23
Число вариантов продукта			17	12	11	13	17	17	16	4	17	8

Варианты белков в каждой группе выделены разными цветами. nd – интактный ген не удалось найти в полногеномном сиквенсе; - – ген отсутствует

у данного штамма; D – дефективный белок (усеченный либо утративший характерную структуру). Для *ChxA* римскими цифрами обозначены типы, среди каждого из которых имеются разные аллели. *штаммы, содержащие профаг pre-STX; #токсигенный штамм, содержащий профаг STX.

Ген *rtxA*, кодирующий синтез цитотоксина MARTX, был представлен множеством аллелей, существенно отличающихся от прототипа. У штаммов 950, 9507, 9767, 9699, 9705, 9785, 9771, 18470, 18362, 18363 продукты имели «нормальную» длину 4545 aa и сохранили все активные домены (актин-связывающий ACD, цистеиновой протеазы CPD и инактивирующий ГТФазу RID), имеющие 95-99% идентичности таковым референс-штамма. Они сохранились и у штамма 19063 с одним «лишним» aa, и 9771, 12250, 8470, имеющих по 2 «лишних» aa, однако у 12935 белок такой же длины (4547 aa) утратил ACD. Такая же утрата наблюдалась и у штаммов 6, 9798, 16, 930 (4524 aa), 19260 (4343 aa) и 19261 (4230 aa). У штаммов 17751 и 19093 образовались «преждевременные» стоп-кодоны, ORF первого укоротилась до 2019 п.н., второго – до 12132 п.н., и продукты утратили функциональность. Несмотря на то, что для штамма 912 не удалось собрать весь ген целиком, анализ дистального участка показал, что последовательности, кодирующие активные домены, практически отсутствуют. Таким образом, почти у половины изученных штаммов MARTX скорее всего утратил свойственную ему биологическую активность актиномодулятора и не может служить фактором патогенности. Вероятно, некоторые вибрионы «специально» вывели из строя этот высокомолекулярный токсин, продукция и функционирование которого требуют огромных энергетических затрат, и проявляют патогенные свойства за счет других факторов. С другой стороны, такие белки могли приобрести другие домены, что будет проверено в процессе дальнейшего анализа. Во всяком случае Dolores J., Sachell K.J.F. [8] выявили у 2 штаммов O137 и O1 серогрупп измененные варианты MARTX, утратившие ACD, но в результате генных перестроек у первого сформировался домен аденилатциклазы, у второго – потенциальный домен АДФ-рибозилазы.

Гены предполагаемого активатора MARTX *rtxC* характеризовались меньшим разнообразием и имели «нормальную» длину 462 п.н., у 7 штаммов не отличались от прототипа, у остальных имелись SNP, не сопровождавшиеся образованием «преждевременных» стоп-кодонов.

Аллели генов *chxA* – cholix-токсина (рибозилтрансферазы, блокатора белкового синтеза эукариот) большинства изученных штаммов были подробно описаны нами ранее [5]. Они относились к I типу, за исключением одного штамма 912, содержащего усеченный ген *chxAIII* с «преждевременным» стоп-кодоном. В рамках данной работы нам удалось идентифицировать еще несколько *chxAI* и 2 *chxAII* (штаммы 6 и 9798), один из них полностью идентичен таковому индийского штамма

(AB75443), оба, по-видимому, функциональные.

Что касается гена структурной единицы маннозочувствительных пилей адгезии *mshA*, то только у одного штамма, 19093, он имел «нормальную» длину 537 п.н. и 99% идентичности прототипу. У остальных штаммов с прототипом совпадало от 119 до 196 5'-концевых п.н., и тем не менее, у всех были выявлены ORF длиной от 471 до 489 п.н. Blast-поиск в NCBI показал, что такие гены встречаются у ряда штаммов, причем их иногда обозначают как *mshA*, мы же называем их *mshA*-подобными. Функции их продуктов пока неизвестны, возможно, они приобрели какие-то новые свойства, значимые для реализации патогенетического либо персистентного потенциала.

Продукты генов металлопротеазы, фактора персистенции в различных экологических нишах *prtV* (в составе *hly*-локуса), имели «нормальную» длину 918 аа и отличались друг от друга и от прототипа различным числом замен, по-видимому, сохраняя функциональное состояние. Это же можно сказать и о генах *cef* (СНО cell elongating factor) – цитотонического фактора, вызывающего удлинение клеток СНО аналогично холерному токсину, за исключением *cef* штамма 9786 с «преждевременным» стоп-кодоном [4]. Продукты различались по заменам аа, а у некоторых также наличием вставок/делений 1-4 аа. Все это могло повлиять на их активность в сторону повышения или снижения.

Ген *hapA* – гемагглютинин/протеазы (НА/Р), способной в высоких дозах вызывать увеличение проницаемости кишечной ткани, только у штамма 9771 был идентичен прототипу, остальные различались по аа заменам, но дефективных среди не выявлено. Продукты регуляторного гена *hapR* у большинства штаммов были идентичными несмотря на присутствие различных SNP, в основном молчащих мутаций. Отсюда следует, что все штаммы способны к продукции НА/Р, но влияние аа состава белков на их активность предстоит еще выяснить.

Напротив, гены другого глобального регулятора *toxR* отличались большим разнообразием, при этом у 4 штаммов (9705, 9767, 9699, 9786) вследствие сдвига рамки полностью изменили С-концевую аа последовательность, а у одного (9507) однонуклеотидная вставка А-75 привела к «смещению» ORF, потерявшей первые 193 п.н. По всей видимости, эти белки утратили свои регуляторные функции.

Видоспецифичный ген белка наружной мембраны *ompW* примерно у половины штаммов не отличался от прототипа, у других же имелись SNP, делеции и вставки, но полностью дефективный ген был выявлен только у штамма 9760, продукт которого за счет сдвига рамки имел совершенно другой С-конец. Функции этого белка точно не установлены, однако Sengupta Т.К. et al. [9] выявили у НАГ-вибриона сходный с ним белок, который повышал адгезивную активность штамма. Не исключено, что у ряда изученных нами штаммов он также приобрел новые свойства.

Таким образом, не все проанализированные факторы сохранили свои непосредственные функции, что не отразилось на способности штаммов вызывать заболевание. Сочетания аллелей в большинстве случаев не коррелировало ни с происхождением штаммов, ни с их серогрупповой принадлежностью. Одинаковыми продуктами всех генов обладали 4 штамма трех серогрупп, выделенные в 1975 году в Ростове и Таганроге. Еще 3 штамма, выделенные в Батайске, Ростове (1968) и Таганроге (2011) различались только по структуре MARTX, которые у всех утратили свои функции. Два штамма из Узбекистана (1987) различались только по наличию у одного из них усеченного гена *chxAI*. У остальных в основном наблюдались уникальные сочетания, хотя отдельные факторы могли быть одинаковыми на фоне присутствия разных вариантов других. По всей видимости, геномы НАГ-вибрионов имеют мозаичную структуру, которая была бы лучше видна на большей выборке штаммов и генов, что является предметом наших дальнейших исследований. Наличие множественных аллелей каждого гена, вероятно, способствует отбору наиболее конкурентоспособных штаммов и поддержанию популяцией в целом как патогенетического, так и персистентного потенциала.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская, И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп как возбудители кишечных инфекций в Ростовской области и республике Калмыкия / И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, Г.В. Демидова // Актуал. Вопр. инф. патологии: Матер. междунар. форума специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» МЗ РФ. – Краснодар, 2016. – С. 25-27.
2. Архангельская, И.В. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С.25-27.
3. Архангельская, И.В. ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова, М.И. Ежова, В.Д. Кругликов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. специалистов Роспотребнадзора. – Ростов н/Д, 2014. – Вып. 27. – С. 66-70.
4. Монахова, Е.В. Структура и изменчивость генов и белков Cef (CNO cell elongation factor) холерных вибрионов / Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, И.В. Архангельская // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии (48.04) Координационного науч. совета по сан.-эпид. охране территории РФ. – Ростов н/Д, 2015. – Вып. 28. –

C.139-144.

5. Монахова, Е.В. Структура и изменчивость генов и белков cholix-токсина холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп / Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, Р.В. Писанов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. Пробл. комиссии. – Ростов н/Д, 2016. – Вып. 29. – С.131-136.

6. Монахова, Е.В. Особенности структуры генома возбудителей холеры, циркулирующих на территориях России и сопредельных стран / Е.В. Монахова, Р.В. Писанов, С.В. Титова // Молекулярная диагностика-2017: Матер. Всерос. конф. с международ. участием. – М., 2017. – С.325-327.

7. Awasthi, S.P. Novel cholix toxin variants, ADP-ribosylating toxins in *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains, and their pathogenicity / S.P. Awasthi, M. Asakura, N. Chowdury, S.B. Neogi, A. Hinenoya, H.M. Golbar, J. Yamate, E. Arakawa, T. Tada, T. Ramamurthy, S. Yamasaki // Infect. Immun. – 2013. – Vol. 81, No.2. – P. 531-541.

8. Dolores, J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA* null-mutation in recent altered El Tor isolates / J. Dolores, K.J.F. Satchell // mBio. – 2013. – Vol. 4, No.2. – e00624-12.

9. Sengupta, T.K. Characterization of a 20-kDa pilus protein expressed by a diarrheogenic strain of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* // T.K. Sengupta, R.K. Nandy, S. Mukhopadhyay, R.H. Hall, V. Sathyamoorthy, A.C. Ghose // FEMS Microbiol. Lett. – Vol.160, No.2 – P.183-189.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/ НЕ O139 СЕРОГРУПП И БЛИЗКОРОДСТВЕННЫХ ВИДОВ

Замарин А.А., Лопастейская Я.А., Шаров Т.Н., Захарова И.Б.

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

Представители более 80 видов рода *Vibrio* являются одними из самых распространенных микроорганизмов и часто составляют основную часть естественной микрофлоры водных сообществ [8]. Некоторые виды этого рода являются патогенными для людей и морских животных. В последние годы во всем мире отмечается рост заболеваемости, обусловленной вибрионами, включая фатальные острые диарейные

заболевания, такие как: холера, гастроэнтерит, раневые инфекции и сепсис. Полагают, что это увеличение может быть связано с глобальным потеплением и повышением температуры поверхностных вод.

Патогенными для человека являются, по меньшей мере, 12 видов *Vibrio*, включая *V. cholerae*, *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* и *V. vulnificus*. Негалофильные представители рода – *V. cholerae* и *V. mimicus* – естественные обитатели как морских, так и пресноводных экосистем [8]. *V. cholerae* и *V. mimicus* очень близки филогенетически, более того, до его выделения в отдельный вид в 1981 году, *V. mimicus* считался биохимически атипичным вариантом *V. cholerae*, поскольку большинство фенотипических признаков этого организма идентичны *V. cholerae*, и ферментация сахарозы является основным биохимическим признаком, который их дифференцирует [4]. *V. cholerae* содержит более 200 серогрупп, но только представители O1 и O139 серогрупп вызывают вспышки и эпидемии холеры во многих частях мира, особенно в развивающихся странах. Все остальные серогруппы *V. cholerae*, суммированные как неO1/неO139, и штаммы *V. mimicus* обычно связаны с менее выраженными кишечными инфекциями, однако описаны и тяжелые холероподобные диареи, гастроэнтериты, отиты и сепсис [3,5,6]. В России штаммы *V. cholerae* неO1/неO139 обнаруживаются практически во всех водоемах, где проводится мониторинг, тогда как зарегистрированные случаи заражения людей на прилегающих территориях весьма немногочисленны [1]. Возможно, это связано с тем, что штаммы *V. cholerae* неO1/неO139, как правило, не вызывают тяжелых диарей и отдельные случаи заболеваний попадают в группу острых кишечных инфекций, вызванных возбудителями неустановленной этиологии, рост которых на территории Российской Федерации, по данным Роспотребнадзора, в 2016 году составил 5,5% ([www.rosпотребнадzor.ru/activities/statistical-materials](http://www.rosпотребнадзор.ru/activities/statistical-materials)).

Применение рутинных методов биохимической идентификации вибрионов не всегда позволяет надежно дифференцировать такие близкородственные виды как *V. cholerae* неO1/неO139 и *V. mimicus*, а также сходные по основным биохимическим тестам виды *Aeromonas*. Вибрионы, в отличие от *Aeromonas* spp., обычно восприимчивы к вибриостатическому соединению O/129. Однако известно, что некоторые изоляты *V. cholerae* могут быть устойчивыми к этому агенту, а некоторые изоляты аэромонад – чувствительны [2]. Таким образом, для окончательной идентификации и дифференциации этих видов обычно требуется более тщательное биохимическое тестирование.

В последние годы активно исследуется возможность использования в этих целях различных коммерческих систем биохимического анализа, а также MALDI-TOF MS (масс-спектрометрии).

Целью настоящей работы было уточнение видовой принадлежности

штаммов *V.cholerae* неO1/неO139, выделенных в ходе мониторинговых исследований эпидсезона 2016 года из одного места отбора проб, с использованием системы VITEK 2 GN и метода MALDI-TOF масс-спектрометрии.

В работе было исследовано 19 штаммов, идентифицированных бактериологическим методом как *V. cholerae* неO1/неO139.

При проведении MALDI-TOF MS штаммы выращивали на LB агаре 18-24 часа при 37°C. Регистрацию масс-спектров осуществляли на приборе «Axima Confidence» Shimadzu™ с азотным лазером. MALDI TOF масс-спектрометрия - современный метод, который стал активно применяться сравнительно недавно, и для возбудителей III-IV групп патогенности нет стандартной методики пробоподготовки. Предварительная оценка качества масс-спектров и эффективности идентификации изучаемых штаммов при использовании метода прямого нанесения, рекомендованного производителем прибора, и с использованием пробоподготовки с экстракцией белков трифторуксусной кислотой, показала, что пробоподготовка значительно повышает качество получаемых масс-спектров.

Для идентификации изолятов на анализаторе VITEK 2 использовали карты GN в соответствии с протоколом производителя.

Оба использованных метода определили 11 исследованных изолятов как *V. cholerae* неO1/неO139, 4 – как *V. mimicus*. Один штамм системой Vitek 2 GN с формулировкой «отличная идентификация» отнесен сразу к двум видам рода *Aeromonas*: *A. hydrophila/caviae* с возможностью их дифференциации с помощью дополнительных тестов; методом масс-спектрометрии этот штамм идентифицирован не был. Три штамма не были идентифицированы ни одним из методов. Полученные нами результаты коррелируют с данными Rychert J. с соавторами о корректной идентификации как биохимическим (Vitek 2 GN), так и масс-спектрометрическим (Vitek MS) методами 78% штаммов *V.cholerae* неO1/неO139 и 100% *Aeromonas* spp., однако, оба метода позволили определить аэромонады только до уровня рода [7]. При этом корректное определение и вибрионов, и аэромонад методом MALDI TOF MS отмечено только при использовании для культивирования бактерий бессолевой среды МакКонки. При выращивании культур на TCBS агаре (содержание хлорида натрия аналогично агару LB – 10 г/л) доля корректно идентифицированных штаммов *V. cholerae* неO1/неO139 снизилась до 22%, а для *Aeromonas* spp. – до нуля [7].

Несмотря на ограниченное количество исследованных в данной работе штаммов, полученные результаты свидетельствуют о применимости обоих методов для идентификации и дифференциации видов *V.cholerae* неO1/неO139, *V. mimicus* и *Aeromonas* spp. Однако, на наш взгляд, метод биохимической идентификации на автоматическом

анализаторе Vitek 2 имеет некоторые преимущества: не требует специальных сред для культивирования штаммов, кроме того, позволяет получить расширенный спектр биохимической активности изолятов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Монахова, Е.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире / Е.В. Монахова, И.В. Архангельская // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С. 14-23.
2. Abbott, S. L. *Vibrio and related organisms* / S.L. Abbott, J.M. Janda, J.J. Farmer // *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. – American Society of Microbiology, 2011. – P. 666-676.
3. Chitov, T. An incidence of large foodborne outbreak associated with *Vibrio mimicus* / T. Chitov et al. // *Europ. J. Clin. Microbiol. & infect. dis.* – 2009. – Vol. 28, № 4. – P. 421-424.
4. Davis, B.R. Characterization of biochemically atypical *Vibrio cholerae* strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus* / B.R. Davis et al. // *J. clin. microbiol.* – 1981. – Vol. 14, № 6. – P. 631-639.
5. Mala, E. *Vibrio* isolates from cases of acute diarrhea and their antimicrobial susceptibility pattern in a tertiary care hospital / E. Mala, A. Oberoi, V.S. Alexander // *Inter. J. Basic and Appl. Sci.* – 2014. – Vol. 3, № 1. – P. 35-37.
6. Muller, S. *Vibrio Mimicus* as the Rare Cause of Acute Diarrheal Illness / S. Muller, H. Chau, K. Boudreaux // *J. of the Louisiana State Med. Soc.* – 2016. – Vol. 168, № 6. – P. 192-193.
7. Rychert, J. Evaluation of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of *Vibrio cholerae* / J. Rychert et al. // *Journal of clinical microbiology.* – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 329-331.
8. Thompson, F.L. Biodiversity of vibrios / F.L. Thompson, T. Iida, J. Swings // *Microbiology and molecular biology reviews.* – 2004. – Vol. 68, № 3. – P. 403-431.

ИММУНОЛОГИЯ

АЛЬФА-ЕНОЛАЗА И ВАКЦИНАЦИЯ ПРИ ХОЛЕРЕ

Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Иванова И.А.

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

В своей статье, посвященной столетию применения испанским врачом Jaime Ferran y Clua первой живой аттенуированной вакцины против холеры, R.A. Finkelstein [6] выразил сожаление по поводу отсутствия пригодной (a suitable) для использования противохолерной вакцины. Оптимистичный J.B. Karer еще раньше (в 1989 году) уверенно писал о маловероятности того, что очередные 100 лет пройдут без успешного решения вопроса о холерной вакцине. С тех пор прошло более 20 лет, но идеальной вакцины, которая бы удовлетворяла всем требованиям ВОЗ, все еще нет. Между тем неустойчивая эпидемиологическая обстановка по холере в мире и в России определяет необходимость разработки и производства современных и надежных национальных средств специфической иммунопрофилактики холеры. Требуется проведение работ по созданию новых вакцинных препаратов, обеспечивающих одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов холерного вибриона двух серогрупп - O1 и O139 [3]. Существующие оральные холерные вакцины (Ducoral, Shanchol, РосНИПЧИ «Микроб»), включающие убитые клетки вибрионов, показали свою протективную эффективность (65-85 % защиты) в случае системной вакцинации и рассматриваются в качестве дополнительного средства защиты населения, подвергающегося высокому риску инфицирования возбудителем холеры.

В литературе имеются сообщения об использовании белков наружных мембран, везикул, токсин-корректирующих пилей адгезии, «теней», холерогена-анатоксина и других структур возбудителя холеры для нужд специфической профилактики и диагностики этого заболевания [1]. В биологии уже закрепилось понятие мульти/полифункциональных белков (moonlighting proteins), создаются базы данных типа MoonProt Database, включающей информацию о 200 многофункциональных белках, у которых одна полипептидная цепь осуществляет несколько биохимических функций [7]. С общих позиций, мультифункциональность определяется способностью белка выполнять несколько не связанных друг с другом функций / активностей, и инактивация одной из них не отражается на состоянии другой. Полифункциональность позволяет клетке быстро отвечать на изменения окружающей среды через использование

альтернативных подходов для координации нескольких активностей и формирования комплексности из существующих белков без увеличения размеров генома [5].

Уже сейчас препараты рекомбинантных енолаз наряду с глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназой, фруктозо-бис-фосфат альдолазой, глюкозо-6-фосфат изомеразой, стрессовыми белками (шапероны 60 и 70) и др. рассматриваются многими исследователями в качестве кандидатов в будущие вакцины при бруцеллезе, висцеральном лейшманиозе, болезни Чагаса, вибриозах, малярии и др. У холерного вибриона активность α -енолазы описана недавно: удалось показать существование у *Vibrio cholerae* системы активации плазминогена человека в условиях *in vitro*, включающую, как минимум, температурозависимую α -енолазу и мембранный белок OmpT [2]. Активность фермента у вибрионов O1 и O139 серогрупп была выражена достаточно четко (9,2 - 32,5 мкг ФЭП/10⁹ м.к.), как и у представителей иерсиний – у микроба чумы [39,42 (16,56 – 78,18 мкг ФЭП/ 10⁹ м.к. /час)], возбудителя псевдотуберкулеза [44,46 (29,9 – 55,0 мкг ФЭП / 10⁹ м.к. / час)] и *Yersinia enterocolitica* [55,65 (39,72 – 67,49 мкг ФЭП/ 10⁹ м.к. /час)]. По данным биоинформационного анализа, фермент из холерного вибриона проявил неожиданную идентичность на 88,9% (сходство 93%) своей аминокислотной последовательности с α -енолазой из чумного микроба, являющегося модельным при изучении активации плазминогена. Структурное сходство с α -енолазой *Homo sapiens* было меньшим: идентичность - 52%, сходство - 67%. Теоретически это может индуцировать иммунный ответ с перекрестной реактивностью со своими антигенами (феномен антигенной мимикрии патогенов). Однако этого не происходит у большинства здоровых людей – носителей нормальной микрофлоры в кишечнике, легких и ротовой полости, среди членов которых широко распространены высоко консервативные стрессовые белки или ферменты [4]. Предполагается, что причиной тому являются пост-трансляционные модификации (ацетилирование, метилирование, фосфорилирование) белка, которые, ко всему прочему, сообщают ему способность вызывать мощный специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ. В этой связи, разработка вакцинных препаратов нового поколения, а также создание универсальной технологии их производства является важным и перспективным направлением научных исследований [3]. По аналогии с таргетной (от англ. target – цель, мишень) терапией в онкологии, когда рост опухоли блокируется на уровне молекул, использование в качестве мишени действия антител к жизненно важному белку α -енолазе может оказаться полезным для разработки новых биомедицинских технологий по созданию вакцинных препаратов, обеспечивающих одновременную защиту от эпидемически опасных штаммов холерного вибриона различного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Иванова, И.А. Использование поверхностных структур холерного вибриона для специфической профилактики и диагностики холеры / И.А. Иванова, Б.Н. Мишанькин, И.А. Беспалова и др. // Ж. микробиол. – 2017. - № 2 .- С. 110 – 115.
2. Мишанькин, Б.Н. Система активации плазминогена у *Vibrio cholerae* / Б.Н. Мишанькин, О.В. Дуванова, Е.С. Шипко и др. // Ж. микробиол. – 2013. - № 5. – С. 14 – 20.
3. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев и др.// Ж. микробиол. – 2016. - № 1. – С. 89 – 101.
4. Alam, J. Potential role of bacterial infection in autoimmune disease: a new aspect of molecular mimicry / J. Alam, Y. C. Kim, Y. Choi // Immune Network. - 2014. – Vol. 14, № 7. – P. 7 – 13.
5. Cheng, X.-Y. A global characterization and identification of multifunctional enzymes./ X.-Y. Cheng, W.-J. Huang, S.C. Hu et al. // PLoS ONE. – 2012. - Vol. 7. – N 6:e38979.doi: 10.1371/journal.pone. 00038979.
6. Finkelstein, R.A. Why we not yet have a suitable vaccine against cholera? / R.A. Finkelstein // Adv. Exp. Med. Biol. – 1995. – Vol. 371B. – P. 1633 – 40.
7. Mani, M. MoonProt: a database for proteins that are know to moonlight / M. Mani, C. Chen, V. Amblee et al. // Nucl. Acid Res. – 2014. – № 1.- doi: 10. 1093/ nar/ gku954.

ДИАГНОСТИКА И ЛЕЧЕНИЕ

ПОЛИМЕРНЫЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЙ ДИАГНОСТИКУМ ДЛЯ ОЦЕНКИ ТОКСИГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Кочеткова А.П., Сорокин Р.А.,
Ларионова Л.В., Симакова Д.И.

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

Маркером эпидпотенциала холерного вибриона, независимо от принадлежности к серогруппе, является его токсигенность, поэтому большое внимание в настоящее время уделяется созданию диагностических препаратов для выявления холерного токсина, как в качественном, так и в количественном выражении.

О важности этого направления можно судить по объему исследований холерного токсина в США. Центр по контролю и профилактике заболеваний США дает перечень методов для исследований холерного токсина. Это иммуноферментный анализ, иммунофлюоресцентный метод с использованием ганглиозид-GM1-содержащей DASS-системы, реакция коаглютинации с коаггулинирующими диагностикумами, латекс-агглютинация с антиХТ-сывороткой, полимеразная цепная реакция, ДНК-секвенирование. Разработан иммуносенсор, основанный на комбинированном использовании GM1-липосом и антител к холерному токсину в проточной системе с регистрацией сигнала специфической флуоресценции [1, 2, 3, 4]. В настоящее время для выявления генов токсинопродукции холерного вибриона применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), требующий специальных тест-систем, реагентов и специфического оборудования [5].

Для изучения токсинопродукции *V. cholerae* также используется ПЦР-РВ, основанная на оценке количества мРНК после транскрипции соответствующих генов бактериальной клеткой. Данный метод имеет ряд ограничений, поскольку требуются высокоочищенные препараты мРНК без примесей хромосомной ДНК.

Использование биопробных животных дает неоднозначные результаты, так как некоторые нетоксигенные штаммы могут давать сходную картину токсической реакции.

В настоящее время существуют и широко применяются диагностические препараты для определения биологических агентов (антигенов или антител) на основе полимерных окрашенных носителей в

простой и весьма экономичной реакции агломерации [5, 6].

Современные технологии позволяют получать синтетические носители определенных размеров с различными реакционно-способными группами на поверхности частиц, способными фиксировать антигены и антитела, что способствует получению стандартных и стабильных диагностических препаратов. Иммуносуспензионная реакция агломерации объемная (РАО), проводимая при использовании латексных диагностикумов, по сути, является аналогом РНГА, доступным и простым в техническом отношении методом, так как не требует наличия специального оборудования и может быть использована при проведении исследований в полевых условиях [6, 7].

Разработанный авторами полимерный диагностический иммуноглобулиновый антитоксический препарат получен путем сенсibilизации на поверхности полиакролеиновых микросфер (размер $1 \pm 0,1$ микрон) иммуноглобулинов из противохолерной антитоксической кроличьей сыворотки.

Для оценки аналитических характеристик диагностикума использовали культуральные жидкости после подращивания холерного вибриона на жидкой питательной среде. Для этого взвеси холерного вибриона в жидкой питательной среде центрифугировали, надосадочную жидкость исследовали в реакции агломерации объемной (РАО) с холерным полимерным иммуноглобулиновым антитоксическим диагностикумом. В качестве положительного контроля использовали холерный токсин, выделенный и очищенный хроматографически из штамма *V. cholerae* O1 569-B в разведении 1:10 в забуференном физиологическом растворе. В качестве отрицательного контроля использовали препараты холерного липополисахарида и чистую жидкую питательную среду, используемую для выращивания холерного вибриона. Исследуемые в РАО цельные образцы токсигенных (*V. cholerae* 12214, 5879, 569 B) и нетоксигенных штаммов (*V. cholerae* 14863, 18775) холерного вибриона двукратно титровали в 10 лунках планшета. Для определения специфичности диагностикума исследовали цельные и обеззараженные культуральные жидкости *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* и *Enterococcus faecalis*. РАО проводили по общеизвестной методике. Результаты реакции учитывали через 2 часа.

Результаты исследования токсигенности штаммов холерного вибриона в РАО с полимерным иммуноглобулиновым диагностикумом показали, что разработанный авторами диагностический препарат выявляет холерный токсин в токсигенных штаммах в различном титре (1:32 - 1:512), дает отрицательную реакцию с нетоксигенными штаммами, штаммами O139 серогруппы и nonO1/nonO139, а также с образцами гетерологичных культур, препаратами ЛПС и жидкой питательной средой.

Исследование чистого холерного токсина в реакции агломерации

объемной показало, что разработанный диагностический препарат выявляет холерный токсин в концентрации 100 нг/мл. Полученные данные демонстрируют возможность количественной оценки токсинопродукции холерного вибриона после проведения дополнительных исследований аналитических характеристик диагностического препарата.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nato F., Boutonnier A., Rajerison M., Grosjean P., Darteville S. et.al. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples // Clin. Diagn. Lab. Immunol. – 2003. – Vol. 10, № 30. – P. 476-478.
2. Ho J.A., Wu L.C., Huang M.R., Lin Y.J., Boemner A.J. et al. Application of ganglioside-sensitized liposomes in flow injection immunoanalytical system for the determination of cholera toxin // Anal. Chem. - 2007. – Vol. 79, № 1. – P. 246 - 250.
3. Tuteja U., Kumar S., Shukla J., Kingston J., Batra H.V. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA // J. Med. Microbiol. -2007. – Vol. 56, № 10. – P. 1340-1345.
4. 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.
5. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней :Практическое руководство / Под ред. Г.Г. Онищенко, В.В. Кутырева. – М.: ЗАО «Шико», 2013. – 560 с.
6. Ломов Ю.М., Терентьев А.Н., Карбышев Г.Л. Перспективы создания препаратов для индикации возбудителей ООИ и других актуальных инфекций // Матер. IX съезда Всерос. Науч.-практ. общества эпидемиол., микробиол. и паразитол. - М., 2007. - Т. 3. - С. 60-61.
7. Л.В. Ларионова, Симакова Д.И., Люкшина Е.Ю., Наркевич А.Н., Архангельская И.В., Меньшикова Е.А. Применение полимерных антигенных диагностикумов для выявления противохолерных антител в сыворотках крови больных // Заметки ученого. - 2016. - № 2. - С. 78 - 80.

ЭФФЕКТЫ КОМБИНАЦИЙ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР

Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М.

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

В настоящее время штаммы *Vibrio cholerae* с множественной лекарственной устойчивостью превалируют над чувствительными. Для предотвращения развития лекарственной резистентности и воздействия на устойчивую микрофлору широко используют комбинированную химиотерапию.

Ранее нами было показано снижение частоты появления Rif^r и Nal^r мутантов холерного вибриона при сочетанном воздействии антибактериальных препаратов в опытах *in vitro* [1].

Целью настоящего исследования стала оценка чувствительности клинических штаммов *V. cholerae El Tor* к комбинациям антибактериальных препаратов.

Материалы и методы. В работе использовали клинические изоляты *V. cholerae El Tor* (ctxA⁺ tcpA⁺), выделенные в г. Казани в 2001 г. (6 штаммов); г. Москве в 2005, 2010, 2012 гг. (7 штаммов); г. Мурманске в 2006 г. (1 штамм). Штаммы получены из Музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) стрептомицина, триметоприма / сульфаметоксазола, налидиксовой кислоты, ципрофлоксацина, фуразолидона, цефтриаксона, полимиксина и их комбинаций между собой определяли методом «шахматной доски» [2], используя серийные разведения антибактериальных препаратов в плотной питательной среде в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [3]. Выбор комбинаций осуществляли по правилам рациональной комбинированной антимикробной химиотерапии [4].

Для оценки взаимодействия антибактериальных препаратов использовали фракционный индекс ингибиции (FIX), который вычисляли по формуле:

$$FIX = FIC (\text{одного антибиотика}) + FIC (\text{второго антибиотика}),$$

где FIC - фракционная ингибирующая концентрация исследуемого антибиотика, которую рассчитывали как отношение величины МПК антибиотика в комбинации к МПК этого антибиотика отдельно.

Результаты вычислений FIX интерпретировали согласно шкале [5]:

- <0,5 синергизм,
- 0,5-4 индифферентность,
- >4 антагонизм.

Результаты исследования.

Антибиотикограммы клинических изолятов *V. cholerae El Tor*, выделенных в 2001-2014 гг., показали устойчивость этих культур к налидиксовой кислоте, триметоприму / сульфаметоксазолу, фуразолидону, стрептомицину, полимиксину, что ограничивает применение этих препаратов при холере (таблица).

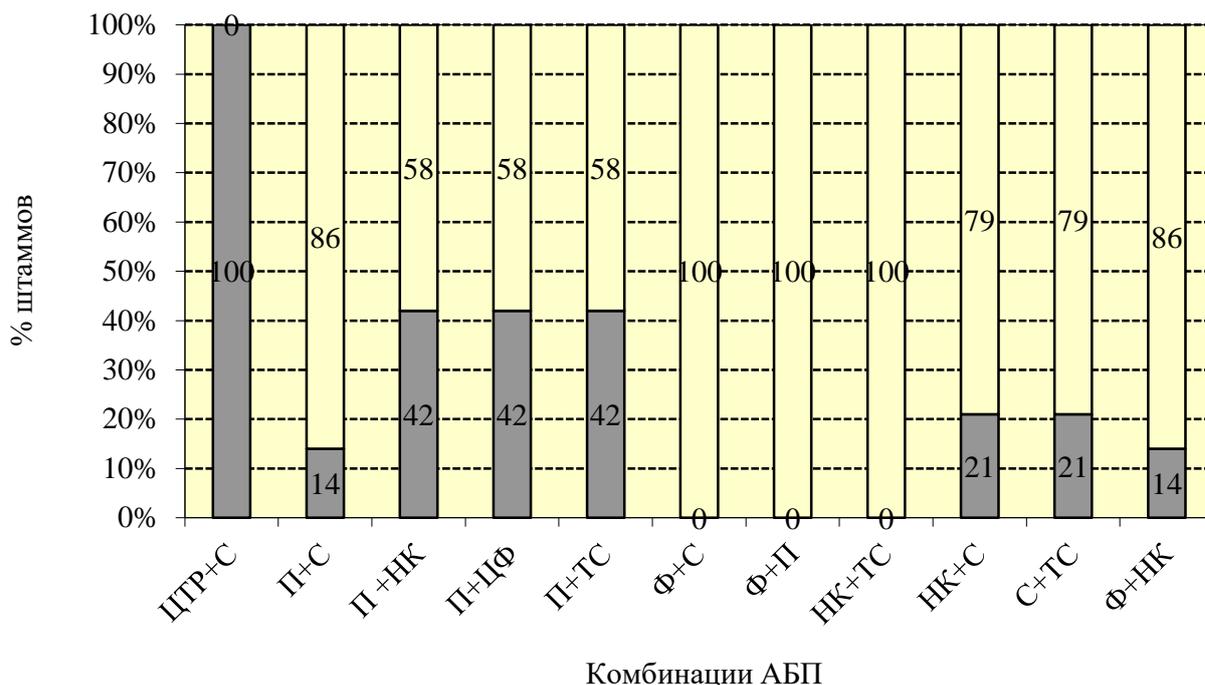
Таблица. Значения МПК штаммов *V. cholerae El Tor*, выделенных от людей в Российской Федерации в 2001-2012 гг.

Антибактериальный препарат	Пограничные значения МПК, мг/л**		Контрольные штаммы		<i>V. cholerae El Tor</i>
	S*	R*	P-9741	P-5879	
Диапазон значений, МПК, мг/л					
Доксициклин	≤ 2	≥ 4	0,25	0,25	0,25-0,5
Тетрациклин	≤ 4	≥ 8	1	1	0,5-1
Левомецетин	≤ 4	≥ 16	2	2	2-4
Налидиксовая кислота	≤ 4	≥ 16,0	2	1	64-256
Ципрофлоксацин	< 0,1	≥ 1	0,001	0,001	0,02-0,5
Стрептомицин	≤ 16	≥ 32	4	2	64-128
Канамицин	≤ 16	≥ 32	16	8	4-8
Гентамицин	≤ 4	≥ 8	2	0,5	2-4
Ампициллин	≤ 4	≥ 16	4	2	4-8
Цефтриаксон	< 1	≥ 4	0,04	0,01	1-2
Рифампицин	≤ 4	≥ 16	2	1	1-4
Фуразолидон	≤ 4	≥ 16	2	2	16-64
Триметоприм/ сульфаметоксазол	≤ 2/ 38	≥ 8/ 152	1/ 5	2/ 10	64/320 -128/640
Полимиксин	≤ 2	> 2	4	256	16-64

Примечание: *S - чувствительный; R - устойчивый; ** - пограничные значения МПК (МУК 4.2.2495-09).

Расчет коэффициентов F_{IX}, проведенный на основании определения чувствительности холерных вибрионов к комбинациям антибактериальных препаратов, позволил выявить два типа действия: синергидный либо индифферентный, при отсутствии антагонистического.

На рисунке представлено распределение штаммов по действию на них комбинаций антибактериальных препаратов.



■ синергидный эффект □ индифферентный эффект

АБП – антибактериальный препарат; ЦТР – цефтриаксон; С – стрептомицин; П – полимиксин;
 Ф – фуразолидон; ТС – триметоприм / сульфаметоксазол; НК – налидиксовая кислота;
 ЦФ – цiproфлоксацин

Рисунок. Типы действия разных комбинаций антибактериальных препаратов в отношении *V. cholerae El Tor*.

Из исследованных сочетаний антибактериальных препаратов наибольшую антимикробную активность проявила комбинация β -лактамоного антибиотика цефтриаксона и стрептомицина (синергидный эффект для 100% штаммов). В литературе описана также эффективность в отношении представителей рода *Vibrio* и других грамотрицательных бактерий комбинаций β -лактамов с фторхинолонами и с миноциклином, цiproфлоксацина с триметопримом [6-9].

Налидиксовая кислота, цiproфлоксацин и триметоприм / сульфаметоксазол совместно с полимиксином оказали синергидный эффект в отношении 42% штаммов вибрионов. В настоящее время комбинации антибактериальных препаратов с полимиксином являются перспективными для лечения инфекций, обусловленных грамотрицательными мультирезистентными бактериями [10]. Налидиксовая кислота способна восстанавливать чувствительность микроорганизмов к полимиксину за счет нарушения синтеза ферментов, инактивирующих этот антибиотик [11].

Таким образом, исследованные клинические штаммы *V. cholerae El Tor* обладают множественной антибиотикорезистентностью, спектр которой включает налидиксовую кислоту, триметоприм /

сульфаметоксазол, фуразолидон, стрептомицин, полимиксин. Комбинации этих антибактериальных препаратов между собой обладают индифферентным либо синергидным действием, что необходимо учитывать при их назначении в клинике. Наиболее активным является сочетание цефтриаксона и стрептомицина. Использование комбинаций антибактериальных препаратов позволяет предотвратить возникновение и распространение устойчивых штаммов, снизить лечебную дозу препаратов и их побочные эффекты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шутько, А.Г. Изучение влияния субингибирующих концентраций антибактериальных препаратов на частоту появления мутантов *Vibrio cholerae* eltor, устойчивых к рифампицину и налидиксовой кислоте / А.Г. Шутько, Р.И. Цураева, И.В. Рыжко, Ю.М. Ломов, Н.Е. Гаевская, Н.А. Дудина, Е.Ю. Скалыга // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2001. – Вып. 14. – С. 65.
2. Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them / F.C. Odds // J. Antimicrob. Chemother. – 2003. - Vol. 52, № 1. – P. 1.
3. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам. Методические указания 4.2.2495-09 – М., 2009. - 59с.
4. Ребенок Ж.А. Рациональная антибиотикотерапия: Инструкция по применению. – Минск, 2003. - 24 с.
5. Takashi, S. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted malassezia species / S. Takashi, T. Mami, I. Tomonobu et al. // J. Clin. Microbiol. - 2005. - Vol. 43. - P. 2824-9.
6. Kim, D.M. In vitro efficacy of the combination of ciprofloxacin and cefotaxime against *Vibrio vulnificus* / D.M. Kim, Y. Lym, S.J. Jang, H. Han, Y.G. Kim, C.H. Chung, S.P. Hong // Antimicrob Agents Chemother. - 2005. - Vol. 49, № 8. – P. 3489 - 3491.
7. Jang, H.C. In vivo efficacy of the combination of ciprofloxacin and cefotaxime against *Vibrio vulnificus* sepsis / H.C. Jang, S.M. Choi, H.K. Kim, S.E. Kim, S.J. Kang, K.H. Park, P.Y. Ryu, T.H. Lee, Y.R. Kim, J.H. Rhee, S.I. Jung, H.E. Choy // PLoS One. - 2014. - Vol. 9, № 6: e101118. doi: 10.1371.
8. Su, B.A. In vitro antimicrobial effect of cefazolin and cefotaxime combined with minocycline against *Vibrio cholerae* non-O1 non-O139 / B.A. Su, H.J. Tang, Y.Y. Wang, Y.C. Liu, W.C. Ko, C.Y. Liu, Y.C. Chuang // J. Microbiol. Immunol. Infect. - 2005. - Vol. 38, № 6. – P. 425 - 429.
9. Mandal, S. Antibacterial activity of ciprofloxacin and trimethoprim, alone and in combination, against *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor serotype

Ogawa isolates / S. Mandal, N.K. Pal, I.H. Chowdhury, M. Debmandal // J. Microbiol. - 2009. - Vol. 58, № 1. P. 57 - 60.

10. Ni, W. In vitro effects of tigecycline in combination with colistin (polymyxin E) and sulbactam against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* / W. Ni, J. Cui, B. Liang, Y. Cai, N. Bai, X. Cai, R. Wang // J. Antibiot (Tokyo). 2013. - Vol. 66, № 12. - P. 705 - 708.

11. Дебабов, Д.В. Устойчивость к антибиотикам: происхождение, механизмы, подходы к преодолению / Д.В. Дебабов // Биотехнология. – 2012. - № 4. - С. 7 - 17.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ МОДЕЛЬ ЭТИОТРОПНОЙ ТЕРАПИИ В ОТНОШЕНИИ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ИНФЕКЦИИ У БЕЛЫХ МЫШЕЙ

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Селянская Н.А., Егиазарян Л.А.,
Погожова М.П.

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

Седьмая пандемия холеры, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, является более продолжительной по времени и масштабная по охвату числа стран всех континентов мира по сравнению с шестью предыдущими [1]. Эпидемиологическая обстановка по холере на современном этапе признана серьезной проблемой для мирового здравоохранения [2].

Сложившиеся условия глобальной резистентности бактериальных возбудителей к антибиотикам заставили исследователей во многих странах мира обратить свое внимание на бактериофаги, как антибактериальные агенты с высоким потенциалом [3].

Бактериофаги – уникальные микроорганизмы, на основе которых создана особая по своим свойствам и характеристикам группа лечебно–профилактических препаратов. Лежащие в основе их действия природные физиологические механизмы взаимодействия фагов и бактерий позволяют прогнозировать бесконечное разнообразие как самих бактериофагов, так и возможных способов их применения [4]. Преимуществом бактериофагов является их способность поражать как чувствительные, так и полиантибиотикорезистентные клетки возбудителя [5].

Спектры активности фагов обычно очень узки и ограничены одним или несколькими близкородственными видами бактерий. Такая узкая

специфичность хороша для терапии, поскольку позволяет элиминировать конкретный микроорганизм, не оказывая влияния на микробиоту человеческого организма. С другой стороны, при необходимости экстренной терапии необходимо иметь препарат, поражающий сразу несколько видов бактерий - возможных возбудителей инфекционного заболевания. Для решения этой проблемы обычно используют комплексные препараты, содержащие несколько фагов разной специфичности [6].

В связи с этим целью нашей работы было отобрать *in vitro* из коллекции бактериофагов лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора подходящие холерные фаги для профилактики и этиотропной терапии холеры, проверить эффективность их свойств *in vivo*.

В результате нашей работы *in vitro* были отобраны холерные бактериофаги №1 и №6 с широким спектром литического действия, лизирующие вибрионы O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor, из которых была приготовлена смесь 1:1.

Изучение свойств бактериофагов проводили общепринятыми методами [7]. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (рН 7,6-7,8).

При отборе холерных фагов для лечения и профилактики возбудителя холеры мы учитывали следующие показатели: максимально высокую репродуктивную активность в отношении холерных вибрионов, специфичность литического действия, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

По данным электронно-микроскопического исследования холерные бактериофаги № 1 и № 6 относились к III морфогруппе и типу семейства Podoviridae [8], но к разным серологическим типам холерных фагов № 1 – к 7, а № 6 – к 2 [9].

Специфичность фагов в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств Vibrionaceae, Pseudomonadaceae, Enterobacteriaceae.

В опытах *in vivo* использовали штамм *V. cholerae* El Tor 19243, устойчивый к стрептомицину, фуразолидону, триметоприму/сульфаметоксазолу, налидиксовой кислоте.

Для оценки эффективности профилактического и лечебного применения фага *in vivo* на модели генерализованной формы инфекции беспородных белых мышей заражали внутрибрюшинно взвесью 18-часовой агаровой культуры (37°C) холерного вибриона в 0,3% агаризованном 0,9% растворе хлорида натрия в дозе 10^8 м.кл. в объеме 0,2 мл.

Фаговую смесь вводили перорально в концентрации $n \cdot 10^{-9}$ - $n \cdot 10^{-10}$

БОЕ/мл один раз в сутки в течение 3 суток перед заражением (профилактика), либо одновременно с заражением с последующим трехдневным введением один раз в сутки (лечение), а также по три дня до и после заражения (профилактика с лечением).

Сравнительное изучение эффективности фагов осуществляли в одном опыте, количество опытов было не менее двух при числе животных в группе не менее 10. Наблюдение за животными осуществляли в течение 10 дней. Проводили бактериологический контроль заражения и эффективности лечения. Опыт учитывали при 100% гибели контрольных (нелеченых) животных. Статистическую обработку данных проводили по таблице А.Я. Боярского (1955).

Профилактическое применение бактериофагов перед заражением защищало от развития инфекционного процесса $70\pm 21\%$ животных. Лечение фагами самостоятельно, а также на фоне фагопрофилактики не уступало действию эффективных антибактериальных препаратов ($90\pm 14\%$ выживших животных).

Таким образом, в работе проведена сравнительная оценка применения *in vivo* фаговой смеси в отношении антибиотикорезистентного штамма *V. cholerae* El Tor 19243 на модели генерализованной формы инфекции у белых мышей, вызванной холерными вибрионами. Эксперимент показал высокую эффективность применения данной фаговой смеси для её профилактического и лечебного использования (более 70% выживших животных).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, О.Л. Адаменко, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов // Вестник РАМН.- 2015; Т. 70, № 2. - С. 249–256.
2. Москвитина Э.А. Эпидемиологические особенности холеры на современном этапе седьмой пандемии / Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, О.А. Арешина, О.Л. Адаменко, А.А. Назаретян, Г.Б. Анисимова // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2014. - Т. 19, № 4. – С. 44–49.
3. Асланов Б.И. Бактериофаги – эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б.И. Асланов // Медицинский совет. - 2015. - № 13. – С. 106-109.
4. Захаренко С.М. Бактериофаги: Современные аспекты применения, перспективы на будущее / С.М. Захаренко // Медицинский совет. СПб, 2013. - №10. - С. 72-74.
5. Бондаренко В.М. Новые горизонты бактериофаготерапии / В.М. Бондаренко // Бюллетень Оренбургского научного центра УрО РАН (электронный журнал). - 2013. - №4. – С. 1-12.
6. Тикунова Н.В. Бактериофаги-враги наших врагов / Н.В.

Тикунова, В.В. Власов // Человек. - 2013. – С. 59-69

7. Адамс М. Бактериофаги / М. Адамс. – М., 1961. - 522с.

8. Каттер Э. Бактериофаги: биология и практическое применение / Э. Каттер, А. Сулаквелидзе. – М., 2012. – 636 с.

9. Gaevskaya N.E. Bacteriophages of pathogenic vibrios, identification, differentiation / N.E. Gaevskaya., T.A. Kudryakova, L.D. Makedonskaya // Bacteriophages an overview and synthesis of a re-emerging field – New York, 2017. – С. 1-30.

ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА БИОВАРА ЭЛЬ ТОР И РАЗРАБОТКА ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ

Савельева И.В., Куличенко А.Н., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Савельев В.Н.

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ставрополь*

Возбудителем седьмой пандемии холеры на протяжении более полувека продолжает оставаться *Vibrio cholerae O1 biotype El Tor*, геном которого подвержен эволюционным преобразованиям. Так, начальный период седьмой пандемии холеры (весна 1961 г. - октябрь 1962 г.) обязан холерному вибриону Эль Тор, гемолизположительному, открытому в 1905 г. F. Gotschlich. [1]. Экспансия гемолитических вибрионов Эль Тор продолжалась до октября 1962 г., когда в Ириане (запад Новой Гвинеи) возникла эпидемия холеры (заболело 1297 человек с высоким уровнем летальности – 35,8 %), возбудителем которой оказался холерный вибрион, потерявший способность гемолизировать эритроциты барана (Hly⁻). Утрата способности продуцировать гемолизин – это результат изменений, произошедших в геноме холерного вибриона Эль Тор в первый год течения седьмой пандемии. Новый вариант вибриона Эль Тор был назван *Vibrio El Tor var. anhaemolyticus* [3]. Его геном содержит гены оперона *ctxAB*, кодирующего синтез термолабильного экзотоксина – главного патогенетического фактора холеры Эль Тор. Типичные токсигенные вибрионы Эль Тор (*V. cholerae O1 biotype El Tor, Hly⁻, ctxA⁺*) более устойчивы к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, чем классические, что объясняется присутствием в геноме дополнительных блоков генов, обеспечивающих высокий уровень адаптации к меняющимся условиям окружающей среды: островков патогенности (VPI-I,II) и пандемичности (VSP-I,II) [2,4,7], и явились

этиологическим фактором холеры в Азии (1961-1969 гг.); в (Азии, Африке, Европе, США, Океании (1970-1980 гг.); в Азии, Африке, Европе, США, Океании, Австралии (1981-1990 гг.). В начале 90-х годов прошлого столетия появились штаммы холерного вибриона O1 серологической группы с типичными фенотипическими признаками биовара Эль Тор, но продуцирующие классический тип энтеротоксина (СТ-1) и с фенотипическими признаками биоваров Эль Тор и классического, также с продукцией энтеротоксина классического типа (СТ-1). Изоляты *V. cholerae* O1 с генотипическими признаками обоих биоваров получили название генетически измененные (геноварианты) или гибридные варианты биовара Эль Тор [5,6], и они являются доминантными этиологическими агентами современного этапа развития седьмой пандемии холеры Эль Тор, начавшегося в 90-е годы XX столетия, а в первые два десятилетия XXI века получившие глобальное распространение. Эволюционные преобразования типичного токсигенного биовара Эль Тор в гибридный вариант сопровождались изменениями структуры генов токсигенности коровой области профага CTX₀ и профага RS1, что необходимо учитывать при конструировании новых ПЦР-тест-систем.

Цель работы. Определить ключевые гены токсигенности, подвергнувшиеся изменениям в процессе эволюции генома типичного холерного вибриона биовара Эль Тор, и сконструировать ПЦР-тест-систему для идентификации штаммов *V. cholerae* O1 с определением биовара и дифференциацией биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов.

Материалы и методы. В работе использованы реагенты: H₂O (РНК-элюент) – прозрачная бесцветная жидкость; дНТФ10х – прозрачная бесцветная жидкость; ПЦР-смесь-Class. – лиофильно высушенный порошок, при растворении которого – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к генам *ctxB^{CL}*, *rstR^{CL}*; ПЦР-смесь – El Tor – лиофильно высушенный порошок, при растворении которого – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к генам *ctxB^{EL}*, *rstR^{EL}*, *rstC*; воск для ПЦР – плотная молочно-белая масса; ПЦР-смесь 2 red – прозрачная красного цвета жидкость, содержащая полимеразу; минеральное масло для ПЦР – маслянистая прозрачная жидкость; ПКО+Class-лиофильно высушенный порошок, при растворении которого – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая ДНК *V. cholerae classical 569B*; ПКО+ El Tor – лиофильно высушенный порошок, при растворении которого – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая ДНК *V. cholerae El Tor 484 Cm*. Для изучения специфичности, специфической активности и чувствительности разработанной тест-системы использованы гомологичные штаммы: штаммы *V. cholerae* O1 стандартного образца ФГУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора СО

002 – 9388–2010 «Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики холеры –35 штаммов, *V. cholerae non O1* – 6 штаммов, гетерологичные штаммы – 6 (*Shigella zonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli*). Праймеры к генам $ctxB^{CL}$, $rstR^{CL}$, $ctxB^{EL}$, $rstR^{EL}$, $rstC$ [5].

Результаты и обсуждение. В качестве ключевых генов токсигенности, подвергнувшихся изменениям в процессе эволюции генома типичного холерного вибриона биовара Эль Тор, использовали гены коровой области профагов CTX_{ϕ}^{Class} ($ctxB^{Class}$, $rstR^{Class}$), CTX_{ϕ}^{Eltor} ($ctxB^{Eltor}$, $rstR^{Eltor}$) и RS1($rstC$).

Определение биовара классического холерного вибриона основывалось на использовании праймеров к генам $ctxB^{Class}$, $rstR^{Class}$, а биовара Эль Тор – праймеров к генам $ctxB^{Eltor}$, $rstR^{Eltor}$ и $rstC$, который характерен для холерных вибрионов биовара Эль Тор. Аллель гена $ctxB$ определяли в МАМА ПЦР (Mismatch Amplification Mutation Assay PCA), предложенной М. Morita et al. (2008), основанной на использовании праймеров, несущих на одном конце специфический для каждого аллеля нуклеотид. В связи с этим мультиплексную ПЦР проводили в один прием, но в двух реакционных смесях. В одну пробирку вносят ПЦР - смесь - El Tor (праймеры для амплификации фрагментов генов $ctxB^{Eltor}$, $rstR^{Eltor}$ и $rstC$); во вторую – ПЦР - смесь - Class (праймеры для амплификации фрагментов генов $ctxB^{Class}$ и $rstR^{Class}$). Для проведения двух реакций отбирают необходимое количество пробирок объемом 0,6 мл, соответствующих числу исследуемых проб и ОКВ и по 3 пробирки для двух положительных и отрицательного контролей. В двух отдельных микропробирках объемом 0,6 мл готовят реакционные смеси № 1 и № 2.

Реакционную смесь № 1 готовят, внося в микропробирку:

2 мкл H₂O (РНК-элюент) x (N+1), 4 мкл дНТФ x (N+1), 0,8 мкл ПЦР-смеси-El Tor x (N+1), где N – необходимое количество реакций (пробирок). Готовую смесь перемешивают на центрифуге-встряхивателе и переносят по 6,8 мкл в подготовленные микропробирки объемом 0,6 мл (количество исследуемых проб) и в 3 пробирки для двух положительных и отрицательного контролей.

Реакционную смесь № 2 готовят, внося в микропробирку:

2 мкл H₂O (РНК-элюент) x (N+1), 4 мкл дНТФ x (N+1), 0,8 мкл ПЦР-смеси-Class x (N+1), где N – необходимое количество реакций (пробирок). Готовую смесь перемешивают на центрифуге-встряхивателе и переносят по 6,8 мкл в подготовленные микропробирки объемом 0,6 мл (количество исследуемых проб) и в 3 пробирки для двух положительных и отрицательного контролей.

Рабочая схема постановки ПЦР:

Смесь № 1. Эль Тор (1 проба, 3 контроля – всего 4 пробирки;
6 проб, 3 контроля – всего 9 пробирок)

	H ₂ O	dNTP	ПЦР-смесь-El Tor	Затем	Воск 2 red	ДНК	H ₂ O	Контроли		
								ПКО El Tor, Class	Масло	
1 пр.:	2x4	4x4	0,8x4		10	10	10	10	10	1 капля
10 пр.:	20	40	8		10	10	10	10	10	1 капля

Смесь № 2. Classical (проба, 3 контроля – всего 4 пробирки;
6 проб, 3 контроля – всего 9 пробирок)

	H ₂ O	dNTP	ПЦР-смесь-Classical	Затем	Воск 2 red	ДНК	H ₂ O	Контроли		
								ПКО El Tor, Class	Масло	
1 пр.:	2x4	4x4	0,8x4		10	10	10	10	10	1 капля
10 пр.:	20	40	8		10	10	10	10	10	1 капля

Общий объем смеси №1 и № 2 на 10 проб = 68 мкл, тогда в каждую пробирку (6 проб, 3 контроля) нужно будет внести 68 мкл:10 = 6,8 мкл.

Затем во все микропробирки, соответственно, со смесями № 1 и № 2, вносят 10 мкл расплавленного в термотельном термостате при 70°C воска для ПЦР, а после его застывания на поверхности смесей вносят последовательно 10 мкл ПЦР-смесь 2 red, 10 мкл ДНК исследуемой пробы, 1 каплю минерального масла. В микропробирки «отрицательный контроль (К–)» вносят 10 мкл H₂O «очищенную или РНК – элюент», в микропробирки для положительных контролей вносят, соответственно, по 10 мкл ДНК из пробирки ПКО + El Tor или из пробирки ПКО + Class.

Подготовленные таким образом микропробирки помещают в термоциклер «Терцик» (ДНК-технология, Россия) и запускают программу – режим амплификации Fast: предварительная денатурация – 96°C, 2 мин, затем 25 циклов при 96°C, 10 сек, отжиг праймеров – 59°C, 10 сек, синтез комплементарной цепи при 72°C, 30 сек. Заключительный этап амплификации – достройка цепи при 72°C, 5 мин.

Регистрацию результатов ПЦР осуществляют методом электрофореза в 2% агарозном геле с использованием коммерческого набора «ЭФ» («Интерлабсервис») и проводят в соответствии с инструкцией к набору. Электрофорез проводят при напряжении 10 В/см в течение 30-35 минут. Визуализацию гелей осуществляют в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе «Gel Doc TM XR» с видеодокументированием результатов с помощью программы Quantity One (Bio-Rad, США). Для определения размеров ампликонов используют DNA Ladder 100.

Результаты ПЦР-анализа исследуемых проб подлежат учету при отрицательном контроле (К–) (специфические полосы ампликонов к генам реакционных смесей 1 и 2 отсутствуют) и двух положительных контролей ПКО + El Tor и ПКО + Class (наличие специфических полос ампликонов к генам типичного холерного биовара Эль Тор и классического биовара).

Далее учитывают наличие (или отсутствие) на электрофореграмме

специфических полос амплифицированной ДНК исследуемых проб.

Учет результатов идентификации и дифференциации штаммов *V. cholerae* проводят в соответствии с протоколом:

Пробы	Реакционные смеси					Результат	
	№ 1			№ 2		Вариант	Генотип
	ctxB ^{EI} 186п.н.	rstR ^{EI} 50п.н.	rstC 224п.н.	ctxB ^{CI} 186п.н.	rstR ^{CI} 501п.н.		
ОКВ, К –	–	–	–	–	–	–	–
ПКО – Class	–	–	–	+	+	Биовар классический	I (ctxB ^{CI} , rstR ^{CI})
ПКО–EI Tor	+	+	+	–	–	Биовар Эль Тор типичный	II (ctxB ^{EI} , rstR ^{EI} , rstC)
ДНК, № пробы	–	+	+	+	+	Биовар Эль Тор гибридный	III (ctxB ^{CI} , rstR ^{CI} , rstR ^{EI} , rstC)
ДНК, № пробы	–	+	+	+	–	Биовар Эль Тор гибридный	IV (ctxB ^{CI} , rstR ^{EI} , rstC)
ДНК, № пробы	–	–	+	+	+	Биовар Эль Тор гибридный	V (ctxB ^{CI} , rstR ^{CI} , rstC)
ДНК, № пробы	–	+	–	+	+	Биовар Эль Тор гибридный	VI (ctxB ^{CI} , rstR ^{CI} , rstR ^{EI})

Обозначения: ОК – отрицательный контроль; ПКО+Class – положительный контроль образца (классического биовара); ПКО+EI Tor – положительный контроль образца (биовара Эль Тор).

Таким образом, сконструированный набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант ctxB- rstR- rstC, РЭФ» позволяет идентифицировать токсигенные штаммы холерных вибрионов, определять биовар (Classical или EI Tor), дифференцировать типичные токсигенные штаммы биовара Эль Тор и генетически измененные варианты холерных вибрионов биовара Эль Тор. Кроме того данная тест-система в отличие от ПЦР-тест-системы «Ген *Vibrio cholerae* вариант ctxB-РЭФ» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, позволяет выявлять генотипы генетически измененных штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, что важно для эпидемиологического слежения за развитием холерной эпидемии.

Специфичность разработанного набора подтверждена при анализе ДНК 35 штаммов *V. cholerae* O1, 6 штаммов *V. cholerae non O1*, и 6 гетерологичных штаммов (*Shigella zonnei*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Esherichia coli*).

ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант ctxB- rstR- rstC, РЭФ» может быть использована также для мониторинга появления ключевых генов токсигенности, кодирующих энтеротоксин, в геноме штаммов микроорганизмов вида *V. cholerae* различных серогрупп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gotschlich, F. Über cholera - und choleraähnliche Vibrionen unter den ans Mekka zuzukkehrenden Pilgern / F. Gotschlich // Ztschr. Hyg. and

Infektr. - 1906. – Vol. 55. - P. 30-34.

2. De Haan, L. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms / L. De Haan, T.R. Hirst // Mol. Membr. Biol. – 2004. – Vol. 21, N 2. – P. 77-92.

3. De Moor, C.E. A non-haemolytic El Tor *Vibrio* as the cause of an outbreak of paracholera in West New Guinea. The El Tor problem paracholera in the West Pacific / C.E. De Moor // Trop. a. Geograph. Med. – 1963. - Vol. 15., N 2. – P. 97-107.

4. Dziejman, M. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and handemic disease / M. Dziejman, E. Balon, D. Boyd et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. - Vol. 99, N 3. - P. 1556-1561.

5. Morita, M. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor / M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakava et al. // Microbiol. Immunol. – 2008. – Vol. 52. – P. 314-317.

6. Nair, G.B. Cholerae due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh / G.B. Nair, F. Qadri, J. Holmgren // J. Clin. Microbiol. – 2006, Vol. 44. - P. 4211.

7. Pradhan, S. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype / S. Pradhan, A.K. Baidya, A. Ghosh et al. // J. Bacteriol. – 2010. – Vol. 192, N 4. – P. 955- 963.

ПРИМЕНЕНИЕ ТРАНСПОРТНЫХ СРЕД И СРЕД, СОДЕРЖАЩИХ ИНГИБИТОРЫ РОСТА ПОСТОРОННЕЙ МИКРОФЛОРЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ

Ярымбаш Е.Г., Пидченко Н.Н., Зинич Л.С., Тихонов С.Н.

*ФГКУЗ Противочумная станция «Республики Крым» Роспотребнадзора,
г. Симферополь*

При плановом эпиднадзоре за холерой в условиях односменной работы баклабораторий возникает необходимость вместе с ингибированием роста сопутствующей микрофлоры увеличить время роста холерных вибрионов. Поэтому, наряду со средами, содержащими теллурит калия, целесообразно применять в качестве транспортных сред коммерческие среды, зарегистрированные в РФ. Для пролонгирования роста вибрионов и угнетения роста сопутствующей микрофлоры можно

инкубировать одну из двух сред накопления при комнатной температуре (18-25°C), применять среды с добавлением моющего средства «Прогресс», а также первую среду накопления использовать с повышенным рН.

1. Инкубация проб при комнатной температуре. Пробы отбирают в транспортную 1% пептонную воду без теллурита калия в объеме 5-10 мл, во флаконах или пробирках и сохраняют при комнатной температуре до 24 ч. Эта транспортная среда засеивается в первую среду накопления в полном объеме.

Действующие в РФ нормативные документы при исследовании материала на патогенные вибрионы позволяют одну из двух сред накопления рН 8,4±0,1 инкубировать при комнатной температуре до 24 ч. Это дает возможность при исследовании материала от людей посева, доставленные в течение 24 часов, в объеме 50 мл считать первой средой накопления, что сокращает количество этапов исследования.

2. Использование 1% пептонной воды с рН 9,5±0,5.

В условиях односменной работы лаборатории можно использовать 1% пептонную воду рН 9,5±0,5 в качестве первой среды накопления. Практический опыт свидетельствует, а группой специалистов ФКУЗ «Ставропольский ПЧИ» Роспотребнадзора подтверждено экспериментально, что срок инкубации при этом можно установить 18-48 ч., а время пересева с 1% пептонной воды рН 8,4±0,1 через 4-8 ч (в зависимости от наличия роста).

При исследовании материала от больных с подозрением на заболевание холерой, когда нужно получить результат в кратчайшие сроки, в качестве транспортных и накопительных сред на всех этапах необходимо применять 1% пептонную воду рН 8,4±0,1 без теллурита калия (применение моющего средства «Прогресс» на сроки исследования не влияет).

3. Использование других транспортных сред (коммерческих транспортных систем), зарегистрированных в РФ и пригодных для культивирования бактерий рода *Vibrio*, например, среды Кэри-Блэйра:

- предназначена для бактериологических (традиционный и автоматизированный посев), культуральных и молекулярных методов исследований, 2 мл жидкой среды могут быть при необходимости разделены на аликвоты;

- система хранится при температуре от +4°C до +25°C. Срок хранения 2 года, доставка материала в транспортной системе в течение 48 часов;

- система состоит из пластикового Sigma-тампона с красной меткой, контролирующей глубину введения зонда, и полипропиленовой пробирки 12*80 мм с резьбовой крышкой и коническим дном с юбкой устойчивости. Наконечник Sigma-тампона выполнен из пенистого полиуретана, обеспечивает максимальное высвобождение образца в среду.

4. Использование 1% пептонной воды с моющим средством «Прогресс» в качестве ингибитора роста посторонней микрофлоры при исследованиях проб на наличие холерных вибрионов.

При транспортировке отобранного материала, а также в качестве 1-й или 2-й среды накопления в 1% пептонную воду рН 9,5±0,5 или рН 8,4±0,1 в качестве ингибитора сопутствующей флоры до внесения исследуемого материала может быть добавлено моющее средство «Прогресс» в концентрации 0,1-0,2 %. Время инкубации при этом не изменяется.

С целью подавления «роения» сопутствующих микроорганизмов целесообразно дополнительно перед расплавлением среды во флакон с готовым щелочным агаром добавлять моющее средство «Прогресс» в количестве 0,1-0,2 %.

5. Контроль и хранение сред.

Практический опыт показывает, что сроки хранения для сред лабораторного изготовления целесообразно установить:

- для щелочного агара - 12 месяцев с момента изготовления, затем переконтроль ещё на 6 месяцев;
- для сред во флаконах или пробирках, закрытых ватно-марлевыми пробками, сроки хранения возможно увеличить до 7 суток.

Таким образом, изложенные предложения позволяют оптимизировать организацию лабораторных исследований при плановом эпиднадзоре за холерой в условиях односменной работы лаборатории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика холеры. МУК 4.2.2218-07.
2. Методические рекомендации по выделению вибрионов и организации бактериологических исследований на холеру. МР №28-6/7 от 04.05.1988
3. Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллеза, легионеллеза. МУ 3.3.2.2124-06.
4. Методические рекомендации по использованию вторичных алкилсульфатов натрия при бактериологической диагностике холеры. - Ростов-на-Дону, 1980.
5. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами. МУК 4.2.1793-03.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ

АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2017 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

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

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

В 2017 г. по проблеме 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» сотрудниками противочумных институтов во взаимодействии с иными учреждениями Роспотребнадзора выполнялось 24 НИР (научно-исследовательская работа). Из них завершаются в 2017 г. – 11 научных тем; работа, направленная на выполнение еще 13 НИР, будет продолжена в 2018 г.

Раздел 48.04.01 «Экология вибрионов, эпидемиология холеры и эпиднадзор» представлен 4 направлениями:

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.

Научное обоснование внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории Российской Федерации.

Изучение экологии возбудителя холеры и других, патогенных для человека вибрионов с использованием современных методов. Разработка системы внешнего контроля качества при проведении мониторинга за холерой.

Совершенствование мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, с использованием молекулярно-биологических методов.

В рамках 1 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 4 темы, выполнение 1 темы будет продолжено:

▪ 165-4-14 «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2014-2017 гг., руководитель НИР: Э.А. Москвитина).

В ходе комплексного межинститутского выполнения данной НИР были получены следующие результаты:

- Научно обосновано районирование Российской Федерации по холере с учетом определения эпидемического потенциала субъектов (область, край, республика) по комплексу показателей. Разработаны методические рекомендации «Порядок определения эпидемического потенциала административной территории для районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры». Проведено определение эпидемического потенциала 84 субъектов Российской Федерации. Внесены изменения в санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» в части «Районирование административных территорий Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры». Для отнесения административной территории к определенному типу территории по ее эпидемическому потенциалу использована комплексная оценка степени потенциальной эпидемической опасности субъекта при холере с учетом количественных и качественных показателей и данных, характеризующих их эпидемический потенциал. Впервые предусмотрена оценка и получены результаты СПЭО интенсивности эпидемического процесса с учетом выделения от больных штаммов *V. cholerae* O1ctxA+tcpA+, *V. cholerae* O1 ctxA- tcpA+ и *V. cholerae* O1/O139 ctxA-/tcpA-. При эпидемиологической оценке миграции населения в возможности заноса холеры через международные пункты пропуска на Государственной границе Российской Федерации использованы коэффициенты интенсивности миграционного оборота и чистой миграции населения для воздушного, автомобильного, водного и железнодорожного транспорта.

- В ходе анализа рисков завоза возбудителя холеры на территорию Сибири и Дальнего Востока получены данные о существовании «участков риска» водных объектов.

▪ 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 ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Впервые при эпидемиологическом анализе месячной заболеваемости холерой в мире выявлена закономерность, заключающаяся в регистрации холеры в мире круглогодично. Определен эпидемиологический год при холере с сезонными подъемами

заболеваемости. Определены ЧС как источники рисков, способствующие активизации эпидемического процесса при холере. Разработана оценка риска активизации эпидемического процесса при холере в мире с учетом систематизации ЧС различного происхождения, градации их и экспертной оценки в баллах для прогнозирования эпидемиологической обстановки по холере в мире.

- Обеспечено постоянное регулярное информационное обеспечение заинтересованных организаций о выделении культур холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации о текущем состоянии и прогнозах распространения холеры в мире.

▪ «Тематическая рабочая группа по реализации основных направлений стратегии совершенствования эпидемиологического надзора и противохолерных мероприятий в Российской Федерации на 2016 – 2017 гг.» (срок выполнения темы: 2016-2017 гг., руководители НИР: В.В. Кутырев, С.В. Титова).

В ходе комплексного межинститутского выполнения данной НИР были получены следующие результаты:

- Проведен ретроспективный анализ нормативной документации, касающейся эпидемиологического надзора за холерой в плане оценки эпидзначимости атоксигенных штаммов.

- Решены вопросы, касающиеся систематики, номенклатуры и терминологии: 1) Возбудителями холеры являются эпидемически значимые, содержащие гены холерного токсина (ctx AB+) и токсин-корегулируемых пилей (tcpA+) *Vibrio cholerae* O1 серогруппы, биоваров Classical и El Tor, а также *V. cholerae* O139 серогруппы. 2)

Выделенные из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды нетоксигенные холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп могут вызывать единичные заболевания (вибриононосительство) и вспышки острой кишечной инфекции установленной этиологии. 3) Для *V. cholerae* El Tor ctxAB+ рекомендовано использовать термин «токсигенные», а для *V. cholerae* El Tor ctxAB⁻ – «нетоксигенные».

- Проведён анализ перечня используемых диагностических препаратов с целью совершенствования мониторинга холеры и исключения дублирования исследований, направленных на разработку препаратов. Рассмотрены перспективы государственной регистрации диагностических 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.

▪ «Молекулярно-эпидемиологический мониторинг за холерой на территории Гвинейской Республики: оперативная оценка состояния эпидемической ситуации и изучение молекулярно-биологических свойств циркулирующих штаммов *Vibrio cholerae*» в рамках реализации распоряжения Правительства РФ от 25.07.2015 г. № 1448-р о финансировании российско-гвинейского научно-технического сотрудничества в области изучения эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных и вирусных инфекций в Гвинейской республике в 2015-2017 годах» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководитель НИР: В.В. Кутырев).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Проведен анализ данных о заболеваемости холерой в Гвинейской республике и сопредельных государствах. Проведено рекогносцировочное исследование территории Гвинейской республики, определены места, время и источники для отбора проб из объектов окружающей среды. Определен контингент пациентов для забора клинического материала. Осуществлен эпидемиологический мониторинг холеры на территории ряда префектур Республики Гвинея. Продолжается работа по эпидемиологическому районированию территории Гвинейской Республики и составлению атласа по степени риска развития эпидемических проявлений холеры.

▪ 195-4-17 «Применение информационных технологий для обеспечения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» и «Чума»» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководитель НИР: Э.А. Москвитина).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Обработаны отечественные и зарубежные документированные источники информации по проблеме «Холера». Осуществлен перевод публикаций из зарубежных источников информации, из баз данных «Medline», «PubMed» и из on-line журналов. Рефераты введены в информационно-библиографическую базу данных «Холера и патогенные для человека вибрионы».

В рамках 2 направления: «Научное обоснование внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории Российской Федерации» 1 НИР завершается и выполнение 1 темы будет продолжено:

▪ 159-4-13 «Изучение способов обработки судового балласта, контаминированного *Vibrio cholerae*» (срок выполнения темы: 2013-2017 гг., руководители НИР: С.Ю. Водяницкая, Л.П. Алексеева, О.С. Чемисова).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Дана эпидемиологическая оценка возможности использования химических веществ различных классов в деконтаминации водяного

балласта. Полученные данные позволили предложить в качестве перспективного препарата «Биопаг-Д». Разработаны способы деконтаминации балластных вод.

■ Исследования, направленные на развитие данного направления, продолжены в рамках НИР 197-4-17 «Научное обоснование реализации требований Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими (2004г.) в Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководитель НИР: С.Ю. Водяницкая).

В рамках 3 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» 1 НИР завершается и выполнение 1 темы будет продолжено:

■ 177-4-15 «Особенности формирования биопленки холерными вибрионами и ее роль, как патогенного биологического агента (ПБА)» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководитель НИР: С.В. Титова).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Установлена способность холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных на различных территориях России, к образованию биопленок, как стратегия для их сохранения в объектах окружающей среды и реализации возбудителями патогенетического и эпидемического потенциала.

- Разработаны модельные системы биопленкообразования на покровных стеклах, отвечающие требованиям биологической безопасности при работе с возбудителями II группы патогенности (получен патент на изобретение). Охарактеризованы структурно-функциональные признаки биопленки холерных вибрионов разных серогрупп и токсигенности. Разработаны способы качественной и количественной оценки холерных вибрионов в составе сложных биопленок по числу КОЕ их отпечатков на пластинах агара и с помощью ПЦР. С помощью световой и люминесцентной микроскопии установлены стадии формирования биопленки токсигенными и нетоксигенными холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп на различных твердых поверхностях. На основе трансмиссионной электронной микроскопии показана структурная организация биопленки холерных вибрионов, включающая межклеточный матрикс, и ее изменения при воздействии антибактериальных препаратов и дезинфицирующих средств.

- Проведены сравнительные исследования фено- и генотипических свойств широкого набора штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в форме планктона и биопленки, результаты которых могут быть основанием для разработки наиболее адекватных профилактических мероприятий в системе эпидемиологического надзора за холерой.

- Показана возможность использования метода масс-спектрометрии для идентификации видовой принадлежности холерных вибрионов в составе моновидной биопленки.

- Создана нативная экспериментальная модель мультивидовой биопленки и продемонстрирована способность токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139 к выживанию в подобных условиях за счет их конкурентных возможностей.

- Получены приоритетные данные, свидетельствующие о том, что для достижения бактерицидного эффекта в отношении биопленочных форм холерных вибрионов необходимы концентрации антибиотиков, в 50 и более раз превышающие значения МПК для планктонных культур. Установлено, что биопленочные формы холерных вибрионов более устойчивы к действию дезинфектантов, чем их планктонные культуры.

- Разработан новый способ отбора воды из поверхностных водоемов для определения присутствия холерных вибрионов и переносное устройство для его осуществления (получен патент на изобретение). В отличие от рутинного метода забора больших объемов воды, рекомендованного МУК 4.2.2870-11, лабораторному анализу подвергаются мультивидовые пленки, образованные на поверхности пробоотборника, в состав которых могут входить и холерные вибрионы. Практическое использование устройства повышает эффективность мониторинга холеры, о чем свидетельствует выделение большего числа культур новым способом в сравнении с традиционным.

▪ 180-4-15 «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону» (срок выполнения темы: 2015-2018 гг., руководители НИР: С.В. Титова, С.О. Водопьянов).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Разработан алгоритм идентификации представителей р. *Vibrio* с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии белков, оформлен СОП. Данный алгоритм включен в проект методических рекомендаций по лабораторной диагностике холеры.

Продолжено изучение выделенных вибрионов современными молекулярно-биологическими методами, включая VNTR, INDEL-типирование, полногеномное секвенирование.

Продолжается изучение фагового пейзажа водоемов г. Ростова, с определением фаготипов у представителей вибриофлоры, выделенных из водоемов г. Ростова-на-Дону.

Охарактеризована антибиотикочувствительность вибриофлоры и патогенной микрофлоры, выделенной из водоемов г. Ростова-на-Дону. Начат поиск генетических детерминант антибиотикоустойчивости вибрионов, выделенных из водоемов г. Ростова-на-Дону.

Заключен договор о научно-практическом сотрудничестве с ФБУНУ

АзНИИРХ, в рамках которого получены результаты по гидрохимическим и гидробиологическим характеристикам водоемов г. Ростова-на-Дону и Ростовской области.

На основании полученных данных создана Единая эпидемиологическая карта г. Ростова-на-Дону (ЕЭКР).

В рамках 4 направления «Совершенствование мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, с использованием молекулярно-биологических методов» выполнение 1 темы будет завершено:

- 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., руководители НИР: В.Д. Кругликов, С.В. Титова, А.Б. Мазрухо). Тема выполнялась комплексно с участием всех противочумных институтов.

В ходе выполнения данной НИР во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора получены следующие результаты:

- В плане научно-методического обеспечения эпиднадзора за холерой дан биоинформационный анализ биологических свойств и генотипической организации культур холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды РФ.

- Подтверждена диагностическая ценность применения MALDI-ToF анализа при идентификации морфологически сходных с холерным вибрионом культур в рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов.

- Показана эффективность применения ПЦР-скрининга детерминант холерного вибриона при исследовании проб из объектов окружающей среды. На основании макрорестрикционного анализа установлена территориальная приуроченность штаммов холерного вибриона определенных пульс-электротипов, определена специфичность *NotI*-генерируемых паттернов рестрикции R-вариантов *V. cholerae*. Показано, что экспрессией выявленных генов (ген *cholix*-токсина (*chxA*), а также аллели генов *mshA* и *cef*), был обусловлен повышенный персистентный потенциал клона в 2015 г. в г. Сочи. Определено, что ПЦР-генотипы отличались значительной гетерогенностью и содержали гены в различных сочетаниях, однако их полный набор был представлен в совокупной популяции, что предполагает возможность генетического обмена и, как следствие, формирование новых клонов с повышенным патогенным и персистентным потенциалом.

- Устойчивость к фагу Эль Тор II и чувствительность к фагу С свидетельствовали об изменчивости геномов изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1. По-видимому, штаммы, циркулирующие в РФ,

как и в других регионах мира, могут рассматриваться как резервуар генов факторов патогенности/персистенции.

- Установлено, что наличие ICE элемента можно рассматривать как новый маркер «заносных штаммов» нетоксигенных холерных вибрионов.

- Установлено, что стабильный INDEL - генотип у всех изученных токсигенных штаммов, изолированных с разрывом в десятки лет, свидетельствует о высоком генетическом консерватизме выбранных INDEL-локусов по сравнению с VNTR-локусами.

- Определено, что генетическая вариабельность коррелирует с выявляемостью холерных вибрионов в объектах окружающей среды.

- Разработан подход к актуализации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, связанный с установлением их генотипов, то есть, выявлением сходств/различий со штаммами, как вновь выделенными, так и обнаруженными ранее, а также установление их происхождения (занос / переживание) и предположительное определение возможной степени вероятности этиологической роли в возникновении ОКИ.

- Полученные данные будут использованы для совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в части оптимизации методической составляющей мониторинга, этапности лабораторной диагностики, осуществляемой в лабораториях различного уровня (территориального, регионального и федерального) и а также комплекса мероприятий в соответствии с многофакторной характеристикой фенотипических и молекулярно-генетических свойств выделяемых культур холерных вибрионов.

- Во ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт разработаны: метод детекции генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor на основе MALDI-ToF минисеквенирования, а также база данных «*V. cholerae* Сибирь и Дальний Восток – PFGE генотип». Сконструирована мультиплексная тест-система для обнаружения клинически значимых микроорганизмов рода *Vibrio*.

- Во ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора разработана экспериментальная ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rstR-rstC*, РЭФ».

Раздел 48.04.02 «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов» представлен 3 направлениями:

- 1) Комплексный анализ механизмов изменения вирулентных, иммуно-генных 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.

2) Создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов.

3) Анализ механизмов формирования у возбудителя устойчивости к антимикробным соединениям и использование высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности.

В рамках 1 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» будет продолжено выполнение 3 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). Тема выполняется комплексно с участием всех противочумных институтов.

В рамках данной НИР во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в 2017 г. получены следующие результаты:

- Осуществлено секвенирование 43 штаммов *V. cholerae* O1, 4 штаммов O139 и 24 штаммов неO1/неO139 серогрупп. Поведен их биоинформационный анализ с помощью имеющихся и разработанных авторами алгоритмов. В полученных сиквенсах идентифицированы детерминанты наиболее значимых факторов патогенности/персистенции, геномные острова, мобильные элементы. Поведен сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей, а также аминокислотных последовательностей их продуктов. Выявлены новые, в том числе уникальные аллели ряда генов. Нуклеотидные последовательности депонированы в созданной авторами онлайн базе данных нуклеотидных последовательностей, которая доступна по адресу genomes.antiplague.ru, а также в NCBI Genbank.

Во ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Проведено секвенирование, сборка и депонирование в БД GenBank генома штамма *V. cholerae* I-1181. Для сборки генома использовано 166954 последовательностей общей длиной 75530778. При картировании на рефересный геном N16961 был получен скаффолд, покрывающий 98,8 % референса.

- Определена локализация СТХ профага и RS1 области в геномах измененных штаммов *V. cholerae* с использованием специфичных праймеров к профагу и участкам хромосом холерного вибриона. Установлено, что у двух штаммов (И-1181 и И-1300) присутствуют две копии СТХ профага на второй хромосоме и две копии RS1 области – на первой, тогда как у двух других исследованных штаммов (И-1187 и И-1263) СТХ профага и RS1 область локализуется на первой хромосоме.

- В рамках изучения особенностей организации SXT элемента у штаммов *V. cholerae*, проведено секвенирование гена *intSXT* 11 штаммов (6 – *V. cholerae* O1 El Tor, 3 – *V. cholerae* O139, 2 – *V. cholerae* non O1/O139). Кластерный анализ нуклеотидных последовательностей гена показал, что в общий кластер объединены нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* non O1/O139, выделенные из окружающей среды, отдельные кластеры образовали токсигенные *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* O139, близкими по структуре определены интегразы токсигенных и нетоксигенных *V. cholerae* O139.

- Экспериментально установлена трансформация MLVA- и PFGE-профилей штаммов *V. cholerae* O1 El Tor при культивировании в условиях дефицита питательных веществ при комнатной температуре. При этом на начальных этапах изменения исследуемых локусов происходят преимущественно по типу дубликации участков генома, на более поздних сроках подключаются процессы редукции.

- Зимографически установлено наличие хитиноподобной активности у препаратов субклеточных фракций и супернатантов культуральной жидкости *V. cholerae* O1 Classical и *V. cholerae* O1 El Tor. Обнаружены количественные межштаммовые различия в спектре активных хитиназ в группе исследуемых штаммов.

- Проведена серия экспериментов по выделению и очистке растворимых белков из препарата мочевинового экстракта *V. cholerae* O1 El Tor М-878 с помощью аффинной хроматографии, выполнен электрофоретический и энзимологический анализ полученного препарата. Установлено, что препарат состоит из двух полипептидов с относительной молекулярной массой 35-40 кДа, обладает протеолитической и липолитической активностью.

Во ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Подобраны праймеры к генам, кодирующим биосинтез токсинов у *Vibrio cholerae* O1: *ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*, *ompU*, *tcpA*, *rtxA*, *ser*, *nanH*.

▪ 171-4-14 «Изучение транс-кодированных малых РНК, ассоциированных с белком Hfq, *Vibrio cholerae* O1 серогрупп» (срок выполнения темы: 2014-2018 гг., руководитель НИР: Р.В. Писанов).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Подана патентная заявка на плазмиду рHFQ30 с клонированным геном *hfq* *V. cholerae* O1. Создана программа для поиска «нестабильных нуклеотидов» в генах малых РНК секвенированных штаммов *V. cholerae* для выявления отличий по профилям *tesRNA*, *in silico*. Подготовлен проект методических рекомендаций по выделению транскодируемых малых РНК *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. Проводится подготовка пакета документов для регистрации латексного антительного диагностикума для определения токсинопродукции *V. cholerae in vitro*.

▪ Во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора продолжается работа над НИР 47-4-14 «Молекулярно-генетический анализ механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор в современный период 7-ой пандемии холеры» (срок выполнения темы: 2014-2018 гг., руководитель НИР: Н.И. Смирнова).

В рамках 2 направления: «Создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов» завершается 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 ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Сформирована документированная коллекция детально охарактеризованных рекомбинантных плазмид, холерных и других патогенных вибрионов, которая впоследствии послужит основой для создания одноименного банка.

- Рекомбинантные плазмиды и содержащие их штаммы *E. coli* – продуценты искомым белков предназначены для получения очищенных целевых продуктов как основы диагностических препаратов и компонентов химических холерных вакцин.

- В ГКПБ «Микроб» депонированы штаммы *E.coli*: M15[pREP4]pHlyA – суперпродуцент гемолизина *V.cholerae* и Jm103pCefVp – продуцент предполагаемой липазы (CefVp) *V. parahaemolyticus*, подготовлены к депонированию штаммы Jm103pCtxAB7 – продуцент холерного токсина и Jm103pNanH – суперпродуцент нейраминидазы *V.cholerae*. Нуклеотидные последовательности клонированных генов депонированы в NCBI GenBank.

- Создана и готовится к государственной регистрации база данных «Рекомбинантные плазмиды, экспрессирующие клонированные гены патогенных вибрионов».

В рамках 3 направления: «Анализ механизмов формирования у возбудителя устойчивости к антимикробным соединениям и

использование высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности» будет продолжено 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 2017 г. получены следующие результаты:

- Показана эффективность *in vitro* и *in vivo* комбинации налидиксовой кислоты и полимиксина в отношении штаммов *V. cholerae*, устойчивых к этим препаратам.

- Наблюдается повышение чувствительности *V. cholerae* к фторхинолонам при комбинации этих препаратов с супрастином, диклофенаком, верапамилом, протамина сульфатом, метиленовым синим, а также повышение чувствительности к триметоприму/ сульфаметоксазолу при воздействии твин-20..

- Показано, что пектин обладает антибактериальными свойствами в отношении холерных вибрионов и образованных ими биопленок. Доказана его эффективность при профилактическом применении на модели генерализованной инфекции у белых мышей, вызванной антибиотикорезистентным штаммом *V. cholerae*.

- Получены данные, свидетельствующие об эффективности профилактического и лечебного применения холерных бактериофагов при генерализованной инфекции у белых мышей, вызванной антибиотикорезистентным штаммом *V. cholerae*.

В рамках раздела 48.04.03 «Фундаментальные основы патогенеза и иммуногенеза холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами» в настоящее время разработки не осуществляются, хотя направление продолжает оставаться актуальным.

Раздел 48.04.04 «Разработка современных медико-иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами» представлен 3 направлениями:

1) Оптимизация специфической профилактики холеры за счет новых методических подходов.

2) Оптимизация лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий. Разработка и внедрение современных импортозамещающих и новых питательных сред.

3) Создание новых эффективных фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов. Коллекционирование бактериофагов патогенных вибрионов и изучение их геномов методом полногеномного секвенирования с последующим созданием рекомбинатных диагностических бактериофагов.

В рамках 1 направления: «Оптимизация специфической

профилактики холеры за счет новых методических подходов» будет продолжено 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 2017 г. получены следующие результаты:

- На основании изучения действия полиоксидония, ликопида, дерината на популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов, на функциональную активность иммунокомпетентных клеток в процессе формирования системного и местного клеточного иммунного ответа, а также на процессы антителообразования в крови и кишечнике у вакцинированных разными дозами таблетированной холерной бивалентной химической вакцины животных, будет дано заключение об эффективности изучаемых препаратов у вакцинированных взрослых белых мышей и кроликов. Начаты эксперименты по исследованию способности полиоксидония, ликопида, дерината повышать протективную активность таблетированной холерной бивалентной химической вакцины.

В рамках 2 направления: «Оптимизация лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий. Разработка и внедрение современных импортозамещающих и новых питательных сред» завершается 2 темы и выполнение 3 НИР будет продолжено:

- 160-4-13 «Получение и характеристика термостабильного прямого гемолизина *Vibrio parahaemolyticus*» (срок выполнения темы: 2013-2017 гг., руководитель НИР: О.С. Чемисова).

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Показано, что штаммы парагемолитических вибрионов, выделенные из объектов окружающей среды и клинических проб могут быть типированы с помощью метода INDEL в зависимости от наличия генов основных факторов патогенности и принадлежности к «пандемичному» клону.

- Определены молекулярные маркеры (масс-пики) для внутривидового типирования *V. parahaemolyticus*.

- Показана эффективность использования метода MALDI-ToF масс-спектрометрии при определении стабильности полученной фракции белков в процессе хранения.

- Сконструированы праймеры и зонды для определения видовой принадлежности и генов термостабильного прямого гемолизина (TDH) и TDH-родственного гемолизина (TRH) *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме «реального времени». Оптимизированы условия амплификации.

- Разработан способ идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме «реального времени» (Real-

Time PCR).

- Подобран штамм-продуцент TDH *V. parahaemolyticus*.

▪ 1-4-15 «Научное обоснование конструирования ПЦР-тест-систем для детекции, идентификации, генотипирования *Vibrio cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты биовара Эль Тор в мультиплексном формате с электрофорезным и гибридационно-флуоресцентным методами учета результатов» (срок выполнения темы: 2015-2017 гг., руководитель НИР: В.Н. Савельев)

В ходе выполнения данной НИР получены следующие результаты:

- Сконструирована ПЦР-тест-система для идентификации и генотипирования *Vibrio cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты биовара Эль Тор в мультиплексном формате с электрофорезным методом учета результатов – «Гены *Vibrio cholerae* *ctxB*, *rstR*, *rstC* РЭФ»). На препарат разработана нормативная и методическая документация. Проведены лабораторные и межлабораторные испытания ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* *ctxB*–*rstR*–*rstC* РЭФ»), положительные результаты которых утверждены директором ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.

- В стадии конструирования находится аналогичная ПЦР-тест-система с гибридационно-флуоресцентным («Гены *Vibrio cholerae* *ctxB*–*rstR* – *rstC* FL») методом учета результатов (оптимизированы праймеры для специфической амплификации *ctxB^{El}*, *rstR^{El}*, *rstC*, *ctxB^{Cl}*, *rstR^{Cl}* генов с гибридационными методами учета результатов; разрабатываются условия проведения ПЦР для амплификации генов *ctxB^{El}*, *rstR^{El}*, *rstC*, *ctxB^{Cl}*, *rstR^{Cl}* в реальном времени с использованием Rotor Gene (состав реакционной смеси, программа амплификации, подбор флуоресцентных красителей и гасителей для создания меченых флуоресцинами праймеров).

▪ 192-4-17 «Создание моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов для специфической детекции холерного токсина» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководитель НИР: Л.П. Алексеева).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Подобраны условия постановки иммуноферментного анализа для выявления холерного токсина (экспериментальный образец ХТ).

- Оценена специфическая активность экспериментального препарата МКА к холерному токсину в непрямом иммуноферментном анализе.

▪ 193-4-17 «Контроль качества лабораторной диагностики холеры» (срок выполнения темы: 2017-2021 гг., руководители НИР: О.С. Чемисова, В.Д. Кругликов, С.О. Водопьянов).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Проведена оценка состояния внутрилабораторного и внешнего контроля качества микробиологической диагностики холеры в

современных условиях.

- Проведен анализ данных литературы и геномов выделенных штаммов для выявления спектра генотипов штаммов вибрионов циркулирующих в различных регионах мира. На основе анализа отобрана репрезентативная коллекция вибрионов, включающих основные циркулирующие генотипы вибрионов, для создания контрольной панели при осуществлении внешнего контроля качества генодиагностических исследований.

- Разработаны и подготовлены экспериментальные серии стандартных контрольных материалов для осуществления внешнего контроля качества лабораторных исследований на холеру с использованием генодиагностических методов.

- Контрольные зашифрованные материалы подготовлены к отправке в противочумные станции.

- Отобрана и охарактеризована по комплексу генетических детерминант коллекция штаммов р. *Vibrio* для создания диагностически значимых масс-спектров.

- 194-4-17 «Разработка набора питательных сред для выделения галофильных патогенных вибрионов из пищевых продуктов, объектов окружающей среды и материала от людей» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководители НИР: А.Б. Мазрухо, О.С. Чемисова).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Подобраны антибактериальные препараты, улучшающие элективные свойства сред, отработаны их концентрации.

- Изучены ростовые свойства специализированных сред на коллекционных штаммах галофильных вибрионов и гетерологичных микроорганизмов и модельных смесях с «полевым» материалом.

- Отработаны требования к оценке качества элективных сред (характер роста, ингибирующая активность).

- Подобран тест-штамм *V. parahaemolyticus* для контроля качества элективных сред для галофильных вибрионов.

Раздел 48.04.05. «Биологическая безопасность при холере и других заболеваниях, вызываемых патогенными вибрионами. Противодействие биотерроризму» представлен 1 НИР:

- -198-4-17 «Внедрение дистанционно-обучающих электронных технологий на очно-заочных курсах повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций Ростовской области по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководители НИР: О.С. Бурлакова, А.С. Водопьянов).

В рамках данной НИР в 2017 г. получены следующие результаты:

- Разработаны анкеты-опросники для проведения мониторинга кадрового состава и уровня подготовки эпидемиологов, врачей-

бактериологов и биологов учреждений Роспотребнадзора и ЛПО Минздрава. Осуществляется подготовка учебных материалов, разработка системы тестирования и оценки уровня знаний обучающихся при использовании технологий дистанционного образования.

**ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ О ВНЕДРЕНИИ РЕЗУЛЬТАТОВ
НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ
КООРДИНАЦИОННОГО НАУЧНОГО СОВЕТА ПО САНИТАРНО-
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ
КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА
ВИБРИОНЫ» В 2017 ГОДУ**

Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С.

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

В 2017 году научно-исследовательская деятельность всех противочумных институтов Роспотребнадзора осуществлялась в рамках Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» по запланированной тематике. Основные задачи практического выхода:

1) разработка новых и актуализация ранее разработанных нормативно-методических документов (СП, МУК, Методических рекомендаций и др.) различного уровня внедрения;

2) активная информационно-аналитическая работа, связанная с результатами эпидемиолого-мониторинговых исследований, оформление информационных материалов и рассылка заинтересованным учреждениям;

3) развитие методов для целей биоинформационного анализа, генетической оперативной и ретроспективной диагностики; депонирование нуклеотидных последовательностей в международной базе данных;

4) создание новых и пополнение существующих проблемно-ориентированных баз данных, ГИС, служащих для целей эпидемиологического надзора и научного прогресса;

5) разработка новых тест-систем, диагностических препаратов, питательных сред.

В разработке и переработке ряда нормативных документов, действующих на территории Российской Федерации принимали участие специалисты всех научно-исследовательских противочумных институтов, Противочумного центра, Федеральной службы по надзору в сфере защиты

прав потребителей и благополучия человека:

- Методические указания «Лабораторная диагностика холеры» содержат: порядок организации лабораторных исследований, методы изучения свойств холерных вибрионов, серологические методы исследования, перечень питательных сред, диагностических препаратов тест-систем для лабораторной диагностики холеры.

- В Методических рекомендациях «Правила работы с бактериофагами микроорганизмов I-IV групп патогенности» описаны основные правила безопасности и режим работы с материалом, содержащим бактериофаги и ПБА I-IV групп патогенности, а так же основные методы, используемые при выделении, получении и изучении бактериофагов.

- Разработанные в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора Методические рекомендации «Отбор и микробиологическое исследование проб балластных вод морских (речных) судов, выполняющих международные рейсы» содержат описание простых, правомерных процедур отбора проб балластных вод на соответствие требованиям по их безопасности и качеству.

Перечисленные документы находятся на рассмотрении в Федеральной службе Роспотребнадзора.

Напряжённая эпидемиологическая обстановка по холере в мире заставляет усиленно работать эпидемиологическую службу структур Роспотребнадзора в плане анализа, обзоров и прогнозов:

- Руководителю Роспотребнадзора направлено информационное письмо «Об эпидемиологической ситуации по холере в 2016 г. и прогноз заболеваемости на 2017 г.». Данное письмо Роспотребнадзором было направлено в адреса Руководителей управлений Роспотребнадзора по субъектам РФ и железнодорожному транспорту, Руководителям ПЧУ, Руководителям органов исполнительной власти в субъектах РФ в области охраны здоровья. Исполнитель - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

- Еженедельно Руководителю Роспотребнадзора представляются аналитические справки: «Информация о распространении холеры по континентам и странам мира» и «Информация о выделении культур холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации». Исполнитель - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

- Информационные бюллетени «О распространении холеры по континентам и странам мира» еженедельно размещаются на сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

- В Управление Роспотребнадзора по Ростовской области направлено информационное письмо «Об оказании методической помощи по расчету мощности учреждений госпитальной базы по холере».

Исполнитель - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Результаты мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов РФ будут представлены в Роспотребнадзор по окончании эпидсезона 2017 года. Исполнитель - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

- В Роспотребнадзор было направлено информационное письмо «Ситуация по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2016 г. и прогноз на 2017 г.». Исполнитель - ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора.

В выполнении тематики и планов внедрения приняли участие все противочумные институты.

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Получены Решения о выдаче патентов:

- «Способ отбора проб с поверхности водоемов для определения присутствия холерных вибрионов, и переносное устройство для его осуществления»;

- «Способ молекулярно-генетического внутривидового типирования токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor»;

- «Способ оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам».

Зарегистрирована программа «Seg-Analyser – программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *V. cholerae*, определения кратности вариабельных тандемных повторов (VNTR), выявления INDEL – маркеров».

Зарегистрированы базы данных:

- «ГИС Эпидемиологический надзор за холерой»;

- «Спектр микрофлоры открытых водоемов г. Ростова-на-Дону, чувствительность / устойчивость к антибактериальным препаратам»;

- «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, циркулирующих на территории республики Калмыкия».

Получена приоритетная справка на патент «Способ идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени».

Подготовлены и поданы заявки на выдачу патентов:

- «Способ получения образцов биопленок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии»;

- «Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus Musculus* – продуцент моноклонального антитела к мембранному белку, общему для tcr⁺ штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп»;

- «Рекомбинантная плазмида, экспрессирующая клонированный

ген гемолизина *Vibrio cholerae* и штамм *Escherichia coli* – суперпродуцент гемолизина *Vibrio cholerae*»;

- «Способ идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 сорогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант».

Подготовлены заявки на государственную регистрацию баз данных:

- «Устойчивость к антибиотикам холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации»;

- «VNTR-генотипы штаммов *Helicobacter pylori* в Ростовской и Астраханской области»;

- «Коллекция рекомбинантных плазмид, экспрессирующих гены патогенных для человека вибрионов».

Постоянно пополняются проблемно-ориентированные базы данных «Холера Эль-Тор. Мир», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия», «Холерные вибрионы. Россия», ГИС «Холера 1989-2014».

Создан, обсужден на Ученом совете и утвержден директором института Аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы».

Обсуждены на Учёном совете и утверждены директором методические рекомендации:

- «ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов»;

- «Работа с геоинформационным порталом (ГИС-порталом) Ростовского-на-Дону противочумного института. Географическая привязка эпидемиологических данных».

Разработаны и подготовлены к обсуждению на Учёном совете методические рекомендации:

- «Способ оценки чувствительности биопленок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам»;

- «Способ повышения иммуногенности таблетированной холерной бивалентной химической вакцины»

В стадии доработки:

- Предложения к действующим СП 3.1.2521-09 в части, касающейся районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры»;

- Методические рекомендации «О проведении эпидемиологического расследования в связи с выделением холерных вибрионов O1/O139 из объектов окружающей среды».

Состоялось депонирование в ГКПБ:

- штамма *V. cholerae* O1 17551 в качестве тест-штамма для оценки эффективности дезинфицирующих средств в отношении холерных вибрионов;

- штамма *V. parahaemolyticus* в качестве продуцента термостабильного прямого гемолизина;

- штаммов кишечной палочки - продуцентов рекомбинантных белков холерного токсина, гемолизина, нейраминидазы холерных вибрионов, гемолизина TRH и предполагаемой липазы *V. parahaemolyticus*.

Направлены на депонирование в ГКПБ 2 тест-штамма *V. cholerae* El Tor предназначенных для размножения холерных фагов, перспективных для идентификации холерных вибрионов.

В коллекцию бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора депонирован бактериофаг № 6 *V. cholerae*, который лизирует штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor, в том числе антибиотикоустойчивый штамм *V. cholerae* El Tor 19243.

Состоялось депонирование в NCBI GenBank последовательностей ДНК штаммов холерного вибриона, участков генома, отдельных генов и их продуктов, а также нуклеотидных последовательностей генов холерного вибриона, клонированных в составе рекомбинантных плазмид.

Оформляется нормативная документация на тест-систему для видовой идентификации *V. parahaemolyticus* и определения TDH и TRH методом ПЦР в реальном времени.

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

Подготовлена для государственной регистрации программа ЭВМ «Электронный паспорт штамма *V. cholerae*» для автоматического определение систематического положения (принадлежность к роду, виду, серогруппе, биовару) изолированной культуры холерного вибриона, а также оценки эпидемической значимости культуры и резистентности к антибактериальным препаратам.

Депонированы в GenBank:

- 10 нуклеотидных последовательностей «housekeeping» генов штаммов холерного вибриона, которые могут быть использованы для проведения филогенетического анализа, межлабораторного сопоставления MLST-профилей штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, биоваров и серогрупп, анализа глобального распространения отдельных клонов *V. cholerae*;

- геном штамма *V. cholerae* И-1181, который может быть использован для проведения углубленного исследования структурной организации отдельных локусов генома и сравнительного филогенетического анализа.

Подготовлены проекты документов для обсуждения на Учёном совете:

- Методические рекомендации «Способ визуализации лецитиназ

холерного вибриона с помощью субстратного ДСН-электрофореза в полиакриламидном геле»;

- Методические рекомендации «Детекция генетически измененных вариантов *V. cholerae* El Tor методом MALDI-TOF минисеквенирования».

ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Создан и прошёл комиссионные испытания опытный образец ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* ctxB– rstR– rstC FL») в мультилокусном формате с электрофорезным учетом результатов. Проект НД (Инструкция по применению, ТУ, пусковой регламент) на ПЦР тест-систему «Гены *Vibrio cholerae* ctxB– rstR– rstC FL). Набор реагентов состоит из мишеней ключевых генов патогенности типичного биовара Эль Тор (ctxB^{EL}, rstR^{EL}, rstC) и классического биовара (ctxB^{EL}, rstR^{EL}), позволяющий при обнаружении в ДНК испытуемого штамма тех или иных генов в различных сочетаниях, дать заключение о типичности или гибридности патогена и типе продуцируемого им энтеротоксина, а также определить генотип геноварианта холерного вибриона биовара Эль Тор.

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Депонированы в GenBank:

- последовательность интегративного конъюгативного элемента (ICE) штамма *V. cholerae* O1 El Tor 18826;

- последовательность интегративного конъюгативного элемента (ICE) штамма *V. cholerae* O1 El Tor 6878.

Планирование и выполнение научной тематики осуществляется в тесном взаимодействии с органами и организациями Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации. Проблемы, связанные с возможными эпидосложнениями по холере остаются актуальными. Активно проводится эпидемиологический мониторинг, всевозможные мероприятия по санитарной охране территории Российской Федерации, разрабатываются нормативно-правовые документы. Создаются новые диагностические препараты, разрабатываются новые методы исследований на молекулярном уровне, питательные среды для культивирования холерного вибриона. Большая работа коллективов научных сотрудников противочумных учреждений направлена на решение конкретных задач, которые ставит здравоохранение, а именно – недопущение заноса и распространения холеры на территории Российской Федерации.

**КРАТКИЕ ИТОГИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА
С УЧРЕЖДЕНИЯМИ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ И НАУКИ
РОСПОТРЕБНАДЗОРА, А ТАКЖЕ СТРУКТУРАМИ РОСТОВСКОЙ
ОБЛАСТИ, ОБЕСПЕЧИВАЮЩИМИ САНИТАРНО-
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ БЛАГОПОЛУЧИЕ НАСЕЛЕНИЯ
ПО ХОЛЕРЕ ЗА I-II КВАРТАЛ 2017 ГОДА**

Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С.

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

Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора взаимодействует с целым рядом учреждений здравоохранения и науки Роспотребнадзора: ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора, ФКУЗ Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора, ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора, ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, ФКУЗ Противочумные станции Роспотребнадзора, Управления Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации, ФБУЗ Центры гигиены и эпидемиологии в субъектах РФ.

В основе взаимодействия лежит деятельность по выполнению научно-исследовательских работ в области эпидемиологии, микробиологии, биохимии и генетики возбудителей особо-опасных инфекций. Большая часть взаимодействия осуществляется по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы». Совместно выполняется 13 тем по вопросам эпидемиологии холеры, эпидемиологического надзора, качества лабораторной диагностики, разработки новых методов диагностики и питательных сред для холерного вибриона. Совместно с ФКУЗ Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора продолжаются исследования по направлению создания новых эффективных фаговых препаратов для идентификации холерных вибрионов O1 серогруппы.

Являясь референс-центром и ведущим по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы», институт ответственен за выполнение тематики и достойные результаты её выполнения.

Опубликованы совместные научные работы:

- в журнале «Проблемы ООИ» – об эпидемиологической

обстановке по холере в мире;

- в журнале «Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России» – о плане санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации в случае ЧС санитарно-эпидемиологического характера;

- в журнале «Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России» – об экономической эффективности мероприятий по деконтаминации водяного балласта.

Направлены в Федеральную службу по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека еженедельные информационные бюллетени по холере.

В период проведения Кубка Конфедераций в 2017 г. плане консультативно-методической и практической помощи по организации и проведению работы объединённой СПЭБ состоялось взаимодействие с Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан и специалистами института «Микроб».

Созданы: ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой», содержащая информацию о точках отбора проб воды на вибриофлору в различных регионах Российской Федерации и ГИС «Единая эпидемиологическая карта г. Ростова-на-Дону», содержащая данные об эпидемиологически значимых объектах, которые доступны для сотрудников Роспотребнадзора на сайте института.

Музей живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, осуществляя взаимодействие с ФБУЗ «ЦГиЭ в Липецкой области» и ФБУЗ «ЦГиЭ в Мурманской области» предоставил тест-штаммы *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* для контроля питательных сред на этапах лабораторной диагностики.

Для осуществления научно-методического и практического обеспечения федерального государственного санитарно-эпидемиологического надзора и помощи по вопросам профилактики особо опасных, природно-очаговых и зоонозных инфекционных болезней в соответствии с Приказом Роспотребнадзора «Об организации деятельности системы противочумных учреждений Роспотребнадзора» (№ 274 от 01.04.2015) за Ростовским-на-Дону научно-исследовательским противочумным институтом закреплена Ростовская область.

Во исполнение данного приказа, институт осуществляет взаимодействие со следующими структурами, обеспечивающими санитарно-эпидемиологическое благополучие населения по опасным инфекционным болезням в Ростовской области: Управление Роспотребнадзора по Ростовской области; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Ростовской области; ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора; ФБУН Ростов НИИМП

Роспотребнадзора. Кроме того институт взаимодействует с Министерством здравоохранения Ростовской области, в частности с Ростовским Государственным медицинским университетом.

В плане выполнения научной тематики с осуществляется взаимодействие в выполнении следующих тем: «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону», «Изучение способов обработки судового балласта, контаминированного *Vibrio cholerae*», «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории РФ», «Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации» и других. С 2017 г. специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора совместно с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» начато исследование по внедрению дистанционно-обучающих электронных технологий на очно-заочных курсах повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций Ростовской области по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой. Совместно с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области в материалах IX Ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням опубликованы тезисы о некоторых особенностях эпидемиологического надзора за холерой в Ростовской области. В текущем году утверждена ВАК диссертационная работа О.В. Ляха на тему «Эпидемиологические аспекты изучения способов контроля и управления балластными водами на судах смешанного «река-море» плавания (на примере международного морского порта Таганрог)», представленная на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.02.02 – эпидемиология. Работа выполнена в рамках НИР, проводимой совместно с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области.

Консультативно-методическая и практическая помощь:

- Проведены курсы повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой. Обучены специалисты следующих организаций: Филиал ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области в Аксайском районе; ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора в Ростовской области; ФКУЗ Северо-Кавказская противочумная станция Роспотребнадзора.

- Проведены курсы повышения квалификации врачей и биологов по программе «ПЦР в диагностике инфекционных болезней и индикации патогенных микроорганизмов». Обучены специалисты ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора в Ростовской области.

- Оказана консультативно-методической помощью по обеспечению готовности к работе на случай выявления больного с ООИ организациям здравоохранения области в г. Азов, г. Таганрог, Неклиновский район Ростовской области.

- Оказана консультативно-методическая помощь при подготовке и проведении учений по организации мероприятий при выявлении больного с подозрением на ООИ на СКП Матвеево-Курганский район, г. Таганрог.

- Оказана консультативно-методическая помощь при подготовке и проведении учений по организации мероприятий при выявлении больного с подозрением на ООИ в аэропорту.

- Проведена проверка качества 73 серий питательных сред (щелочной агар и основной раствор пептона) и ингибитора роста посторонней микрофлоры (теллурит калия) для учреждений Роспотребнадзора и здравоохранения в субъектах Ростовской области.

- В телефонном режиме оказана консультативно-методическая помощь по вопросам организации и проведения лабораторных исследований на наличие холерных вибрионов следующим учреждениям Роспотребнадзора: ФБУЗ ЦГиЭ Оренбургской области, ФБУЗ ЦГиЭ Свердловской области, ФБУЗ ЦГиЭ Ростовской области и его филиалам.

- Проведена идентификация и серотипирование культуры *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенной ФБУЗ ЦГиЭ в Тамбовской области от больной, прибывшей из Таиланда, в январе 2017 года.

- Оказана консультативно-методическая помощь по расчету мощности холерного госпиталя совместно с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области и ФГКУЗ «ПЧС Республики Крым» Роспотребнадзора.

- Еженедельное информирование территориальных органов и учреждений Роспотребнадзора, региональных Центров и Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека о выявлении холерных вибрионов из шести стационарных точек и 1 дополнительной, закрепленных за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Директор Ростовского-на-Дону противочумного института Титова С.В. является членом областной и городской Комиссии по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения и ведению социально-гигиенического мониторинга (СПЭЖ), оперативного штаба Южного Федерального округа по санитарно-эпидемиологическому благополучию населения. Это позволяет институту оперативно реагировать на запросы практического здравоохранения.

Таким образом, все вышеизложенное свидетельствует о неразрывной связи обеспечения эпидемиологического благополучия страны с полноценным многоплановым взаимодействием всех органов и

организаций Роспотребнадзора как в плане научных разработок, так и в практической их реализации.

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

НАБОР РЕАГЕНТОВ «ИММУНОГЛОБУЛИНЫ МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ, МЕЧЕННЫЕ ПЕРОКСИДАЗОЙ ХРЕНА, СУХИЕ ДЛЯ СЕРОЛОГИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *V. CHOLERAЕ* O1 И O139 (*IN VITRO*) МЕТОДОМ ИФА И ДОТ-ИФА» («ИГ - *V. CHOLERAЕ* O1/O139 – ИФА/ДОТ-ИФА»).

Алексеева Л.П., Евдокимова В.В., Зюзина В.П., Кругликов В.Д.,
Архангельская И.В., Яговкин М.Э.

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

Создан набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» («ИГ - *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА»). Диагностический набор предназначен для детекции и дифференциации холерных вибрионов O1 и O139 прямым методом планшетного ТИФА и дот-ИФА как в стационарных, так и полевых условиях (без приборного оснащения). Один набор рассчитан на 640 определений холерных вибрионов O1 серогруппы и 1280 определений холерных вибрионов O139 серогруппы.

Применение видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов позволяет обнаружить холерные вибрионы O1, O139 серогрупп в течение 70-90 мин в прямых вариантах иммуноферментного анализа при чувствительности 10^6 м.кл./мл. Лабораторными испытаниями широкого набора штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов в иммуноферментных методах подтверждена диагностическая ценность разработанных видоспецифических моноклональных пероксидазных конъюгатов. В схеме лабораторной диагностики холеры препараты могут быть использованы для обнаружения холерных вибрионов в пробах из объектов окружающей среды и из клинического материала после их подрачивания во II пептоне и на всех последующих этапах.

На базе лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в процессе мониторинга холеры использованы диагностические моноклональные препараты для подтверждения принадлежности выделенных культур к *V. cholerae* O1 El Tor в серологических методах (Акт внедрения № 1041/1-16-10 от

02.09.2016 г.). Нормативная документация (ТУ и Инструкция по применению) на набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» одобрена Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 10 от 5.12.2016 г.) и утверждена директором института.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕДИЦИНСКОГО ИЗДЕЛИЯ.
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ БЫСТРОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ
ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ
«ТЕСТ-ПОЛОСКА *VIBRIO CHOLERAЕ* TOX⁺»
(ИНФОРМАЦИОННО-МЕТОДИЧЕСКОЕ ПИСЬМО)**

Бикетов С.Ф., Баранова Е.В., Соловьев П.В., Храмов М.В., Дятлов И.А.
ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии», Оболensk, Московская обл.

Аннотация.

В настоящем информационно-методическом письме приводится описание методики ускоренного выявления и идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* с применением диагностического препарата «Тест-полоска *V. cholerae* tox⁺» при проведении клинической лабораторной диагностики на стадии бактериологического исследования образцов по МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

Целью информационно-методического письма является внедрение разработанного отечественного иммунохроматографического теста «Тест-полоска *V. cholerae* tox⁺» (Регистрационное удостоверение № РЗН 2015/2650 на медицинское изделие «Набор реагентов для быстрой идентификации токсигенных штаммов возбудителя холеры «Тест-полоска *V. cholerae* tox⁺» по ТУ 9398-158-78095326-2012) в практику бактериологических лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор за холерой в части, касающейся организации и проведения лабораторной диагностики холеры.

1. Общие положения.

Холера является острой кишечная инфекцией, вызываемой при

попадании в организм пищевых продуктов или воды, зараженных бактерией *Vibrio cholerae*. Болеют взрослые и дети. Холера имеет короткий инкубационный период - от нескольких часов до пяти дней. Попавшие в организм вибрионы вырабатывают энтеротоксин, вызывающий обильную, безболезненную, водянистую диарею. По оценкам ВОЗ, ежегодно происходит от 1,4 до 4,3 миллиона случаев заболевания холерой и от 28 до 142 тысяч случаев смерти от холеры. Короткий инкубационный период — от 2 часов до 5 дней — усиливает потенциально взрывной характер вспышек этой болезни [1].

Существующая тенденция роста заболеваемости в мире, регистрация крупных вспышек и эпидемий в ряде стран способствуют сохранению высокого риска заносов, прежде всего, из неблагополучных по холере регионов Юго-Восточной Азии, Африки и Карибского бассейна (Гаити, Доминиканская Республика, Куба).

За последние 10 лет на территории России практически ежегодно отмечали завозные случаи холеры (кроме 2007, 2011 и 2013 гг.).

Из Индии в Россию заносы холеры зарегистрированы в 2004 и 2008 гг. в Белорецк (Республика Башкортостан); в 2006 г. – в Мурманск; в 2010, 2012 и 2014 гг. – в Москву.

Одним из основных факторов вирулентности (и эпидемической значимости) холерных вибрионов, определяющих тяжесть клинической картины при холере, является холерный энтеротоксин, синтез которого контролируется кластером генов *ctxAB*.

Холерный энтеротоксин продуцируется серотипами *V. cholerae* O1 и O139, и большинство проявлений клинической картины холеры обусловлено действием токсина. Холерный энтеротоксин представляет собой белок, состоящий из А-субъединицы и пяти В-субъединиц [2]. А-субъединица обладает ферментативной активностью, В-субъединица обеспечивает прикрепление токсина к поверхности клеток тонкого кишечника и внедрение А-субъединицы внутрь клеток. Прикрепление В-субъединицы происходит за счет взаимодействия с ганглиозидом M1, расположенном на поверхности энтероцитов.

Специфической мишенью, выявляемой набором реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* tox⁺», является холерный энтеротоксин, появляющийся на поверхности бактерий и в культуральной жидкости в ходе культивирования токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* в питательном бульоне, поддерживающем токсинообразование. Набор реагентов представляет собой пластиковую диагностическую панель (футляр) с круглой лункой для добавления исследуемой пробы и с прямоугольным окошком для считывания результатов. На футляре имеется маркировка, указывающая название определяемого микроорганизма «*V. cholerae* tox⁺». При добавлении исследуемой пробы в круглую лунку диагностической панели, холерный энтеротоксин

образует комплекс с «детекторными» антителами к холерному энтеротоксину, которые конъюгированы с красителем – коллоидным золотом. Окрашенный комплекс мигрирует по капиллярам мембраны и концентрируется в тестовой (Т) полосе за счет взаимодействия с иммобилизованными там «захватывающими» антителами к холерному энтеротоксину. Учет результата проводят визуально.

2. Аналитические и диагностические характеристики набора реагентов для быстрой идентификации токсигенных штаммов возбудителя холеры «ТЕСТ-ПОЛОСКА *V. cholerae tox⁺*».

Набор реагентов для быстрой идентификации токсигенных штаммов возбудителя холеры «Тест-полоска *V. cholerae tox⁺*» обладает диагностической чувствительностью (доля правильных положительных результатов при исследовании образцов) не менее 85 %, и диагностической специфичностью (доля правильных отрицательных результатов при исследовании образцов) не менее 90 %.

Для проведения исследования не требуется специальное оборудование. Надежная упаковка тестов обеспечивает сохранность при хранении и транспортировке. Использование набора «Тест-полоска *V. cholerae tox⁺*» позволяет сократить время исследования и в дальнейшем целенаправленно изучать положительные на холерный энтеротоксин биологические образцы.

Для работы с иммунохроматографическим тестом «Тест-полоска *V. cholerae tox⁺*» необходимы:

- пробирки стеклянные;
- пипетки стеклянные или одноразовые пластиковые, позволяющие отбирать объемы жидкости 0,15 мл;
- чашки Петри;
- стандарты мутности (ОСО42-28-85 П), (ОСО42-25-86 П);
- бактериологическая петля диаметром 0,3 см;
- питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая (щелочной агар) или другая питательная среда с аналогичными свойствами;
- питательная среда Бульон Лурия или другой бульон, поддерживающий токсинообразование.

3. Подготовка материала для исследования.

3.1. Взятие, посев и анализ исследуемого материала производится в соответствии с МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», МУК 4.2.1793-03 «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами», МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная

диагностика холеры».

3.2. Выделенные из клинического материала культуры, подозрительные на патогенные холерные вибрионы, культивируют на щелочном агаре (рН 7,6) при температуре 37°C в течение 18 ч. Далее культуру микроорганизмов со щелочного агара в количестве одной стандартной бактериологической петли стерильно вносят в 5,0 мл среды Бульон Лурия или в другой бульон, поддерживающий токсинообразование, и инкубируют при температуре 37 °С в стационарных условиях в течение 3 ч. Затем 0,5 мл полученной бульонной культуры вносят в 5,0 мл свежей среды Бульон Лурия или другой среды, поддерживающей токсинообразование, и снова инкубируют при температуре 37 °С в течение 6 ч. Полученную бульонную культуру используют для идентификации с помощью набора реагентов «Тест-полоска *V. cholerae* tox+».

Обработанные материалы автоклавируют при температуре 126±2°C 60 минут в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)»

4. Проведение исследования.

4.1. Вскрыть пакет, извлечь необходимое количество «Тест-полосок *V. cholerae* tox+», поместить в чашку Петри (поверхность должна быть горизонтальной) и выдержать при комнатной температуре (22 ± 2) °С 15 мин.

4.2. С помощью пипетки внести в круглую лунку футляра каждого теста 0,15 мл испытуемой бульонной культуры.

5. Учет и интерпретация результатов.

Учет результата провести через 15-20 минут в соответствии со схемой интерпретации результатов и указателем расположения тестовой (Т) и контрольной (С) полос на футляре теста (рисунок 1, 2).

<p>Положительный результат</p> <p>↓</p> <p>Наличие видимых глазом двух окрашенных линий «Т» и «С»</p>	<p>Отрицательный результат</p> <p>↓</p> <p>Наличие только одной окрашенной линии «С»</p>
<p>Тест не работает</p> <p>↓</p> <p>Отсутствие окрашенной линии «С»</p>	<p>Тест не работает</p> <p>↓</p> <p>Отсутствие окрашенных линий «Т» и «С»</p>

Рисунок 1. Схема интерпретации результата.

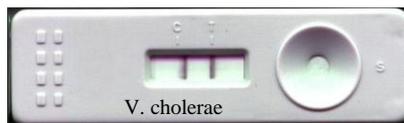


Рисунок 2. Пример положительного результата.

6. Меры предосторожности.

При работе с образцами и микробными культурами необходимо соблюдать санитарно-эпидемиологические правила: СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень ВОЗ. – 2015. – № 107.
2. Finkelstein, R.A. Pathogenesis experimental cholera in infant rabbits. 1. Observations on the intrainestinal infection and experimental cholera produced with cell-free products / R.A. Finkelstein, H.T. Norris, N.K. Dutta // J. Infect. Dis. – 1964. – Vol. 114. – P. 203-216.
3. Лабораторная диагностика холеры. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора: МУ 4.2.2218-07 2007. – 87 с.
4. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521-09.

АННОТАЦИЯ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА»

«АНТИЛАКТОФЕРРИНОВАЯ АКТИВНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ»

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЁНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.02.03. –
МИКРОБИОЛОГИЯ

Коршенко В.А.

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

Диссертация «Антилактоферриновая активность холерных вибрионов» Коршенко Виктории Александровны выполнена в отделе профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов ФКУЗ Ростовский – на – Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Проведена модернизация методики изучения антилактоферриновой активности у условно-патогенных микроорганизмов для исследования штаммов холерных вибрионов.

Доказано наличие антилактоферриновой активности у холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп; показаны различия в уровнях антилактоферриновой активности у *Vibrio cholerae* El Tor, *Vibrio cholerae* O139 и *Vibrio cholerae classical*.

Изложены доказательства наличия высоких показателей антилактоферриновой активности у эпидемически значимых штаммов вибрионов Эль Тор, выделенных от людей (больных, вибрионосителей), что косвенно указывает на возможную роль антилактоферриновой активности в патогенезе холеры в качестве «малого фактора» патогенности. Введены новые понятия в механизм действия антилактоферриновой активности: доказано участие в механизме антилактоферриновой активности углеводных лектиновых рецепторов как связующего звена между лактоферрином и клетками холерного вибриона, показано участие гемагглютинин/протеазы в проявлении антилактоферриновой активности.

Разработан метод количественной оценки уровня адгезии холерных вибрионов на модели культур клеток аденакарциномы двенадцатиперстной кишки человека HuTu 80, подобраны критерии оценки уровня адгезии холерных вибрионов, патент на изобретение №

2595423 от 3.08.2016г.

Изучены свойства потенциально эпидемически опасных вибрионов Эль Тор с генотипом *ctxABtcpA*⁺, обладающих максимально выраженной способностью к продукции антилактоферринового фактора, и высказана гипотеза о значительной роли данного признака для персистенции этой группы вибрионов.

В Государственной коллекции патогенных бактерий Российского-научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора (ГКПБ) депонирован авторский штамм *V. cholerae* P-18775 серогруппы O1 биовара Эль Тор, обладающий высокой антикомплементарной и антилактоферриновой активностью (номер в коллекции КМ275). Справка о депонировании № 2014149782 от 9.12.2014 г.

Разработаны методики, позволяющие изучать персистентные свойства холерных вибрионов с использованием методических приемов, адекватных с точки зрения требований биологической безопасности при работе с микроорганизмами II группы патогенности, изложенные в Методических рекомендациях «Методика создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры» (утверждены Ученым Советом и директором Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора 04.12.2014 г., протокол №12 от 04.12.2014г.) и в Методических рекомендациях «Изучение свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов» (утверждены Ученым Советом и директором Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора 20.11.2009 г., протокол №10 от 20.11.2009г.).

Результаты диссертационной работы используются в Ростовском Государственном медицинском университете Минздрава РФ на кафедре микробиологии при чтении лекций и проведении практических занятий (Акт о внедрении от 7.10.2015 г.). А также в Ростовском-на-Дону противочумном институте Роспотребнадзора для определения уровня адгезии холерных вибрионов в культуре клеток Нер-2 и NuTu-80 (Акт внедрения от 03.04.2015 г.).

Диссертация защищена 8.04.2016 на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 на базе Федерального Бюджетного Учреждения Науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

**МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ИДЕНТИФИКАЦИИ И
ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* И *VIBRIO
ALGINOLYTICUS***

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
БИОЛОГИЧЕСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 03.02.03 –
МИКРОБИОЛОГИЯ

Рыковская О.А.

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

Разработана схема лабораторной диагностики заболеваний, вызываемых парагемолитическими и другими патогенными для человека вибрионами, включающая, наряду с классическими бактериологическими, и современные молекулярно-генетические методы; доказана перспективность использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для дифференциации парагемолитических вибрионов от близкородственных видов; предложен комплексный метод оценки вирулентности штаммов *V. parahaemolyticus*, основанный на фено- и генотипической характеристиках вибрионов, связанных с патогенностью; разработана модель для определения эффективной экспрессии гена термостабильного прямого гемолизина парагемолитических вибрионов *in vitro*; представлены данные о гено- и фенотипических признаках, включая и антибиотикорезистентность, большой коллекции штаммов *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, выделенных из различных источников с 1973 по 2014 гг.

Разработаны и внедрены на учрежденческом уровне двое методических рекомендации и 6-ой выпуск каталога патогенных для человека вибрионов, депонировано два авторских штамма *V. parahaemolyticus* в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и две нуклеотидные последовательности *trh-nik-ure*- кластеров двух штаммов *V. parahaemolyticus* в базах GenBank. Создана и зарегистрирована база данных «Фено- и генотипическая характеристика штаммов алгинолитических вибрионов».

Диссертация защищена 25 октября 2016 г. на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ИЗУЧЕНИЯ СПОСОБОВ КОНТРОЛЯ И УПРАВЛЕНИЯ БАЛЛАСТНЫМИ ВОДАМИ НА СУДАХ СМЕШАННОГО «РЕКА-МОРЕ» ПЛАВАНИЯ

ДИССЕРТАЦИЯ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА
МЕДИЦИНСКИХ НАУК ПО СПЕЦИАЛЬНОСТИ 14.02.02 –
ЭПИДЕМИОЛОГИЯ

Лях О.В.

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

Вступление в силу Постановления Правительства РФ от 28.03. 2012 г. № 256 «О присоединении Российской Федерации к Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года» делают научную работу по исследованию балластных вод судов актуальной. Впервые в РФ (на примере порта Таганрог) проведены исследования на наличие возбудителей холеры в пробах балластных вод, отобранных на судах смешанного «река-море» плавания. Результаты мониторинга наличия индикаторных микроорганизмов (*V. cholerae* O1 и O139, *E. coli*, кишечных энтерококков) в соответствии с международным стандартом качества балластных вод и изучение морских транспортных сообщений порта Таганрог с зарубежными странами позволили выделить «территории риска» - порты - «доноры» холерных вибрионов и «факторы риска» - типы судов, что будет способствовать дальнейшему совершенствованию эпидемиологического надзора за холерой в РФ.

Для обеспечения эпидемиологической безопасности балластных операций впервые осуществлен санитарно-карантинный контроль операций по смене балласта на судах смешанного «река-море» плавания в бассейне Таганрогского залива Азовского моря и разработан «Алгоритм контроля замены балласта уполномоченным должностным лицом морского порта».

Впервые разработан План противоэпидемических и профилактических мероприятий при выделении из судовых балластных вод *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. План включает мероприятия не только на судне, в балластных водах которого выделены возбудители холеры, но и на судах портофлота, портовой акватории и населенных пунктах, непосредственно граничащих с портом и имеющих с ним совместную инфраструктуру.

Автором диссертационной работы предложены различные способы отбора проб балластной воды на судах. Приоритет разработок

подтвержден патентом на изобретение № 2537010 от 27.06.2013 г. «Способ отбора проб из балластных емкостей судов «река - море» и устройство для его реализации».

Степень и эффективность внедрения результатов диссертации: два методических документа учрежденческого уровня; четыре распорядительных документа Правительства Ростовской области и администрации г. Таганрога.

Диссертация защищена 25.10.2016 г. на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПРАВИЛА РАБОТЫ С БАКТЕРИОФАГАМИ МИКРООРГАНИЗМОВ I-IV ГРУПП ПАТОГЕННОСТИ»

Гаевская Н.Е., Титова С.В., Чемисова О.С., Тюрина А.В., Романова Л.В.
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

Методические рекомендации предназначены для практических и научных работников, занимающихся вопросами выделения, получения, изучения бактериофагов возбудителей ПБА I-IV групп патогенности. Состоят из двух частей, в первой из которых описаны особенности режима работы с бактериофагами, во второй – основные методы, используемые при выделении фагов и при диагностике возбудителей ПБА I-IV групп патогенности с помощью бактериофагов. Описанные приемы могут совершенствоваться в зависимости от целей и условий работы с системой фаг-бактерия.

Методические рекомендации одобрены Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 11 от 12.12.2016 г.) и утверждены директором института.

Для последующего утверждения на федеральном уровне методические рекомендации направлены на согласование в учреждения Роспотребнадзора (письмо № 167-17-10 от 10.02.2017 г.).

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«РАБОТА С ГЕОИНФОРМАЦИОННЫМ ПОРТАЛОМ
(ГИС-ПОРТАЛ) РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО
ИНСТИТУТА. ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ ПРИВЯЗКА
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ ДАННЫХ»**

Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Пичурина Н.Л.¹, Савченко А.П.¹,
Водопьянов С.О.¹, Олейников И.П.¹, Баташев В.В.¹, Ковалёв Е.В.²,
Ненадская С.А.², Леоненко Н.В.², Гончарова О.В.², Слись С.С.²,
Махненко Д.С.², Новикова А.И.², Швагер М.М.³, Богунов И.И.³,
Поливенко В.А.³, Полонский А.В.³, Гончаров А.Ю.³, Говорухина М.В.³,
Киреев Ю.Г.⁴, Балахнова В.В.⁴, Берберов Г.А.⁴

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

²*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области;*

³*ФКУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области»;*

⁴*ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора*

В методических рекомендациях рассматриваются вопросы, связанные с работой на геоинформационном портале, выбор тематических атласов, изменение масштаба карт, работа со слоями.

Отдельный раздел атласа посвящён описанию различных координатных систем и способам географической привязки различных данных, включающих как измерение координат на местности, так и непосредственное указание точек на ГИС-портале.

Методические рекомендации предназначены для эпидемиологов, зоологов и специалистов, занимающихся проблемами эпидемиологического надзора.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 2 от 04.04.2017 г.) и утверждены директором института.

**ЭПИДЕМИОЛОГО-ГЕОГРАФИЧЕСКИЙ АТЛАС
«РОССИЙСКО-УКРАИНСКАЯ ГРАНИЦА» ЧАСТЬ I – РЕКИ
(РОСТОВСКАЯ, ВОРОНЕЖСКАЯ, БЕЛГОРОДСКАЯ, КУРСКАЯ,
БРЯНСКАЯ ОБЛАСТИ)**

Титова С.В., Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Водопьянов С.О,
Кругликов В.Д., Олейников И.П., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В.

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

В атласе представлены реки, протекающие в непосредственной близости от российско - украинской границы. Истоки рек обозначены более бледным цветом, что позволяет легко определять направление течения рек. Дополнительно в атлас внесены крупные населённые пункты России и Украины. Для облегчения визуального анализа территория Украины обозначена розовым цветом.

Документ предназначен для обеспечения справочной информацией, необходимой для работы специалистов Роспотребнадзора и организаторов здравоохранения.

Атлас одобрен Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 15 от 27.12.2016 г.), утвержден директором института.

**SEQANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ
ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ VIBRIO CHOLERAЕ**

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П.,
Кулешов К.В., Керманов А.В., Олейникова К.В.

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

SeqAnalyzer позволяет проводить анализ данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона. В основе метода лежит поиск заранее определенных референсных генов среди набора контигов, что позволяет определять вид, серогруппу, биовар анализируемого штамма, а также ряд мобильных генетических элементов и островков. Важной особенностью является возможность определения кратности переменных тандемных повторов и выявление INDEL-маркеров, что

имеет существенное значение для эпидемиологического анализа.

Отличительные особенности программы SeqAnalyzer:

- Низкие требования к оборудованию – для работы требуется обычный «офисный» компьютер или ноутбук с 1 Гб оперативной памяти.

- Высокая скорость работы – на анализ данных одного генома (около 10 Мб) требуется 3-4 минуты.

- Простота управления – программа разработана по принципу «одной кнопки» — никаких дополнительных настроек или специальных знаний не требуется.

- Программа рассчитана на работу с набором контигов, что не требует проведения предварительной сборки генома.

- Простота оценки результатов – данные анализа полногеномного секвенирования представляют собой интуитивно понятный текстовый файл на русском языке.

SeqAnalyzer доступен для скачивания на сайте Ростовского противочумного института по адресу <http://antiplague.ru/seqanalyzer> в виде полной версии (предназначена для компьютеров с операционной системой Windows XP, 7, 8 без установленной виртуальной машины JAVA) и только лишь исполняемый файл (для компьютеров с установленной виртуальной машиной JAVA). Помимо этого для загрузки доступны методические рекомендации по использованию программы SeqAnalyzer.

Программа зарегистрирована в Государственном реестре программ для ЭВМ № 2017613695 от 24 марта 2017.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ БИОПЛЁНКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Титова С.В., Веркина Л.М., Селянская Н.А., Лысова Л.К., Егиазарян Л.А.,
Таркаева Ж.В., Корнеева Л.А.

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

В методических рекомендациях предложена модель для изучения процесса формирования биоплёнок холерными вибрионами на твёрдых субстратах в экспериментальных условиях.

Метод получения и визуализации биоплёнок холерных вибрионов, предложенный авторами, даёт возможность наблюдать за поэтапным формированием биоплёнки, оценить состояние её физиологической жизнедеятельности в количественном и качественном измерениях, а также

устойчивость к различным внешним воздействиям. Стадии развития биоплёнки оценивали с помощью световой и люминесцентной микроскопии.

Методические рекомендации предназначены для сотрудников научно – исследовательских учреждений Роспотребнадзора, имеющих разрешение на работу с возбудителем холеры.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 6 от 25.08.2016 г.), утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПЦР-ГЕНОТИПИРОВАНИЕ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ»

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б.
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
г. Ростов-на-Дону*

В методических рекомендациях предложена методика ПЦР – генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов по детекции 14-ти генетических детерминант факторов патогенности, рассчитанных по статистической методике определения их минимально оптимального количества. Последующий сравнительный анализ различных сочетаний (наличие/отсутствие) данных генов дает возможность определения генотипов указанных штаммов. Предлагаемая методика генотипирования позволяет дать ответ с высокой дискриминирующей силой о сходстве/различии, возможном происхождении (занос/переживание), а также о вероятном значении нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 различного происхождения, как этиологического фактора ОКИ.

Методические рекомендации предназначены для сотрудников научно – исследовательских учреждений Роспотребнадзора, имеющих разрешение на работу с возбудителем холеры.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 2 от 05.04.2017 г.), утверждены директором института.

БАЗА ДАННЫХ
«VIBRIO CHOLERAЕ. СИБИРЬ И ДАЛЬНИЙ ВОСТОК –
АМПЛИФИКАЦИОННЫЙ ПРОФИЛЬ_MLVA-ГЕНОТИП»

Миронова Л.В., Балахонов С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С.,
Басов Е.А., Феранчук С.И., Миткеева С.К., Гольдапель Э.Г., Бочалгин Н.О.
ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск

В базе представлены данные молекулярно-генетического анализа изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке штаммов *V. cholerae* по комплексу детерминант патогенности, пандемичности, персистенции, принадлежности к серогруппе, биовару и пяти локусам вариабельных tandemных повторов – VcA, VcB, VcC, VcD, VcG. Работа с базой данных предусматривает использование СУБД Microsoft Access, интегрированной с дополнительными инструментами обработки и представления данных. Возможности обработки выборки из базы включают средства представления данных на интерактивной географической карте и построение дендрограммы на основе расстояния между генотипами штаммов.

База может использоваться для ретроспективного и оперативного эпидемиологического анализа, оценки распространенности *V. cholerae* определенных генотипов на отдельных территориях региона, оперативной характеристики генотипов вновь выделяемых штаммов.

Внесена в Реестр баз данных, выдано свидетельство о государственной регистрации (регистрационный № 2016620904 от 1.07.2016 г.).

ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ НА ИЗОБРЕТЕНИЯ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ

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

Способ оценки адгезивных свойств холерных вибрионов *V.cholerae El Tor* и *V.cholerae O139* на клеточной культуре HU TU-80.

Патент № 2595423 от 03.08.2016 г.

Татаренко О.А., Коршенко В.А., Титова С.В., Алексеева Л.П.,
Черепихина И.Я.

Изобретение относится к медицинской микробиологии и касается способа оценки адгезивных свойств холерных вибрионов. Способ включает следующие стадии:

- подготовку монослоя клеток Hu Tu-80 путём их выращивания;
- подготовку бактериальной суспензии штаммов *V.cholerae El Tor* и *V.cholerae O139*;
- эксперимент проводят в пенфлаконах с дисками, на которых сформировался разряженный монослой Hu Tu-80, куда добавляют 10 мгл бактериальной суспензии и 1 мл среды DMEM с 5% сыворотки эмбриональной бычьей до концентрации холерных вибрионов 10^6 м.к./мл.
- по окрашенным дискам проводят подсчет связанных бактериальных клеток.

Изобретение может быть использовано в лабораторной диагностике для определения индекса адгезии холерных вибрионов *V.cholerae El Tor* и *V. cholerae O139* (Бенгал.)

Способ дифференциации токсигенных и атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы по ингибирующей активности.

Патент № 2596401 от 10.09.2016 г.

Водопьянов С.О., Водопьянов А. С., Титова С.В.

Изобретение относится к области медицинской микробиологии и касается способа дифференциации токсигенных и атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы по ингибирующей активности. Способ включает заданные технологические стадии. Изобретение позволяет быстро определять способность выживать в водных объектах штаммов холерных вибрионов и может быть использовано для мониторинга вод водоемов на наличие токсигенных штаммов холерных вибрионов и предотвращения холеры.

Способ отбора проб с поверхности водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов и переносное устройство для его осуществления.

Решение о выдаче патента от 3.03.2017 год

Титова С.В., Веркина Л.М., Головин С.Н., Тришина А.В.

Изобретение относится к медицинской микробиологии, а именно к области получения и подготовки образцов проб с водных поверхностей водоёмов для проведения бактериологических исследований. Способ отбора проб воды с поверхности водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов включает спуск устройства для отбора воды с использованием троса на глубину пробоотбора. Одновременно в отведенном месте водоема берут с помощью переносного устройства шесть проб, используя сменные проботорники. Технический результат: повышения эффективности проведения бактериологических исследований.

Способ молекулярно-генетического внутривидового типирования токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor.

Решение о выдаче патента от 11.04.2017 год

Водопьянов С.О., Водопьянов А. С., Олейников И.П.

Изобретение относится к области биохимии. Заявлен способ молекулярно-генетического внутривидового типирования токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Способ включает выделение ДНК из исследуемого штамма *Vibrio cholerae* O1 El Tor, постановку ПЦР со специфическими праймерами и учет полученных результатов. Амплификацию исследуемой ДНК проводят сконструированными праймерами к каждому из ICE элементов индийского и мозамбикского типов в присутствии интеркалирующего красителя Siber Green. Затем продукты амплификации подвергают плавлению, учет результатов проводят по температурным пикам плавления и размеру ампликона. При температуре плавления 87°C и размере ампликона 300 п.о. регистрируют наличие ICE индийского типа. При температуре плавления 79°C и размере ампликона 149 п.о., регистрируют наличие ICE мозамбикского типа. Изобретение позволяет быстро и достоверно определять происхождение выделенных токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor.

Способ оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам.

Решение о выдаче патента от 25.05.2017 г.

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Титова С.В.

Изобретение относится к медицинской микробиологии. Предложен

способ оценки чувствительности биопленок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам, включающий получение биопленки на стеклянных цилиндрах. Цилиндры с полученной биопленкой устанавливают на агар в чашке Петри, в середину цилиндра вносят растворы антибактериального препарата в разных концентрациях. Результаты учитывают через 18-20 ч инкубации при 37°C по наличию или отсутствию роста холерных вибрионов в отпечатках цилиндров. Чувствительность биопленки холерных вибрионов к антибактериальным препаратам оценивают по индексу активности, рассчитанному по формуле:

$$ИА = \frac{МПК_ч}{МПК_б}$$
 где ИА - индекс активности антибактериального препарата;

МПК_ч- максимальное значение МПК данного антибактериального препарата для чувствительных штаммов в соответствии с МУК 4.2.2495-09; МПК_б - значение МПК данного антибактериального препарата в отношении биопленки исследуемого штамма. Чувствительность биопленки исследуемого штамма прямо пропорциональна индексу ИА. Способ обеспечивает точность оценки чувствительности биопленки штаммов холерных вибрионов к антибактериальному препарату.

Способ идентификации штаммов вида *V.parahaemolyticus* методом ПЦР в режиме реального времени.

Заявка № 2016146441 от 25.11.2016 г.

Чемисова О.С., Трухачёв А.Л., Рыковская В.А., Полеева М.В.

Изобретение относится к области биотехнологии и генетической инженерии и может быть использовано при экспресс - диагностике представителей вида *V. parahaemolyticus*. Амплификацию исследуемой ДНК проводят с помощью сконструированных праймеров:

vppC For CGG-CAA-GCG-TGG-TTT-GTG-AC

vppC Rev CGT-TGA-TGC-AAC-TTG-CAC-CTT-G

в присутствии специфичного зонда:

vppC ProbaA (5'-ROX-CG-TTC-ACA-ACC-ACC-AAC-AGC-AAC-GAC-TTG- BHQ2- 3'),

при этом зонд содержит в своем составе флуоресцентную метку ROX и гаситель флуоресценции BHQ2, учет результатов идентификации происходит автоматически на мониторе компьютера в виде кривых и в численных значениях, отражающих уровень флуоресцентного свечения определенной длины волны, если возникает флуоресцентный сигнал с длиной волны 605 нм, характерный для флуорофора RQX, то делают заключение о наличии в пробе ДНК штаммов вида *V. parahaemolyticus*.

При этом ПЦР проводят в объеме 25 мкл и реакционная смесь содержит: TagДНК-полимераза - 0,5 мкл, 10×dNTP - 0,5 мкл, 5×буфер - 5

мкл, праймер For - 2 мкл, праймер Rev - 2 мкл, зонд - 1,5 мкл, исследуемая ДНК - 5 мкл, денонсированная вода - 8,5 мкл.

Кроме того ПЦР реакции проходит с соблюдением определенных этапов.

Использование этого способа позволяет достоверно, быстро и эффективно проводить детекцию и дифференцировать от близкородственных видов штаммы *V. parahaemolyticus*.

Способ получения препарата белка OmpT для моделирования противохолерного иммунитета у экспериментальных животных.

Заявка № 20171000642 от 10.01.2017 г.

Иванова И.А., Мишанькин Б.Н., Омельченко Н.Д., Шипко Е.С., Филиппенко А.В., Беспалова И.А.

Изобретение относится к области экспериментальной медицины, а именно к специфической профилактике инфекционных болезней, касающейся получения препаратов для создания специфического серотипового иммунитета к холере у экспериментальных животных на основе белка внешней мембраны **OmpT** холерного вибриона.

Сущность изобретения заключается в том, что получают препарат белка OmpT для моделирования противохолерного иммунитета у экспериментальных животных по определенной технологии.

Результаты изобретения могут быть использованы при разработке новых иммунобиологических вакцинных препаратов для специфической профилактики холеры.

Способ получения образцов биоплёнок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии.

Заявка № 2017108346 от 13.03.2017 г.

Головин С.Н., Титова С.В., Симонова И.Р.

Изобретение относится к экспериментальной биологии и медицине и может быть использовано при проведении научно-исследовательских работ, связанных с изучением пространственной структуры биопленок холерных вибрионов.

Сущность изобретения заключается в том, что биоплёнки культивируют в суспензии на поверхности плёнок-подложек субстрата в течение не менее 5 суток при температуре 22°C. Практическое применение данного способа позволяет получать качественные и информативные образцы биопленок холерных вибрионов, визуализировать их отдельные структуры, проследить динамику формирования и изменения клеток в процессе её развития, определять пространственную структуру экстрацеллюлярного матрикса.

База данных «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп республики Калмыкия.

Свидетельство № 2017620363 от 03.04.2017 г.

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

База данных содержит информацию о 60 штаммах холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, выделенных от больных на территории Республики Калмыкия с 2000 по 2015 гг.

В базе представлены данные по определению серологической принадлежности и ПЦР-типированию штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп. Серотипирование проводили с помощью набора сывороток к 80 серогруппам, полученных в Ростовском противочумном институте. ПЦР-генотипирование проводили по расширенному набору детерминант факторов патогенности / персистенции, включающему 65 генов и их аллелей, большинство которых входили в состав нескольких кластеров, мобильных элементов либо геномных островов.

База данных «Спектр микрофлоры открытых водоёмов г. Ростова-на-Дону, чувствительность к антибактериальным препаратам.

Свидетельство № 2017620443 от 18.04.2017 г.

Березняк Е.А., Тришина А.В., Архангельская И.В., Симонова И.Р., Веркина Л.М., Полеева М.В., Егиазарян Л.А., Селянская Н.А.

База данных содержит информацию о 750 видах микроорганизмов, принадлежащих 13 семействам, выделенных в 2016 г. из водоёмов г. Ростова-на-Дону и предназначена для обнаружения доминирующих групп микроорганизмов, выявления патогенных и условно - патогенных бактерий, а также для анализа чувствительности\устойчивости выделенных штаммов к антибактериальным препаратам.

Полученные данные могут быть использованы как в фундаментальных научных исследованиях, так и в практических, для мониторинга эпидемиологической ситуации в регионе. Анализ результатов дает возможность оценить риск появления и распространения мультирезистентных штаммов в окружающей среде, позволяя предотвратить вспышки заболеваний, вызванных такими штаммами.

База данных ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой»

Свидетельство № 2017620636 от 9.06.2017 г.

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

ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» содержит данные о точках отбора проб воды на вибриофлору в различных регионах РФ с привязкой к конкретным водным объектам. ГИС доступна для сотрудников Роспотребнадзора на ГИС-портале ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (gis.antiplague.ru).

В ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» внесены данные о местах выделения холерных вибрионов O1 серогруппы за 2014-2016 годы с привязкой к конкретным местам выделения.

Данные ГИС могут быть использованы для оценки взаиморасположения точек отбора проб воды относительно различных эпидемиологических объектов и мест выделения штаммов, что может использоваться для планирования противоэпидемических мероприятий.

Программа ЭВМ «Seq-Analyser» – программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *V.cholerae*, определения кратности переменных тандемных повторов (VNTR), выявления INDELh-маркеров.

Свидетельство № 2017613695 от 24.03.2017 г.

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Иванов С.А.

Разработанная программа, позволяет проводить анализ данных полногеномного секвенирования штаммов холерного вибриона. В основе метода лежит поиск заранее определенных референсных генов среди набора контигов, что позволяет определять вид, серогруппу, биовар анализируемого штамма а также ряд мобильных генетических элементов и островков.

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ

В ГКПБ «Микроб» ФКУЗ Российский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора депонированы штаммы:

- *V.cholerae* КМ 2043 – *V.cholerae* 17551. Штамм может быть использован в качестве тест-штамма для оценки эффективности дезинфицирующих средств в отношении холерных вибрионов.

Авторы: Чемисова О.С., Сагакянц М.М., Голенищева Е.Н., Полеева М.В.

Дата депонирования: 26.04.2017 г.

- *V.cholerae* КМ 2025 - *V.cholerae* El Tor Oqava 19 243 и *V.cholerae* КМ 2026 - *V.cholerae nonO1/nonO139 19 190* – могут быть использованы как референтные для различных типов конъюгативного SXT-элемента при изучении молекулярно-генетических механизмов антибиотикорезистентности и паспортизации штаммов возбудителя холеры.

Авторы: Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Замарин А.А., Викторов Д.В.

(ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ); Селянская Н.А., Веркина Л.М., (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт).

Дата депонирования: 16.08.2016 г.

- *E.coli* КМ 2028 - M15[pREP4]pHlyA – суперпродуцент прогемолизина (pro-HlyA) *V.cholerae*. Предназначен для получения препаративных количеств гемолизина в целях создания специфических диагностикумов, а также изучения значимости гемолизина как фактора патогенности/персистенции.

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Непомнящая Н.Б.

Дата депонирования: 17.02.2017 г.

- *E.coli* КМ 2029 - Jm103pCefVp – продуцент предполагаемой липазы (CefVp) *V. parahaemolyticus*. Предназначен для получения препаратов искомого белка в целях определения его биологической активности *in vitro* и *in vivo* и выяснения возможной роли в вирулентности негемолитичных штаммов.

Авторы: Монахова Е.В., Демидова Г.В., Подойнищина О.А., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В.

Дата депонирования: 17.02.2017 г.

- *E.coli* КМ 2030 - Jm109pНГ-Q2.21 – суперпродуцент шаперона Hfq

V.cholerae

Авторы: Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И., Иванов С.А.
Дата депонирования: 17.02.2017 г.

- *V.parahaemolyticus* КМ 2027 – *V.parahaemolyticus* P-14810/1 – продуцент термостабильного прямого гемолизина (ТДН)

Авторы: Чемисова О.С., Рыковская О.А., Сагакянц М.М., Полеева М.В.

Дата депонирования: 17.02.2017 г.

В ФБУН ГНЦ ПМБ г. Оболенск депонированы:

- **Н-61** Авторский штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus.musculus* L. ГХ–Н2F6/Орп – продуцирует МКА к антигену возбудителя холеры, может быть использован при создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации тср⁺штаммов *V.cholerae* O1/O139 серогрупп. (Свидетельство о депонировании № 179 от 12.12.2016)

Авторы: Алексеева Л.П., Евдокимова В.В.

- **Н-60** Авторский штамм гибридных культивируемых клеток животных *Mus.musculus* L. ГХ – А5Д8/Орп – МКА к антигену возбудителя холеры, может быть использован при создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации штаммов *V.cholerae* O1 и O139 серогрупп (Свидетельство о депонировании № 179 от 12.12.2016).

Авторы: Алексеева Л.П., Евдокимова В.В.

В коллекцию бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора депонирован:

- **ФК-109** бактериофаг № 6 *Vibrio cholerae* – лизирует штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров *Classical* и *El Tor*, в том числе антибиотикоустойчивый *V.cholerae* *El Tor* 19243. Фаг депонирован для научных и прикладных целей.

Авторы: Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожева М.П.

Дата депонирования 13.06.2017 г.

ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

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

Посвящается 95-летию
санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации

Выпуск № 30

.....

Сдано в набор 05.09.2017 г.. Подписано в печать 10.09.2017 г.
Заказ № 34 от 05.09.2017 г.
Обложка: бумага мелованная 250 гр/м². Внутренний блок:
офсетная 80 гр/м². Формат бумаги 60×84/16. Усл. печ. л. 14,5.
Тираж 100 экз.

Отпечатано в типографии ИП Андрющенко И.Е.
344004, г. Ростов-на-Дону, пер. Отрадный, 1
тел.: 8 (863) 247-75-53

Издательство ООО «Медиа-Полис»
344038, г. Ростов-на-Дону, пр. Нагибина, 14а
тел.: 8 (863) 201-37-80

.....