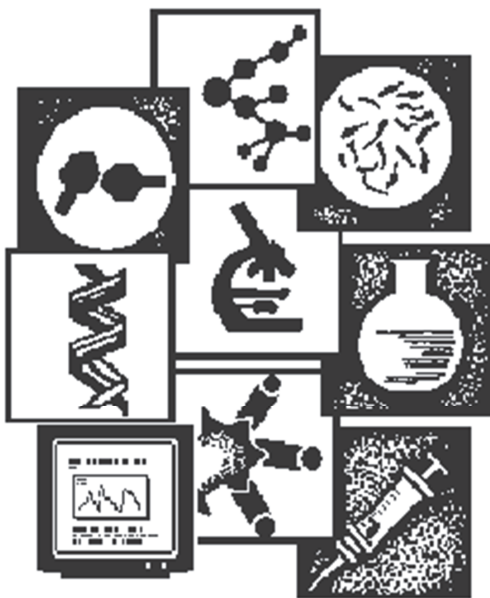




ПОСВЯЩАЕТСЯ 85-ЛЕТИЮ
РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ
ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА

ХОЛЕРА И
ПАТОГЕННЫЕ
ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА
ВИБРИОНЫ
СБОРНИК СТАТЕЙ
ПРОБЛЕМНОЙ
КОМИССИИ (48.04)
Координационного
научного совета по
санитарно-
эпидемиологической
охране территории
Российской Федерации



Выпуск № 32

РОСТОВ-НА-ДОНУ
2019 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., Щипелева И.А., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Левченко Д.А., Водопьянов С.О., Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Романова Л.В., Писанов Р.В., Дуванова О.В., Бурлакова О.С., Сизова Ю.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. - Новосибирск: ООО "Типография Продвижение", 2019. - Вып. 32. - 245 с.

ISBN 978-5-0019836-5-1

Сборник посвящен изучению широкого спектра вопросов по таким важным направлениям, как совершенствование эпиднадзора за холерой на территории Российской Федерации; обеспечение прогнозирования ситуации по холере; оптимизация эпидемиологических и других информационно-аналитических критериев при мониторинге; оптимизация мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, с использованием молекулярно-биологических методов; изучение экологии возбудителя холеры и других патогенных вибрионов с использованием современных методов; анализ механизмов изменения вирулентных, иммуногенных и адаптивных свойств природных штаммов возбудителя холеры; полногеномное секвенирование современных штаммов возбудителя холеры и других патогенных вибрионов, а также бактериофагов патогенных вибрионов; совершенствование лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий, разработка и внедрение новых, современных импортозамещающих диагностических препаратов и питательных сред; анализ механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиск способов преодоления резистентности.

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

ISBN 978-5-0019836-5-1

ФКУЗ Ростовский-на-Дону
противочумный институт
Роспотребнадзора

СОДЕРЖАНИЕ

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ И МОНИТОРИНГ ХОЛЕРЫ.....	12
СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ В МИРЕ В 2018 ГОДУ, ПРОГНОЗ НА 2019 ГОД НАУЧНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ	
Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Гаевская Н.Е., Пичурина Н.Л.....	12
АЛГОРИТМ СОЗДАНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ БЮЛЛЕТЕНЕЙ «ОБ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ В МИРЕ»	
Москвитина Э.А., Кривенко А.С., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Пичурина Н.Л., Мишанькин Б.М.	21
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В СВЯЗИ С НАЧАЛОМ РАБОТЫ МЕЖДУНАРОДНОГО АЭРОПОРТА «ПЛАТОВ»	
Водопьянов А.С. ¹ , Титова С.В. ¹ , Пичурина Н.Л. ¹ , Москвитина Э.А. ¹ , Ковалев Е.В. ² , Слись С.С. ² , Рыжков Ю.В. ²	25
УЧЕБНО-ТРЕНИРОВОЧНЫЕ ЗАНЯТИЯ ПО РАЗВЕРТЫВАНИЮ ПРОВИЗОРНОГО ГОСПИТАЛЯ КАК ВАЖНАЯ СТУПЕНЬ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ГОТОВНОСТИ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ	
Мазрухо А.Б. ¹ , Пичурина Н.Л. ¹ , Гаевская Н.Е. ¹ , Ширанов А.Б. ² , Лебедева Е.В. ² , Рыбасова З.В. ² , Скибенко О.А. ² , Рожков К.К. ¹ , Куриленко М.Л. ¹ , Прутков В.Е. ² , Виноградова М.В. ²	28
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРО - ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА	
Чмырь И.А., Титова Н.М., Тимошин В.Б.	35
ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ И САНИТАРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ	
Кожанова О.И., Матвеева Н.И., Архипова Г.Н.	37
ОРГАНИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН	
Галимзянова Н.Ю., Борисова Л.О., Авдонина Л.Г., Пяташина М.А.	42
ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ	
Морозова С.И., Решетняк Е.А., Чеботарь М.А., Просянкикова М.Н., Захарова Г.А, Борзов В.П., Иванова П.В.....	45
ОЦЕНКА РИСКА ЗАНОСА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С БАЛЛАСТНЫМИ ВОДАМИ СУДОВ, ПРИБЫВШИХ В ПОРТЫ ПРИМОРСКОГО КРАЯ	
Хунхеева Ж.Ю. ¹ , Миронова Л.В. ¹ , Носков А.К. ¹ , Шаракшанов М.Б. ¹ , Селезнев В.А. ² , Чеботарь М.А. ² , Балахонов С.В. ¹	49

ХОЛЕРА НА ДОНБАССЕ	
Романенко Т.А., Скрипка Л.В., Бабуркина А.И., Дядюн В.Н.	51
ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПЕРСИСТЕНЦИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ	
Курбатова Е.М., Меньшикова Е.А., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Титова С.В.	56
ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ / ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAE</i> EL TOR В ПЛАНКТОННОЙ ФОРМЕ И В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ К ФАГОЦИТОЗУ ПРОСТЕЙШИМИ	
Меньшикова Е.А., Демидова Г.В., Курбатова Е.М., Миронова А.В., Захаров М.В., Титова С.В., Водопьянов С.О.	61
О РЕЗУЛЬТАТАХ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ХОЛЕРУ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ	
Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Ренгач М.В., Ежова М.И.	65
ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ	
Иванова С.М. ¹ , Иванников В.В. ¹ , Мискинова Т.А. ¹ , Лопатин А.А. ¹ Титова С.В. ² , Кругликов В.Д. ² , Москвитина Э.А. ² , Чемисова О.С. ² , Архангельская И.В. ² , Левченко Д.А. ² , Гаевская Н.Е. ² , Ежова М.И. ² , Непомнящая Н.Б. ²	69
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ, ПРОВОДИМОГО ФКУЗ «СЕВЕРО-КАВКАЗСКАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ СТАНЦИЯ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА ЗА ПЕРИОД С 2009 ГОДА ПО 2018 ГОД	
Киреев Ю.Г., Балахнова В.В., Баташев В.В., Алиева А.А.	73
МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ ГОРОДА МОСКВЫ	
Иваненко А.В., Волкова Н.В., Салова Н.Я., Трусова Н.В.	75
АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ	
Полякова С.В., Габараева Е.А., Винникова О.Н., Дичковский Л.И.	77
РЕЗУЛЬТАТЫ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ХОЛЕРОЙ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ ДАГЕСТАНА	
Батырова Б.А., Бамматов Д.М., Фараджева А.З., Омарова Б.К.	79
О ВЫДЕЛЕНИИ КУЛЬТУР <i>VIBRIO CHOLERAE</i> ИЗ РЕКИ АГУРА ГОРОДА СОЧИ	
Потемкина М.А., Гречаная Т.В., Ваниева Д.С., Скорбобенко В.В.	83
РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ	
Гальцева Г.В., Малай О.П., Классовская А.Е.	87

О ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРАХ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ	
Румянцев А.П., Фролова И.Н., Замулина Л.Н., Цапко Д.Г.	91
ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ ПО ХОЛЕРЕ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ	
Еремин А.Н. ¹ , Русин М.В. ¹ , Сутурина Ю.Э. ¹ , Кириллова О.В. ¹ , Сорокина О.В. ²	95
ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ ПО ХОЛЕРЕ ТРАНСГРАНИЧНЫХ С КИТАЙСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКОЙ РЕК, ПРОТЕКАЮЩИХ ПО ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ	
Алленов А.В., Борзов В.П., Краснощеков В.Н., Иванова П.В.	97
АНАЛИЗ МОНИТОРИНГА ИССЛЕДОВАНИЙ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ НА НАЛИЧИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	
Чащина В.Д., Хорошавина Л.В., Никитин С.В.	98
МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ	101
О РЕЗУЛЬТАТАХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ ЗАГРАНПЛАВАНИЯ, ПРИБЫВШИХ В РОССИЙСКИЕ МЕЖДУНАРОДНЫЕ МОРСКИЕ ПОРТЫ	
Водяницкая С.Ю. ¹ , Павлович Н.В. ¹ , Ренгач М.В. ¹ , Лях О.В. ¹ , Сергиенко О.В. ¹ , Кононенко А.А. ¹ , Киреев Ю.Г. ² , Баташев В.В. ² , Балахнова В.В. ² , Историк О.А. ³ , Черный М.А. ³ , Палилов М.Б. ³ , Мосевич О.С. ⁴ , Бабура Е.А. ⁵ , Григорян Т.Ю. ⁵ , Дерябкина Л.А. ⁶	101
О КУЛЬТУРАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ С 2009 ПО 2018 ГОДЫ	
Тюнникова В.Д., Оброткина Н.Ф., Каляева Т.Б., Бембеева Е.С., Цебекова М.Г., Кулик В.В., Бембинов А.Ю.	107
СВОЙСТВА ЗАБАЙКАЛЬСКИХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, ВЫДЕЛЕННЫХ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ПЯТЬ ЛЕТ	
Мошкина А.А.	110
АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ <i>VIBRIO CHOLERAE</i> EL TOR В СОСТАВЕ ПОЛИМИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ	
Селянская Н.А., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.	112
ГИС: ИНТЕРНЕТ-ПЛАТФОРМА МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ	
Селянская Н.А., Тришина А.В., Березняк Е.А., Егиазарян Л.А., Симонова И.Р., Водопьянов А.С.	117
ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ	
Тришина А.В., Березняк Е.А., Архангельская И.В., Симонова И.Р., Ренгач М.В.	121

О РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ БАЛЛАСТНЫХ ВОД ДЕЗСРЕДСТВОМ ИЗ ГРУППЫ ПОЛИГУАНИДИНОВ	
Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Сергиенко О.В., Кононенко А.А., Иванова Н.Г., Воловикова С.В.	124
СИСТЕМАТИКА, НОМЕНКЛАТУРА, ТАКСОНОМИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА <i>VIBRIO</i>	
Гальцева Г.В., Швец О.Г.	127
ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И O139 СЕРОГРУПП К ДЕСТРУКЦИИ ДИБУТИЛФТАЛАТА	
Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В.	132
СПЕКТР ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O1 EL TOR	
Шипко Е.С., Дуванова О.В., Захаров М.В.	135
ВЫЯВЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ХИТИНАЗ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭНЗИМ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С КОЛЛОИДНЫМ ХИТИНОМ	
Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.	137
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА 141	
БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОФАГОВ PRESTX, ИНТЕГРИРОВАННЫХ В ГЕНОМЫ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	
Монахова Е.В., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Писанов Р.В.	141
СТРУКТУРА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ ШЕСТОГО ТИПА (T6SS) У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП	
Монахова Е.В., Архангельская И.В., Демидова Г.В., Левченко Д.А., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В.	146
ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММОВ «ГАИТЯНСКОЙ» ГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ INDEL- МАРКЕРА	
Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П.	152
СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ДНК <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> В ВОДАХ ЕСТЕСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ	
Сорокин Р.А., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Головин С.Н.	154
ДЕТЕКЦИЯ И ПЕРЕНОС SXT-ЭЛЕМЕНТА У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ	
Селянская Н.А., Водопьянов С.О.	158
РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЯ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>	
Бочалгин Н.О., Миронова Л.В., Беляева А.С., Балахонов С.В.	162
МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ У ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ	
Гладких А.С., Федотова И.С., Миронова Л.В.	167

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ КАВКАЗА В ПЕРИОД С 1970 ПО 1998 ГОДЫ

Бобрышева О.В., Шапаков Н.А., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Кузнецова И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Ульшина Д.В., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Куличенко А.Н. 170

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ SNP-АНАЛИЗ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Васильева О.В., Кузнецова И.В., Савельев В.Н., Куличенко А.Н. 174

ИММУНОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ 177

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ЛИКОПИДА ПРИ ПРОТИВОХОЛЕРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Иванова И.А., Пасюкова Н.И., Труфанова А.А., Беспалова И.А. 177

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Демидова Г.В. 180

ДИАГНОСТИКА 186

АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗАЦИОННЫХ ВОПРОСОВ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ, НОМЕНКЛАТУРЫ И ОБЪЕМОМ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, НА ТЕРРИТОРИЯХ КОТОРЫХ ВЫДЕЛЯЛИСЬ ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ В ПЕРИОД С 2013 ПО 2018 ГОДЫ

Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ренгач М.В., Янович Е.Г. 186

ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ O1, O139*

Алексеева Л.П., Якушева О.А. 189

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ КОНЬЮГАТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Якушева О.А., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Яговкин М.Э. 195

КОНСТРУИРОВАНИЕ *IN SILICO* ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*

Пономарева А.С., Хунжеева Ж.Ю., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Миронова Л.В. 197

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (ПГВС)

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахан Г.Д., Савельева И.К., Самаянц Е.М., Сагакянц М.М., Каминский Д.И., Ульрих Е.П. 200

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ К ДИАГНОСТИЧЕСКИМ ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ ДЛЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ	
Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджаян Г.Д., Савельева И.К., Санамянц Е.М., Сагакянц М.М., Каминский Д.И., Ульрих Е.П.	203
ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ.....	205
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТОК НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРОТИВОЧУМНЫХ ИНСТИТУТОВ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2019 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»	
Щипелева И.А., Марковская Е.И., Кретенчук О.Ф., Титова С.В., Чемисова О.С., Алексеева Л.П.	205
РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ.....	216
НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (НАБОР ПГВС) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO	
Мазрухо А.Б., Харабаджаян Г.Д., Савельева И.К., Каминский Д.И., Ульрих Е.П., Рожков К.К., Чемисова О.С., Санамянц Е.М., Сагакянц М.М.	216
АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ В 2019 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА».....	217
РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, O139 СЕРОГРУПП ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ	
Евдокимова В.В.	217
ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAE</i> O1 БИОВАРА EL TOR	
Крицкий А.А.	218
ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAE</i> БИОВАРА ЭЛЬ ТОР	
Агафонова Е.Ю.	219
АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И ИНСТРУКЦИЙ.....	221
АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ПЕРИОД ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ВОСЕМНАДЦАТЫХ ДЕЛЬФИЙСКИХ ИГР РОССИИ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ 19-24 АПРЕЛЯ 2019 ГОДА.....	221
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА <i>VIBRIO CHOLERAE</i> O1 569 В»	
Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Ларионова Л.П., Галичева А.Л.	222

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «КОНТРОЛЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ ПОКАЗАТЕЛЯМ»	
Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Титова С.В., Харабаджахан Г.Д., Савельева И.К., Каминский Д.И., Санамянц Е.М., Ульрих Е.П.....	223
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ «ИНСПЕКТИРОВАНИЕ МОРСКИХ СУДОВ»	
Водопьянов А.С. ¹ , Москвитина Э.А. ¹ , Водопьянов С.О. ¹ , Олейников И.П. ¹ , Рыжков Ю.В., ² Беспалова С.А. ² , Косорукова О.Г. ²	224
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛИОФИЛЬНОЙ УСТАНОВКЕ КОЛЛЕКТОРНОГО ТИПА ALPHA 1-4 LSC MARTIN CHRIST С ПРИМЕНЕНИЕМ АДСОРБЕНТОВ»	
Чемисова О.С., Сагаянц М.М., Голенищева Е.Н., Полеева М.В., Морозова И.В., Санамянц Е.М.....	224
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИКЛОФЕНАКА»	
Селянская Н.А., Егизарян Л.А., Березняк Е.А.	225
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОНЕНТОВ ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ»	
Гаева А.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Громова О.В., Ливанова Л.Ф., Волох О.А.....	226
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ ОЧИЩЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТСРА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЙ КОМБИНИРОВАННЫМ МЕТОДОМ НА КОЛОНКАХ С НИКЕЛЬ-ХЕЛАТНЫМ СОРБЕНТОМ»	
Тучков И.В., Хопрова Е.В.....	226
МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «VNTR-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ <i>VIBRIO PARAHAEOLYTICUS</i>»	
Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Фортунатова А.В., Балахонов С.В.	227
РАЗРАБОТАННЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ И ДРУГИЕ ПРОГРАММЫ	228
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ»	
Сизова Ю.В., Бурлакова О.С., Балахнова В.В.	228
СБОРНИК КВАЛИФИКАЦИОННЫХ ТЕСТОВ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЕ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ»	
Бурлакова О.С., Балахнова В.В., Сизова Ю.В., Пичурина Н.Л., Архангельская И.В., Ежова М.И., Левченко Д.А., Чемисова О.С.	228

ПОЛОЖЕНИЕ О ДИСТАНЦИОННОМ ОБУЧЕНИИ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ	
Сизова Ю.В., Буракова О.С.	229
ПОЛОЖЕНИЕ О ПРОМЕЖУТОЧНОЙ И ИТОГОВОЙ АТТЕСТАЦИИ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ	
Сизова Ю.В., Буракова О.С.	230
ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ, СОДЕРЖАНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ЭЛЕКТРОННЫХ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ	
Сизова Ю.В., Буракова О.С.	230
ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА «БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ В МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ. ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ, ТРЕБУЮЩИЕ ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»	
Буракова О.С., Сизова Ю.В., Пичурин Н.Л., Чемисова О.С., Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В.	231
ПРОГРАММА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ЧЛЕНОВ ЭКИПАЖЕЙ ПО ВОПРОСАМ ОБРАЩЕНИЯ С ВОДЯНЫМ БАЛЛАСТОМ	
Водяницкая С.Ю.	231
ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ.....	232
ПАТЕНТ «РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ КЛОНИРОВАННЫЙ ГЕН ГЕМОЛИЗИНА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>, И ШТАММ <i>ESCHERICHIA COLI</i> – СУПЕРПРОДУЦЕНТ ГЕМОЛИЗИНА <i>V. CHOLERAЕ</i>»	
Монахова Е.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Непомнящая И.Б.	232
ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ»	
Селянская Н.А., Егизарян Л.А.	232
ПАТЕНТ «СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК, ФОРМИРУЕМЫХ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O1 СЕРОГРУППЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ХИТИНА»	
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Титова С.В.	233
ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОХОЛЕРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ»	
Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Беспалова И.А., Труфанова А.А.	234
ПАТЕНТ «СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР С РАЗЛИЧНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ»	
Агафонова Е.Ю., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.	235
ПАТЕНТ «ШТАММ <i>ESCHERICHIA COLI</i> ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТСПА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА БИОВАРА ЭЛЬ ТОР»	
Тучков И.В., Хопрова Е.В.	235

БАЗА ДАННЫХ «ГЕНОВАРИАНТЫ *VIBRIO CHOLERAE* – РОССИЯ И ПОГРАНИЧНЫЕ СТРАНЫ»

Писанов Р.В.¹, Кулешов К.В.², Монахова Е.В.¹, Ежова М.И.¹, Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Демидова Г.В.¹, Непомнящая Н.Б.¹, Кругликов В.Д.¹, Ковалев Д.А.², Писаренко С.В.³, Жиров А.В.³, Савельева И.В.³, Васильева О.В.³, Савельев В.Н.³, Куличенко А.Н.³..... 236

БАЗА ДАННЫХ «ГИС МЕЖДУНАРОДНЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ СООБЩЕНИЯ. РОСТОВСКАЯ ОБЛАСТЬ»

Рыжков Ю.В.¹, Водопьянов А.С.², Москвитина Э.А.²..... 236

БАЗА ДАННЫХ «ПОТЕНЦИАЛЬНО МАЛЫЕ РНК ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1»

Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М., Захаров М.В..... 237

БАЗА ДАННЫХ «ИНСПЕКТИРОВАНИЕ МОРСКИХ СУДОВ»

Рыжков Ю.В.¹, Водопьянов А.С.², Москвитина Э.А.², Водопьянов С.О.², Олейников И.П.², Беспалова С.А.², Косорукова О.Г.¹ 237

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ЕДИНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТА ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ»

Пичурина Н.Л.¹, Титова С.В.¹, Олейников И.П.¹, Водопьянов С.О.¹, Ковалев А.В.², Конченко А.В.², Ненадская С.А.², Калинина М.В.², Слись С.С.², Полонский А.В.³, Водопьянов А.С.¹..... 238

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ВОДОЕМЫ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ»

Водопьянов С.О.¹, Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Олейников И.П.¹, Гаевская Н.Е.¹, Ковалев Е.В.², Ненадская С.А.², Коржов С.А.², Леоненко Н.В.², Слись С.С.², Полонский А.В.². 239

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ВНЕШНИЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ РИСК – ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ»

Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Янович Е.Г., Кононенко А.А., Сергиенко О.В., Мишанькин Б.П., Водопьянов С.О., Олейников И.П. 239

ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ «PHAGE-ANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ»

Погожова М.П., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. 240

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ 241

ЭПИДЕМИОЛОГИЯ, ЭКОЛОГИЯ И МОНИТОРИНГ ХОЛЕРЫ

СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ В МИРЕ В 2018 ГОДУ, ПРОГНОЗ НА 2019 ГОД НАУЧНОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Чемисова О.С.,
Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Монахова Е.В.,
Левченко Д.А., Гаевская Н.Е., Пичурина Н.Л.

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

Современная концепция эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, в том числе холерой, предусматривает комплекс мероприятий, направленных на обеспечение биологической безопасности и санитарно-эпидемиологического благополучия населения Российской Федерации. Цель, задачи и основные принципы эпидемиологического надзора за холерой в России согласуются с ММСП (2005 г.) и отвечают международным требованиям и нормам. Эпидемиологический надзор составляет основу противохолерных мероприятий, предусматривает эпидемиологический мониторинг холеры на глобальном и других территориальных уровнях во взаимосвязи с эпидемиологическими и экологическими рисками, способствующими активизации эпидемического процесса [1].

При осуществлении эпидемиологического надзора на глобальном уровне выявлена тенденция роста в динамике заболеваемости в 2018 г. (относительно 2009 г.) со средним ежегодным темпом прироста – 5,352 %. Прогноз на 2019 г. по степенной и полиномиальной линиям тренда показал тенденцию роста в динамике заболеваемости, что обусловлено активизацией эпидемического процесса в странах Азии (Йемен), ряде стран Африки за счет чрезвычайных ситуаций (ЧС) социального и природного характера. В 2018 г. зафиксированы заносы холеры в Казахстан (5), Южную Корею (1) из Индии; в Саудовскую Аравию (28) из Йемена, в Йемен (2) из Эфиопии, а также в Китай (Гонконг) и ЮАР, что, наряду с существованием эндемичных очагов на различных континентах, определяет неблагоприятный прогноз на 2019 г.

За последнее десятилетие в России выявлены заносы холеры, обусловленные штаммами *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA⁺tcpA⁺*, российскими гражданами, возвратившимися из Индии в Москву (2010, 2012, 2014 гг.), без последующего распространения возбудителя инфекции.

Из объектов окружающей среды изолировано 744 штамма *V. cholerae*

O1 биовара Эль Тор, в том числе – 10 *V. cholerae* ctxA⁺tcpA⁺ (Республика Крым – восемь штаммов, 2010 г.; Ростовская область – два штамма, 2011 и 2014 гг.), 33 – *V. cholerae* ctxA⁻tcpA⁺, 696 – *V. cholerae* ctxA⁻tcpA⁻ – и пять штаммов *V. cholerae* O139 ctxA⁻tcpA⁻ – в 29 субъектах, что обуславливает неустойчивую эпидемиологическую обстановку по холере в стране.

Совершенствование системы эпидемиологического надзора за холерой предлагается по основным подсистемам эпидемиологического надзора: информационное обеспечение, эпидемиологический мониторинг, районирование административных территорий, тактика бактериологического обследования определенных контингентов населения и проб из объектов окружающей среды (ООС), а также в части оптимизации профилактических и противоэпидемических мероприятий, противохолерных мероприятий. Неотъемлемым является совершенствование лабораторного и научного обеспечения эпидемиологического надзора, нормативно-методических документов в связи с функциональным реформированием учреждений, осуществляющих мониторинг холеры, в соответствии с приказом Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. №1116 [2], подготовка кадров, ранее не отраженных в действующих СП 3.1.1.2521-09.

Предложения по информационному обеспечению при холере – это создание еженедельных информационных бюллетеней «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире» с представлением их в Роспотребнадзор, размещением на сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рубрике «Противоэпидемическая деятельность института». В 2018 году передано в Роспотребнадзор 53 информационных бюллетеня.

В Роспотребнадзор институт направляет с мая по сентябрь «Информацию о выделении холерных вибрионов из ООС в России» по данным, полученным из противочумных учреждений (ПЧУ) и ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии в субъектах». В 2018 г. направлено 14 информационных писем.

Предоставляются внеочередные донесения в связи с осложнением эпидемиологической ситуации по холере на сопредельных территориях с Россией (Украина, Казахстан) и других с разработкой рекомендаций по проведению профилактических мероприятий.

Предусмотрено продолжить информационный мониторинг эпидемиологической ситуации по данным сайтов Министерств здравоохранения Луганской и Донецкой Народных Республик, а также СМИ Украины, с особым вниманием к приграничным областям и территориям, расположенным на Азовском и Черном морях. В связи с выявлением в 2018 г. в городе Бердянске Запорожской области большого холерой, обусловленной нетоксигенным штаммом *V. cholerae* O1 серовара Огава [3], выделением нетоксигенных холерных вибрионов O1 серовара Огава в

Запорожской (р. Молочная, г. Мелитополь), *Одесской* (вода морская, лиманная, сточная вода очистных сооружений г. Вилково, сточная вода инфекционной больницы г. Б. Днестровский) и *Днепропетровской областей* (на четырех пляжах рек Днепр, Самара и Кильчень Днепропетровской области) [4, 5, 6] в оперативном порядке было направлено 13 информационных писем с визуализацией данных, в том числе рекомендации о профилактических мероприятиях (в Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, Краснодарскому краю, Межрегиональное Управление по Республике Крым и городу федерального подчинения Севастополю, директорам ФГКУЗ «Противочумная станция Республики Крым» и «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора.

С целью совершенствования эпидемиологического мониторинга референс-центр предлагает использование, наряду с ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой», созданной в 2016 г., ГИС «Единая система мониторинга эпидемиологических угроз», включающую информацию о заболеваемости холерой во взаимосвязи с экологическими ЧС (наводнения, ураганы) и другими. ГИС позволяет получать эпидемиологические данные за выбранный период времени и спроектирована с учетом возможности работы на коммуникаторах.

С учетом проведенного районирования 85 административных территорий Российской Федерации по эпидемическому потенциалу необходимо дальнейшее совершенствование эпидемиологического надзора в части дифференциации тактики при бактериологическом обследовании определенных контингентов населения, кратности их обследования.

В плане дальнейшей гармонизации с ММСП (2005 г.) должно быть предусмотрено изменение тактики эпидемиологического надзора при обследовании иностранных граждан в соответствии со статьями 23 п. 3 и 31. п. 2. (с) ММСП (2005 г.).

В 2019 году осуществляется актуализация точек и способов отбора проб на контаминацию холерными вибрионами с определением координат для использования в ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» во взаимодействии с Управлениями Роспотребнадзора по субъектам (в том числе территориями III типа подтип В), ПЧУ. Данные в настоящее время систематизируются по типам территорий, вносятся в ГИС.

Необходимо отметить в плане совершенствования профилактических мероприятий при выделении холерных вибрионов из объектов ООС используется алгоритм эпидемиологического расследования и ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой». Так, при эпидемиологическом расследовании в связи с выделением штаммов холерного вибриона в Забайкальском крае и Иркутске в 2017 г. применение указанной ГИС позволило выявить возможные источники контаминация поверхностных водоемов за счет наличия полей фильтрации, расположенных на расстоянии

500 - 100 метров от мест выделения холерных вибрионов, а также сбросов несанкционированных стоков соответственно.

В плане научного обеспечения эпидемиологического надзора в 2018 г. продолжено полногеномное секвенирование ДНК штаммов и филогенетический анализ, результаты которых позволяют установить родственные связи с возбудителями из других регионов мира (рис. 1). Создана и зарегистрирована база данных «Геноварианты *Vibrio cholerae* – Россия и пограничные страны».

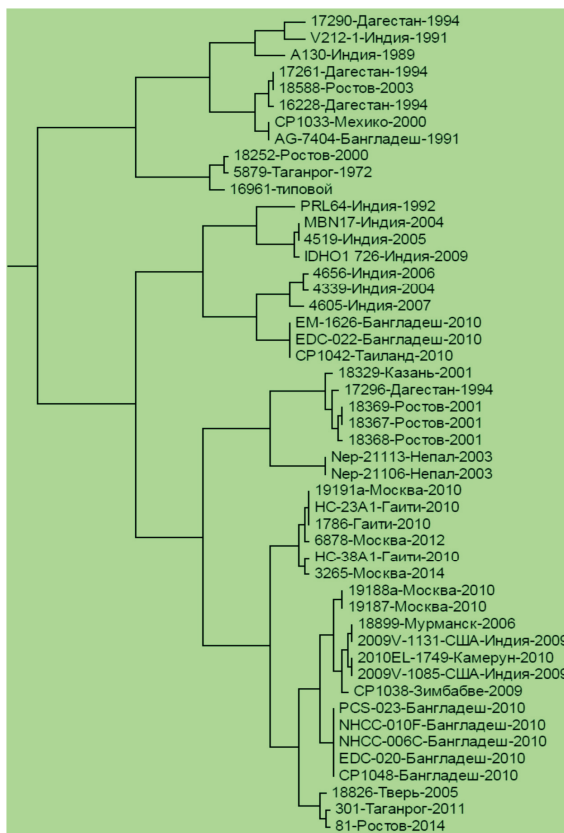


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная на основании анализа данных полногеномного секвенирования штаммов холерных вибрионов.

Продолжалось изучение транскриптома *V. cholerae* по оригинальной методике выделения РНК, основанной на дифференциальном осаждении биополимеров в кислых условиях бактерий в присутствии ионов лития. Авторское программное обеспечение для обработки данных написано на

языках программирования Java и Python. Транскриптомный анализ генов хитиназного комплекса из семи хитиназ у штаммов холерных вибрионов различного генотипов показал различный уровень экспрессии ферментов, что свидетельствовало об их способности утилизировать хитин как особенности биологии возбудителя.

При анализе более 800 сиквенсов из GenBank установлено, что в геноме нетоксигенного штамма *V. cholerae* 20000, выделенного из реки Темерник (2017 г.), имеется новая, не описанная ранее генетическая структура, обозначенная как остров RND размером 43 596 пар оснований, содержащий 51 открытую рамку считывания. Компьютерный анализ нуклеотидных последовательностей, представленных в GenBank, выявил остров RND у трех нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных в Индии (1974 г.) и на Гаити (2012 г.). Можно предположить, что остров RND способен к горизонтальному переносу.

Комбинирование двух технологий секвенирования с использованием двух секвенаторов разного типа – Illumina MiSeq и Oxford Nanopore MiniION (рис.2) удалось полностью собрать две хромосомы нетоксигенного штамма (*V. cholerae* O1 20000). Последовательности депонированы в GenBank. Гибридный сиквенс позволяет повысить качество получаемых данных и дает возможность проводить картирование генов на хромосомах и определять их копийность. Это в результате ведет к уменьшению времени на пробоподготовку и, следовательно, на окончательный ответ.



Illumina MiSeq



Oxford Nanopore MiniION

Рисунок 2. Гибридное секвенирование с использованием секвенаторов разных типов.

Для изучения происхождения выделенных при мониторинге за контаминацией холерными вибрионами O1 поверхностных водоемов и других ООС предлагается проведение их комплексного генотипирования методами ПЦР-генотипирование по наличию/отсутствию 14 генов-мишеней и INDEL-типирования [7,8]. При ПЦР-генотипировании установлено, что нетоксигенные штаммы холерных вибрионов 2013-2018 гг. отличались по

наличие/отсутствию от двух до восьми генов. У 14 штаммов, выделенных на территориях Республик Калмыкия, Коми, Ростовской области и Хабаровского края были обнаружены гены острова патогенности VP1. При этом изолированы штаммы с новыми генотипами: Иркутская область (A1), Республика Калмыкия (A2, A8, A10, E5, F7, F8), Ростовская область (E6) и Хабаровский край (E1, E4), что указывает на вероятность их заносного происхождения, а также с идентичными генотипами, обнаруженными ранее на одной и той же территории, или в разные годы на различных территориях – Республика Калмыкия (A4, B1), а также генотип F1: Хабаровский край (2018); Республика Крым (2014); Псковская область (2014, 2017); Кировская область (2018); Иркутская область (2014, 2017); Забайкальский край (2014); Рязанская область (2014) (рис. 3.). Это свидетельствует о возможности сохранения штаммов *V. cholerae* O1 в определенных экологических нишах, в том числе в биопленочной форме.

Приведенные данные совпали с результатами INDEL-типирования 312 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (2014-2018 гг.). Так, выделенные в Иркутской области штаммы холерных вибрионов с генотипом B6 и F5 (2017 г.) на фоне генотипов A1, A7, A8 (2014-2018 гг.) можно рассматривать как заносные (рис. 3). В Республике Калмыкия при гетерогенности штаммов по генотипам от A2 до A10 отмечено выделение штаммов генотипа C4 в 2016-2018 гг., что может указывать на наличие благоприятных условий для выживания холерных вибрионов в поверхностных водоемах. В Республике Крым циркулировали штаммы двух близкородственных генотипов B3 и B7 (2014-2016 гг.).

С 2013 по 2018 г. от 35 больных ОКИ было изолировано 38 штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп в Ростовской (21 человек), Тамбовской (один), Челябинской (один) и Магаданской (один) областях, в Республиках Калмыкия (три) и Крым (11). ПЦР-генотипированием клинических и выделенных из ООС объектов окружающей среды штаммов вибрионов неO1/неO139 серогрупп было выявлено четыре клинических штамма с ранее не встречавшимся геном термостабильного токсина (2 - из Крыма, 1 - из Азова и 1 – занос из Таиланда в Тамбовскую область).

С целью научного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой начато использование программного комплекса, позволяющего проводить анализ данных масс-спектрометрии штаммов холерного вибриона на основе искусственной нейронной сети, что позволяет быстро выявлять штаммы O1 серогруппы и дифференцировать токсигенные и нетоксигенные.

Для повышения результативности дифференциации и идентификации микроорганизмов непосредственно в исследуемом материале будут продолжены исследования по определению состава жирных кислот (ЖК) методом газовой хроматографии – масс-спектрометрии. В настоящее время в рамках НИР создается база данных ЖК спектров *V. cholerae* различных серогрупп. Охарактеризовано около 300 штаммов. Разработана программа

Chromato Analyzer 1.0, позволяющая определять спектр ЖК и процентное их соотношение, характерное для каждого штамма возбудителя.

Регион	Генотипы
Ростовская область	B8 B6 F3 F6 F10 F13 G11 J1 M1
Республика Калмыкия	A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8 A10 B1 B4 B5 B7 C1 D1 D5 E5 F2 F3 F4 F6 F7 F8 F9 F10 F12 F13
Краснодарский край	B1
Республика Крым	E3 E5 F1
Республика Коми	K1
Калининградская область	F9
Псковская область	F1
Республика Бурятия	F4
Забайкальский край	B5 F1 F2 F3 F11 F12
Алтайский край	F1
Иркутская область	A1 D2 D3 D4 F1 F2
Приморский край	A11 B3 E3 F4 F5 F11
Хабаровский край	B1 E2 E3 E4 L1
Свердловская область	C4 E5 E9 F16
Челябинская область	B1 E3
Московская область	A9
Рязанская область	F1
Ставропольский край	E7
Республика Татарстан	F4
Кировская область	F1

Регион	Год	Генотипы
Забайкальский край	2014	A8
	2015	A7
	2016	A7
	2017	A7
Иркутская область	2014	A8
	2015	A7
	2017	A7 B6 F5
	2018	A1
Калининградская область	2014	A8
Кировская область	2018	A7
Краснодарский край	2015	B6
Приморский край	2014	A8 H5
	2016	F5
	2017	F5 F6
Псковская область	2014	A8
	2018	A7
Республика Бурятия	2016	A7
	2017	F6
Республика Калмыкия	2014	B4 C2 C3 C4 C5 E1 F3 G2 G3 I1
	2015	A7 D2 F5 G3
	2016	A4 C1 C4 F2 F5 H2 H3
	2017	A3 A7 C4 D2 F2 F4 F5 G3 H2
2018	A2 A5 A6 A7 B1 B3 C4 F1 G1 G2	
Республика Коми	2016	D1
Республика Крым	2014	B7
	2016	B3
Ростовская область	2014	C4 C5
	2015	D3 F7
	2016	C4 D3 F5
	2017	B5
2018	B7	
2014	A9	
Свердловская область	2016	B2 F5
	2017	F5
Татарстан	2016	A7
Хабаровский край	2016	D1
	2018	A7
Челябинская область	2015	B6
	2016	C4

А (2013-2018 гг.)

Б (2014-2018 гг.)

Рисунок 3. А. ПЦР-характеристика по 14 генам-мишеням нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных по регионам РФ. Б. Распределение INDEL-генотипов нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных по регионам РФ.

Установлено, что холерные вибрионы токсигенных и нетоксигенных штаммов, содержащие интактные гены биопленкообразования, способны к колонизации объектов биотической (хитин) и небактериальной среды (пластикфера) благодаря наличию матрикса, хорошо видимому с использованием трансмиссионной электронной микроскопии. Экспериментально подтвержденная способность к антагонистической активности холерных вибрионов при межродовой конкуренции объясняет тот факт, что холерные вибрионы можно обнаружить в тех областях, где они ранее не выделялись. Полученные нами данные способствуют прогнозированию эпидемиологической ситуации.

В связи с распространением фагорезистентности к холерным коммерческим диагностическим фагам предусматривается продолжение работы по совершенствованию диагностических препаратов для идентификации их на основе проведенной биологической и генетической характеристики холерных бактериофагов, перспективных для использования в этих целях. Полные геномы фагов Rostov-1 и Rostov-6 зарегистрированы и доступны в Genbank (NCBI). Ведутся работы по разработке стабильной формы выпуска диагностического препарата фага эльтор для дифференциации холерных вибрионов O1 серогруппы с последующим внедрением в производство и лабораторную практику.

В 2019 году планируется проведение внешнего контроля качества (ВКК) исследований на холеру методами ПЦР и флюоресцирующих Ат в ФБУЗ «Центрах гигиены и эпидемиологии в субъектах» и противочумных учреждениях на основании Приказа Роспотребнадзора № 153 от 01.04.2019 г. «Об организации проведения внешнего контроля качества лабораторных исследований на холеру в 2019 году».

Что касается распорядительных и нормативно-методических документов, следует отметить следующее. Предложения по совершенствованию эпидемиологического надзора будут использованы при переработке СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» (по заданию Роспотребнадзора). МУК «Лабораторная диагностика холеры» направлены на утверждение в Роспотребнадзор в 2018 г.

В 2019 г. будет продолжено осуществление деятельности по мониторингу холеры на территории страны в соответствии с проведенным функциональным реформированием учреждений, осуществляющих мониторинг холеры, на основании Приказа Роспотребнадзора от 01.12.2017 г. № 1116 [2]. Осуществляется переработка нормативно-методической базы, в частности, подготовка проекта МУК «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». Определены и сформулированы ряд предложений, которые будут учтены при составлении проекта перерабатываемых МУК:

- внесение изменений в функциональную градацию территориальных и региональных учреждений, осуществляющих мониторинг холеры на территории страны;

- корректировка номенклатуры и объема исследований лабораторий территориального уровня в соответствии с переизданными МУК «Лабораторная диагностика холеры»; уточнение формы ответов для лабораторий ЛПО и Роспотребнадзора; уточнение порядка информирования об обнаружении и передачи для идентификации штаммов *V. cholerae* O1, O139; уточнение порядка передачи информации о результатах

идентификации изолированных штаммов холерных вибрионов O1,O139 от больных холерой и вибрионосителей и из ООС, а также штаммов не O1/неO139 от больных ОКИ;

- коррекция порядка и организации межведомственного взаимодействия лабораторий различного уровня, проводящих мониторинг холеры на территории Российской Федерации с использованием современных информационных технологий (включая ГИС - информационный портал Референс-центра по холере) в плане оказания консультативно-методической и практической помощи. Создание проекта усовершенствованных МУК будет соответствовать направлению (раздел 1) Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями».

Анализ уровня подготовки кадрового состава Роспотребнадзора субъектов Российской Федерации по вопросам диагностики холеры показал, что только в 4 регионах: Краснодарский, Приморский, Забайкальский края, Ленинградская область, специалисты регулярно проходят повышение квалификации. Предусмотрено в рамках НИР разработать и внедрить новые научно-методические подходы для очно-заочных циклов по дополнительным профессиональным программам повышения квалификации специалистов с использованием дистанционного обучения.

Реализация предложений по научному обеспечению эпидемиологического надзора за холерой будет осуществляться при изучении штаммов холерных вибрионов, выделенных в рамках микробиологической диагностики, в Референс-центре по мониторингу холеры.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина Э.А. Прогноз по холере на 2019 год на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009-2018 гг. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Янович, В.Д. Кругликов и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2019. – Вып. 1. – С. 64-73.
2. О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской федерации: Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 г. № 1116.
3. На популярном морском курорте в Запорожской области зафиксировали случай холеры. <https://racurs.ua/n110826-na-populyarnom-morskom-kurorte-v-zaporojskoy-oblasti-zafiksirovali-sluchay-holery.html>. 11.09.2018. (дата обращения 11.09.2018 г.).

4. Про результати моніторингу за циркуляцією збудника холери за період з 16.06. по 22.06.2018 року http://www.oblses.zp.ua/comment.php?n_id=3365 25.06.2018. (дата обращения 25.06.2018 г.).

5. Інформація щодо санепідситуації в Одеській області за період з 20.07. по 26.07.2018р http://oolcmoz.at.ua/news/informacija_shhodo_sanepidsituaciji_v_odeskij_oblasti_za_period_z_20_07_po_26_07_2018r/2018-08-01-201.01.08.2018. (дата обращения 01.08.2018 г.).

6. На пляжах Днепропетровщини обнарзухили холеру. <https://dnepr.news/news/na-plyazhah-dnepropetrovshiny-obnaruzhili-holeru>. (дата обращения 11.07.2018 г.).

7. Патент на изобретение № 2665542. «Способ идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» от 30.08.2018 г. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б.

АЛГОРИТМ СОЗДАНИЯ ИНФОРМАЦИОННЫХ БЮЛЛЕТЕНЕЙ «ОБ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ В МИРЕ»

Москвитина Э.А., Кривенко А.С., Янович Е.Г., Куриленко М.Л.,
Пичурина Н.Л., Мишанькин Б.М.

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

Информационное обеспечение органов и учреждений, уполномоченных осуществлять государственный санитарно-эпидемиологический надзор; органов управления здравоохранением; противочумных учреждений, порядок его осуществления определен действующими СП 3.1.1.2521-09 [1]. С целью совершенствования тактики эпидемиологического надзора в информационно-аналитической подсистеме эпидемиологического надзора Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, референс-центр по мониторингу за холерой в Российской Федерации, осуществляет мониторинг информации об эпидемиологической ситуации по холере по континентам, регионам и странам мира. Одна из задач – создание информационных бюллетеней «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире», которые формируются еженедельно с 2014 года.

На первом этапе алгоритм создания информационных бюллетеней

включает поиск данных в системе Internet, на соответствующих веб-сайтах: ProMED-mail; WHO | Regional Office for Africa – ВОЗ, Региональный офис Африка; ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control - Европейский центр профилактики и контроля заболеваний); UNICEF – United Nations Children's Fund. Plateforme cholera.info – ЮНИСЕФ – Детский фонд ООН. Информационная платформа по холере; MMSP Republique D’Haiti, Ministère de la Santé Publique et de la Population Republique D’Haiti - Министерство здравоохранения и народонаселения Республики Гаити. На указанных интернет-ресурсах представлена информация из различных источников о числе больных (с подозрением) холерой, летальных исходах и заносах в страны Африки, Азии и Америки и другая.

Полученная информация публикуется на английском и французском языках в виде резюме (ProMED-mail); информационных бюллетеней (WHO | Regional Office for Africa, ECDC, UNICEF. Plateforme cholera.info; таблиц с указанием статистических данных (WHO | Regional Office for Africa, UNICEF. Plateforme cholera.info, MMSP Republique D’Haiti).

Информация может быть представлена в виде оперативной сводки с указанием пораженных районов/стран/регионов (ProMED-mail, WHO | Regional Office for Africa, ECDC, UNICEF. Plateforme cholera.info; MMSP Republique D’Haiti).

Информационные сообщения публикуются по мере поступления сведений и, как правило, по эпидемиологическим неделям, соответствующим календарным.

Для формирования информационных бюллетеней проводится поиск соответствующей информации не только на основных, но и на дочерних сайтах, упомянутых интернет ресурсах.

Так, сообщения **ProMED-mail**, актуальные для определенных стран, представлены на сайтах: ProMED-ESPCHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-RUS CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-MBDS CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-FRA CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-PORT CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-EAFR CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-SoAs CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY; ProMED-MENA CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY.

В ProMED-mail CHOLERA, DIARRHEA AND DYSENTERY приводятся данные по континентам из следующих источников: **Африка (Западная и Центральная Африка)** - RFI (Международное французское радио); ИА REGNUM (федеральное информационное агентство «REGNUM»); France 24 via AFPA gence France Presse (информационное агентство и пресс-служба Франции); Associated Press (международное агентство информации и новостей); **Африка (Южная и Восточная Африка)** - UNICEF bulletin-cholera-and-awd-outbreaks-eastern-and-southern-africa (ЮНИСЕФ информационный бюллетень по

холере и острой водянистой диарее (ОВД) в Южной и Восточной Африке); The Independent (Британское интернет-издание); Associated Press (международное агентство информации и новостей); ИА REGNUM (федеральное информационное агентство «REGNUM»); The Daily Telegraph (Британское интернет-издание); VOA Afrique via AFP Voice of America in Africa (Информационное интернет издание «Голос Америки. Африка»; Leadership & Mentoring | Leadership (Международное информационное интернет издание); **Азия** - UNICEF bulletin-cholera-and-awd-outbreaks-Asia (ЮНИСЕФ информационный бюллетень по холере и ОВД; WHO | Regional Office for the Eastern Mediterranean. an (ВОЗ/ Доклад из регионального офиса Восточного средиземноморья); News Yemen (международное агентство информации и новостей в Йемене); Odishatv.in (Информационный портал новостей в Индии); 4May (Периодическое печатное издание новостей); Associated Press (международное агентство информации и новостей); **Америка** – WHO Pan American Health Organization (Панамериканское бюро ВОЗ); CDC. MMWR Morb Mortal Wkly Rep (Еженедельный бюллетень о заболеваемости и смертности); BioBioChile - La Redde Prensa Más Grande de Chile (международное агентство информации и новостей в Чили); WDAM7, KMIR/CNN report (Доклад из международного телеканала новостей CNN); AFP Voice of America (Информационное интернет издание «Голос Америки».

Информационные отчеты WHO | Regional Office for Africa (ВОЗ | Региональный офис Африка) поступают в виде бюллетеней по эпидемиологическим неделям с резюме об эпидемиологической обстановке по странам и их административным территориям. Данные, предоставленные в сообщениях, формируются из территориальных и региональных представительств ВОЗ.

Информационные отчеты Europe an Centre for Disease Prevention and Control (Европейский центр профилактики и контроля болезней) выпускаются в виде бюллетеней по эпидемиологическим неделям с информацией в виде кратких резюме об эпидемиологической обстановке, рисках и мерах реагирования. Широко представляется информация о наиболее пораженных холерой странах и регионах. Дополнительно освещаются рекомендации в области профилактики и гигиены.

Публикуемые данные **UNICEF (United Nations Children's Fund)** - это бюллетени с предоставлением информации о числе больных и летальных исходах по эпидемиологическим неделям. Информационный сайт издания представлен двумя регионами, включающие **Cholera Outbreaks in Central and West Africa: Regional Update** (Вспышки холеры в Центральной и Западной Африке: обновленная информация по региону) и **Weekly Reported Cholera /AWD Cases and Deaths for Countries in Eastern and Southern** (Еженедельные сообщения о случаях холеры /AWD и смертях в странах Востока и Юга). В бюллетене дается информация о количестве случаев с подозрением на холеру, а также о количестве подтвержденных больных холерой и летальных исходах в

странах: Мозамбик, Танзания, Сомали, Кения, Замбия, Бурунди и других. В региональных бюллетенях для стран Центральной и Западной Африки: ДРК, Конго, Либерия, Нигер, Камерун, Сенегал и других публикуются оперативные эпидемиологические данные с диаграммами о динамике заболеваемости во время вспышек, их территориальном распространении с визуализацией на картах, приводятся данные о планах реализации Глобальной дорожной карты к 2030 году по трем основным направлениям [2].

Информационные отчеты MMSP Republique D’Haiti содержат еженедельные бюллетени о количестве больных холерой и летальных исходах по департаментам. Дополнительно освещаются рекомендации в области профилактики и гигиены.

Осуществляется также информационный мониторинг сайтов средств массовой информации и других Украины.

Следующий этап включает систематизацию данных информационного мониторинга заболеваемости холерой и другим показателям по континентам, регионам и странам мира с обработкой их по состоянию на конец каждой недели.

При формировании информационного бюллетеня включаются ретроспективные сведения об эпидемиологической ситуации по холере в мире с 01.01. текущего года по число, месяц текущего года с указанием числа больных холерой (смертей), пораженных стран, а также о числе больных с подозрением на холеру (с). Кроме того, готовится оперативная еженедельная информация с указанием информационных интернет ресурсов, источников информации, дат публикации, периода и имеющихся данных об эпидемиологической ситуации в странах. Кроме описательной части, по континентам, регионам и странам указываются количественные показатели (абс.) о больных холерой, с подозрением, летальных исходах и заносах. Сведения предоставляются в форме таблицы.

Заключительными этапами алгоритма создания информационных бюллетеней «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире» является передача их в Роспотребнадзор.

Еженедельные данные о холере помещаются на сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рубрике «Противоэпидемическая деятельность института», вносятся в ГИС «Единая система мониторинга эпидемиологических угроз», а также в проблемно-ориентированную базу данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-

эпидемиологические правила: СП 3.1.1.2521-09. – М., 2009.

2. www.unicef.org/cholera. Cholera Outbreaks in Central and West Africa:2019 Regional Update Week 8,11.

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ В СВЯЗИ С НАЧАЛОМ РАБОТЫ МЕЖДУНАРОДНОГО АЭРОПОРТА «ПЛАТОВ»

Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Пичурина Н.Л.¹, Москвитина Э.А.¹,
Ковалев Е.В.², Слись С.С.², Рыжков Ю.В.²

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

²*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

Одной из актуальных задач, стоящих перед учреждениями Роспотребнадзора, является предупреждение заноса и распространения на территории России инфекционных болезней, представляющих опасность для населения. Необходимо отметить, что важной составляющей эпидемиологического надзора за холерой является проведение бактериологического исследования проб из объектов окружающей среды на контаминацию холерными вибрионами. При этом ключевое значение имеет выбор и своевременный пересмотр мониторинговых точек.

На территории России все случаи холеры в последние десятилетие были связаны с заносами инфекции из Индии, ранее - из других стран [1]. Это позволяет сделать вывод, что для нашей страны холера представляет «внешнюю» угрозу, что явилось основанием для создания в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт ГИС «Холера - внешний эпидемиологический риск, инфекционная заболеваемость» [2]. При этом установлено, что наибольшее значение имеет воздушный транспорт [3, 4].

В связи с изложенным, цель настоящей работы состояла в оценке необходимости оптимизации мониторинга холеры в связи с функционированием международного Аэропорта г. Ростова-на-Дону «Платов», расположенного в Аксайском районе, ст. Грушевской, Ростовской области.

Материалы и методы. Для пространственного анализа использовали ГИС-систему с открытым исходным кодом QGIS версий 2.2-3.2. Картографические данные были получены из проекта OpenStreetsMap

(openstreetmap.org). Данные о водоотведении аэропорта «Платов» получены с официального портала Правительства Ростовской области [5]. Данные о поверхностных водах получены из Автоматизированной информационной системы государственного мониторинга водных объектов [6].

Результаты и обсуждение. По данным официального сайта [7], Аэропорт «Платов», принимает прямые рейсы из 53 аэропортов, расположенных в России и странах ближнего зарубежья. Не менее актуальным в плане риска заноса возбудителя холеры представляют не прямые рейсы в неблагополучные по холере страны, совершаемые через транзитные аэропорты. В г. Ростове-на-Дону и области расположено несколько крупных ВУЗов, где обучаются иностранные студенты. Необходимо отметить, что только в одном ВУЗе города - в Ростовском медицинском университете обучаются граждане более чем из 100 стран мира, в том числе, студенты из Йемена и Нигерии – стран, где продолжают регистрировать крупные вспышки холеры. Кроме того, в Ростовской области осуществляется с использованием авиатранспорта деловая, экономическая, туристическая (религиозная) миграция населения в зарубежные страны, в том числе, неблагополучные по холере.

В XXI веке одним из основных видов рисков возникновения sporadic инфекционных заболеваний и эпидемий является риск завоза патогенов при миграции населения с использованием различных международных транспортных средств, в том числе воздушных. Вышесказанное позволяет рассматривать Аэропорт «Платов» как потенциальный «источник внешнего эпидемиологического риска» в плане возможности заноса холеры на территорию страны.

Обоснованием этому явился этап работы, состоящий в анализе схемы водоотведения аэропорта «Платов». Так, по данным Правительства Ростовской области [5], аэропорт имеет собственный комплекс очистных сооружений мощностью 5 тыс. куб. м в сутки со сбросом очищенных сточных вод в реку Большой Несветай. Данные о географическом расположении указанных объектов были внесены в ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой», что позволило визуально оценить их взаимное расположение относительно существующих точек отбора проб воды на вибриофлору (рисунок).

Как видно из данных ГИС, сброс проводится в реку Большой Несветай, в районе ее последующего впадения в реку Тузлов, протекающую далее через станицу Грушевская и город Новочеркасск. При этом мониторинговые точки на указанных реках отсутствовали.

Несмотря на то, что река Тузлов не используется для водоснабжения или водопользования, сброс большого количества сточных вод перед крупным населенным пунктом требует проведения микробиологического

мониторинга контаминации холерными вибрионами O1, O139 серогрупп.

Таким образом, в ходе проведенного исследования получены и проанализированы данные о водоотведении аэропорта «Платов», произведено пополнение ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» и обосновано введение Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области новой стационарной точки.

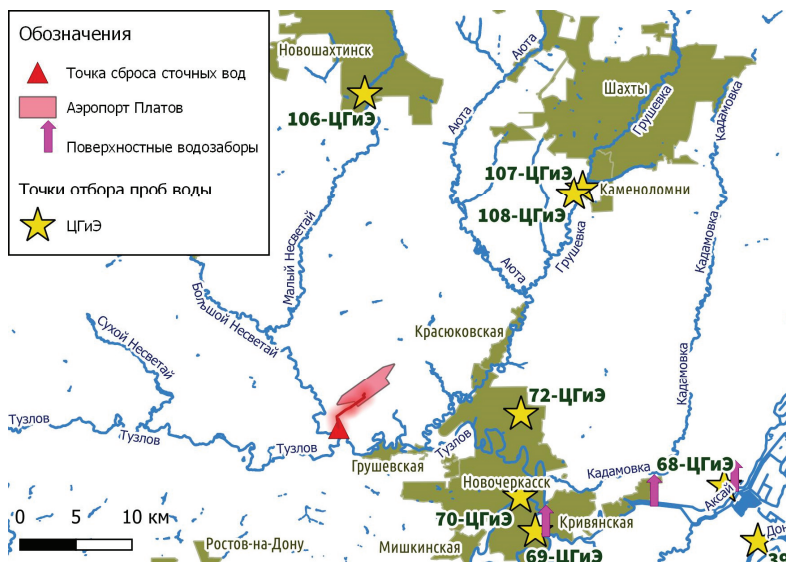


Рисунок. ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» - точка сброса сточных вод аэропорта «Платов», поверхностные водозаборы и ближайшие точки отбора проб воды на вибриофлору, закрепленные за ФБУЗ Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. и др. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. Совершенствование эпидемиологического надзора за холерой в стране. Сообщение II // ЗНиСО. – 2015. – № 10. – С.47-51.
2. Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С. и др. ГИС «Внешний эпидемиологический риск - заболеваемость» // Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019620083 от 15 января 2019.
3. Прометной В.И., Москвитина Э.А., Ломов Ю.М. Эпидемиологическое значение международных транспортных сообщений в

возможности завоза опасных инфекционных болезней // Научная мысль Кавказа. Приложение. – 2003. – № 1 – С. 26-33.

4. Тюленева Е.Г., Москвитина Э.А. Эпидемиологическая оценка миграции населения в возможности заноса холеры в субъекты Российской Федерации // Журн. микробиол.,эпидемиол. и иммунобиол. – 2018. – № 3. – С. 3-10

5. Официальный портал Правительства Ростовской области <https://www.donland.ru>

6. Автоматизированная информационная система государственного мониторинга водных объектов (АИС ГМВО) <https://gmvo.skniivh.ru/>

7. Официальный сайт аэропорта Платов <http://rov.aero>

УЧЕБНО-ТРЕНИРОВОЧНЫЕ ЗАНЯТИЯ ПО РАЗВЕРТЫВАНИЮ ПРОВИЗОРНОГО ГОСПИТАЛЯ КАК ВАЖНАЯ СТУПЕНЬ ПОВЫШЕНИЯ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ГОТОВНОСТИ МЕДИЦИНСКОЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Мазрухо А.Б.¹, Пичурина Н.Л.¹, Гаевская Н.Е.¹, Ширанов А.Б.²,
Лебедева Е.В.², Рыбасова З.В.², Скибенко О.А.², Рожков К.К.¹,
Куриленко М.Л.¹, Прутков В.Е.², Виноградова М.В.²

¹*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*

²*МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова на-Дону*

Россия, г. Ростов-на-Дону

Одним из приоритетных направлений совершенствования системы биологической безопасности страны является повышение готовности медицинских организаций к противодействию биологическим угрозам [1].

Сущность лечебно-эвакуационного обеспечения инфекционных больных заключается в организации своевременных и последовательных мероприятий по оказанию медицинской помощи, лечению и временной изоляции как заболевших, так и подвергшихся риску заражения при нахождении в зоне чрезвычайной ситуации (ЧС), связанной с выявлением больного (трупа), подозрительного на опасную инфекционную болезнь [2, 3]. Для этой цели Комплексными планами по санитарной охране территорий предусмотрено развертывание госпитальной базы специального назначения, включающей инфекционные госпитали, провизорные госпитали, изоляторы, обсерваторы, общежития для медицинского персонала [4]. Одно из главных требований к учреждениям, на базе которых развертываются госпитали

специального назначения – «планировочные решения госпиталя должны обеспечивать надежную изоляцию больных, возможность проведения диагностических и лечебных мероприятий, исключение перекрестного инфицирования больных, надлежащий санитарно-гигиенический и противоэпидемический режим» [5].

Провизорный госпиталь – это временно развертываемый на базе лечебно-профилактической или иной приспособленной (в случае возможности соблюдения необходимого противоэпидемического режима) организации инфекционный стационар, где размещаются больные с неподтвержденным диагнозом, но имеющие симптомы, которые не позволяют исключить опасную инфекционную болезнь при наличии выявления таковой на определенной территории.

Провизорная госпитализация, как составная часть механизма развертывания госпитальной базы, является одним из наиболее значимых мероприятий при возникновении очага холеры, так как способствует его быстрой локализации и ставит мощный барьер на пути распространения этой опасной инфекционной болезни.

Ежегодно проводимая специалистами органов и учреждений Роспотребнадзора (включая противочумные учреждения) оценка противоэпидемической готовности медицинских организаций к развертыванию на их базе госпиталей специального назначения (включая провизорные госпитали) в соответствии с МУ 3.1.1.2232-07 [6], является действенным организационным профилактическим противохолерным мероприятием. Другим фактором, способствующим повышению противоэпидемической готовности медицинской организации, является систематическое проведение учений, учебно-тренировочных занятий с вводом условного больного и тематическое усовершенствование персонала по специальным программам [1].

В соответствии с Комплексным планом мероприятий по предупреждению заноса и распространения холеры в г. Ростове-на-Дону на 2016 – 2020 годы на базе терапевтического отделения МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону предусмотрено развертывание провизорного госпиталя (III этап). Количество коек в развертываемом стационаре – 75. Регламентированное время развертывания – 2 часа.

По результатам проведенной 20 марта 2019 года специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и Филиала ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в г. Ростове-на-Дону комплексной оценки - уровень противоэпидемической готовности провизорного госпиталя (III этап), развертываемого на базе терапевтического отделения МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону, признан высоким (97 баллов из 100). При развертывании госпиталя предусмотрено формирование полноценного санитарного пропускника для персонала из

четырёх помещений. Для поступления больных имеется отдельный вход и отдельный санитарный пропускник. Предусмотрен отдельный вход для передачи пищи в госпиталь через выделенный тамбур-шлюз. В заразной зоне расположены: 11 палат для больных, палата интенсивной терапии, процедурная, три помещения для дезинфекции. Поверхности стен, полов выполнены устойчивыми к дезинфицирующим средствам материалами. Госпиталь укомплектован в необходимом количестве средствами индивидуальной защиты, оборудованием, медикаментами и другими материалами, необходимыми для проведения диагностики, патогенетического и этиотропного лечения, средствами дезинфекции, укладками для забора клинического материала. Оборудованная асфальтированная площадка для дезинфекционной обработки автотранспорта снабжена специальным пневмокаркасным дезинфекционным барьером. Штатно-организационная структура развертываемого госпиталя представлена тремя составами: основным и двумя резервными, что обеспечивает возможность трехсменного круглосуточного режима работы.

В соответствии с «Комплексным планом мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения Восемнадцатых молодежных Дельфийских игр России на территории Ростовской области 19-24 апреля 2019 года», 4 апреля 2019 года было проведено учебно-тренировочное занятие с вводом условного больного по развертыванию провизорного госпиталя на базе терапевтического отделения МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону. В качестве консультантов в подготовке и проведении данного мероприятия приняли участие три специалиста ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

В учебно-тренировочном занятии по развертыванию провизорного госпиталя участвовали 19 сотрудников МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону, была задействована одна единица автотранспорта – спецавтомобиль, доставивший условного больного, пневмокаркасный дезинфекционный барьер, универсальная укладка для забора материала от больных и из объектов окружающей среды.

В ходе учебно-тренировочного занятия осуществлен хронометраж каждого из этапов, их фото- и видеосъемка.

Легенда учебно-тренировочного занятия по развертыванию провизорного госпиталя была разработана совместно консультантами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и специалистами МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону.

Согласно разработанной легенде, в городскую больницу N поступает команда от Управления здравоохранения города NN о развертывании провизорного госпиталя на базе терапевтического отделения данной больницы в связи с выявлением в гостинице NNN больного холерой,

который был доставлен в модульный инфекционный госпиталь. Диагноз у больного лабораторно подтвержден.

У контактной с ним гражданки Х обнаружены симптомы гастроэнтерита, не исключающие заболевания холерой. Состояние гражданки Х осложнено болями высокой интенсивности колющего характера в эпигастральной области (требующими проведения дифференциальной диагностики с острой хирургической патологией). Больная доставлена в развернутый провизорный госпиталь специализированной бригадой скорой помощи. В ходе транспортирования состояние гражданки Х ухудшилось - появилась рвота, усилились боли в животе.

Целью учебно-тренировочного занятия явилась отработка алгоритма развертывания провизорного госпиталя на базе терапевтического отделения МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону.

В ходе занятия необходимо было решить следующие задачи:

1. Отработать схему оповещения и сбора личного состава развертываемого госпиталя по получении команды от Управления здравоохранения.

2. Отработать план перевода соматических больных в другие отделения больницы.

3. Отработать последовательность действий и навыки подготовки функциональных помещений развертываемого провизорного госпиталя: санитарного пропускника для поступления больных, палат для больных, процедурной, помещений для дезинфекции, санитарного пропускника для персонала.

4. Отработать навыки надевания-снятия средств индивидуальной защиты – противочумных костюмов IV типа.

5. Отработать действия сотрудников при поступлении больного с моделированием нештатной ситуации.

6. Отработать навыки дезинфекционной обработки специализированного автотранспорта, доставившего больного.

7. Отработать действия сотрудников госпиталя при сборе анамнеза, объективном обследовании поступившего больного.

8. Отработать навыки отбора проб различного клинического материала (фекалий, рвотных масс, крови) от больного.

9. Отработать навыки упаковки отобранных проб клинического материала и передачи их для исследования в бактериологическую лабораторию.

Учебно-тренировочное занятие начато в 11.00, когда в приемное отделение МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону поступила

команда от Управления здравоохранения города о разворачивании провизорного госпиталя на базе терапевтического отделения и информация о возможном поступлении больного к 13.00. Старшая медсестра приемного отделения в течение 10 минут реализовала имеющуюся схему оповещения и сбора в рабочее время администрации больницы и персонала госпиталя.

Перевод соматических больных из терапевтического в другие отделения больницы был начат в 11.10 и завершен в 11.40 (на 20 минут раньше регламентированного времени). Данный этап реализован силами начальника госпиталя, одного врача, старшей медсестры, двух медсестер и сестры хозяйки. Перевод осуществляли в отделение, расположенные в другом крыле здания через систему коридоров без вывода больных из здания. На данном этапе моделировали ситуацию, когда больные выражали недовольство и возражения против перевода, с отработкой действий медицинского персонала в подобных случаях. После перевода соматических больных в другие отделения больницы осуществляли решение вопроса о продолжении стационарного лечения для них, или о выписке на амбулаторное лечение в зависимости от тяжести состояния и с учетом соблюдения стандартов оказания медицинской помощи по каждой нозологической форме.

Подготовка функциональных помещений разворачиваемого провизорного госпиталя была начата в 11.40, тотчас после завершения перевода соматических больных в другие отделения больницы. На этом этапе были задействованы: начальник госпиталя, два врача, старшая медсестра, две медсестры, сестра-хозяйка и две санитарки. Были осуществлены: смена постельного белья, влажная уборка палат, комплектование разворачиваемых функциональных помещений необходимым медицинским и хозяйственно-бытовым имуществом, средствами этиотропной и патогенетической терапии, горшками, емкостям для дезинфекции, комплектами из укладки для забора клинического материала, приготовление рабочих растворов дезинфицирующих средств, подготовка средств индивидуальной защиты, разворачивание помещений санитарного пропускника для персонала, опечатывание смесителей с водопроводной водой, оборудование в имеющихся санузлах помещений для дезинфекции. Все операционные процедуры данного этапа разворачивания были завершены в 12.10 (на 20 минут раньше расчетного времени при обеспечении качества выполненных работ).

В период с 12.10 до 12.20 первая дежурная смена госпиталя в помещениях развернутого санитарного пропускника для персонала осуществила надевание рабочей одежды и средств индивидуальной защиты – противочумных костюмов IV типа. Ошибок при надевании противочумных костюмов сотрудниками госпиталя не было.

В 12.20 начальник провизорного госпиталя доложил главному врачу больницы о готовности вверенного ему подразделения к приему

инфекционных больных. Общее время развертывания госпиталя составило один час двадцать минут. Сложная работа персонала позволила решить задачу по его развертыванию с запасом времени в 40 минут от регламентированного паспортом госпиталя расчетного норматива. Вместе с тем существование субъективного фактора и различной степени тяжести пациентов при переводе соматических больных в другие отделения может потребовать дополнительного времени на данном этапе. Поэтому, несмотря на достигнутый в ходе учения показатель времени развертывания, сокращать этот этап относительно регламентированных двух часов не целесообразно.

Доставку условного больного в развернутый госпиталь осуществила специализированная эвакуационная бригада в составе трех человек и водителя в 12.30. Так как доставка осуществлялась специализированным транспортом без использования индивидуального мобильного бокса для больного, все члены эвакуационной бригады были одеты в противочумные костюмы IV типа. Перенос условного больного из доставившего его транспорта в развернутый санитарный пропускник для поступающих больных был осуществлен силами членов эвакуационной бригады в средствах индивидуальной защиты на мягких носилках. В процессе переноса была смоделирована нештатная ситуация – возникновение у условного больного интенсивной рвоты с попаданием рвотных масс на полы и стены в тамбуре перед входом в санитарный пропускник. Уборка рвотных масс и дезинфекция тамбура проведена силами двух дезинфекторов в средствах индивидуальной защиты.

В период с 12.50 до 13.10 на оборудованной пневмокаркасным дезинфекционным барьером площадке два дезинфектора в противочумных костюмах IV типа с помощью гидропультов провели дезинфекционную обработку специализированного транспортного средства, доставившего условного больного.

Сбор эпидемиологического анамнеза, объективное обследование больного с соблюдением требований биологической безопасности были осуществлены врачом-инфекционистом в период с 13.10 до 13.35. В этот же временной промежуток условный больной был осмотрен приглашенным консультантом-хирургом, одетым в противочумный костюм IV типа. Острая хирургическая патология была исключена.

При отборе проб клинического материала (фекалий, рвотных масс, крови), проведенном врачом-инфекционистом и медсестрой в период с 13.35 до 13.50, ошибок и нарушений требований биологической безопасности не было.

Упаковка отобранных проб и передача их через тамбур-шлюз для дальнейшего исследования в бактериологическую и клиническую лаборатории проведена врачом-инфекционистом и медсестрой в соответствии с требованиями действующих нормативных документов в период времени с 13.50 до 14.00.

Заключительным этапом учебно-тренировочного занятия, проведенным в период с 14.00 до 14.15, явилась отработка навыков снятия и замачивания в дезинфицирующем растворе средств индивидуальной защиты. Данный этап все сотрудники госпиталя, принимавшие участие в учебно-тренировочном занятии, выполнили слаженно и без ошибок.

На подведении итогов учебно-тренировочного занятия с участием консультантов из ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора был проведен детальный разбор и анализ действий сотрудников госпиталя на каждом из его этапов. Установлено, что развертывание провизорного госпиталя проведено в соответствии с требованиями действующих нормативных документов и с опережением регламентированных сроков. Была отмечена слаженность, профессионализм и высокий уровень подготовки специалистов МБУЗ Городская больница № 7 г. Ростова-на-Дону при осуществлении всех операционных процедур – от реализации схемы оповещения и сбора до отбора проб клинического материала у поступившего условного больного.

По материалам выполненной фото- и видеосъемки смонтирован учебный фильм, который может быть использован в качестве дидактического материала для дальнейшего повышения уровня профессиональной компетенции специалистов.

Таким образом, на примере конкретной лечебно-профилактической организации показано, что проведение учебно-тренировочных занятий по развертыванию специализированных подразделений госпитальной базы является важным направлением обеспечения постоянной готовности медицинских учреждений к проведению противоохолерных мероприятий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Суранова Т.Г., Чикова С.С., Широков А.Ю., Никифоров В.В. Комплекс мероприятий, проводимых медицинской организацией по предупреждению заноса и распространения инфекционных болезней, вызывающих чрезвычайную ситуацию в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения // Эпидемиология и инфекционные болезни.- 2015.- №2.- С. 6-13.

2. Противоэпидемическое обеспечение населения в условиях чрезвычайных ситуаций, в том числе при формировании очагов опасных инфекционных заболеваний: Методические указания МУ 3.1.3260-15. – М., 2015.

3. Организация и проведение первичных противоэпидемических мероприятий в случаях выявления больного (трупа), подозрительного на заболевания инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия

населения: Методические указания МУ 3.4.2552-09. – М., 2009.

4. СП 3.4.2318-08 "Санитарная охрана территории Российской Федерации".

5. Безсмертный В.Е., Бредихин В.Н., Конева А.С. и др. Опыт создания стационарного инфекционного госпиталя для лечения особо опасных инфекционных болезней в Гвинейской Республике // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015.- № 3.- С.13-15.

6. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противозидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры: Методические указания МУ 3.1.1.2232-07. – М., 2008.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ НА ТЕРРИТОРИЯХ СЕВЕРО - ЗАПАДНОГО ФЕДЕРАЛЬНОГО ОКРУГА РФ

Чмырь И.А., Титова Н.М., Тимошин В.Б.

*ФКУЗ «Северо-Западная противочумная станция» Роспотребнадзора,
Россия, г. Санкт-Петербург*

В течение многих десятилетий на территории Северо-Западного Федерального округа Российской Федерации сохраняется эпидемическое благополучие по холере. Как в г. Санкт-Петербурге, так и в других областях округа документированные заболевания холерой не регистрируются более 100 лет, кроме последнего заносного случая этой инфекции, который был выявлен в Мурманской области в 2006 г. Заболевание имело благополучный исход и не привело к распространению инфекции и возникновению вторичных эпидочагов (эпидосложнений). Единичные случаи подозрения на холеру, выявленные в 2007 г. в Ленинградской и в 2017 г. в Мурманской областях, были предварительно диагностированы на основании эпидемиологических и не четких клинических данных. При углубленном клиническом и лабораторном обследовании эти случаи не получили подтверждения. В соответствии с действующей системой эпидемиологического надзора за холерой на территории округа продолжается исследование воды поверхностных водоемов на контаминацию холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп. На 11 административных территориях утверждено (определено) более 500 стационарных точек отбора воды. Ежегодно с июля по август отбирается и исследуется около 4,5 тысяч

проб. Последнее выделение токсигенного штамма *V. cholerae* O1 серовара Инаба из воды имело место в 2005 году. Слабопатогенная культура холерного вибриона обнаружена в воде в месте массового отдыха населения на территории г. Санкт-Петербурга. Эпидемически не опасные, нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 серовара Инаба были выделены из воды в г. Санкт-Петербурге в 2009 г.; в Архангельской области в 2013 г.; в Республике Коми в 2016 г.; в Псковской области в 2018 г. Холерные вибрионы, не относящиеся к серогруппам O1 и O139, выделяются ежегодно на всей территории округа в количестве 200-220 штаммов. Анализируя результаты длительного наблюдения за контаминацией водных объектов микроорганизмами рода *Vibrio* и принимая во внимание санитарно-гигиенические и природно-климатические условия Северо-Запада следует признать низкую потенциальную опасность серьезных эпидосложнений по холере за счет реализации водного пути распространения возбудителя. Вместе с тем нет сомнения в том, что действующая система контроля за состоянием водных объектов позволяет получать информацию о появлении фактора эпидемиологической опасности распространения возбудителя холеры. В условиях Северо-Запада действие водного фактора крайне ограничено по времени, в связи с чем степень реальной угрозы может быть сведена к нулю в период полного прекращения контактов населения с контаминированным водоемом. Отмечая крайне низкую вероятность распространения холеры водным путем, мы считаем целесообразным сократить регламентированный период отбора воды в контрольных точках, ограничиваясь временем реального использования водоема в рекреационных целях. Это можно рассматривать как предложение к переработке действующих СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». В то же время, принимая во внимание наличие на территории округа 17 морских, 7 воздушных, 22 автомобильных и 8 железнодорожных пунктов пропуска через государственную границу Российской Федерации с высокой интенсивностью межгосударственного сообщения с неблагополучными странами, следует прогнозировать высокую вероятность заноса холеры и регистрацию единичных спорадических заболеваний.

Таким образом, при наличии низкого внутреннего риска и высокого потенциального внешнего риска возникновения заболеваний холерой на контролируемой территории, целесообразно провести корректировку проводимых профилактических мероприятий, уделив больше внимания вопросам организации госпитальной и лабораторной базы, подготовке медицинских работников, специалистов, осуществляющих санитарно-карантинный контроль в пунктах пропуска через государственную границу РФ, и сотрудников туристических организаций по вопросам диагностики и профилактики холеры. При этом целесообразно сократить объем и время проведения мероприятий по обследованию водоемов, получив при этом определенный экономический эффект.

ОРГАНИЗАЦИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ И САНИТАРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ ТЕРРИТОРИИ САРАТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Кожанова О.И., Матвеева Н.И., Архипова Г.Н.

Управление Роспотребнадзора по Саратовской области, Россия, г. Саратов

В Саратовской области в рамках реализации Международных Медико-Санитарных правил (ММСП 2005) и с целью недопущения завоза и распространения опасных инфекционных заболеваний на постоянной основе проводятся мероприятия по санитарной охране территории.

С целью организации мероприятий по санитарной охране территории и координации деятельности заинтересованных органов государственной власти и ведомств 18 марта 2016 года издано Постановление Правительства Саратовской области № 122-П «О неотложных мерах по предупреждению завоза и распространения инфекционных (паразитарных) заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Саратовской области, на 2016-2020 годы», в соответствии с которым утвержден «Комплексный план мероприятий по санитарной охране территории Саратовской области на 2016-2020 годы».

Одним из важных разделов «Комплексного плана» является организация мероприятий по профилактике холеры. Эпидемиологический надзор за холерой включает систему мер, направленных на своевременное выявление завозных и местных случаев холеры, обнаружение холерных вибрионов в объектах окружающей среды, информационное обеспечение, выработку основных мероприятий по планированию и проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Ежегодно управлением осуществляется контроль за организацией деятельности бактериологических лабораторий, проводящих исследования на холеру, включая проверку ростовых качеств питательных сред и оценку практических навыков медицинского персонала медицинских организаций области, специалистов бактериологических лабораторий филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» по идентификации возбудителей.

В 2018 году были проверены 13 бактериологических лабораторий медицинских организаций, подведомственных Министерству здравоохранения области, и 10 бактериологических лабораторий филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» (в 2019 году

запланировано проверить 11 бактериологических лабораторий медицинских организаций, подведомственных Министерству здравоохранения области и 10 бактериологических лабораторий филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области»). Все проверенные бактериологические лаборатории показали 100 %-ную расшифровку полученных проб и надлежащее качество питательных сред, что свидетельствует о готовности лабораторной службы к работе по выделению возбудителя холеры.

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия по холере на территории Саратовской области Управлением проводится мониторинг циркуляции возбудителя холеры во внешней среде. Ежегодно перед началом эпидсезона по холере (в мае-июне т.г.) уточняются мониторинговые точки отбора проб воды на наличие холерных вибрионов, которые затем согласовываются с ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и утверждаются руководителем Управления Роспотребнадзора по Саратовской области.

Всего по области в 2018 году было определено 194 мониторинговых стационарных точек отбора проб воды из поверхностных водоемов (перечень стационарных точек на 2019 год корректируется). В течение эпидемического сезона 2018 года отобрано на наличие холерного вибриона 1746 проб воды. По результатам проведенных исследований в 2018 году из объектов окружающей среды в Саратовской области культуры холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп не выделены.

Мероприятия по санитарной охране территории Саратовской области осуществляются во взаимодействии с заинтересованными органами в соответствии с «Планом оперативного взаимодействия по проведению противоэпидемических мероприятий в случаях возникновения инфекционных (паразитарных) болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории РФ и массовых инфекционных заболеваний на территории Саратовской области на 2017 – 2019 годы», утвержденным Правительством Саратовской области; «Планом взаимодействия Пограничного Управления ФСБ РФ по Саратовской и Самарской областям с Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области по вопросам санитарной охраны территории» и «Планом взаимодействия Пограничного Управления ФСБ РФ по Саратовской и Самарской областям с Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области при выявлении источников ионизирующего излучения в автомобильном пункте пропуска через государственную границу РФ «Озинки».

В мае 2018 года в целях усиления санитарно-карантинного контроля (СКК) на период проведения ЧМ по футболу FIFA 2018 было усилено взаимодействие с Пограничным Управлением ФСБ РФ по Саратовской и Самарской областям, внесены корректировки в оперативный план в целях

организации СКК при пересечении границы РФ в МАПП «Озинки» организованных групп футбольных болельщиков к местам проведения игр ЧМ по футболу FIFA 2018.

В декабре 2018 года внесены изменения в Порядок взаимодействия Саратовской таможни и Управления Роспотребнадзора по Саратовской области при осуществлении контроля за перемещением через таможенную границу Таможенного союза товаров, подлежащих санитарно-карантинному контролю.

Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области в рамках действующего Порядка взаимодействия осуществляется информирование Саратовской таможни о наличии угроз или возникновении чрезвычайной ситуации, связанной с ввозом на территорию РФ опасной продукции. Информация об аннулировании или прекращении действия свидетельств о государственной регистрации продукции своевременно доводится до таможенной службы с целью недопущения ввоза на территорию РФ продукции (товаров), опасных для здоровья человека.

В соответствии с Приказом Управления Роспотребнадзора по Саратовской области и Министерства здравоохранения области от 05 апреля 2019 г № 57/57-п «Об обеспечении мероприятий по санитарной охране территории области в 2019 году» утверждены:

- порядок информирования о регистрации случая опасного инфекционного (паразитарного) заболевания, о выделении холерного вибриона от людей и из объектов окружающей среды из городов и районов области (в рабочее и нерабочее время);

- состав консультантов по диагностике, лечению и проведению мероприятий по локализации и ликвидации очагов опасных инфекционных (паразитарных) заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории.

В муниципальных городах и административных районах области ежегодно проводится корректировка территориальных комплексных планов мероприятий по санитарной охране и оперативных планов первичных противоэпидемических мероприятий, вносятся изменения в состав территориальных противоэпидемических штабов и порядок оповещения на случай выявления больных инфекционными (паразитарными) заболеваниями, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории; паспортов госпиталей специального назначения (инфекционных госпиталей для больных холерой и чумой, провизорных госпиталей, изоляторов, обсерваторов), с указанием источников пополнения оборудования и инвентаря.

Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области осуществляется подготовка специалистов управления, медицинских

организаций, должностных лиц государственных контрольных органов в пункте пропуска через государственную границу РФ по вопросам эпидемиологии, клиники, диагностики и профилактики опасных инфекционных заболеваний. Обучение проводится ежегодно в форме семинаров, практических занятий, тренировочных учений с вводом «условного» больного с подозрением на опасное инфекционное заболевание, требующее проведения мероприятий по санитарной охране территории.

В целях предотвращения возникновения и распространения на территории области опасных инфекционных заболеваний управлением проводится информирование паломников Саратовской области, выезжающих на Хадж, о мерах профилактики инфекционных заболеваний; после окончания Хаджа информация о прибывших паломниках передается управлением в медицинские организации области для организации медицинского наблюдения за ними. Данные мероприятия проводятся во взаимодействии с Духовным управлением мусульман Поволжья и министерством здравоохранения области.

На территории Саратовской области в высших учебных заведениях (университетах, военных институтах) обучаются иностранные студенты. Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области продолжается взаимодействие с ВУЗами по мониторингу прибывающих на территорию области иностранных граждан для организации медицинского наблюдения за ними.

Управление Роспотребнадзора по Саратовской области на постоянной основе информирует Министерство молодежной политики и спорта Саратовской области, Комитет по туризму Саратовской области, руководителей туристических фирм и турагентств о санитарно-эпидемиологической обстановке в мире. Ежегодно Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области с участием специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Саратовской области» проводится совещание с руководителями организаций, предоставляющих туристические услуги населению области, на котором рассматриваются вопросы профилактики опасных инфекционных болезней, и мероприятия по предотвращению их заноса и распространения на территории области.

Управление Роспотребнадзора по Саратовской области принимает активное участие в информационных акциях (брифингах, круглых столах) в средствах массовой информации области, посвященных вопросам профилактики инфекционных заболеваний, в том числе связанных с выездами в зарубежные страны.

Проводимые Управлением Роспотребнадзора по Саратовской области во взаимодействии со всеми заинтересованными органами государственной исполнительной власти, службами и ведомствами мероприятия по

санитарной охране территории позволили избежать возникновения и распространения чрезвычайных ситуаций в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Саратовской области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международные медико-санитарные правила (ММСП 2005).
2. Решение Комиссии Таможенного союза от 28.05.2010 N 299 (ред. от 22.02.2019) "О применении санитарных мер в таможенном союзе".
3. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 22.01.2008 N 3 (ред. от 29.11.2016) "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.4.2318-08" (вместе с "СП 3.4.2318-08. Санитарная охрана территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила") (Зарегистрировано в Минюсте России 03.04.2008 N 11459).
4. Постановление Главного государственного санитарного врача РФ от 09.06.2009 N 43 (ред. от 17.05.2016) "Об утверждении санитарно-эпидемиологических правил СП 3.1.1.2521-09" (вместе с "СП 3.1.1.2521-09. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила") (Зарегистрировано в Минюсте России 09.07.2009 № 14285).
5. Постановление Правительства Саратовской области от 18.03.2016 N 122-П (ред. от 29.12.2017) "О неотложных мерах по предупреждению завоза и распространения инфекционных (паразитарных) заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Саратовской области, на 2016 - 2020 годы" (вместе с "Комплексным планом мероприятий по предупреждению завоза и распространения инфекционных (паразитарных) заболеваний, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Саратовской области, на 2016 - 2020 годы").

ОРГАНИЗАЦИЯ МОНИТОРИНГА ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ В РЕСПУБЛИКЕ ТАТАРСТАН

Галимзянова Н.Ю., Борисова Л.О., Авдонина Л.Г., Пяташина М.А.

*Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан,
Россия, г. Казань*

В Татарстане туризм стал полноценной отраслью, республика является одним из наиболее крупных по населению и экономическому потенциалу регионов России, что делает ее привлекательной для жителей из других субъектов России, стран ближнего и дальнего зарубежья и увеличивает туристические и миграционные потоки.

Неотъемлемой составляющей современной общественной жизни республики является проведение крупных спортивных, культурных, политических и др. мероприятий (Универсиада - 2013 г., Чемпионат мира по водным видам спорта 2015 г., Кубок Конфедераций 2017 г., Чемпионат мира по футболу 2018 г). Международные массовые мероприятия привлекают участников и гостей из различных уголков мира, в том числе из стран, неблагополучных по опасным инфекционным болезням.

В настоящее время холера продолжает оставаться одной из актуальных и социально-значимых особо опасных инфекционных болезней.

Последняя вспышка холеры в Республике Татарстан была зарегистрирована с 16 июля по 13 августа 2001 г. (52 больных и 18 вибрионосителей). Причина возникновения очага холеры - купание населения микрорайона г. Казани в водоеме, в который самотеком попадали сточные воды в результате аварии на канализационном коллекторе. В исследованной пробе воды из данного водоема был обнаружен токсигенный холерный вибрион Эль Тор серовара Огава, 15 фаговара, идентичный по свойствам культурам, выделенным от больных. С 2002 г. случаи холеры в республике не зарегистрированы.

План противохолерных мероприятий включен отдельным разделом в «Комплексный план мероприятий по санитарной охране территории Республики Татарстан от завоза и распространения инфекционных болезней, которые могут привести к возникновению чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения, на 2016-2020 годы», утвержденный Распоряжением Кабинета Министров Республики Татарстан от 12.10.2016г. № 2264-р.

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения и организации единого подхода к лабораторному контролю и мониторингу за поверхностными водоемами с 2016г. ежегодно издается приказ Управления и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике

Татарстан» «Об организации лабораторного контроля и мониторинга за поверхностными водоемами в Республике Татарстан». Всего на учете Управления состоит 184 водоема в 45 муниципальных образованиях.

В соответствии с СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» республика относится к территории III типа подтипа А, на которой мониторинговые исследования на холеру проводятся один раз в семь дней в июле и августе. Однако в период проведения в летние месяцы международных массовых мероприятий мониторинговые исследования начинаются с июня.

Паспортизация стационарных точек проводится в соответствии с СП 3.1.1.2521-09 и МУ 3.1.1. 2232-07 «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры».

Определение точек отбора проб воды для бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов проводится с учетом характера использования водоемов, зоны санитарной охраны водных объектов, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, мест выпуска хозяйственно-бытовых сточных вод независимо от степени их очистки, места организованного рекреационного водопользования.

График отбора проб на вибриофлору утверждаются руководителем Управления Роспотребнадзора по Республике Татарстан и главным врачом ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан (Татарстан)», согласование с ФКУЗ «РосНИПЧИ «Микроб». Лабораторный контроль осуществляется в рамках оказания государственных работ на базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Татарстан».

Точки отбора проб на вибриофлору ежегодно актуализируются, так в 2018г. с целью оптимизации эпидемиологического надзора за холерой в график дополнительно было включено 136 точек отбора (места несанкционированного купания населения), представленные Министерством по гражданской обороне и чрезвычайным ситуациям Республики Татарстан.

Управлением перед началом проведения мониторинговых исследований водных объектов проводятся семинары со специалистами, осуществляющими отбор проб воды поверхностных водоемов и стоков в соответствии с требованиями МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». В 2018 и 2019г. обучением были охвачены 127 специалистов ФБУЗ (охват – 100%).

Всего с 2014г. по 2018г. количество точек отбора увеличилось с 265 до 403 (на 34,3%), отобрано 15 230 проб, из них 520 положительных, в том

числе культур с выделением холероподобных вибрионов не O1 группы (холероподобных НАГ вибрионов) – 517, группы O1, штамм атоксигенный (*V. cholerae*) – 3. Доля положительных положительных проб варьировала от 2,5% в 2014г., 2015г. до 6,0% в 2016г.

Удельный вес положительных проб воды по категориям составил: из источников централизованного водоснабжения – 13,8%, мест санкционированного купания – 15,9%, мест несанкционированного купания - 40%, мест выпуска сточных вод - 30%. (таб. 1).

Таблица 1. Результаты исследования воды поверхностных водоемов на вибриофлору в Республике Татарстан с 2014 г. по 2018 г.

год	Кол-во точек	Кол-во проб	Кол-во полож. проб	доля полож. проб (%)	Положительные пробы			
					места выпуска сточных вод	источники централизованного водоснабжения	места санкционированного купания	места несанкционированного купания
2014	265	2 353	58	2,5	6	12	9	31
2015	259	2 656	67	2,5	-	15	19	33
2016	272	2 466	148	6,0	56	12	17	63
2017	403	3 849	97	2,5	43	18	20	16
2018	395	3 906	150	3,8	52	14	18	66
ИТОГО		15230	520	3,4	157 (30%)	71 (13,8%)	83 (15,9%)	209 (40%)

По выявленным фактам нестандартных проб с выделением холероподобных вибрионов и превышением гигиенических нормативов в сбрасываемых сточных водах и воде водоемов, Управлением проводится информирование водного Управления Федерального агентства водных ресурсов, Управление Росприроднадзора по Республике Татарстан, Министерства экологии и природных ресурсов Республики Татарстан, руководителей исполнительных комитетов муниципальных образований республики для принятия управленческих решений, установления аншлагов о запрете купания.

Кроме того, направляются предписания в адрес гарантирующих организаций и хозяйствующего субъекта, на балансе которого находится очистное сооружения канализации на проведение дополнительных профилактических мероприятий.

При выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп Управлением проводится полный комплекс регламентированных противоэпидемических мероприятий в соответствии с требованиями санитарного законодательства.

В рамках государственного санитарно-эпидемиологического надзора в

2018 г. проверено 448 объектов водоснабжения, выявлено 2318 правонарушений. По выявленным нарушениям санитарного законодательства составлено 330 протоколов об административном правонарушении, вынесено постановлений о наложении административного штрафа на общую сумму 1 млн. 282 тыс. рублей. В суды направлено 32 иска о понуждении выполнения хозяйствующими субъектами, эксплуатирующими объекты водоснабжения, требований санитарного законодательства, из которых рассмотрено 25, все удовлетворены, 19 исков находятся на рассмотрении.

Проводимый мониторинг вибриофлоры показал наличие в открытых водоемах Республики Татарстан условий, достаточных для поддержания жизнеспособности и размножения холерных вибрионов, при возможном их завозе из неблагополучных территорий. Принимаемые Управлением Роспотребнадзора по Республике Татарстан меры и проводимый комплекс противоэпидемических мероприятий не позволил вызвать осложнения эпидемиологической ситуации по холере на территории Республики Татарстан.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

Морозова С.И., Решетняк Е.А., Чеботарь М.А., Просяникова М.Н.,
Захарова Г.А., Борзов В.П., Иванова П.В.

*Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю
ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае», Россия,
г. Владивосток*

*ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора, Россия
г. Уссурийск*

Приморский край в силу его географического положения и международных транспортных связей является территорией, для которой существует вероятность заноса и распространения холеры. Территория Приморского края относится ко 2 типу по эпидемическим проявлениям холеры [1].

Одним из разделов эпидемиологического надзора за холерой является мониторинг контаминации водоемов холерными вибрионами. Исследования проб воды проводятся на территории Приморского края в 160 стационарных точках (70 точек ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае» и 90 точек ФКУЗ «Приморская противочумная станция»), в том числе

17 точек в трансграничных водоемах, берущих начало в КНР и в озере Ханка, имеющего общую акваторию с КНР.

За период с июня по сентябрь 2018 года исследовано 2610 проб воды из морских и пресноводных водоемов в местах отдыха людей, забора воды для хозяйственно-питьевых целей и около выпусков сточных вод, из трансграничных водоемов (за этот же период 2017 года - 2763 пробы, 2016 года - 2656 проб, 2015 года – 2711 проб, 2014 года – 2719 проб, 2013 года - 2735 проб, 2012 года – 2646 проб, 2011 года - 2661 проба).

Из воды открытых водоемов в 2018 году выделено 160 штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп (в 2017 году – 121 штамм, в 2016 году – 110 штаммов, в 2015 году – 86 штаммов, в 2014 году – 91 штамм, в 2013 году 162 штамма, в 2012 году - 174 штамма, в 2011 году – 190 штаммов).

В 2018 г. холерные вибрионы неO1/не O139 серогруппы выделялись из стационарных точек отбора на территориях Артемовского городского округа (бухта Муравьиная); Надеждинского района (бухта Тихая лагуна, Амурский залив); Хасанского района (оз. Хасан, бухта Нарва, бухта Экспедиция, р. Туманная); Ханкайского района (оз. Ханка); Уссурийского городского округа (р. Раздольная, р. Раковка, р. Славянка, р. Репьевка, р. Борисовка); Октябрьского района (р. Раздольная); Находкинского городского округа (оз. Соленое, оз. Лебединое, оз. Лебяжье, р. Каменка, залив Находка - пляж «Волна», пляж «Лесозавод», залив Восток - бухта у яхт-клуба «Антарес»); Партизанского района (р. Партизанская, слияние рек Глинка и Хмыловка, р. Литовка, пляж п. Волчанец, озеро Ливадийское); Владивостокского городского округа (в воде морской на ст. Седанка, ст. Океанская, бухта Лазурная, бухта Змеинка, водохранилище р. Седанка, р. Богатая, р. Вторая речка, р. Первая речка, р. Лазурная, р. Черная, р. Луговая, ручей в б. Лазурная, ручей в п. Рыбачий, пляж ДОО «Юнга»и ДОО «Океан»); Пограничного района (р. Нестеровка).

В июле 2016 года из озера Соленое (г. Находка) выделено четыре культуры атипичных холерных вибрионов (R-вариант).

В связи с паводковой ситуацией на территории Приморского края было увеличено количество точек отбора проб воды из поверхностных водоемов для исследования на наличие холерного вибриона в дополнительных точках (Надеждинский, Михайловский, Черниговский, Октябрьский районы, Уссурийский городской округ). На территориях, попавших в зону подтопления, отобрано 248 проб воды на наличие холерных вибрионов из пресноводных водоемов в местах отдыха людей, забора воды для хозяйственно-питьевых целей, около выпусков сточных вод, из трансграничных водоемов. В 244-х пробах холерные вибрионы не обнаружены. В 4-х пробах, отобранных на территории Уссурийского городского округа, обнаружены *V. cholerae* non O1/non O139.

В 2018 году холерные вибрионы O1/ O139 не выделялись.

В июле 2017 года при проведении мониторинга циркуляции холерных вибрионов во внешней среде, в стационарной точке поверхностного открытого водоема оз. Соленое, г. Находка – месте сброса ливневых и смешанных производственных и хозяйственно-бытовых сточных вод, выделено три культуры *V. cholerae* O1 El Tor (2 серовар Огава и один серовар Inaba) - нетоксигенные штаммы.

В августе 2016 года из оз. Соленое, г. Находка выделена культура нетоксигенного холерного вибриона O1 серовар El Tor Ogava, штамм № 217-2016-Н (гемолизположительный, ген токсина холеры в ПЦР не обнаружен). Проведены санитарно-противоэпидемические мероприятия.

Другим элементом эпиднадзора за холерой является исследование материала от больных «острыми кишечными инфекциями» (ОКИ) на носительство холерных вибрионов.

В 2018 году с предварительным диагнозом «острая кишечная инфекция» на носительство холерных вибрионов обследовано 7352 больных ОКИ (97,3 %) результаты отрицательные. Имели место отказы от обследования – 221сл. За этот же период 2017 года обследовано 7904 больных ОКИ (99,5 %), результаты отрицательные. В 2016 году обследовано 9225 больных ОКИ (100 %), результаты отрицательные (табл. №1).

Таблица 1. Сведения о лабораторном обследовании на холеру населения Приморского края в 2016-2018 гг.

	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Количество больных ОКИ, подлежащих обследованию на холеру	9194	7941	7557
из них обследовано			
аб абс.	9225	7904	7352
уд. вес.	100,3	(99,5)	97,3%
выделено культур холерных вибрионов при обследовании	0	0	0

Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю осуществляет санитарно-карантинный контроль [2, 3] в 12 пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации:

1 СКП на воздушном транспорте (ВПП Аэропорт Владивосток(Кневичи);

8 СКП в 6 морских пунктах пропуска (2 СКП размещены в удаленных

морских терминалах: Славянка (МПП Посъет) и Пластун (МПП Ольга);

5 СКП в автомобильных пунктах пропуска на границе с КНР.

В 2018 году при осуществлении санитарно-карантинного контроля выявлено 32 больных и лиц с подозрением на инфекционные заболевания, из них 3 человека с острыми кишечными инфекциями. Проведено медицинское обследование больных на холеру, результаты отрицательные.

Ежегодно в муниципальных образованиях Приморского края проводятся учения по локализации и ликвидации очагов опасных инфекционных болезней с участием Департамента здравоохранения Приморского края, других органов исполнительной власти, медицинских организаций, предприятий дезинфекционного профиля.

В рамках обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия при подготовке и проведении Восточно-экономического форума, в 2017-2018 гг. проведены учения во Владивостоке по локализации и ликвидации очага холеры по случаю предполагаемого выявления иностранного гражданина с признаками особо опасного инфекционного заболевания.

В ходе учений практически отработаны навыки проведения санитарно-противоэпидемических мероприятий в очаге заболевания, взаимодействие с медицинскими организациями, предприятиями дезинфекционного профиля и другими организациями.

В пунктах пропуска через государственную границу утверждены планы проведения противоэпидемических мероприятий, включающие схемы оповещения на случай выявления больного (трупа), подозрительного на инфекционное заболевание, и алгоритмы действий. Планы и схемы оповещения ежегодно корректируются, актуализируются согласно изменениям в нормативно-правовых актах.

В соответствии с планами работы Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю в пунктах пропуска через государственную границу ежегодно проводятся тренировочные учения по локализации и ликвидации очага холеры с участием органов государственного контроля, медицинских организаций, транспортных предприятий, предприятий дезинфекционного профиля.

Мероприятия по санитарной охране осуществляются в соответствии с Комплексным планом мероприятий по санитарной охране территории Приморского края от заноса и распространения инфекционных болезней, ввоза опасных товаров и грузов, как чрезвычайных ситуаций в области общественного здравоохранения, имеющих международное значение на 2018 – 2022 годы, утвержденным вице-губернатором Приморского края 26 апреля 2018 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.2521-09. – М., 2009.
2. Санитарная охрана территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.4.2318-08. – М., 2008.
3. Материалы государственного доклада Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю и информационно-аналитические материалы ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае» по мониторингу за контаминацией холерными вибрионами поверхностных водных объектов края с 2011 по 2018 год.

ОЦЕНКА РИСКА ЗАНОСА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С БАЛЛАСТНЫМИ ВОДАМИ СУДОВ, ПРИБЫВШИХ В ПОРТЫ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Хунхеева Ж.Ю.¹, Миронова Л.В.¹, Носков А.К.¹, Шаракшанов М.Б.¹,
Селезнев В.А.², Чеботарь М.А.², Балахонов С.В.¹

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

²*Управление Роспотребнадзора по Приморскому краю, Россия,
г. Владивосток*

Управление балластными водами судов, прибывших из неблагоприятных по холере стран, рассматривается в настоящее время как одно из актуальных направлений совершенствования эпидемиологического надзора за холерой на территории РФ. При анализе активности судоходства в морских портах Ленинградской, Калининградской, Астраханской областей, Республики Дагестан и Приморского края установлено, что порты Приморского края, наряду с портами Калининградской области, являются наиболее загруженными по показателям грузооборота [1]. С целью оценки риска заноса возбудителя холеры с балластными водами морских судов в субъекты РФ, в т.ч. на территорию Приморского края, был проведен анализ международных направлений судоходства (2015-2017 гг.), показавший, что азиатское направление является наиболее интенсивным для Приморского края, а в отдельных посещаемых судами странах складывается

неблагополучная эпидемиологическая ситуация по холере [1, 2].

Для детальной оценки риска заноса возбудителя холеры с балластными водами морских транспортных средств было проведено добровольное анкетирование капитанов судов специалистами санитарно-карантинных пунктов (СКП) Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю в морских пунктах пропуска (МПП) через государственную границу Российской Федерации с целью получения данных о типе судна, маршруте следования, местах смены балластных вод, периоде пребывания судна в порту, оснащении системами обеззараживания балластных вод.

Всего за период с февраля 2018 г. по февраль 2019 г. получено 243 анкеты от экипажей 189 судов, прибывших в МПП «Владивосток», «Находка», «Восточный», «Морской терминал Славянка МПП Посыет», «Зарубино», «Морской терминал Пластун МПП Ольга». Проанализировано 42 анкеты от капитанов 34 судов, прибывших в МПП «Владивосток». Все 34 судна являлись грузовыми, большинство из которых (n=16) прибыло из Южной Кореи (гг. Пусан, Пхохан), девять судов – из Китая (гг. Шанхай, Далянь, Дафенг, Чжоушань, Чангши, Ляньюньган, Женьян), шесть судов – из Японии (гг. Нагойя, Токачи, Кобе, Фусики, Симидзу), по одному судну – из КНДР, США, Ямайки.

Маршрут следования в большинстве случаев проходил по следующей схеме: порт убытия (Ю. Корея, Китай, Япония, КНДР) - порт прибытия (Владивосток) - порт отбытия (Южная Корея, Китай, Япония, КНДР). Суда, прибывшие из США, Ямайки направлялись в Китай и Южную Корею с заходом на два дня в порт «Владивосток». Время пребывания в порту г. Владивосток составляло преимущественно 2-3 суток (11 случаев), 7-8 суток (2 случая), 1 сутки (6 случаев). При изучении смены балласта установлено, что в 19 случаях забор балласта осуществлялся в Японском море, в 12 случаях – смена балласта не производилась, в четырех случаях – смена балласта осуществлялась в территориальных водах РФ и Китая, в двух случаях – забор в Желтом море, в четырех случаях – места смены балласта не указаны, в одном случае – в открытом океане. Места смены балласта в Японском море в четырех случаях определены расстоянием в 50-80 морских миль от берега, в одном случае – указаны координаты северной широты и восточной долготы, соответствующие месту отбора балласта в Японском море вдали от берега. Сброс балластных вод судами преимущественно осуществлялся в открытом море на расстоянии не менее 12 морских миль от берега (55,8 %).

Большинство судов (75,5 %) не были оснащены системами обеззараживания балластных вод; 23,5 % – оснащены и в 1 % анкет – сведения не предоставлены. Отсутствие систем управления балластными водами на морских судах и необходимость их модернизации данным оборудованием является актуальной проблемой как для морского флота в целом, так и для судовладельцев, в частности [3].

Таким образом, исходя из анализа судозаходов в Приморском крае, подтверждено, что значимым направлением для региона является азиатское. Полученные данные о смене балласта международными судами, свидетельствуют о заборе и сбросе балластных вод в открытом море, длительном времени нахождения судна в порту и отсутствию оснащения системами обеззараживания балласта. Все это необходимо учитывать при проведении санитарно-карантинного контроля (досмотра) транспортных средств, прибывших из неблагополучных по холере стран. Также необходима оценка возможности отбора проб балластных вод из балластных цистерн, организация и проведение лабораторных исследований на наличие возбудителя холеры и других индикаторных микроорганизмов в рамках усовершенствования эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водяницкая С.Ю., Сергиенко О.В., Баташев В.В., Рыжова А.А. О первом этапе выполнения НИР «Научное обоснование реализации требований международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими (2004 г.) в Российской Федерации // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. спец-ов Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2018. – Вып. 26. – С. 36-42.

2. Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Носков А.К. и др. Мониторинг международного судоходства в Приморском крае в рамках оценки риска заноса токсигенного холерного вибриона с балластными водами судов // Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» - Саратов, 2018. – С. 396-398

3. <http://www.morvesti.ru/analytics/detail.php?ID=71688>

ХОЛЕРА НА ДОНБАССЕ

Романенко Т.А., Скрипка Л.В., Бабуркина А.И., Дядюн В.Н.

*ГОО ВПО Донецкий национальный медицинский университет
им. М. Горького Донецкой Народной Республики, Донецкая Народная
Республика, г. Донецк*

*Республиканский центр санэпиднадзора Государственной санэпидслужбы,
Донецкая Народная Республика, г. Донецк*

Актуальность. События, которые происходят в мире в последние годы, обуславливают увеличение количества и скорости передвижения миграционных потоков и создают условия для распространения холеры на эндемичных территориях. Ежегодно в Европейских странах регистрируют более 20 случаев холеры [1]. Остановить этот процесс сложно, так как международные связи продолжают активизироваться. В связи с этим в Донецкой Народной Республике в современный период сохраняется риск возникновения эпидемических осложнений по холере, связанный с возможностью заноса возбудителя из эндемичных стран [2].

Целью работы явился анализ эпидемиологической ситуации по холере на Донбассе в историческом аспекте, оценка уровня и причин заболеваемости холерой на территории Донецкого региона с 1823 г. по настоящее время.

Для проведения анализа использованы источники научной литературы, архивные данные, донесения и воспоминания, бюллетени, а также данные отчетов из регионов, карты эпидрасследования случаев холеры и вибрионосительства при вспышке холеры в городе Мариуполе в 2011 г. Рассчитаны показатели заболеваемости и летальности по общепринятой методике.

В России в течение 1823-1993 гг., то есть за 170 лет, было 60 «холерных лет». В Украину холера заносилась во время всех пандемий, кроме первой [3].

Во вторую пандемию холера на Украине была занесена в 1830 г. из Закавказья через Ростов-на-Дону. В 1847 г. она распространилась по всему Северному Кавказу, захватила Ростов-на-Дону и достигла границ Украины.

В IV пандемию (1865 г.) холера была занесена в Россию через Украину. Она быстро распространилась в Волынскую, Таврическую, Киевскую и Екатеринославскую губернии. Донецкая губерния была выделена в апреле 1920 г. из частей территорий Харьковской и Екатеринославской областей и области Войска Донского.

В дореволюционный период в Донбассе случаи заболевания холерой никогда не прекращались. Врач Смидович писал: «Со времени своего появления в России (1823 г.) холера посетила Донбасс 17 раз (считая 1908г.)».

В 1831 г. в Донецкой губернии заболело 18744 человека, умерло 7340; в 1848 г. заболело – 53159, умерло – 16723; в 1872 г. заболело – 23389, умерло – 7629. Летальность составила 39,2 %, 31,5 %, 32,6 % соответственно.

В 1889 г. в отчетах по Мариупольскому уезду упоминается о регистрации 9 случаев заболевания, в том числе на Павловском врачебном участке – 6 случаев. С 24 июля по 4 августа 1892 г. зарегистрировано 34 случая азиатской холеры, из них 11 закончились летально (32,4 %).

Г.И. Розет писал, что решения экспертного съезда горнопромышленников Юга России в 1892 г. по водоснабжению, дезинфекции, удалению нечистот и т.д. реализованы не были. В связи с этим почва для новой эпидемии была подготовлена. В донесениях и воспоминаниях о заболевании холерой отражены сведения о холерном бунте в поселке Юзовка и о его последствиях (август 1892 г.). Бунту предшествовала вспышка холеры, во время которой ежедневно умирало от 10 до 20 больных. Всего в 1892 г. от холеры умерло 800 человек. К этому привело отсутствие санитарного надзора, голод, нехватка питьевой воды, скученность людей в бараках и землянках.

После эпидемии 1892 года холера в течение 15 лет на Донбассе не регистрировалась, но в 1906 г. она появилась вновь. Наиболее пораженным оказался Бахмутский уезд, а в нем, по-прежнему, первое место по заболеваемости холерой занял поселок Юзовка. Однако, в годы межэпидемического периода не были разработаны и не проводились необходимые противоэпидемические мероприятия, и холера вновь появилась на рудниках в 1909 г., а в 1910 г. эпидемия достигла своего пика. Из 22154 больных холерой, зарегистрированных в Екатеринославской губернии в 1910 г., 55 % заболевших приходилось на Бахмутский и Славяносербский уезды. В уездах Донбасса в 1910 г. было зарегистрировано более 75 % всех заболеваний холерой по Екатеринославской губернии. По отчету Горного управления Юга России в 1910 г. в шести округах (Алмазном, Бахмутском, Горловском, Луганском, Мариупольском, Юзовском) было зарегистрировано 5889 больных, из которых умерло 2824 (48,0 %).

В 1915 г. в Екатеринославской губернии было зарегистрировано 709 больных холерой. В Бахмутском уезде – 264 случая в 20 населенных пунктах, в т. ч. в Юзовке – 82, в Мариупольском уезде – 445 случаев в 24 пунктах, в т.ч. в г. Мариуполе – 149).

В бюллетене о холерных заболеваниях в Екатеринославской губернии сообщается, что с 20 по 22 июня 1919 г. в Бахмутском уезде заболело 104 человека, 44 умерло, в Мариупольском уезде – 3 случая (Волноваха).

В 1920 г. с 14 июня в Юзовке начали регистрироваться первые случаи заболевания, которые далее приобрели массовый характер (с 14 июня по 1 ноября возникло уже 2039 случаев). С 1917 г. Юзовский район перенес четыре эпидемии холеры, обусловленные антисанитарным состоянием рудников и заводов. В Донецкой губернии в 1920 г. было зарегистрировано 3648 случаев холеры. Летальность от холеры была высокой – 30-60 %.

Отрицательно сказался на эпидемическом процессе холеры нагрянувший в 1921 г. голод. В отчете Юзовского санитарного управления (Юзсанупр) за май 1921 г. указывается, что в течение этого месяца зарегистрировано 15 случаев заболевания холерой, из них 3 на станции Ясиноватая, 2 – городе Юзовка, 8 – на станции Иловайск, 2 – на «Унион».

Все случаи были завозные.

В отчете Юзсанупра (1922 г.) отмечается, что эпидемия холеры началась в Юзовском уезде необычно с высоким уровнем смертности. Эпидемическое неблагополучие длилось в течение 3 месяцев. В эпидемический процесс было вовлечено 30 населенных пунктов. Всего зарегистрировано 1340 случаев заболевания холерой, из них на города Юзовка и Дмитриевск (Макеевка) пришлось 523 случая (39,0 %), на сельские районы – 817 случаев (61,0 %). Летальность по уезду составила 52,6 %.

Борьба с голодом и холерой в 1921- 1922 г.г. потребовала значительных сил и средств. По имеющимся данным в июле 1923 г. был зарегистрирован 1 случай бактериологически подтвержденной холеры в г. Юзовка. Проведение противоэпидемических и профилактических мероприятий привело к ликвидации холеры: если с 1920 г. по 1925 г. на территории Донецкой губернии регистрировались единичные случаи холеры, то с 1925 г. по 1941 г. в Донбассе не было ни одного случая заболевания холерой.

Инфекция снова возникла во время фашистской оккупации. В сентябре 1942 г. в г. Макеевке было зарегистрировано около 100 случаев холеры. Первый случай холеры задокументирован среди сотрудников вспомогательных частей немецкой армии. Заболевший находился в охране лагеря в поселке Холодная Балка. Одновременно с регистрацией последующих случаев заболевания среди населения поселка Холодная Балка были выявлены 2 заболевших в 10 км от города Макеевки. Эпидемия холеры в поселке Холодная Балка продолжалась в течение 3 недель. Во время вспышки преобладали тяжелые формы заболевания, умерло более 80 % больных. Описаны 3 случая «сухой холеры» с летальностью в течение нескольких часов.

С 1943 г. по 1970 г. холера в Донбассе не регистрировалась.

Эпидемическое неблагополучие по холере, начавшееся в г. Донецке и Марьинском районе Донецкой области 18 июля 1971 г., продолжалось до октября 1971 г. В этот период было зарегистрировано 14 случаев заболевания холерой и 278 вибрионосителей Эль-Тор. В том числе в городе Донецке – 12 больных и 123 вибрионосителя, в Марьинском районе – 2 больных и 155 вибрионосителей. В ходе расследования была установлена общность серотипов и данных по фаготипированию штаммов, что позволило более вероятным считать занос холеры в Донецкую область из города Одессы, где ранее регистрировалась вспышка холеры.

В период с 1974 г. по 1993 г. в Донецкой области было зарегистрировано 100 случаев холеры, из них 42 случая больных холерой и 58 вибрионосителей. В 1974 г. в городе Мариуполе было выявлено 29 больных холерой и 33 вибрионосителя. Межэпидемический период холеры в течение 20 лет варьировал в пределах 1-5-6-8 лет в 5 городах (Макеевка, Снежное, Харцызск, Мариуполь, Донецк) и 3 районах (Амвросиевский,

Новоазовский, Первомайский).

Новая вспышка холеры на Донбассе была зарегистрирована в октябре 1994 г. преимущественно на юге области. Было выявлено 22 случая больных холерой и 45 вибрионосителей холеры Эль-Тор Огава. Больные холерой и вибрионосители регистрировались в городе Мариуполе, а также в Першотравневом и Володарском районах. В Горловке был зарегистрирован заносной случай холеры из Турции, в Мариуполе – из России (Дагестана).

С 29 июня по 7 августа 1995 г. в г. Мариуполе было зарегистрировано 2 случая вибрионосительства холеры Эль-Тор. Фактором передачи инфекции послужила вяленая рыба, выловленная в реке Кальмиус, где с 1972 г. выделялись холерные вибрионы из проб воды, ила и гидробионтов.

В дальнейшем заболевания холерой на территории Донецкой области не регистрировались вплоть до 2011 г. Следующая вспышка инфекции возникла в Мариуполе, где с мая по август 2011 г. выявлено 57 случаев заболевания и вибрионосительства, вызванных штаммом холерного вибриона O1 серогруппы, биовар Эль-Тор, серовар Огава с генами токсигенности [4].

В настоящее время, несмотря на отсутствие с 2011 г. заболеваемости среди людей, проблема холеры в Донецкой Народной Республике не утратила своей актуальности. Мониторинг циркуляции возбудителя холеры в объектах окружающей среды свидетельствует об интенсивной контаминации окружающей среды вибриофлорой. Ежегодно в Республике осуществляется исследование более 800 проб, выделяется более 190 холерных вибрионов не O1 группы и единичные штаммы O1 группы (по среднеголетним показателям за 2014-2018 гг.)

Таким образом, анализ исторических данных показывает, что холера на Донбассе является актуальной инфекцией, так как регистрируется в течение многих лет. Для объективной оценки современной эпидемиологической ситуации, своевременного прогноза эпидемических осложнений большое значение имеет постоянный мониторинг циркуляции возбудителя в окружающей среде. Сложившаяся эпидемиологическая ситуация по холере в мире, возможность заноса инфекции на территорию ДНР требуют дальнейшей работы по обеспечению мониторинга этой инфекции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Малый В.П. Холера (эпидемиология, клиника, лечение): Монография. – Х. : ООО «ЭДАНА», 2010. – 110 с.
2. Денисенко В.И., Гончаров Г.Я., Ванханен В.Д. и др. Холера: предупреждение и борьба. – Донецк, 1995. – 46 с.
3. Анищенко Г.А. Холера в Донбассе, причины распространения, меры борьбы с ней за 165 лет (1831 - 1997 гг.). – Донецк, 2000. – 318 с.

4. Барина О.Ю., Хайтович А.Б. Применение полимеразной цепной реакции при диагностике холеры в г. Мариуполе // Материалы научно-практической конференции «Актуальні проблеми особливо небезпечних інфекцій та біологічної безпеки» 18-20 сентября 2012 г., АР Крым, Евпатория.

ВЛИЯНИЕ НЕКОТОРЫХ ЭКОЛОГИЧЕСКИХ ФАКТОРОВ НА ПЕРСИСТЕНЦИЮ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ ГОРОДА РОСТОВА - НА - ДОНУ

Курбатова Е.М., Меньшикова Е.А., Левченко Д.А., Архангельская И.В.,
Кругликов В.Д., Титова С.В.

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

Холерные вибрионы O1, O139, в том числе и токсигенные, и неO1/неO139 серогрупп, являясь компонентом микрофлоры поверхностных водоемов эндемичных по холере территорий, встречаются с разнообразными многочисленными представителями гидробиоты, взаимоотношения с которыми представляют интерес с точки зрения их роли в эпидемическом процессе [1]. Установлено, что *Vibrio cholerae* могут существовать в ассоциации с фито- и зоопланктоном в прудах, реках и эстуарных системах по всему миру, при этом массовое развитие и цветение фитопланктона и водорослей в начале теплых сезонов играет важную роль в развитии водного сообщества, поскольку обеспечивает дополнительные питательные вещества для последующего развития зоопланктона и гидробионтов, а также активного размножения холерных вибрионов [2, 3, 4]. Зоо- и фитопланктон рассматриваются как важный фактор в распространении холеры как внутри континентов, так и между ними [5, 6].

На не эндемичной по холере территории России при проведении мониторинговых исследований проб из объектов окружающей среды на наличие холерных вибрионов ежегодно выделяются штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139 наряду с обнаружением единичных штаммов *V. cholerae* O1, в том числе и на территории Ростовской области, которая относится к территориям I типа по эпидпроявлениям холеры. Для водоемов данного региона характерны сезонные и многолетние колебания видового состава и численности фито- и зоопланктона, влияющие на бактериопланктон, в том числе и на вибриофлору.

Цель работы: изучение влияния некоторых экологических факторов на обнаружение штаммов *V. cholerae* в поверхностных водоемах Ростовской области: в реках г. Ростова-на-Дону и в морской воде Таганрогского залива.

Материалы и методы. В работе использовали данные мониторинговых исследований проб воды в двух стационарных точках г. Ростова-на-Дону: р. Дон, правый берег (Державинский спуск) и р. Темерник (Ботанический сад, у моста), где происходит организованный выпуск системы сброса дренажных, ливневых и талых вод, и морской воды Таганрогского залива, с мая по сентябрь включительно. Температуру воды измеряли в момент забора проб в водоеме в одно и то же время (с 8 до 9 часов утра). Выделение и идентификацию холерных вибрионов проводили в соответствии с действующими нормативными документами [7, 8]. Процент выделения *V. cholerae* определяли как отношение выделенных штаммов холерных вибрионов к общему количеству отобранных проб. Данные о составе и численности фито- и зоопланктона предоставлены институтом рыбного хозяйства ФГБНУ «АзНИИРХ» в соответствии с договором о совместном проведении научно-исследовательской работы № 180-4-15 «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону».

Результаты и обсуждение. В 90-х гг. прошлого столетия были проанализированы показатели состава и численности планктонных сообществ, а также показатели вибриофлоры р. Дон в черте г. Ростова-на-Дону с мая по сентябрь в различные годы по интенсивности выделения холерных вибрионов. Голубевым Б.П. (1997 г.) при изучении влияния видов сине-зеленых и зеленых водорослей на концентрацию вибрионов O1 Эль Тор было установлено, что сильное антагонистическое действие на *V. cholerae* O1 оказывают представители сине-зеленых водорослей *Aspergillus nidulans*. Представители зеленых водорослей – *Scenedesmus quadricauda* и *Chlorella vulgaris* проявляли выраженное бактериостатическое действие при температуре культивирования 24-25° С, а при более низких температурах (4-16° С) они оказывали стимулирующее действие. Возможно, антагонизм связан с антибактериальными веществами, выделяемыми этими водорослями во внешнюю среду при температуре 24-25° С [9, 10]. Титовой С.В. (2000 г.) экспериментально были определены токсигенные штаммы холерных вибрионов, которые выживали в период бурного развития зеленых водорослей *Scenedesmus quadricauda*. Куликалова Е.С. с соавт. (2016 г.) показала влияние некоторых экологических факторов, в том числе и фитопланктона, на выделение холерных вибрионов в водоемах г. Иркутска.

Нами в ходе изучения влияния температуры на фито-, зоопланктон и вибриофлору поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону на современном этапе было установлено, что при средней температуре 17,3 - 19,9° С (май - июнь) в пресной и морской воде доминировали диатомовые водоросли. В этот период из проб воды (речной и морской) в ходе мониторинговых

исследований контаминации поверхностных водоемов холерными вибрионами выделяли *V. cholerae* nonO1/non139, процент выделения которых составлял 10 % (табл. 1). Зоопланктон был представлен ветвистоусыми рачками в мае и коловратками в июне.

В июле – августе при средней температуре воды 22-24,7° С в речной воде доминировали динофлагелляты, зеленые и диатомовые водоросли, ветвистоусые рачки. В морской воде при температуре 26-26,5° С видовой состав гидробиоты изменился, появились сине-зеленые водоросли и двусторчатые ракообразные в июле, а копеподы – в августе. В этот период холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп выделялись из всех исследуемых проб (100 %). С понижением температуры воды в сентябре месяце (от 19,4° С в пресной воде до 18,5° С в морской) в обоих водоемах доминировали сине-зеленые водоросли. Процент выделения *V. cholerae* nonO1/nonO139 снизился с 87,5% до 50% в пресной и морской воде соответственно. Видовой состав зоопланктона не изменился.

При сравнении речной и морской воды стоит отметить более высокую температуру воды в Азовском море, а также появление сине-зеленых водорослей в морской воде в июле, тогда как в речной воде это произошло только в сентябре. Выделение *V. cholerae* nonO1/nonO139 из речной и морской воды в ходе мониторинговых исследований зависело больше от температурных колебаний.

Таким образом, в ходе изучения действия некоторых экологических факторов на вибриофлору установили, что температура является одним из основных факторов, влияющих на частоту обнаружения и численность вибрионов. В весенне – летний период в водоемах Ростова-на-Дону и области при повышении температуры воды наблюдается массовое развитие фито- и зоопланктона, представленных доминирующими видами: диатомовыми, динофитовыми, сине - зелеными водорослями, ветвистоусыми рачками. Такое массовое развитие гидробиоты совпадает с обнаружением *V. cholerae* в пробах воды в период мониторинговых исследований. Представители сине - зеленых водорослей (сентябрь) оказывают явное стимулирующее действие на холерные вибрионы, особенно в морской воде.

В настоящее время возникает необходимость изучения экологии патогенных бактерий, так как в результате происходящего на планете изменения климата и усиливающегося антропогенного воздействия на водные экосистемы возможно изменение области географического распространения холерных вибрионов, что может способствовать возрастанию возможного контакта с этими патогенными бактериями и повышению риска заражения человека. Кроме того, несомненный интерес представляет вопрос изучения процессов адгезии и колонизации холерных вибрионов на объектах внешней среды, взаимоотношений их с фито - и зоопланктоном, что поможет понять пути циркуляции возбудителя во внешней среде при изменяющихся условиях в водных экосистемах.

Таблица 1. Влияние абиотических и биотических факторов на персистенцию холерных вибрионов (май-сентябрь 2017 г.)

Месяц	Гидробиологические показатели	Ростов-на-Дону (реки Дон и Темерник)		Таганрогский залив		
		Доминирующие виды	Средняя температура ура воды (°C)	Доминирующие виды	Средняя температура ура воды (°C)	
Май	фитопланктон	Диатомовые <i>Aulacosira granulata</i>	17,35	10	Диатомовые <i>Aulacosira granulata</i>	-
	зоопланктон	Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>			Ветвистоусые рачки	-
Июнь	фитопланктон	Диатомовые <i>Aulacosira granulata</i>	19,9	12,5	Диатомовые <i>Aulacosira granulata</i>	-
	зоопланктон	Коловратки <i>Brachionus calyciflorus</i>			Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>	-
Июль	фитопланктон	Динофлагеллаты <i>Gymnodinium sp.</i> , Зеленые <i>Coelastrum nigrorogum</i> ФФФ	22	80	Сине-зеленые <i>L. ульгва</i> , <i>Anabaena contorta</i>	26
	зоопланктон	Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>			Двустворчатые ракообразные <i>Maina rectirostris</i>	100
Август	фитопланктон	Диатомовые <i>Aulacosira granulata</i>	24,7	100	Сине-зеленые <i>L. ульгва limnetica</i> , Колопеды <i>Acartia clausi</i> ,	26,5
	зоопланктон	Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>			Ветвистоусые рачки <i>Podonevadne</i>	100
Сентябрь	фитопланктон	Сине-зеленые <i>Oscillatoria agardhii</i>	19,4	87,5	Сине-зеленые <i>L. ульгва limnetica</i> ,	18,5
	зоопланктон	Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>			Ветвистоусые рачки <i>Bosmina longirostris</i>	50

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sakib S., Reddi G., Almagro S. Moreno environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae* // J. of Bacteriology. – 2018. – Vol. 200. – P. 1-12. DOI:10.1128 / JB.00795-17
2. Bhowmick R., Ghosal A., Chatterjee N.S. Effect of environmental factors on expression and activity of chitinase genes of vibrios with special reference to *Vibrio cholerae* // J. Appl. Microbiol. – 2007. – Vol. 103. – № 2. – P. 97–108.
3. Андрусенко И.Т., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р. и др. Гидробионтный фактор в эпидемиологии холеры // ЗНИСО. – 2009. – № 3. – С. 11-19.
4. Жукова Е.А. Экологические особенности взаимоотношений холерных вибрионов с другими представителями водной биоты // Автореф. дис. канд. мед. наук. – Волгоград, 2000. – 14 с.
5. Colwell R. Global climate and infectious disease: The cholerae paradigm // Science. – 1996. – Vol. 274. – № 5295. – P. 2025-2031.
6. Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartiatonsa* and *Eurytemoraaffinis* // Appl. Environ. Microbiol. – 2007. – Vol. 73 (24). – P. 7926 – 7933.
7. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): СП 1.3.3118-13. – М., 2013.
8. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. – М., 2007. – 87 с.
9. Голубев Б.П. Экологические аспекты распространения вибрионов Эль Тор в объектах окружающей среды: Автореф. дис. ...канд. мед. наук. – Саратов, 1993. – 20 с.
10. Голубев Б.П., Ломов Ю.М., Мединский Г.М. Влияние биотических и абиотических факторов поверхностных водоемов на свойства холерных вибрионов // Материалы VII съезда Всерос. общ-ва эпидемиол., микробиол., паразитол. – М. – 1997. – Т.1. – С. 285-286.
11. Титова С.В. Культивирование *Vibrio cholerae* с зелеными водорослями в эксперименте // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2000. – №2. – С.19–22.
12. Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я., Кобанова Г.И. и др. Биоиндикация качества воды поверхностных водоемов г. Иркутска для эколого-флористической характеристики мест обнаружения вибриона Эль Тор // Холера и патогенные для человека вибрионы. – 2016. – Вып. 29. – С. 93–96.

ОЦЕНКА УСТОЙЧИВОСТИ / ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* EL TOR В ПЛАНКТОННОЙ ФОРМЕ И В СОСТАВЕ БИОПЛЕНКИ К ФАГОЦИТОЗУ ПРОСТЕЙШИМИ

Меньшикова Е.А., Демидова Г.В., Курбатова Е.М., Миронова А.В.,
Захаров М.В., Титова С.В., Водопьянов С.О.

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

Молекулярно-генетическими методами установлено, что холерные вибрионы могут находиться как в стадии планктона, так и в биопленке, образуя ее на поверхности хитинового покрова некоторых морских животных и целлюлозного покрова водорослей. Существование в составе биопленок способствует выживанию вибрионов в окружающей среде [1]. В биопленках создаются благоприятные условия для генетического обмена между бактериями, что не исключает возможности появления штаммов холерных вибрионов с новыми свойствами, в том числе эпидемически значимых вариантов [2, 3]. В стадии биопленки холерные вибрионы более устойчивы к негативным факторам окружающей среды, включая дезинфектанты [4, 5]. Считается, что холерные вибрионы в биопленке защищены от поглощения и переваривания простейшими, тогда как свободноживущие планктонные клетки быстро «выедаются». Хищные гетеротрофные протисты являются одним из основных факторов гибели холерных вибрионов в окружающей среде [6].

Цель работы: определение чувствительности/устойчивости *Vibrio cholerae* El Tor в планктонной форме и в составе биопленки к клеточному слизику *Dictyostelium discoideum*.

Материалы и методы.

Для изучения устойчивости/чувствительности к *Dictyostelium discoideum* (амеба) использованы штаммы *V. cholerae* El Tor P-19613 (*ctxAB*⁺, *tcpA*⁺) и *V. cholerae* El Tor P-20000 (*ctxAB*⁻, *tcp*⁻), изолированные из реки Темерник г. Ростова-на-Дону в 2014 и 2016 годах соответственно.

Из суточных агаровых культур исследуемых штаммов холерных вибрионов готовили 1 млрд взвесь в физрастворе pH 7,2 (по стандарту мутности). Взвесь холерных вибрионов титровали до 10⁻¹ степени и распределяли равномерно шпателем по поверхности агара GM pH 7,2 с глюкозой без антибиотиков. Затем взвесь спор разводили в дистиллированной воде pH 7,2 до концентрации 50 спор/мкл и готовили серию двукратных разведений. Амебу в концентрации 50 спор/мкл двукратно раститрованную наносили на газон с *V.cholerae*. Для изучения устойчивости /чувствительности *V. cholerae* El Tor в биопленке использовали хитин

широкопалого речного рака *Astacus astacus* в качестве биотического субстрата. Фрагменты хитинового панциря речного рака без предварительной обработки размером 1 см х 4см помещали во флаконы (100 мл) с 30 мл речной воды и автоклавировали при 132° С 30 минут. Штаммы холерных вибрионов добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 10⁴ мк/мл. Исследуемые штаммы инкубировали до получения зрелой биопленки (7 суток) при температуре 25⁰ С. Работу проводили в соответствии с требованиями биологической безопасности [7].

Фрагменты хитина извлекали стерильным пинцетом, трижды промывали в стерильном физиологическом растворе, несвязавшиеся клетки удаляли на стерильной фильтровальной бумаге и делали отпечатки на агаровой среде GM pH 7,2 . Плодовые тела *D. discoideum* в той же концентрации, что и для планктонной формы холерных вибрионов, наносили на отпечатки зрелой биопленки.

Посевы инкубировали, не переворачивая чашки, во влажной камере при 22°С. Учет результатов проводили на 3-4 сутки по наличию/ отсутствию зон просветления (бляшек) на агаре.

Результаты и обсуждение.

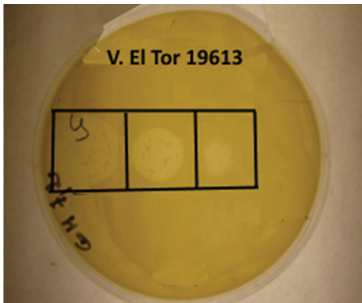
Для оценки устойчивости/чувствительности холерных вибрионов к фагоцитозу простейшими зарубежные исследователи, как правило, в подобных экспериментах используют *Acanthamoeba castellanii*, *Rhynchonomas nasuta* и др. Но, поскольку это свободноживущие в воде организмы, то все эксперименты *in vitro* проходят в жидкой среде, и учет результатов фагоцитоза проводится путем подсчета клеток вибрионов после их совместного культивирования с *Protozoa*. Использование же простейших, способных расти на агаризованных средах, позволило бы получить быструю визуальную оценку результатов фагоцитоза по появлению зон просветления. Таким модельным организмом является клеточный слизевик *D. discoideum*, относящийся к типу *Mycetozoa* [8, 9, 10].

В ходе эксперимента установили, что на 3-4 сутки на газоне обоих вариантов холерных вибрионов в планктонной форме образуются четкие зоны просветления (бляшки). Наличие бляшек свидетельствовало о чувствительности вибрионов в планктонной форме к фагоцитирующей активности миксамеб (рис. 1 А и 2 А).

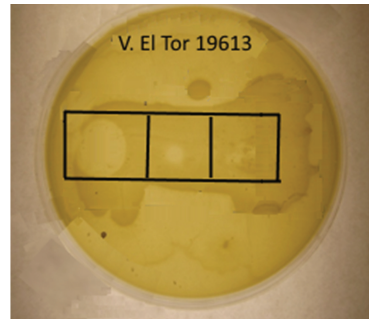
В отличие от планктонной формы *Vibrio cholerae* El Tor в составе биопленок оказались устойчивее к фагоцитозу *D. discoideum*. Зоны «выедания» токсигенного штамма холерных вибрионов слизевиком были значительно меньше, а к малым концентрациям амебы *D. discoideum* штамм P-19613 оказался устойчив. Нетоксигенный штамм *Vibrio cholerae* P-20000 в планктонной форме был устойчив к малым концентрациям «амебы» (12 спор/мкл), а в составе биопленок – ко всем концентрациям *D. discoideum*

(рис. 1 Б и 2 Б).

Таким образом, формирование биопленки на хитиновом субстрате является защитным механизмом, придающим холерным вибрионам устойчивость к фагоцитозу *D. discoideum*, что позволяет холерным вибрионам выживать в различных экологических нишах. Кроме того, устойчивость холерных вибрионов в составе биопленок на хитиновом субстрате к фагоцитозу простейшими может способствовать распространению холеры за пределы эндемичных очагов.

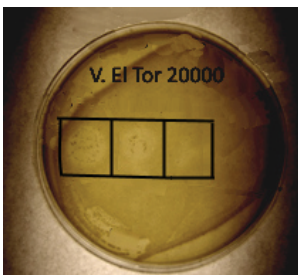


А

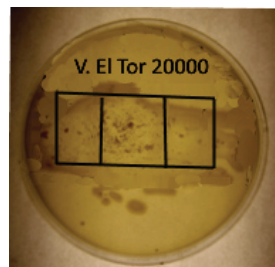


Б

Рисунок 1. Чувствительность/устойчивость к фагоцитозу *V. cholerae* El Tor P-19613 (*ctxAB*⁺, *tcpA*⁺).



А



Б

Рисунок 2. Чувствительность/устойчивость к фагоцитозу *V. cholerae* El Tor P-20000.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Albert M.J., Motarjemi Y., Neira M. The role of food in the epidemiology of cholera // World Health Stat. O. - 1997. - Vol. 50, № 1-2. - P. 111-118.
2. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M. Trans missibility of cholera: in vivo formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. - 2006. - Vol. 193, № 16. - P. 6350-6358.
3. Polyakova E.M., Bozhkova S.A., Krasnova M.V. Fenotipicheskie I genotipicheskie aspekty bioplenkoobrazovaniya u shtammov *S. aureus* osnovnikh vzbuditeley implant-assotsiirovannikh infektsiy // Mater. VI ezhegod. Vseros. Kongr. po inf.Boleznyam. - M., 2014. P. 247–248.
4. Титова С.В., Кушнарева Е.В. Оценка способности холерных вибрионов к образованию биопленок in vitro с помощью нового методического подхода // Фундаментальные исследования. – 2014. - № 10. - С. 375-379.
5. Веркина Л.М., Кирилова О.Д., Лысова Л.К., Таркаева Ж.В. Действие перекиси водорода и хлорамина Б на биопленки холерных вибрионов // Дезинфекционное дело. – 2015. - Т. 93, №3. - С. 6-13.
6. Matz C., McDougald D., Moreno A.M. et al. Biofilm formation and phenotypic variation enhance predation-driven persistence of *Vibrio cholerae* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2005. – Vol. 102, N46. – P. 16819–16824.
7. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Сан.-эпид. правила СП 1.3.3118-13. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2014. – 195 с.
8. Sandstrom G., Saeed A., Abd H. Acanthamoeba polyphaga is a possible host for *Vibrio cholerae* in aquatic environments // Exp. Parasitol. - 2010. - V. 126. - №1. - P. 65-68.
9. Маркина О.В., Шелохович А.И., Люкшина Е.Ю., Терентьев А.Н. Сравнительная оценка устойчивости к фагоцитозу ругозных и гладких вариантов штамма *Vibrio cholerae* El Tor P-18895. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов н/Д, 2015. – Вып. 28. – С. 99-101.
10. Монахова Е.В., Божко Н.В. Изучение экспрессии контакт-зависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum* // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2010. – № 4. – С. 89-92.

О РЕЗУЛЬТАТАХ МОНИТОРИНГОВЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ НА ХОЛЕРУ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ

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

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

Ежегодное выделение десятков нетоксигенных штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды (ООС) на различных территориях Российской Федерации требует систематического эпидемиологического надзора за холерой. Основным методом информации при эпидемиологическом мониторинге является микробиологический мониторинг ООС, изучение свойств изолированных штаммов *V. cholerae* O1 с последующим ПЦР-генотипированием для оценки реальной эпидемиологической ситуации в субъектах [1-4].

Из водных ООС на территории России выделено 37 штаммов *V. cholerae* O1. Установлено выделение штаммов холерных вибрионов O1 из водных ООС на территориях шести субъектов России (Республика Калмыкия – 26, Хабаровский край – 7; Ростовская, Кировская, Псковская и Иркутская области – по одному штамму, соответственно), входящих в пять федеральных округов (Южный, Дальневосточный, Приволжский, Северо-Западный и Сибирский).

Анализ динамики выделения *V. cholerae* в субъектах России и конкретных водоемах показал, что наибольшее количество штаммов (26) изолировано на территории Республики Калмыкия: из прудов (пр.) Заячий (11 штаммов), Колонский (9 штаммов), села Вознесенка (2 штамма) и реки Элистинка (4 штамма). Наибольшее количество культур *V. cholerae* O1 El Tor выделено из пр. Заячий (42,0 %) и Колонский (35,0 %) (рис. 1).

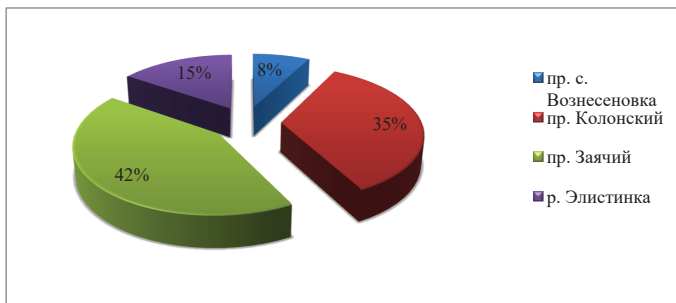


Рисунок 1. Данные о выделяемости штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор из открытых водоемов на территории Республики Калмыкия в 2018 г.

Все штаммы, поступившие в Референс-центр по мониторингу холеры в 2018 г. для идентификации, исследованы традиционными бактериологическими методами для определения родовой и видовой принадлежности и анализа фенотипических свойств. Культуры *V. cholerae* O1 были типичны по родовым и видовым свойствам, а именно: по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. Все штаммы образовывали ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра, давали рост на среде с полимиксином В и относились к *V. cholerae* O1 El Tor. Результаты бактериологических исследований подтверждены автоматизированной масс-спектрометрией (MALDI-ToFF), которая позволяет проводить идентификацию микроорганизмов по спектру белков, состав которых детерминирован генетически.

Результаты серологических исследований показали, что наиболее высокий процент выделенных культур *V. cholerae* O1 El Tor относился к серовару Ogawa – 27 (73,0 %) и серовару Inaba – 9 штаммов (24,3 %), холерные вибрионы RO составили 2,7 % от общего числа. Агглютинация с диагностической холерной O139 адсорбированной кроличьей сывороткой отсутствовала.

Чувствительность к фагу эльтор была выявлена у 8 (21,6 %) выделенных штаммов холерных вибрионов. Все изолированные культуры были устойчивы к классическому холерному фагу. Принадлежность к определенным фаготипам была выявлена у 10 изолятов (27,0 %), а 5 культур принадлежало к 15 фаготипу.

Большинство (36) выделенных штаммов относилось к нетоксигенным, в ПЦР не содержали *ctxA* и *tcpA* генов и один штамм, выделенный на территории Ростовской области г. Ростова-на-Дону (р. Темерник), характеризовался как *ctxA-tcpA+*.

Особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов изучены в ПЦР по наличию/отсутствию 14 генов-мишеней [5]. При анализе результатов установлено, что наибольшее количество нетоксигенных культур *V. cholerae* O1 El Tor вошло в кластер А – 21 штамм, состоящий из пяти генотипов (табл.).

Таблица. ПЦР-характеристика по 14 генам-мишеням нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, выделенных из ООС на территории Российской Федерации в 2018 г.

№ п/п	Кластер	Кластер		RS1, RS2	VPI-1	VPI-2			RTX		T6SS			T3SS		<i>mshA</i>	<i>stm/sto</i>	Кол-во штаммов	Кол-во штаммов
		ПЦР-кластер	ПЦР-генотип			<i>rstA</i>	<i>tcpA</i>	<i>int</i>	<i>nan H</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-ygrG1</i>	<i>phd-ygrG3</i>	<i>vasK</i>				
1	A	A1	_*	-	+**	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	1	20	
2		A2	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	1		
3		A3	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	14		
4		A4	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	3		
5		A5	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	1		
6	B	B1	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	2	2	
7	C	C1	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	2	2	
8	E	E1	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	2	9	
9		E2	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	2		
10		E3	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	2		
11		E4	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	1		
12		E5	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	1		
13		E6	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	1		
14	F	F1	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	2	4	
15		F2	-	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	1		
16		F3	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	1		
Всего																		37	

Примечание:

* – отсутствие гена по результатам ПЦР-анализа;

** – наличие либо отсутствие гена по результатам ПЦР-анализа, что допускается для отдельных генотипов.

Данный кластер был обнаружен на территориях Республики Калмыкия и Иркутской области.

Федеральный округ	Регион	Генотипы
Южный ФО	Ростовская область	E6
	Республика Калмыкия	A2 A3 A4 A5 B1 C1 E5 F2 F3
Приволжский ФО	Кировская область	F1
Сибирский ФО	Иркутская область	A1
Дальневосточный ФО	Хабаровский край	E1 E2 E3 E4
Северо-Запдный ФО	Псковская область	F1

Рисунок 2. Распределение ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* по субъектам России.

С помощью пополняемой БД ГИС «Холера 1989-2014» [3] проведен сравнительный анализ генотипов холерных вибрионов, изолированных из ООС в предыдущие годы. Так, в 2018 г. были изолированы штаммы с новыми генотипами: Иркутская область – А1 (№1-18) и Ростовская область – Е6 (№94), что указывает на вероятность их заносного происхождения. Установлено выделение штаммов с идентичными генотипами, обнаруженными ранее на одной и той же территории в разные годы: Республика Калмыкия (2014, 2015, 2017, 2018 гг.) – генотипы А2-А5, В1, С1, Е5, F2, F3; Псковская область (2014, 2018 гг.) – генотип F1, а также в разные годы на других территориях: Хабаровский край (2018), Кировская область (2018), Иркутская область (2014, 2017), Забайкальский край (2014), Республика Крым (2014), Московская область (2014) – генотипы Е1-Е4, встречающихся наиболее часто в поверхностных водоемах страны.

На фоне эпидемического благополучия по холере в стране в 2018 г. при проведении лабораторных исследований продолжали выделяться в пробах воды из ООС субъектов Российской Федерации штаммы холерных вибрионов О1 серогруппы. У изолированных штаммов отмечены новые, ранее не встречавшиеся, генотипы. Кроме того, обнаружены изоляты с другими генотипами, встречающимися наиболее часто в поверхностных водоемах страны. Таким образом, по результатам мониторинга холеры эпидемиологическая обстановка на территории Российской Федерации в 2018 г. продолжала оставаться нестабильной, что подтверждает прогноз, сделанный в начале года.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левченко, Д.А. Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 гг. с помощью авторской ГИС / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, М.И. Ежова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2017. – №1. – С. 112-117.

2. Титова, С.В. Референс-центр по мониторингу холеры: инфомационный анализ итогов реализации задачи по проведению идентификации штаммов *V. cholerae* О1, выделенных на территории Российской Федерации / С.В. Титова, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина и др. // Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области: Матер. регион. научно-практ. конф. – Ростов-на-Дону, 2017. – С. 29-34.

3. Левченко, Д.А. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС "Холера 1989–2014" / Д.А. Левченко, В.Д.

Кругликов, И.В. Архангельская и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – № 4. – С. 99-102.

4. Левченко, Д.А. Анализ данных генотипирования *V. cholerae* O1 El Tor, из водных экосистем на территории Краснодарского края с 1990 по 2016 год / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. – № 12 (297). – С. 44-46.

5. Кругликов, В.Д. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой / В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2018. – № 2. – С. 28-35.

ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2018 ГОДУ

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

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

В течение 2018 года на территории 6-ти субъектов Российской Федерации из поверхностных водоемов изолировано 37 нетоксигенных гемолизположительных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor сероваров Ogava, Inaba и R-вариант:

- Республика Калмыкия – 26 штаммов (г. Элиста – пруд Заячий, пруд Колонский, река Элистинка, Целинный район – пруд села Вознесенка);

- Хабаровский край – 7 штаммов (г. Хабаровск – реки Черная, Амур, Гнилая Падь);

- Иркутская область – 1 штамм (г. Иркутск – река Ушаковка);

- Ростовская область – 1 штамм (г. Ростов-на-Дону – река Темерник);
- Псковская область – 1 штамм (г. Псков – река Великая).
- Кировская область – 1 штамм (Юрьянский р-н, п. Мурыгино – река Вятка).

В лабораториях противочумных учреждений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора изолировано 17 (46%) и 20 (54%) штаммов соответственно.

Определяющими общую характеристику холерных вибрионов явились штаммы, изолированные на территории Республики Калмыкия (26 штаммов) и Хабаровского края (7) – суммарно 89,2% от всех изолированных на территории Российской Федерации.

Все культуры изолированы из проб воды рек (14 культур – 37,8%) и прудов (23 культуры – 62,2%), в том числе 11 (29,7%) в местах сброса сточных вод.

Наибольшая частота изоляции холерных вибрионов O1 Эль Тор отмечена в июле – 51,4% (19 штаммов) и августе – 35,1% (13). В июне и сентябре изолировано 2,7% (1) и 10,8% (4) штамма соответственно. Первый штамм был выделен в Ростовской области – в пробе от 25 июня, последний штамм – в Республике Калмыкия в пробе от 17 сентября.

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

В числе изученных штаммов серовар Огава составил 73,0% (27 штаммов), Инаба – 24,3% (9), R-вариант – 2,7% (1). При этом отмечено выделение на территориях отдельных субъектов Российской Федерации холерных вибрионов одного серовара: на территории Хабаровского края – Инаба (7), Республики Калмыкия – Огава (26).

Все штаммы протестированы в ПЦР, не содержали гена *ctxA* и большинство гена *tcp A* (за исключением выделенного в Ростовской области), а также лизировали эритроциты барана в пробе Грейга, как при выделении, так и при последующем изучении во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Доля атипичных по биологическим свойствам культур составила 75,7% (в 2017 г. – 94,7%). Типичными по основным тестам при выделении или при последующей идентификации в НИПЧИ были штаммы, изолированные в Хабаровском крае (7), Кировской (1) и Псковской (1) областях. Все они относятся к серовару Инаба.

Показатель изменчивости по фагочувствительности для серовара Огава

составил 100%. Выделение атипичных культур регистрировалось на протяжении всего периода и отмечено в водоемах обоих видов – реки и пруды.

Среди атипичных (28) фоновыми были культуры, резистентные к диагностическому фагу эльтор – 100,0% (по результатам окончательного исследования во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора). Показатель культур, атипичных по агглютинации холерными диагностическими сыворотками, составил 3,6%, атипичных по другим признакам не зарегистрировано. В результате на долю измененных по комплексу признаков пришлось всего 3,6%.

В отношении к общему числу выделенных культур (37) эти показатели составили соответственно 75,7 – 2,7 – 2,7%.

По результатам типирования фагами Дрожевкиной-Аругюнова во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора принадлежность к фаготипу определена для 9-ти штаммов: Хабаровский край – реки Черная, Амур, Гнилая Падь (15 ф/т – 7 штаммов), Кировская область – река Вятка (20 ф/т), Республика Калмыкия – пруд Заячий (17 ф/т).

При изучении чувствительности культур холерных вибрионов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом не зарегистрировано устойчивых к пefлоксацину, ципрофлоксацину, рифампицину, фурадонину и левомицетину; минимальная резистентность отмечена к гентамицину и офлоксацину; максимальная – к канамицину, триметоприму и цефепиму.

Случаев инфицирования людей возбудителем холеры в Российской Федерации в 2018 году не зарегистрировано.

Таблица 1. Характеристика культур холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Российской Федерации в 2018 году

№ п/п	Административная территория	Источник выделения	Всего изучено культур	В том числе по ТЕСТАМ ИДЕНТИФИКАЦИИ*				EPECG**	Распределение А Т И П И Ч Н Ы Х*												
				O1					ГЕМОЛИЗ*		ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ		по СЕРОВАРАМ**								
				O1a	O1b	R-вариант	Гликозила		O139	-	+	сах	глиц	O1a	O1b	Инаb	Гликозила	R-вариант	фаг эльтор	агглютинирующий	желатина
1	Республика Калмыкия	вода	26	-	-	-	-	-	26	-	26	26	-	-	26	-	-	-	-	Фосес-Проксауэр	
2	Хабаровский край	вода	7	-	7	-	-	-	7	-	7	7	-	-	-	-	-	-	-	-	
3	Иркутская область	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	1(1)	-	-	1	1(1)	-	-	1(1)	-	
4	Кировская область	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
5	Псковская область	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
6	Ростовская область	вода	1	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
ИТОГО по Российской Федерации			37	27	9	1	-	-	37	-	37	1	36	28(1)	27	-	-	-	1	28(1)	-
			73, 0, 3	24, 2, 7	-	-	-	100, 0, 0	100, 0, 0	2, 7	97,3	75,7	100, 0, 0	-	-	100, 0, 0	75,7	2, 7	-	-	-
			45, 3, 3	53, 1, 3	-	-	-	100, 0, 0	100, 0, 0	1, 3	98,7	94,7	91, 2, 5	97, 5	100, 0, 0	94,7	1, 3	1, 3	-	-	-
Отношение 2018 г. / 2017 г.			+1, 6	-2, 2, 1	+2, 1	-	-	=	=	=	=	-1,3	+1, 1	=	=	-1,3	=	-1,3	=	-	-

Примечание: * — данные по результатам изучения в НИПЧЦ;

** — в скобках в сочетании с другими признаками

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ, ПРОВОДИМОГО ФКУЗ «СЕВЕРО-КАВКАЗСКАЯ ПРОТИВОЧУМНАЯ СТАНЦИЯ» РОСПОТРЕБНАДЗОРА ЗА ПЕРИОД С 2009 ГОДА ПО 2018 ГОД

Киреев Ю.Г., Балахнова В.В., Баташев В.В., Алиева А.А.

*ФКУЗ «Северо-Кавказская ПЧС» Роспотребнадзора,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

Эпидемиологический надзор за холерой включает комплекс мер, направленных на своевременное обнаружение холерных вибрионов в объектах окружающей среды, выявление заносных и местных случаев холеры среди населения, оперативный обмен информацией между заинтересованными ведомствами и учреждениями с последующей выработкой обоснованных рекомендаций и предложений по планированию, организации и проведению профилактических и противоэпидемических мероприятий для локализации и ликвидации возникших очагов холеры.

Учитывая, что в Российской Федерации Ростовская область относится к территориям I типа по эпидемическим проявлениям холеры, где на протяжении многих лет регулярно выделяются холерные вибрионы из воды поверхностных водоемов, отмечается выраженная сезонность обнаружения *V. cholerae* в водных объектах, одним из основных направлений эпидемиологического надзора является мониторинг контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды [1-3].

Специалистами ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора (Северо-Кавказская ПЧС) на протяжении многих лет с мая по сентябрь включительно осуществляется лабораторный мониторинг воды открытых водоемов на наличие холерных вибрионов. Отбор проб воды производится в соответствии с действующими нормативными документами.

На основании проведенного анализа результатов мониторинга за последние 10 лет (с 2009 г. по 2018 г.) установлено следующее. Всего за указанный период специалистами Северо-Кавказской ПЧС было исследовано 1049 проб воды поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов, отобранных в закрепленных и паспортизованных стационарных точках рек Дон и Темерник. В результате исследований из проб воды выделено 22 штамма *V. cholerae* O1 сероваров Ogawa и Inaba биовара El Tor, (процент выделения - 2,1 %). Данные культуры как при выделении, так и при последующей идентификации в Референс-центре по мониторингу холеры - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора обладали типичными свойствами, агглютинировались до титра O1 холерной диагностической и одной серовароспецифической сыворотками, были

гемолизпозитивны в пробе Грейга. Все изоляты протестированы в ПЦР в режиме «Real-time» и не содержали ген *ctxAB*.

Два штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенные в 2013 году, были исследованы методом мультилокусного VNTR-анализа ДНК. Стабильность VNTR – маркеров возбудителя обеспечивает определение генетической характеристики штаммов вибрионов, выделяемых из клинического материала и из объектов окружающей среды целого региона. Данный метод позволил установить факт «переживания» вибрионов в воде поверхностного водоема: один из штаммов оказался полностью идентичен штаммам, выделенным из рек Дон и Темерник в 2009 и 2011 годах, что подтверждает способность холерных вибрионов длительно персистировать в объектах окружающей среды, в частности, в воде поверхностных водоемов.

На протяжении всего периода мониторинга также было изолировано 885 культур, идентифицированных как *V. cholerae* nonO1/nonO139 (процент выделения культур - 84,4 %). Часть штаммов была передана в Референс-центр по мониторингу холеры - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора для серотипирования и дальнейшего изучения.

Следует отметить, что особое внимание мониторингу было уделено в 2018 году, в период подготовки и проведения игр Чемпионата мира по футболу FIFA 2018 г., когда резко возросло число граждан, прибывающих в Ростовскую область из-за рубежа, в том числе из стран, неблагополучных по холере. В этот же период было увеличено число точек отбора проб воды на холеру из реки Дон в зонах рекреации.

Как показали итоги проведенных исследований в 2018 г., в результате широкого комплекса профилактических и предупредительных мероприятий случаев холеры среди населения области и граждан, прибывших из-за рубежа, не зарегистрировано, находок холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в пробах воды открытых водоемов не обнаружено.

Таким образом, ежегодные мониторинговые исследования на наличие холерных вибрионов в пробах воды поверхностных водоемов с последующим анализом их свойств в рамках эпидемиологического надзора за холерой продолжают оставаться одним из важнейших направлений деятельности ФКУЗ «Северо-Кавказская ПЧС» Роспотребнадзора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009.

2. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина,

В.Д. Кругликов и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2015. – Т. 70. – № 2. – С. 249-256.

3. Москвитина, Э.А. Эпидемиологическая оценка поверхностных водоемов с учетом контаминации их холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп как составляющая при определении эпидемиологического потенциала административных территорий / Э.А. Москвитина, Е.Г. Тюленева, А.В. Самородова и др. // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. – № 7. – С. 44-49.

МОНИТОРИНГ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ ГОРОДА МОСКВЫ

Иваненко А.В., Волкова Н.В., Салова Н.Я., Трусова Н.В.
*ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в городе Москве»,
Россия, г. Москва*

Ежегодно в городе осуществляется мониторинг контаминации холерными вибрионами воды открытых водоемов в местах массового отдыха населения, а также в местах сброса очищенных сточных вод и водозабора для централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения Москвы.

По типу эпидемических проявлений холеры в соответствии с Санитарными правилами «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории РФ» СП 3.1.2521-09 город Москва относится к территории III типа, подтип А. Отбор воды из открытых водоемов для исследования на холеру в Москве проводится один раз в семь дней в июле-августе.

Всего за период с 2010 г. по 2018 г. в микробиологической лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в г. Москве» и его филиалах в административных округах было исследовано 9599 проб воды на холеру и выделено 376 культур холерного вибриона неO1/неO139 серогрупп.

В 2011 г. и 2012 г. в Москве были выделены нетоксигенные культуры *V. cholerae* O1 El Tor. В июле 2011 г. при проведении мониторинга холерных вибрионов в пробах, отобранных из р. Москвы, в стационарных точках в микрорайоне Капотня выделена нетоксигенная культура *V. cholerae* O1 El Tor Ogava. По эпидпоказаниям (вместе с ФКУЗ «Противочумный Центр» Роспотребнадзора) была отобрана 381 проба воды из р. Москвы.

Всего из семи проб выделено: шесть нетоксигенных культур *V. cholerae*

O1 El Tor Ogava и одна – нетоксигенная *V. cholerae* O1 El Tor Inaba. В августе 2012 г. из воды р. Москвы в стационарной точке отбора на Курьяновских очистных сооружениях (500 м выше сбросного канала) ОАО «Мосводоканал» была выделена одна нетоксигенная культура *V. cholerae* O1 El Tor Ogava. По эпидпоказаниям было отобрано 15 проб воды на контрольных точках на Курьяновских очистных сооружениях, холерный вибрион не выделен.

Ежегодно в городе проводится корректировка стационарных точек отбора воды на холеру. Всего зарегистрировано 73 стационарные точки отбора воды на холеру, из них: 65 точек в зонах рекреационного водопользования; 5 - в зонах санитарной охраны поверхностных водоемов, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения; 3 - в месте сброса сточных вод.

Многолетний мониторинг состояния воды открытых водоемов на территории г. Москвы показывает, что наиболее частым местом выделения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп является река Москва в месте сброса сточных вод на Курьяновских очистных сооружениях ОАО «Мосводоканал», а также ниже и выше по течению от места сброса сточных вод.



Рисунок 1. Сбросной канал ОАО Мосводоканал Курьяновские очистные сооружения.

Кроме того, ежегодно выделяются культуры нетоксигенных холерных вибрионов неO1/неO139 из проб воды стационарных точек в зонах санитарной охраны поверхностных водоемов, используемых для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения р. Москвы, Клязьминского и Учинского водохранилища. Так, за анализируемый период в этих

стационарных точках было исследовано 549 проб воды, из них 56 (10,2 %) с выделением культуры холерного вибриона неO1/неO139.

В период подготовки к ЧМ FIFA 2018 в Москве были взяты под наблюдение 66 стационарных точек: 3 точки в месте сброса сточных вод; 5 - на р. Москве в местах стоянки судов в речных портах Москвы; 5 - в местах водозабора для централизованного водоснабжения 4-х станций водоподготовки города и 53 точки в местах массового отдыха населения. Отбор проб воды для лабораторного исследования на холеру проводился в прошедшем сезоне один раз в неделю с июня по август включительно.

В 2018 г. в городе было отобрано 1341 проба воды на холеру, выделены штаммы *V. cholerae* nonO1/ nonO139 в 37-ми пробах, в том числе в 32-х пробах воды открытых водоемов (ВАО – 20, ТиНАО – 2, Курьяновские очистные - 10) и в 5-ти пробах исходной воды Западной (3) и Рублевской (2) водопроводной станции.

Все результаты мониторинга объектов окружающей среды немедленно передаются в Управление Роспотребнадзора по г. Москве для организации и проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий.

Ежегодное выделение нетоксигенных культур холерных вибрионов указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными вибрионами O1 и O139 серогрупп водных объектов и их устранения.

АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ВОДНЫХ ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ КАЛУЖСКОЙ ОБЛАСТИ

Полякова С.В., Габараева Е.А., Винникова О.Н., Дичковский Л.И.
*ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области», Россия,
г. Калуга*

В целях обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения, предупреждения завоза и распространения холеры на территории Калужской области ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калужской области» и его филиалы ежегодно проводят мониторинговые бактериологические исследования воды поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов.

Объектами исследования являются: вода из водоемов I категории,

используемых в качестве источников для питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, в зонах санитарной охраны; вода из водоемов в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод, независимо от степени их очистки, и ниже по течению на 50-500 м; вода из водоемов II категории, в местах рекреационного водопользования [3].

Управлением Роспотребнадзора по Калужской области определено 106 стационарных точек отбора проб из объектов окружающей среды для исследования на наличие холерного вибриона, из них 8 стационарных точек в г. Калуге и 98 стационарных точек в 24-х районах Калужской области. Все стационарные точки отбора паспортизованы. В соответствии с п. 4.8 и приложением СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации» отбор проб осуществляется в июле и августе: один раз в семь дней [3]. За этот период ежегодно исследуется 954 пробы воды поверхностных водоемов.

Анализируя данные эпидемиологического мониторинга, следует отметить, что за последние 10 лет в открытых водоемах области практически ежегодно выделяются *Vibrio cholerae nonO1/nonO139*. Так, в 2009 г. было выделено – 3 культуры, 2010 г. – 11 культур, 2011 г. – 1 культура, 2012 г. – 2 культуры, 2013-2014 гг. – культуры не выделялись, 2015 г. – 1 культура, 2016 г. – 12 культур, 2017 г. – 3 культуры, 2018 г. – 1 культура. Таким образом, наибольшее количество культур было выделено в 2016 году (12), в 2013-2014 годах культуры *V.cholerae nonO1/nonO139* не выделялись.

При характеристике биологических свойств изолированных культур была установлена типичность культурально-морфологических и биохимических свойств, отсутствие изменчивости по агглютинабельности [2]. Данные культуры выделялись в стационарных точках г. Калуги, что свидетельствует о наибольшем загрязнении поверхностных водоемов в г. Калуге. Холерные вибрионы серогрупп O1 и O139 на территории Калужской области не выделялись.

Таким образом, эти данные позволяют судить о наличии в поверхностных водоемах Калужской области экологических ниш, где сочетание комплекса факторов биотической и абиотической природы создает благоприятные условия для пребывания холерного вибриона.

Обнаружение холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп в поверхностных водоемах, являющихся источниками питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения и используемых в рекреационных целях, на фоне выявления неблагополучных проб по микробиологическим показателям на соответствие действующим нормативным документам из водных объектов указывает на высокую степень потенциальной эпидемической опасности реализации водного пути распространения возбудителя холеры при заносе инфекции и является неблагоприятным

прогностическим признаком [1]. Поэтому мониторинг вибриофлоры водной окружающей среды с оперативной оценкой биологических свойств изолируемых культур холерного вибриона, а также надзор за системами водоснабжения и водоотведения, являются ключевыми моментами эпиднадзора за холерой на территории Калужской области и позволяют своевременно проводить профилактические мероприятия.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Ломов Ю.М. и др. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз // Пробл. комиссия «Холера и патоген. для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону, 2011. – Вып. 24. – С. 9 – 14.
2. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания: МУК 4.2.2218-07. – М., 2007.
3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарные правила СП 3.1.1.2521-09. – М., 2009.

РЕЗУЛЬТАТЫ НАБЛЮДЕНИЯ ЗА ХОЛЕРОЙ В ОТКРЫТЫХ ВОДОЕМАХ ДАГЕСТАНА

Батырова Б.А., Бамматов Д.М., Фараджева А.З., Омарова Б.К.

*ФКУЗ «Дагестанская противочумная станция» Роспотребнадзора, Россия,
г. Махачкала*

Согласно районированию субъектов Российской Федерации по типам эпидемиологических проявлений холеры, Республика Дагестан (РД) относится к территории I типа с высоким риском завоза и распространения инфекции. Поводом для этого послужил ряд крупных вспышек заболевания холерой среди населения республики (1970, 1973, 1993, 1994, 1996, 1998 гг.). Остроту проблемы определяет то, что территория республики граничит с рядом государств, в которых регистрируются случаи данной инфекции. Республика своеобразна в плане риска появления и дальнейшего распространения холеры в связи с особенностями климата, наличия разного характера многочисленных открытых водоемов. На территории нашей

республики насчитывается свыше 4000 рек, 14 из которых впадают в Каспийское море. Реки служат источником водоснабжения городов и районов, источником оросительной системы.

Районы Дагестана наиболее густо заселены по побережьям водоемов и крайне неравнозначны в плане санитарного благоустройства. Особенности быта, традиций, менталитета местного населения определяют возможность широкой диссеминации холерной инфекции при ее появлении.

В целях прогнозирования эпидемиологической обстановки по холере и, при необходимости, ее стабилизации, Дагестанская противочумная станция осуществляет динамическое слежение за вибриопейзажем водных объектов окружающей среды. Хорошо известно, что микробиологический контроль поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов остается одним из ключевых факторов, способствующих оптимизации системы эпиднадзора на данной территории, а результаты лабораторной диагностики становятся решающими в своевременном их выявлении.

Специалисты станции проводят мониторинг наиболее значимых в эпидемиологическом плане открытых водоемов с мая по сентябрь согласно СП 3.1.1.2521-09. Забор воды осуществляется еженедельно в утренние часы из 22 стационарных точек отбора, закрепленных за станцией. Помимо этого, в баклабораторию станции по графику доставляются пробы воды из 20-45 мониторинговых точек Центров гигиены и эпидемиологии и их филиалов в семи городах и 10 административных районах республики.

В предлагаемой статье приводятся материалы по изучению вибриофлоры открытых водоемов городов и их окрестностей за последние четверть века.

В структуре исследованных проб вода открытых рекреационных водоемов составляет в среднем до 19%; 37% - вода пресноводных водоемов, (используемая населением, в т.ч. для питья); 44% - хозяйственно-бытовые сточные воды.

За отчетный период (1994-2018 гг.) исследовано 25625 проб воды, из которых изолировали 1642 холерных вибрионов не O1/не O139. Большая их часть (50%) была выделена из морской воды, остальные 50% распределялись по пресноводным водоемам и сточным водам. Помимо этого, из воды выделялись и другие представители семейства *Vibrionaceae* – аэромонады и плезомонады.

Первые вибрионы обнаруживались уже в мае, когда среднемесячная температура воды колебалась в пределах от +15 до +20°C. За три летних месяца, когда водоемы прогреваются до +29°C, высеваемость их увеличивалась. В сентябре температура воды в иные годы снижается до 18-20°C, особенно в канале им. Октябрьской революции (КОР) и остальных пресноводных водоемах, соответственно падает и процент высеваемости

вибрионов. Средний процент высеваемости вибрионов в мае-июне составлял 14%, остальные 86% приходились на июль-сентябрь. Результаты многолетнего мониторинга водоемов за контаминацией возбудителем холеры и иными представителями вибриофлоры представлены в графике.

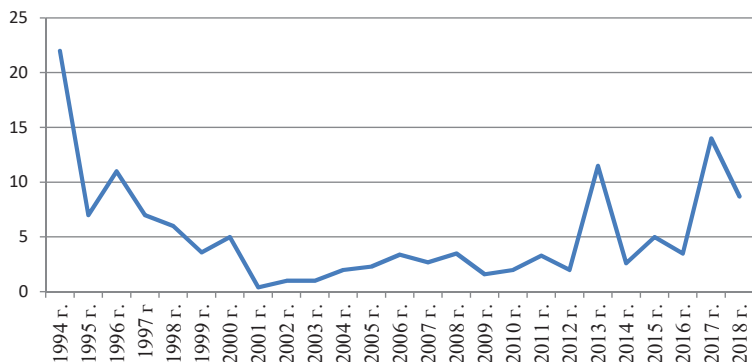


Рисунок. Динамика высеваемости водных штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп из объектов окружающей среды за 1994-2018гг. (%).

Пик высеваемости неагглютинирующихся вибрионов приходится на 1994 год – год эпидемии холеры в Дагестане, когда из объектов внешней среды было изолировано 30 культур холерных вибрионов O1. Попутно отметим, что в тот год по объективным причинам было увеличено количество мониторинговых точек забора и, соответственно, проб исследуемой воды (более 3000). Начиная с 1995 года высеваемость водных вибрионов стала резко снижаться. Небольшой подъем (11%) наблюдался в 1996 году, когда из окружающей среды изолировали 14 штаммов холерных вибрионов. Явный спад прослеживался вплоть до 2001 года (0,4%). Некая тенденция к увеличению роста высеваемости вибрионов замечена уже с 2002 года.

Анализ динамики выделения водных вибрионов показал их способность длительно сохраняться во внешней среде. Хочется отметить, что на высеваемость «морских» вибрионов оказывает воздействие такое явление, как «цветение моря», которое сопровождается понижением температуры воды в июне - начале июля и значительным снижением положительных находок вибриофлоры. И наоборот, при повышении температуры воды и pH среды обитания в июле - августе повышается высеваемость вибрионов, которым комфортно в теплой щелочной среде.

В предлагаемой таблице прослежена зависимость выявления вибрионов от показателей температуры и щелочности среды обитания с мая по сентябрь за последние три года.

Таблица. Результаты выявления изолятов в зависимости от t° и pH водных объектов (2016-2018 гг.)

месяц	t° воды	pH воды	2016 г.			2017 г.			2018 г.		
			<i>V.cholerae</i> non O1	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>V.cholerae</i> non O1	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>V.cholerae</i> non O1	<i>Aeromonas</i>	<i>Plesiomonas</i>
Май	15-20	6,3-7,5	0	0	0	3	2	2	1	7	19
Июнь	18-21	7,1-9,4	1	1	5	1	3	13	7	26	35
Июль	22-26	5,6-8,9	7	8	9	5	6	18	16	59	49
Август	24-28	7,2-9,9	2	1	5	16	18	48	4	32	39
Сентябрь	27-25	7,5-9,4	2	2	3	12	15	41	3	26	36
Всего			12	12	22	37	44	122	31	150	178

По всем изученным тестам изоляты вели себя типично как представители рода *Vibrio* (тинкториальные, культурально-морфологические, биохимические свойства и др.). По признаку утилизации углеводов и многоатомных спиртов основная масса относилась к I - II группам Хейберга.

Таким образом, результаты бактериологического контроля свидетельствуют о постоянной циркуляции холерных вибрионов не O1/не O139 в водоемах республики. За период наблюдения изолировано 1642 культуры неагглютинирующихся холерных вибрионов. Наибольшая частота выделения приходилась на июль – август на фоне высоких показателей температуры воды и pH.

Проводя анализ температурного режима в водоемах республики считаем, что мониторинг холеры необходимо проводить вплоть до снижения температуры в объектах окружающей среды ниже +16°С.

Учитывая динамику высеваемости водных вибрионов, а также последнюю эпидемию холеры в РД, считаем, что необходимо повысить настороженность профилактических служб и готовность лечебной сети на случай ухудшения эпидемической ситуации по холере. Особое внимание следует уделить участкам риска по заносу и распространению холеры на территории Дагестана. Участками риска считаем наиболее уязвимый морской порт, где важно наладить контроль за сбросом балластных вод; автомобильный пункт пропуска через государственную границу Яраг-Казмаляр, где необходимо организовать эффективный санитарно-эпидемиологический контроль за лицами, въезжающими в Российскую Федерацию.

О ВЫДЕЛЕНИИ КУЛЬТУР *VIBRIO CHOLERAЕ* ИЗ РЕКИ АГУРА ГОРОДА СОЧИ

Потемкина М.А., Гречаная Т.В., Ваниева Д.С., Скорбобенко В.В.

*Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по Краснодарскому краю, Россия,
г. Краснодар*

В XIX веке холера распространилась по всему миру из своего первоначального резервуара в дельте реки Ганг в Индии. В дальнейшем произошло шесть пандемий, которые унесли жизни миллионов людей на всех континентах [1]. В настоящее время холера является эндемичной болезнью во многих странах [2].

Существует много серогрупп *V. cholerae*, но только две из них - O1 и O139 - вызывают вспышки болезни [3].

Основными источниками и резервуарами *V. cholerae* являются люди и водоемы с теплой солоноватой водой, такие как устья рек, а также некоторые прибрежные районы [4].

В Краснодарском крае организован ежегодный мониторинг исследований поверхностных водоемов на наличие холерного вибриона с июня по сентябрь, так как Краснодарский край относится к территориям II типа по эпидемическим проявлениям холеры.

Бактериологическое исследование на холеру проб из объектов окружающей среды на территории Краснодарского края осуществляют бактериологические лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае» и ФКУЗ Причерноморская противочумная станция Роспотребнадзора в период с июня по сентябрь с кратностью один раз в семь дней [5].

Точки отбора проб воды из объектов окружающей среды для бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов ежегодно утверждаются совместным Приказом Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Краснодарском крае».

Ежегодно определяется от 200 до 280 точек для проведения исследований поверхностных водоемов на наличие холерного вибриона, из них от 46 до 66 точек исследуется ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора.

В 2015 году на наличие холерного вибриона из открытых водоемов было исследовано с июня по сентябрь 5008 проб, выделено 92 штамма

V. cholerae nonO1/nonO139 и 83 O1/O139 нетоксигенные. Все 83 пробы O1/O139 нетоксигенные были выделены из реки Агура города Сочи.

ФКУЗ «Причерноморская ПЧС» Роспотребнадзора 03.08.2015 года на территории города Сочи было выделено 2 культуры *V. cholerae* O1 El Tor Inaba, нетоксигенных (точка № 278 левый рукав реки Агура, ниже по течению от ресторана «Салхино» и точка № 279 правый рукав реки Агура, ниже по течению от ресторана «Кавказский аул»).

В соответствии с санитарно-гигиеническими нормативами были проведены следующие мероприятия [5]:

- организован выезд специалистов Управления Роспотребнадзора для проведения расследования с целью установления источников контаминации водного объекта;

- в адрес муниципального образования города Сочи внесены предложения о введении ограничительных мероприятий;

- издано Постановление главы города «Об усилении мероприятий по профилактике инфекционных заболеваний, связанных с водным путем передачи» от 11.08.2015 № 2305;

- направлено письмо в ФГБУ «Сочинский национальный парк» с рекомендациями об ограничении доступа экскурсионных групп по маршруту по реке Агура (принятие грязевых ванн);

- продолжен ежедневный отбор проб воды в мониторинговых и дополнительно введенных точках;

- организовано проведение ежедневного эпидемиологического мониторинга уровня заболеваемости города Сочи;

- составлена карта-схема с нанесением точек отбора проб на реке Агура;

- обследованы объекты, расположенные вдоль реки Агура, в том числе предприятие общественного питания ООО «Кавказский аул» (ресторан «Кавказский аул» и кафе «Салхино»).

В ходе проведенного эпидемиологического расследования установлено, что Агура - река бассейна Черного моря, протекает на территории Хостинского района города Сочи. Река Агура берет свое начало у подножия хребта Алек на высоте около 300 метров над уровнем моря вблизи поселка Прогресс. Впадает в Черное море в курортной зоне в микрорайоне Искра города Сочи. Длина реки Агура 10 километров, площадь водосборного бассейна – 30 км². Общее падение реки составляет 300 метров, уклон – 30 м/км, коэффициент извилистости – 1,24. Река Агура течет практически в южном направлении параллельно находящейся справа реке Мацесте [6]. Река Агура протекает по горной местности среди скал (Агурское ущелье). Горные породы в бассейне реки Агура сложены глинами с прослоями песков,

песчаников, алевролитов, иногда мергелей и известняков. Почвы в этой местности бурые лесные в комплексе с желтоземами [6].

Агура – типичная горная река. Средняя скорость течения 5 м/сек.

Питание реки Агура преимущественно дождевое и за счет таяния горных снегов. Водный режим – паводковый, характеризуется высокими резкими подъемами уровня воды во время сильных осадков, ливневых дождей, таяния снегов весной. Агура становится полноводной и стремительной в дождливое время года, особенно с ноября по март. Летом практически полностью пересыхает, в некоторых заводях температура воды может нагреваться до температуры воздуха. В среднем река прогревается от 18 до 30 градусов [7].

Данный водный объект не является источником водоснабжения ввиду низкого дебита водоносного слоя в летний период, а также природного изменения качества воды в нижнем течении ввиду впадения в нее источника с высоким содержанием сероводорода.

Территория Агурского ущелья в зону подтопления 2015 года не входила. При обследовании территории Агурского ущелья прокладка сетей водоснабжения и канализации и другие строительные работы не выявлялись. Объектов проживания, туристических средств размещения на данном участке нет. Туристы на данном участке в периоды года, когда русло реки не пересыхает, имеют возможность купаться в водопадах.

Зона ООО «Кавказский аул», где расположено кафе «Салхино» на 30 мест и ресторан «Кавказский аул» на 50 мест, пикниковая поляна на 10 столов, общественный туалет, павильон по реализации сувенирной продукции, канализована в централизованные сети городской канализации. При осмотре контрольного колодца на границе разграничения балансовой ответственности установлено, что водоотведение действительно производится в централизованные сети. При обследовании зоны расположения системы канализации и ее люков установлено отсутствие разливов сточных вод. По берегам реки Агура при обследовании наличия несанкционированных сбросов не установлено, следов слива стоков, каких-либо устройств для слива нет.

Имеется место излива сероводородных подземных вод (Мацестинское месторождение), которое стихийно используется большим количеством населения (местного или приезжих) в целях купания и грязелечения. Кроме того, в реку Агура изливается родник, который в питьевых целях не используется [6].

Устьевая зона (курортная), где располагаются АО «СОК «Спутник», подключены к городским сетям водоснабжения и канализования.

В ходе обследования территории участка Агурских водопадов каких-либо источников загрязнения русла реки, систем водоотведения, выведенных

в реку не установлено.

Из-за особенностей рельефа ущелья на берегах реки Агура жилые здания отсутствуют. Исключение составляет зона устья реки, где располагается СОК «Спутник», а так же общежитие на 20 мест (район автомобильной дороги «Дублер Курортного проспекта»). Общежитие и СОК «Спутник» имеют централизованные сети инженерного обеспечения и ввиду расположения ниже по течению реки и по уровню рельефа от места выявления *V. cholerae* не могут являться источником загрязнения реки Агура.

Объекты общественного питания (ресторан «Салхино» и «Кавказский Аул») так же подключены к централизованным сетям инженерного обеспечения. С целью исключения возможного загрязнения реки Агура из сетей канализации ресторана территориальным отделом Управления Роспотребнадзора по Краснодарскому краю в городе-курорте Сочи совместно с ООО «Сочи Водоканал» дважды в августе 2015 года обследованы сети канализации в районе места обнаружения *V. cholerae*. По результатам обследования наличия течи из сетей канализации не было установлено.

Точки контроля качества воды реки Агура были определены на основании многолетних наблюдений, так как нетоксигенные холерные вибрионы выявлялись, начиная с прошлого столетия (1972 год) в четырех точках.

Дополнительные точки (38) были определены после получения результатов, не соответствующих гигиеническим нормативам, и предназначены были для уточнения зоны распространения вибрионов в одном объекте.

В ходе проведения расширенного мониторинга получены результаты от лаборатории Сочинского ПЧО об исследовании 184 проб воды, из которых выделены 3 штамма nonO1/non139, 98 проб отрицательных, а в 83 обнаружен *V. cholerae* El Tor Inaba нетоксигенный.

В результате проведенного эпидемиологического расследования можно предположить, что наличие возбудителя *V. cholerae* El Tor Inaba нетоксигенный было связано с прошедшими обильными осадками в начале летнего сезона, содержание сероводорода (щелочной среды) в воде р. Агура и микроклимата данного биотопа (русло реки Агура пересохшее; температура воздуха 30⁰ С, температура воды от 25 до 30⁰ С.; высокая влажность воздуха (до 80%), все это способствовало сохранению холерных вибрионов в открытых водоемах.

Проведенные профилактические мероприятия позволили предотвратить групповую вспышечную заболеваемость среди населения города Сочи и туристов, прибывших на отдых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Актуальные проблемы холеры / Под ред. В.И. Покровского, Г.Г. Онищенко. - М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000 - 384 с.
2. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. и др. Холера в начале XXI века // Журн. микробиол. – 2005. - № 3. – С. 44–48.
3. Ющук Н.Д., Венгеров Ю.Я. Лекции по инфекционным болезням. - 3-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2007.
4. Абрамович А.С., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Погорелов В.И. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за холерой // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 1999. - № 5. - С. 54-57.
5. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521–09. – М., 2009.
6. Голгофская К. Ю., Котов В. А. Там, где начинаются реки. – Краснодар, 1967.
7. Дороватовский С. Сочи и Красная поляна с окрестностями. – Спб, 1911.

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ

Гальцева Г.В., Малай О.П., Классовская А.Е.

*ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора,
Россия, г. Новороссийск*

Седьмая пандемия холеры шагает по странам мира с 1961 г., представляя проблему для общественного здравоохранения и существование угрозы возникновения ЧС, имеющих международное значение и проявляющихся в виде эпидемий и вспышек на различных континентах мира. Современный этап холеры характеризуется распространением заболевания в странах Африки, Азии, Америки с межконтинентальными и межгосударственными заносами в страны Европы, циркуляцией холерных вибрионов O1 в воде открытых водоемов, появлением нового варианта возбудителя холеры, вибрионов O139 серогруппы, и существованием угрозы заноса инфекции на территорию Российской Федерации. Особенность современной холеры еще и в том, что эндемичность инфекции определяется

существованием стойких резервуаров возбудителя, формированием «вторичных» эндемичных очагов, персистенцией холерных вибрионов в межэпидемический период, изменчивостью фено- и генотипических признаков.

По неполным данным ВОЗ в 2018 году холера регистрировалась в странах Африки: Восточная Африка - Танзания, Кения, Замбия, Малави, Мозамбик, Уганда, Нигерия, Сомали, Либерия, Бенин, Бурунди, Зимбабве, Кот-д'Ивуар, Гана, Нигер, Того, Эфиопия, Руанда; Центральная Африка: Ангола, Демократическая Республика Конго, Конго, Камерун, ЦАР; Северная Африка: Алжир, Судан; Западная Африка: Гана, Гвинея, Либерия, Нигер, Нигерия, Сьерра-Леоне, Кот-д-Ивуар; Южная Африка: Намибия, ЮАР. Американский регион: Северная Америка-Канада; Центральная Америка - Мексика; Карибский бассейн - Гаити, Доминиканская Республика; Южная Америка-Куба, Чили, Эквадор. Южная Азия: Индия, Непал, Бангладеш; Центральная Азия: Ирак, Сирия, Афганистан, Китай, Пакистан, Казахстан; Юго-Восточная Азия: Тайланд, Мьянма, Южная Корея, Малайзия; Юго-Западная Азия: Йемен, Сирия, Саудовская Аравия.

Управление Роспотребнадзора Российской Федерации в 2018 году сообщило о 394042 случаях холеры в 40 странах мира, из которых - 2493 летальных (0,64%). Летальность в странах Азии - 0,14%, Африки - 1,94%, Америки - 1,13%.

В Европе заносы холеры имели место в Великобританию, Испанию, Данию, Германию, Швецию, Италию, Норвегию, Швейцарию, Чехию и Украину. Так, в 2016 г. в Мелитополе выявлено двое больных холерой; в 2017 г. в Запорожье - четверо; в 2018 году в г. Бердянске – один больной холерой. Возбудитель – нетоксигенный штамм *V. cholerae* O1 Огава. Такие же штаммы активно выделяли из воды открытых водоемов, сточных вод очистных сооружений и инфекционных больниц регионов.

С начала 2000 года на территории России зарегистрировано 14 заносных случаев холеры. На территории 39 субъектов из проб воды выделено 1182 штамма холерных вибрионов с различными генетическими метками, из них - 12 токсигенных (Республика Татарстан -2001 год, Санкт-Петербург-2005, Ростовская обл. -2001, 2011, 2016 гг.) [1].

В соответствии с ММСП (2005) и СП 3.4.2318-2008, с целью предотвращения риска завоза инфекций в страну, осуществляется санитарно-карантинный контроль в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации, в том числе - в 15 пунктах пропуска на территории Краснодарского края. Ежегодно в край прибывает до 10 - 13 млн. человек всеми видами транспорта из 92-112 и более стран.

На территории Краснодарского края последний случай заболевания холерой был зарегистрирован в г. Сочи в 2004 г. у местной жительницы. От больной выделили нетоксигенный штамм холерного вибриона. Источник

заражения не выявлен. Из проб воды лиманчика на Суджукской косе в г. Новороссийске в 2013 г. был выделен нетоксигенный штамм *V. cholerae* El Tor Ogawa и в 2015 г. – 92 нетоксигенных штамма из р. Агура и воды Черного моря *V. cholerae* El Tor Inaba в городе-курорте Сочи [2, 3].

С учетом эпидемиологической ситуации в мире по холере, возросшей миграции населения, в 2019 году не исключен риск завоза холеры в страну, что определяет необходимость противозидемической готовности медицинских организаций (МО) и мониторингового исследования воды поверхностных водоемов одного из основных компонентов эпидемиологического надзора за холерой на глобальном, федеральном, региональном и муниципальном уровнях [4, 5].

В 2018 году в плане эпидемиологического надзора за холерой в лаборатории ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора (ППЧС) проводили мониторинг объектов окружающей среды (ООС) в сроки, соответствующие второму типу территорий по эпидпроявлениям инфекции, согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». Водных объектов два: море и река Цемес. Стационарных мониторинговых точек-16, в баклабораториях ФБУЗ ЦГиЭ в Краснодарском крае забор проб воды осуществляется из 265-282 точек в разные годы. Забор проб воды проводился еженедельно в соответствии с требованиями СП 3.1.1.2521-09, 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 уровней». В ППЧС исследовано 288 проб воды (2017 г. – 272, 2016 г. – 288). Из них: в местах организованного рекреационного водопользования – 180 проб; в местах неорганизованного рекреационного водопользования – 54; в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод – 36; из р. Цемес – 18. Холерных вибрионов O1 серогруппы не выделено. Идентифицировано 33 штамма *V. cholerae* non O1/ non O139 – 24 из морской воды, 9 из лиманчика на Суджукской косе и в местах сброса сточных вод; из речной воды – 15 штаммов и 158 штаммов представителей рода *Vibrio*, которые выделяются в разные годы в большом количестве: *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. mimicus*, которые выделяется редко, а в 90-е годы выделяли от людей, в том числе *V. mimicus* от детей до 2-х лет. Ежегодно выделяются *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*. При различных погодных условиях выделяли в 2018 г. *V. cincinnatiensis* – два штамма, *V. harveyi* – 11, *V. Pelagius* – 8, *V. campbella* – один. Редко стали выделять штаммы *V. anguillarum*, которые ранее относили к галофильным вибрионам, играющим роль в патологии рыб. Иногда обнаруживали *V. hollisae*, *V. furnissii* и *V. campbella*.

ФКУЗ ППЧС проведен контроль качества 18 питательных сред для лабораторной диагностики холеры и 85, присланных из лабораторий

курируемой территории МО и ЦГиЭ. Для контроля использовали тест-штаммы холерных вибрионов *V. cholerae classical* Inaba P1-145(1391 - номер штамма, полученного из Индии) и *V. cholerae El Tor Ogawa* 878. Проводилась оценка противоэпидемической готовности и корректировка планов перепрофилирования госпитальной и лабораторной базы на случай осложнений. На базе баклаборатории ППЧС в 2016–2018гг. проведено шесть 5-дневных семинаров по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой, прошли подготовку 85 врачей и лаборантов баклабораторий ФБУЗ ЦГиЭ и МО Краснодарского края и Республики Адыгея. В 2019 году с 25.03 по 29.03 состоялся семинар по лабораторной диагностике холеры, на который прибыли 38 человек. Оценена противоэпидемическая готовность 319 учреждений, проведено 319 тренировочных занятий, прочитано 85 лекций по проблеме «Холера», подготовлено 1589 медицинских работников. Широкое эколого-географическое распространение холерных вибрионов O1 и неO1/неO139, а также представителей других видов рода *Vibrio* создает потенциальную опасность возникновения эпидемических осложнений. В системе эпидемиологического надзора важная роль принадлежит лабораторной диагностике, эффективность которой зависит не только от наличия качественных питательных сред и МИБП, совершенных приемов и методов по выделению вибрионов, а также от наличия четких и надежных таксономических критериев, позволяющих идентифицировать и дифференцировать вибрионы в пределах рода и вида вибрионов. Для эпидемиологического анализа необходимы и более четкие характеристики по серотипам, фаготипам, вирулентности, особенно при выделении атипичных штаммов вибрионов. Известно, что для идентификации и дифференциации вибрионов в пределах рода *Vibrio* МИБП для лабораторий, практически, отсутствуют. Роль этих вибрионов в патологии человека еще недостаточно изучена и при выделении этих вибрионов из ООС нет нормативных документов, позволяющих оценивать степень контаминации объектов окружающей среды и прогнозировать степень опасности таких объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Письмо Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 29.01.2019г. № 01/1215-2019-32 «Об эпидемиологической ситуации по холере в 2018г. и прогнозе заболеваемости на 2019 год».
2. Гальцева Г.В., Пономарева Л.В., Христенко О.А., Малай О.П. Проблема выявления вибриофлоры при заболеваниях людей и в объектах окружающей среды // Холера и патогенные вибрионы для человека: Матер. пробл. комиссии. – 2015. – № 28. – С. 53–56.
3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской

Федерации: СП 3.1.1.2521- 09. – М, 2009.

4. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания МУК 4.2.2218-07. М: Федеративный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007.

5. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания МУК 4.2.2811. М: Федеративный центр гигиены и Эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011.

О ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКИХ МЕРАХ И ПРОФИЛАКТИКЕ ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ ОРЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Румянцев А.П., Фролова И.Н., Замулина Л.Н, Цапко Д.Г.

*Управление Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав
потребителей и благополучия человека по Орловской области,
Россия, г. Орел*

Охрана территории Орловской области от заноса особо опасных инфекций является одним из приоритетных направлений в деятельности Управления Роспотребнадзора по Орловской области.

Актуальность проведения в Орловской области, как и в целом на территории Российской Федерации, комплекса профилактических мероприятий по эпидемиологическому надзору за холерой обусловлена нестабильной эпидемической обстановкой по холере в мире, интенсивными миграционными процессами, установлением туристических и экономических связей с зарубежными странами, неблагоприятными по этой инфекции [1].

Комплекс мероприятий по профилактике холеры на территории Орловской области проводится во взаимодействии с лечебной, ветеринарной, миграционной службами, Московским территориальным отделом Управления Роспотребнадзора на железнодорожном транспорте, Управлением Федеральной службы ветеринарного и фито-санитарного надзора по Орловско-Курской областям, ГУ МЧС России по Орловской области и другими заинтересованными службами и ведомствами при активной поддержке органов исполнительной власти.

В целях обеспечения мероприятий по санитарной охране территории Правительством Орловской области утвержден «Комплексный план

мероприятий по санитарной охране территории Орловской области от завоза и распространения опасных и особо опасных инфекционных болезней», откорректирован в 1 квартале 2019 года. Аналогичные планы реализуются на всех административных территориях [2].

Вопросы, касающиеся проблематики особо опасных инфекций, заложены также в региональную программу «Развитие отрасли здравоохранения в Орловской области на 2013-2020 годы», утвержденную Правительством Орловской области от 30.04.2013г.

На территории Орловской области действуют 14 соглашений об информационном взаимодействии Управления с другими службами и ведомствами, в том числе заключено соглашение о взаимодействии с ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения по опасным инфекционным болезням.

Совместно с Департаментом здравоохранения Орловской области определены госпитальная и лабораторная базы, список консультантов по вопросам эпидемиологии, клиники и диагностики особо опасных инфекций, схемы оповещения в рабочее и не рабочее время. Корректировка планов проводится ежегодно.

Актуальные вопросы санитарной охраны территории Орловской области, обеспечения ее биологической безопасности и вопросы профилактики холеры в 2018 году рассмотрены на заседании областной санитарно-противоэпидемической комиссии, заседании оперативного штаба по координации мероприятий по предупреждению распространения опасных болезней человека на территории Орловской области, 2 заседаниях комиссии по обеспечению эпизоотологического благополучия Орловской области по особо опасным и карантинным болезням, 4 заседаниях коллегий Управления.

Направлены информационные письма об организации мероприятий по санитарной охране территории Орловской области, в том числе от завоза и распространения холеры, в Департамент здравоохранения Орловской области, территориальные отделы Управления Роспотребнадзора по Орловской области и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области, территориальный отдел Управления Роспотребнадзора на железнодорожном транспорте.

Ежегодно в соответствии с приказом Управления Роспотребнадзора по Орловской области проводятся тренировочные учения и практические занятия (в 2018 году проведено 2 учения с вводом условного больного холерой), в ходе которых отрабатываются практические навыки и функциональные обязанности специалистов, как лечебной, так и санитарной служб, по соблюдению порядка надевания и снятия противочумного

костюма, лабораторному обследованию больного с подозрением на холеру, организации противоэпидемических и дезинфекционных мероприятий.

В соответствии с МУ 3.1.1.2232-07 «Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Степень противоэпидемической готовности медицинских учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры» Управлением Роспотребнадзора по Орловской области проводится оценка противоэпидемической готовности медицинских организаций к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры. При проведении надзорных мероприятий в отношении медицинских организаций в 2018 году должностными лицами Управления нарушений санитарного законодательства в части готовности медицинских организаций к выявлению и приему больных опасными инфекционными болезнями не выявлено.

С целью повышения уровня знаний медицинских работников по клинике, диагностике организации профилактических и противоэпидемических мероприятий по особо опасным инфекциям, в т. ч. холере, ежегодно в области проводятся семинары с должностными лицами территориальных отделов и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области», с медицинскими работниками учреждений здравоохранения г. Орла и области, специалистами клиничко-диагностических и микробиологических лабораторий медицинских организаций Орловской области, руководителями туристических фирм, работниками гостиниц. На семинарах, конференциях, совещаниях осуществлена подготовка 3200 специалистов медицинских организаций, туристических фирм и др. организаций.

В соответствии с районированием территорий по типам эпидемических проявлений холеры согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры» Орловская область относится к 111 типу, подтипу В [1].

На территории Орловской области организован мониторинг за широтой циркуляции и степенью контаминации поверхностных водоемов вибриофлорой. Откорректирован перечень и паспорта «Стационарных точек отбора проб воды для бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов», расположенных на территории Орловской области».

В ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» 8 лабораторий микробиологического профиля выполняют исследования на холеру, в том числе лаборатория особо опасных инфекций. Все лаборатории лицензированы, имеют санитарно-эпидемиологические заключения на право работы с микроорганизмами 3-4 групп патогенности, аккредитованы. Лаборатория ООИ имеет санитарно-эпидемиологическое заключение на право диагностических исследований материала, подозрительного на зараженность микроорганизмами II группы патогенности – холеры, туляремии, бруцеллеза, сибирской язвы.

На базе ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» ежегодно проводятся лабораторные советы для бактериологов в период подготовки к сезонным исследованиям проб воды открытых водоемов, на которых рассматриваются вопросы диагностики холерных вибрионов, осуществляется выдача шифрованных проб по индикации холеры.

Лаборатории филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области», осуществляющие исследования на холеру, обеспечены измерительным, испытательным и вспомогательным оборудованием, питательными средами и диагностическими препаратами для выполнения исследований в регламентированном объеме.

Закупка питательных сред и диагностических препаратов осуществляется централизованно. Приготовление щелочного агара и основного пептона производится в лаборатории особо опасных инфекций. Лаборатории филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» обеспечиваются данными средами по мере необходимости, лактозосахарозную среду готовят самостоятельно.

Бактериологические лаборатории филиалов ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» выполняют плановые исследования проб воды из объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона до полиуглеводной среды. В случае выявления культуры, подозрительной на холерный вибрион, она передается для дальнейшей идентификации в лабораторию особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области».

В 2018 г. лабораториями ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Орловской области» было отобрано и исследовано 512 проб воды открытых водоемов, выделено 13 культур *V. cholerae* non O1 non O139.

С целью гигиенического воспитания населения по вопросам профилактики холеры, в том числе для лиц, выезжающих в страны, неблагополучные по данной инфекции, Управлением Роспотребнадзора по Орловской области в 2018 г. – 6 месяцев 2019 г. проведено 12 выступлений по радио, 4 выступления по телевидению, опубликовано 18 статей в местные газеты, издано 125 памяток, размещено 9 информационных на официальном сайте Управления Роспотребнадзора по Орловской области.

Выводы: Проведена оценка эффективности проводимых мероприятий, направленных на предупреждение завоза и распространения опасных инфекционных заболеваний, в том числе холеры, среди населения Орловской области.

В результате проведенных мероприятий по санитарной охране на территории Орловской области в 2018 г. – 6 месяцев 2019 г. не регистрировались завозные случаи заболеваний холерой и другими карантинными инфекциями, представляющих опасность для населения

области.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09.
2. Комплексный план мероприятий по санитарной охране территории Орловской области от завоза и распространения опасных и особо опасных инфекционных болезней.
3. Государственный доклад о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения Орловской области за 2018 год.

ОБЕСПЕЧЕНИЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО БЛАГОПОЛУЧИЯ ПО ХОЛЕРЕ НА ТЕРРИТОРИИ КРАСНОЯРСКОГО КРАЯ

Еремин А.Н.¹, Русин М.В.¹, Сутурина Ю.Э.¹, Кириллова О.В.¹,
Сорокина О.В.²

*¹Управление Роспотребнадзора по Красноярскому краю, Россия,
г. Красноярск*

*²ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае», Россия,
г. Красноярск*

Территория Красноярского края не отнесена к числу эндемичных территорий по холере. Несмотря на это, с целью раннего выявления очагов холеры на территории края, организована работа по обеспечению профилактических и противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения очагов холеры и распространения возбудителя инфекции.

С целью оценки противоэпидемической готовности по холере на территории края Управлением Роспотребнадзора по Красноярскому краю (далее – Управление) проводится регулярная проверка медицинских организаций (далее – МО) края: в 2017 году проверено 173 МО, в 2018 году проверено 160 МО. По результатам проверки учреждений с неудовлетворительной готовностью не выявлено.

Регулярно ведется подготовка медицинских работников края, в том числе сотрудников ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» (далее – ФБУЗ) и филиалов по профилактике холеры. В 2018 году подготовлено 4037 сотрудников, прочитано 77 лекций, проведено 188 семинаров по профилактике холеры. Проводится повышение квалификации кадров на базе ФКУЗ «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (далее – Иркутский НИИПЧИ Роспотребнадзора) и ФКУЗ «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора.

С целью оценки готовности медицинских организаций, контрольно-надзорных органов к работе в очагах холеры Управлением ежегодно проводятся специальные тренировочные учения по организации и проведению комплекса противоэпидемических мероприятий по ликвидации инфекционного очага холеры при выявлении холеры при взаимодействии с Иркутским НИПЧИ Роспотребнадзора.

Ежегодно на территории края проводятся командно-штабные учения для специализированных формирований ФБУЗ с отработкой действий в очаге холеры.

На территории края ведется мониторинг циркуляции возбудителей холеры, который осуществляется согласно требований санитарных правил СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», точки отбора проб воды открытых водоемов утверждены в приложении № 3 к Плану деятельности Управления.

Отделение особо опасных инфекций ФБУЗ для выполнения исследований на холеру обеспечено материально-техническими ресурсами и необходимым технологическим оснащением. С целью исследования материала на наличие возбудителей холеры используются серологические методы с применением холерных диагностических сывороток: O1, O139, RO, а также методы ПЦР-диагностики с применением тест-систем: «АмплиСенс *Vibrio cholerae*-Fl». С целью контроля качества питательных сред используются тест-штаммы: *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 № 9741. По результатам контроля забракованных серий сред не выявлено.

Плановые показатели мониторинговых исследований за водой открытых водоемов края выполняются в 100 %. В 2018 г. отобрано проб на наличие холерного вибриона – 1301 или 100 % от плана, холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп выделены в 173 пробах (13,3 %), против 1,2 % в 2017 году.

На основании соглашения о взаимодействии Иркутского НИПЧИ Роспотребнадзора, Управления и ФБУЗ по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения в отношении инфекционных

болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, и других особо опасных, природно-очаговых инфекций ежегодно все выделенные культуры холерных вибрионов O1, O139, R - вариант, выделенные от людей и из объектов окружающей среды, а также штаммы холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп, изолированные от людей, направляются на идентификацию и изучение токсигенных свойств в Иркутский НИПЧИ Роспотребнадзора.

Для оценки готовности микробиологических лабораторий ФБУЗ к индикации на БС отделением исследований особо опасных инфекций ФБУЗ в 2017-2018 гг. специалистам лабораторий филиалов ФБУЗ было выдано по 13 шифрованных проб на идентификацию холерных вибрионов. Все пробы были идентифицированы правильно.

За анализируемый период в Красноярском крае по результатам мониторинга холерный вибрион не обнаружен. Эпидемиологическая обстановка на территории края оценивается как благополучная.

ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ОПАСНОСТЬ ПО ХОЛЕРЕ ТРАНСГРАНИЧНЫХ С КИТАЙСКОЙ НАРОДНОЙ РЕСПУБЛИКОЙ РЕК, ПРОТЕКАЮЩИХ ПО ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

Алленов А.В., Борзов В.П., Краснощеков В.Н., Иванова П.В.

*ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора,
Россия, г. Уссурийск*

В Приморском крае протекают берущие свое начало на территории Китая реки Раздольная, Туманная, Уссури. Самое большое озеро Дальнего Востока – Ханка также находится на территории Приморья и по нему проходит водная граница с сопредельной страной.

Река Туманная на самом юге края течет по границе трех государств России, Китая и Северной Кореи и впадает в районе Хасанского района Приморского края в залив Петра Великого Японского моря, являющегося первым в стране морским природным заповедником. Хасанский район одно из любимых мест летнего отпуска жителей края, Дальнего Востока и страны. Природный морской заповедник, располагающийся в мягком муссонном климате, обладает уникальной марикультурой, не встречающейся более на Дальнем Востоке. Вблизи реки Туманной, впадающей в море, обустроены морские фермы для выращивания марикультуры: морского гребешка, устриц, мидий, морской капусты и др.

Река Раздольная протекает на территории Приморья по нескольким районам: Октябрьскому, Уссурийскому городскому округу, Надеждинскому и впадает в пригороде Владивостока в Амурский залив Японского моря. Амурский залив также является рекреационной зоной, где располагаются санатории и базы отдыха, известные далеко за пределами края.

Река Уссури течет вдоль границы с Китаем до Хабаровского края и в районе Хабаровска впадает реку Амур.

Озеро Ханка используется в хозяйственных целях приморскими и китайскими жителями для ловли рыбы и рекреационных целях.

Осуществляя мониторинг холеры из объектов окружающей среды на вышеуказанных территориях, Приморская ПЧС особое внимание уделяет приграничным рекам, в которых холерные вибрионы хорошо размножаются и могут циркулировать в водоемах с начала лета по конец сентября.

За 40 летний период с момента первого выделения холерных вибрионов из объектов окружающей среды многократно выделялись нетоксигенные холерные вибрионы O1 и не O1/O139 серогрупп, что повышало риск заболевания людей холерой и холероподобными инфекционными болезнями.

Например с 2007 по 2014 гг. наибольшее количество (13 шт.) культур *V. cholerae* O1 серогруппы серовара Inaba были изолированы из реки Раздольной. В 2010 г. из реки Туманной – два штамма *V. cholerae* R-варианта. В 2005 и 2006 гг. из озера Ханка два штамма *V. cholerae* серовара Ogawa.

Приморская ПЧС продолжает мониторинг холеры из вышеуказанных объектов окружающей среды и считает данную работу очень важной для служб Роспотребнадзора, здравоохранения, властей всех уровней, населения и гостей Приморского края.

АНАЛИЗ МОНИТОРИНГА ИССЛЕДОВАНИЙ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ ОМСКОЙ ОБЛАСТИ НА НАЛИЧИЕ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Чащина В.Д., Хорошавина Л.В., Никитин С.В.

*ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Омской области»,
Россия, г. Омск*

В Омской области случаи заболевания холерой не регистрируются последние 30 лет. Однако на протяжении многих лет и по настоящее время холера остается одной из самых актуальных особо-опасных инфекций.

Эпидемиологическую ситуацию по холере в Омской области можно считать неустойчивой в связи с увеличением интенсивности туризма в неблагополучные страны по заболеваемости холерой и дальнейшей возможностью заноса этой инфекции в Омскую область. Также имеется вероятность заноса холерных вибрионов серогрупп O1 и O139 и попадания их в открытые водоемы, в которых создаются благоприятные условия для их выживания в связи с изменением климатических условий, таких как увеличение температурного режима и длительности теплого периода. В связи с данными факторами, территория Омской области относится к третьему типу, подтипу «А» территорий по эпидемическим проявлениям холеры и существует опасность возникновения вспышек и распространения инфекции водным путем [1]. Поэтому проводится ежегодный мониторинг воды поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов. Ежегодно исследованию подлежат 30 стационарных точек воды из водоемов I и II категории водопользования, из них 11 расположены в городе Омске и Омском районе и 19 точек в районах Омской области. В рамках мониторинговых исследований, в соответствии с государственным заданием, согласованным с Управлением Роспотребнадзора по Омской области, ежегодно в июле — августе отбирается по 270 проб воды, в том числе, 99 проб по городу Омску и Омскому району и по районам области — 171.

Процент выделения холерных вибрионов *V. cholerae* non O1/ non O139 из воды открытых водоемов в Омской области варьирует от 24,8% до 33,3% от общего числа отобранных за сезон проб. Самые частые места обнаружения положительных находок приходится на пляжи и зоны рекреации — 50,8%. В зонах водозабора выделение холерных вибрионов *V. cholerae* non O1/ non O139 — 35,8%, в зонах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод — 13,4%.

За последние пять лет (2014–2018 гг.) наибольшее количество культур *V. cholerae* non O1/ non O139 выявлено в 2016 году, наименьшее — в 2018 году. Самая разнообразная география выделения культур в районах области наблюдалась в 2014 году (5 районов), наименьшая — в 2016 и 2017 годах (3 района). Большая часть положительных находок в 2018 году приходилась на точки отбора, расположенные в г. Омске и Омском районе, что может свидетельствовать о загрязнении поверхностных водоемов. За анализируемый период (2014–2018 гг.) в Омской области холерные вибрионы серогрупп O1 и O139 не выделялись. Результаты выделения холерных вибрионов *V. cholerae* non O1/ non O139 из воды открытых водоемов в Омской области за 5 лет приведены в таблице.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего ежегодного мониторинга водных объектов окружающей среды и должны учитываться при осуществлении эпидемиологического надзора для оценки потенциальной опасности водного пути распространения холеры на территории Омской области.

Таблица. Выделение *V. cholerae* non O1/ non O139 из воды открытых водоемов в Омской области за 2014–2018 гг.

	2014 г.	2015 г.	2016 г.	2017 г.	2018 г.
Количество выделенных культур холерного вибриона <i>V. cholerae</i> non O1/ non O139 по г. Омску	56	68	76	76	53
Количество выделенных культур холерного вибриона <i>V. cholerae</i> non O1/ non O139 по районам Омской области	Всего - 13 Любинский – 5 Тарский – 2 Таврический – 1 Калачинский – 2 Черлакский – 3	Всего - 14 Любинский - 9 Тарский - 1 Саргатский - 4	Всего - 14 Любинский - 6 Калачинский - 6 Таврический - 2	Всего - 10 Таврический - 2 Тарский - 1 Калачинский - 5 Черлакский - 2	⇒ Всего — 14 ⇒ Черлакский - 3 ⇒ Любинский — 1 ⇒ Тарский — 2 ⇒ Таврический - 8 ⇒
Общее количество выделенных культур холерного вибриона <i>V. cholerae</i> non O1/ non O139 по Омской области	69	82	90	86	67

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09.

2. Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в 2018 году по Омской области». – 2019. – С. 156.

МИКРОБИОЛОГИЯ И БИОХИМИЯ

О РЕЗУЛЬТАТАХ ИССЛЕДОВАНИЙ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ ЗАГРАНПЛАВАНИЯ, ПРИБЫВШИХ В РОССИЙСКИЕ МЕЖДУНАРОДНЫЕ МОРСКИЕ ПОРТЫ

Водяницкая С.Ю.¹, Павлович Н.В.¹, Ренгач М.В.¹, Лях О.В.¹, Сергиенко О.В.¹, Кононенко А.А.¹, Киреев Ю.Г.², Баташев В.В.², Балахнова В.В.², Историк О.А.³, Черный М.А.³, Палилов М.Б.³, Мосевич О.С.⁴, Бабура Е.А.⁵, Григорян Т.Ю.⁵, Дерябкина Л.А.⁶

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

²ФКУЗ Северо-Кавказская противочумная станция, Россия, г. Ростов-на-Дону

³Управление Роспотребнадзора по Ленинградской области, Россия, г. Санкт-Петербург

⁴ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области» Роспотребнадзора, Россия, г. Санкт-Петербург

⁵Управление Роспотребнадзора по Калининградской области, Россия, г. Калининград

⁶ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области в г. Таганроге» Роспотребнадзора, Россия, г. Таганрог

В Российской Федерации Международная конвенция «О контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими» 2004 года вступила в силу в сентябре 2017 г. [1]. Для реализации положений Конвенции в территориальных водах России должен быть организован отбор и анализ проб балластных вод, которые будут проводиться по решению портовых властей без вынужденной задержки судов (статья 9 Конвенции), на наличие *E. coli*, *Enterococcus* spp., *V. cholerae* O1 и O139 (стандарт D-2 Конвенции). «Пилотными» территориями России, имеющими международные морские порты для внедрения положений Конвенции, были выбраны Калининградская, Ленинградская и Ростовская области.

Проведенные лабораторные исследования балласта судов, прибывших в международные морские порты Российской Федерации, дали следующие результаты: пробы, исследованные специалистами лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ленинградской области» показали, что *E. coli*, *Enterococcus* spp. находятся в пределах нормы, *V. cholerae* O1 и O139 - отсутствовали в балласте. Пробы, исследованные специалистами лаборатории ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Калининградской области» показали: *E. coli*, *Enterococcus* spp. - в пределах нормы, *V. cholerae* O1 и O139 – не обнаружены. Из 21 пробы, исследованной специалистами

лабораторий Ростовской области – в 12 пробах балластной воды находились *V. cholerae* non O1/non O139, балласт был взят от кораблей, прибывших из Румынии, России (Темрюк) и Турции (Карасу), *E. coli* и *Enterococcus* spp. находились в пределах нормы (Таблица 1).

В лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора было проведено изучение биологических свойств 12 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных в июле и августе 2018 года из судового водяного балласта, взятого с пяти различных судов и поступивших на исследование из ФКУЗ Северо-Кавказской противочумной станции.

Установлено, что все культуры *V. cholerae* non O1/non O139 были типичны по культурально- морфологическим и биохимическим свойствам, обладали оксидазной активностью, ферментировали глюкозу в среде Хью-Лейфсона в аэробных и анаэробных условиях с образованием кислоты без газа, сахарозу, маннозу, манит и не расщепляли арабинозу, инозит, декарбоксилировали лизин и орнитин, но не обладали дигидролазой аргинина, образовывали индол, не продуцировали сероводород, гемолизопозитивные, не содержали генов основных факторов патогенности (*ctxA* и *tcpA*).

В результате серологического типирования у 10 штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 (83,3 %) была установлена принадлежность к 10 серогруппам, среди которых преобладали O13 (шесть штаммов), O76, O2, O16, O60 (по одному штамму) (таблица 2) [2, 3].

Представители O2, O16 и O76 серогрупп ранее были изолированы из проб воды водоемов Ростовской области, вибрионы O13 и O60 серогрупп встречаются на данной территории впервые.

На следующем этапе было проведено генотипирование культур по 15 генам факторов патогенности/персистенции [4]. Полученные данные приведены в таблице 3.

Штаммы *V.cholerae* non O1/non O139, выделенные из судового водяного балласта, были представлены девятью кластерами, отличающимися между собой по наличию/отсутствию от двух до шести генов. У этих штаммов не были выявлены кластеры: RS1-, RS2-элементы (*rstA*); VPI-I (представленный геном токсин-корегулируемых пилей - *tcpA*); T3SS (*vesN2*, *vspD*); T6SS (*acd-rtxA*, *pbd-vgrG3*). Остальные гены были представлены в различных сочетаниях.

Таблица 1. Характеристика проб водного балласта судов, прибывших из-за рубежа в порты Российской Федерации

№ п/п	Название судна	Дата отбора пробы	Страна порт убытия	Тип судна	Параметры водного балласта			Результат обнаружения		
					Объем Тис. м ³	Процент смены балласта	Способ смены балласта	<i>V. cholerae</i> O1 и O139	<i>E. coli</i> КОЕ/100 мл	Энтеро-кокки КОЕ/100 мл
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Ленинградская область - порт прибытия - Усть-Луга										
1.	Giorgis	20.08.18	Великобритания,	сухогруз	23,039	98,3	прокачивание	0	менее 10	0
2.	Vera Rambow	01.08.18	Германия, Гамбург	контейнеровоз	3,965	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
3.	Seychelles Pioneer	05.08.18	Германия, Росток	танкер	12,349	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
4.	Rekiable	28.08.18	Германия, Гамбург	балкер	11,790	16,0	прокачивание	0	менее 10	0
5.	Delphinus	02.08.18	Нидерланды	сухогруз	31,843	18,0	прокачивание	0	менее 10	0
6.	Navigator	04.08.18	Нидерланды, Роттердам	танкер	9,211	33,2	прокачивание	0	менее 10	0
7.	Katrin	12.08.18	Польша, Гданьск	сухогруз	0,983	100,0	прокачивание	0	91	0
8.	Eira (Eisa)	06.08.18	Финляндия, Ураса	сухогруз	7272	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
9.	Navigator Yauza	06.08.18	Финляндия, Porvoo	танкер	7290	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
10.	Eira	26.08.18	Финляндия, Vaasza	сухогруз	7,264	37,0	прокачивание	0	менее 10	0
11.	Ina Lehmann	26.08.18	Финляндия, Kotka	сухогруз	7,152	62,0	прокачивание	0	менее 10	0
12.	NS Consul	13.08.18	Франция, Donges - Донгес	танкер	34,818	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
13	Silva	26.08.18	Швеция, Ваза	сухогруз	2,225	52,0	прокачивание	0	230	0

14.	Adele	13.08.18	Эстония, Пярну	сухогруз	0,997	100,0	прокачивание	0	менее 10	0
15.	Port Boteny	22.08.18	Эстония, Таллинн	сухогруз	7,135	60,0	прокачивание	0	менее 10	0
Калининградская область - порт прибытия – Калининград										
1.	Wilson Mersin	26.02.18	Уругвай, Новая Пальмира	нет данных	нет данных	нет данных	нет данных	отсутств	нет данных	нет данных
Ростовская область - порт прибытия – Таганрог										
1.	ВФ Танкер-20	17.08.18.	Греция, Теодора	танкер	нет данных	100,0	последов.		18	5
2.	ВФ Танкер-20	17.08.18.	Греция, Теодора	танкер	нет данных	100,0	последов.		18	5
3.	Карелис-52	30.07.18	Италия		нет данных	100,0	последов.	поп 01/0139	нет данных	нет данных
4.	Карелис-52	30.07.18	Италия			100,0	последов.	поп 01/0139		
5.	Баку Прайд	17.08.18	Россия, Азов			100,0	последов.		90	21
6.	Баку Прайд	17.08.18	Россия, Азов			100,0	последов.		108	24
7.	Капитан Иван	12.08.18.	Россия, Темрюк	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139	72	32
8.	Викулов	12.08.18.	Россия, Темрюк	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139	110	20
9.	Русич-10	05.08.18.	Румыния	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139	не обнар.	14
10.	Русич-10	05.08.18.	Румыния	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139	не обнар.	14
11.	Маэстро Ниязи	24.07.18.	Турция, Бандырма			100,0	последов.	поп 01/0139	200	17
12.	Маэстро Ниязи	24.07.18.	Турция			100,0	последов.	поп 01/0139	200	17
13.	Генерал Асланов	30.07.18	Турция			100,0	последов.	поп 01/0139		
14.	Генерал Асланов	30.07.18	Турция			100,0	последов.	поп 01/0139		
15.	Сормовский-19	02.09.18.	Турция, Карасу	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139		
16.	Сормовский-19	02.09.18.	Турция, Карасу	сухогруз		100,0	последов.	поп 01/0139		
17.	Тюмень-1	08.09.18.	Турция, Хопа			100,0	последов.			
18.	Тюмень-1	08.09.18.	Турция, Хопа			100,0	последов.			
19.	Тюмень-1	08.09.18.	Турция, Хопа			100,0	последов.			
20.	ВФ Танкер-2	02.09.18.	нейтральные воды	танкер		100,0	последов.			
21.	ВФ Танкер-2	02.09.18.	Черного моря	танкер		100,0	последов.			

Таблица 2. Результаты серотипирования штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, поступивших из ФКУЗ Северо-Кавказской ПЧС в 2018 г.

№ пп	Объект / Название судна	Дата выделения	№ штамма	Серогруппа
1	Балластные воды, теплоход «Ниязи», балластный танк № 1	27.07.18 г.	77	O13
2	Балластные воды, теплоход «Ниязи», балластный танк № 2	27.07.18 г.	78	O76
3	Балластные воды, теплоход «Генерал Асланов», балластный танк № 1	02.08.18 г.	85	O13
4	Балластные воды, теплоход «Генерал Асланов», балластный танк № 2	02.08.18 г.	86	O13
5	Балластные воды, теплоход «Генерал Асланов», балластный танк № 3	02.08.18 г.	87	O2
6	Балластные воды, теплоход «Генерал Асланов», балластный танк № 4	02.08.18 г.	88	O13
7	Балластные воды, теплоход «Русич-10», балластный танк № 1	09.08.18 г.	95	O13
8	Балластные воды, теплоход «Русич-10», балластный танк № 2	09.08.18 г.	96	O13
9	Балластные воды, теплоход «Капитан Иван Викулов», балластный танк № 1	16.08.18 г.	103	O16
10	Балластные воды, теплоход «Капитан Иван Викулов», балластный танк № 5	16.08.18 г.	104	O60
11	Балластные воды, теплоход «Сормовский 119», балластный танк № 4	06.09.18 г.	127	не типировался
12	Балластные воды, теплоход «Сормовский 119», балластный танк № 7	06.09.18 г.	128	не типировался

Таблица 3. Результаты генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп из судового балласта

№№ п/п	Кластер	<i>rstA</i>	<i>tcpAelt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-ygrG1</i>	<i>pbd-ygrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>	<i>mshA</i>	<i>stm/sto</i>	<i>chxA</i>
1	77	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
2	78	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
3	85	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-
4	86	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
5	87	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
6	95	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
7	88	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
8	96	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
9	103	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+
10	104	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
11	128	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
12	127	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-

Таким образом, впервые на территории двух субъектов Российской Федерации (Ленинградской и Калининградской области) проведены исследования балластных вод, в Ростовской области исследования продолжаются с 2010 года по настоящее время. Следует отметить, что из водяного балласта судов, прибывших в порты Ростовской области, выделяются нетоксигенные штаммы *V. cholerae* non O1/non O139, различные по серологическим свойствам, что соответствует данным о циркуляции в водных объектах окружающей среды большого числа клонов холерных вибрионов различных серогрупп. Циркуляция представителей большого количества сменяющих друг друга серогрупп объясняются межпопуляционными взаимодействиями в рамках вида *V. cholerae* и изменчивостью в процессе длительной персистенции в объектах окружающей среды. Появление штаммов других серогрупп на определенной территории не исключает вероятность новых заносов холерных вибрионов, в том числе с судовым балластом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 г. – СПб.: ЗАО ЦНИИМФ, 2005. – 120 с.
2. Григоренко, Л.В. Холерные вибрионы не O1/ неO 139, выделенные в ходе мониторинга водоемов и стоков Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год / Л.В. Григоренко, В.Д. Кругликов, А.Б. Мазрухо и др. // Проблемы особо опас. инф.- 2013. - № 4. - С.48-50.
3. Архангельская, И.В. Серологическая идентификация холерных вибрионов не O1 /не O139 серогрупп, выделенных в результате мониторинга водных экосистем Ростовской области с 1999 по 2016 годы / И.В. Архангельская, М.И. Ежова, В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. спец-тов Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2017. – Вып. 30. – С. 89-92.
4. Кругликов, В.Д. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой / В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая // Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы. – 2018. – № 2. – С. 28-35.

О КУЛЬТУРАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ КАЛМЫКИЯ С 2009 ПО 2018 ГОДЫ

Тюнникова В.Д., Оброткина Н.Ф., Каляева Т.Б., Бембеева Е.С.,
Цебекова М.Г., Кулик В.В., Бембинов А.Ю.

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

Эпидемиологический надзор за холерой включает в себя ежегодный микробиологический мониторинг водных объектов окружающей среды (ООС) с целью выявления холерных вибрионов и определения их эпидемической опасности. За последние 10 лет были зарегистрированы единичные случаи обнаружения в ООС токсигенных штаммов при отсутствии эпидосложнений. Результаты ежегодных мониторинговых исследований свидетельствуют о постоянном выделении из воды поверхностных водоемов значительного числа нетоксигенных штаммов холерных вибрионов прежде всего на территориях, которые по эпидемическим проявлениям относятся к территориям II типа, т.е. с повышенной степенью опасности к возникновению вспышек и возможностью водного распространения инфекции.

Республика Калмыкия по эпидемическим проявлениям холеры относится к территориям II типа. Мониторинг поверхностных водоемов направлен на поиск возбудителя холеры и осуществляется лабораториями особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Республике Калмыкия» (ООИ «ЦГиЭ в РК»), его филиалами в районах и бактериологической лабораторией ФКУЗ «Элистинская противочумная станция». Исследование проб воды в стационарных точках проводится с 1 июня по 30 сентября один раз в семь дней. Исследование материала от населения, госпитализированного в БУРК «Республиканский центр специализированных видов медицинской помощи», осуществляется бактериологической лабораторией этого стационара.

За последние 10 лет было изолировано 299 культур холерного вибриона O1 серогруппы из открытых водоемов (24 – в местах организованного водопользования, 273 – неорганизованного водопользования, две – из воды плавательного бассейна Дома детского творчества) и четыре культуры холерного вибриона не O1/не O139 серогруппы от населения.

Установлено, что 197 штаммов холерных вибрионов были выделены в лаборатории ООИ ФБУЗ «ЦГиЭ в РК» (три культуры в филиалах ФБУЗ «ЦГиЭ в РК») и 102 культуры в бактериологической лаборатории ФКУЗ «Элистинская противочумная станция». В результате изолированы культуры холерных вибрионов из стационарных точек трех водоемов в черте города (р.

Элистинка, пр. Кирзавода и пр. Колонский) и трех водоемов, расположенных в окрестностях города (пр. «Заячий», пр. Сайгачонок и пруд с. Вознесенка), а также два штамма из воды бассейна Детского дома творчества.

Наибольшее количество штаммов (117) изолировано из пр. «Заячий», который расположен на юго-востоке от г. Элисты и представляет собой перегороженную плотиной часть р. Элистинка, в которую впадают сточные воды частного сектора. Второе место по количеству изолированных штаммов (72) занимает р. Элистинка, которая пересекает г. Элисту с запада на восток. Третье место – пр. Колонский – 79 культур, из которых 16 штаммов было изолировано из воды пр. с. Вознесенка и по пять культур из пр. Кирзавода и Сайгачонок.

Выделенные культуры представляли собой подвижные полиморфные палочки, прямые и изогнутые, окрашенные по Граму отрицательно. 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, не обладали протеолитической активностью, имели декарбоксилазу лизина и орнитина и не имели дигидролазы аргинина. Выделенные штаммы агглютинировались до титра сывороткой диагностической холерной O1, что указывает на присутствие на поверхности клеток O1 антигена. При определении серовара четко прослеживается преимущественное отношение культур к серовару Огава, т. к. в 95,3 % случаев культуры агглютинировались одноименной сывороткой; 3,6 % относились к серовару Инаба; один штамм агглютинировался обеими сыворотками и поэтому был отнесен к серовару Гикошима и один штамм агглютинировался RO-сывороткой.

Чувствительность к диагностическим холерным монофагам представлена следующим образом: выделенные культуры лизировались холерным монофагом эльтор в различных его разведениях в 15,0 % случаев (и только 12 штаммов из этого количества лизировались фагом до его титра), классическим – 49,0 % выделенных культур и до диагностического разведения титра не лизировалась ни одна культура. Главным образом культуры лизировались цельным монофагом и лишь в небольшом количестве его разведениями. Проведено фаготипирование и определены следующие фаготипы: 13 фаготип – 7,7 % штаммов, 15 фаготип – 3,6% и 16 фаготип – 1,0 %, остальные штаммы (87,7 %) не типировались.

Изучена чувствительность выделенных культур холерных вибрионов к десяти различным антибиотикам: тетрациклинового ряда (доксциклин, тетрациклин), бета-лактаминового ряда (ампициллин), фторхинолового ряда (ципрофлоксацин, пefлоксацин, офлоксацин), цефалоспорином (цефотаксим), аминогликозидам (гентамицин), ансамицинам (рифампицин) и ацетидами (левомецетин). Чувствительность к доксциклину, ампициллину

и ципрофлоксацину установлена у 86,0 % штаммов; к тетрациклину и рифампицину 87,0-88,0 %; левомицетину и офлоксацину 94,0-96,0 % и цефотаксиму 62,0 % культур. В результате выявлено, что с каждым годом происходит нарастание количества антибиотикорезистентных изолятов. Если в 2013 г. таких штаммов было 7,7 %, то в 2014 г. уже 10,5 %, 2015 г. – 12,5%, 2016 г. – 32,0 %. В 2017 г. уже половина исследованных штаммов (50,0 %) была устойчива к исследованным антибактериальным препаратам. Кроме того, в 2016-2017 гг. были изолированы штаммы, одновременно устойчивые к двум и более (4-5) антибиотикам. Настораживает увеличение в данные годы и количества изолятов, резистентных к антибиотикам нового поколения – цефалоспоринам. В 2016 г. таких штаммов выделено 5,0 %, а в 2017 г. уже 14,7 %.

Определение продукции термолabileного гемолизина в пробе Грейга показало, что все штаммы продуцировали гемолизин.

Одна из основных задач, стоящих перед бактериологами при выделении *V. cholerae* O1, состоит в определении их эпидемической опасности. Поскольку ключевыми маркерами эпидемически опасных штаммов являются гены *ctxA* и *tcpA*, соответственно кодирующие А-субъединицу холерного токсина и определяющие биосинтез основной субъединицы токсинкодирующих пилей у возбудителя холеры, то именно фрагменты этих генов тестировали в геноме выделенные штаммы методом ПЦР. В результате у выделенных штаммов фрагменты гена *ctxA* не выявили ни в одном случае, в шести случаях был выявлен ген *tcpA*. Это означает, что все штаммы, циркулирующие в открытых водоемах Республики Калмыкии, были нетоксигенными.

Все описанные штаммы были отправлены и подтверждены в Референс-центре по мониторингу холеры – ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Часть штаммов, изолированных в 2016 г., была изучена во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. По данным кластерного анализа они оказались наиболее близки штаммам холерных вибрионов, выделенным в г. Ростове-на-Дону в 2014 г. и 2016 г., а также были близки к штаммам, ранее выделенным в Республике Калмыкия.

Проведенный эпидемиологический мониторинг вибриофлоры открытых водоемов Республики Калмыкия показал, что основную роль в циркуляции и распространении холерных вибрионов на территории Республики играет водный фактор. По всей вероятности, значение имеют следующие факторы: неглубокие и пресноводные водоемы, загрязненные сточными водами, pH от 7,9 до 8,2, в летние месяцы аномально высокие показатели температуры воздуха (до +42° С в тени) и воды (до +30° С). Все это способствует длительному выделению вибрионов биовара Эль Тор из воды открытых водоемов.

Проведенный анализ вибриофлоры открытых водоемов Республики Калмыкия показал, что циркуляция нетоксигенных штаммов *V. cholerae* подтверждает наличие в воде открытых водоемов условий, оптимальных для поддержания жизнеспособности и размножения вирулентных штаммов при возможном их завозе с неблагополучных по холере территорий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информация «Об эпидемиологической ситуации по холере с 2009 по 2018 гг. и прогнозе заболеваемости на 2019 год», Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.
2. Каляева, Т.Б. О культурах холерных вибрионов, выделенных на территории Республики Калмыкия с 2012 по 2016 годы / Т.Б. Каляева, Н.Ф. Оброткина, В.Д. Тюнникова // Холера и патогенные для человека вибрионы. – 2017. – Вып. 30. – С. 83-86.

СВОЙСТВА ЗАБАЙКАЛЬСКИХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, ВЫДЕЛЕННЫХ ЗА ПОСЛЕДНИЕ ПЯТЬ ЛЕТ

Мошкина А.А.

ФКУЗ «Читинская ПЧС» Роспотребнадзора, Россия, г. Чита

Забайкалье – историко-географическая область, включающая в себя два субъекта РФ – Забайкальский край и Республику Бурятия. Приграничное расположение Забайкалья определяет особую важность в организации мероприятий по санитарной охране территории РФ от заноса и распространения особо опасных инфекционных заболеваний, в том числе холеры из Китая и Монголии.

ФКУЗ «Читинская ПЧС» Роспотребнадзора осуществляет мониторинг поверхностных водоемов на наличие холерных вибрионов из одиннадцати открытых водоемов Забайкалья: рек Аргунь, Чита, Борзя, Чикой, Киранка, Селенга, Кяхтинка, озер Кенон, Харанор, Цаган-Нор, Киран.

Отбор проб воды ежегодно осуществляется в июле и августе месяце из 36 стационарных точек в границах городов Чита, Борзя, Кяхта, с. Абагайтуй Забайкальского района, пос. Шерловая Гора Борзинского района, п. Наушки и п. Заготзерно Кяхтинского района. Точки отбора проб выбраны с учетом характера использования водоемов, количества и места сброса сточных вод, результатов санитарно-микробиологических исследований воды. Наиболее важные мониторинговые точки расположены в приграничных

административных районах – Забайкальском Забайкальского края и Кяхтинском Республики Бурятия. Именно здесь с сопредельных территорий Монголии и Китая проходят основные транспортные и пассажиропотоки, и именно отсюда возможен занос возбудителя на территорию Российской Федерации трансграничными реками Аргунь, Чикой и Селенга.

За сезон с 2014 по 2018 годы из объектов окружающей среды (вода, иловые отложения) отобрано и исследовано более 4 тысяч проб, в которых обнаружены как холерные вибрионы *non01/nonO139* серогрупп, так и холерные вибрионы O1 серогруппы.

Всего за 5 лет нами было изолировано 42 штамма холерного вириона O1 серогруппы из рек Борзя (31 штамм), Чита (4 штамма), Селенга (1 штамм), оз. Харанор (4 штамма), оз. Кенон (2 штамма), все относятся к серовару Инаба. В 90,5% случаев культуры изолированы из проб, взятых в местах рекреационного водопользования, и только 9,5% приходятся на места сброса хозяйственно-бытовых сточных вод.

Большинство культур типичны по комплексу таксономических признаков, агглютинируются O1 холерной сывороткой и сывороткой Инаба до титра, дают специфическое свечение в реакции иммунофлуоресценции, не чувствительны к фагу C, но лизируются фагом эльтор, лизируются фагами ХДФ-3, ХДФ-4. Изолированные культуры не содержат генов *ctxA* и *tcpA* при тестировании в ПЦР, являются эпидемически неопасными.

Следует отметить, что встречаются атипичные штаммы с неустойчивыми свойствами. Так, при первичной изоляции культуры некоторые штаммы обладают агглютинабельностью до титра диагностической холерной сыворотки, лизируются фагом эльтор и очень слабо – цельным классическим. При последующих пересевах агглютинационный титр и фаголизабельные свойства резко снижаются, вследствие чего они приравняются к холерным вибрионам *non01/ non O139* серогруппы. В ряде случаев наблюдается диссоциация культур, появляются R колонии, поэтому некоторые культуры дают слабую агглютинацию с RO сывороткой в титрах 1:100, 1:200. Зачастую такие культуры через 6-12 месяцев вообще теряют способность агглютинироваться холерной O1 диагностической сывороткой. Нестабильны проявления в гемолитических свойствах атипичных штаммов. Так, наблюдается частичный лизис эритроцитов барана или его отсутствие.

В ряде случаев встречаются штаммы с нечеткими результатами по ферментации маннозы и крахмала. Как правило, у таких штаммов кислотообразование прослеживается через 3-6 часов после посева, затем питательная среда щелочится, что затрудняет определение группы по Хейбергу.

Нами так же отмечается неоднородность выделенных культур, где, наряду с типичными клонами культуры, выделяются атипичные, а порой и

неагглютинирующиеся холерными диагностическими O1, O139 сыворотками, клоны.

Все выделенные штаммы направлялись в Центр индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности в Сибирском федеральном округе (ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) и Референс-центр по мониторингу холеры (ФКУЗ Ростовский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора), где были подтверждены и дополнительно изучены. Так, было установлено, что большинство выделенных штаммов входят в один генотипический кластер, что может свидетельствовать об их длительном сохранении в отдельных экологических нишах [1].

Таким образом, холерные вибрионы O1 серогруппы, выделенные в Забайкалье за анализируемый период, имеют нестабильные и нетипичные свойства, что свидетельствует об их эволюционной изменчивости, в частности, приобретению адаптационных механизмов для длительного существования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Пономарева А.С., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю. и др. MLVA-типирование штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, выделенных на территории Забайкальского края в период седьмой пандемии // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. - № 3 (94). – С. 50-57.

АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *VIBRIO CHOLERAЕ* EL TOR В СОСТАВЕ ПОЛИМИКРОБНОЙ БИОПЛЕНКИ

Селянская Н.А., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.

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

Проведенные нами ранее исследования показали повышение антибиотикорезистентности холерных вибрионов в составе образованных ими мономикробных биопленок в сравнении с планктонными культурами [1]. Однако в естественных условиях обитания холерные вибрионы вступают в конкурентные взаимодействия с различными видами бактерий. Токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 El при совместном культивировании с нетоксигенными *V. cholerae* O1 El Tor и штаммами *V. cholerae* O1 Classical, a

также другими представителями семейства *Enterobacteriaceae* способны образовывать полимикробные биопленки [2, 3]. По литературным данным, чувствительность к антибиотикам одного микроба может измениться в присутствии других видов микроорганизмов [4].

Поскольку данные о чувствительности к антибактериальным препаратам холерных вибрионов в составе полимикробной биопленки на сегодняшний день отсутствуют, целью настоящей работы явилась оценка эффективности антибактериальных препаратов в отношении клеток *V. cholerae* O1 El Tor в составе полимикробной биопленки.

Материалы и методы. В работе использованы штаммы, полученные из Музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: *V. cholerae* O1 Classical (ctx⁺ tcp⁺) №№569 В, 1392, *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁺ tcp⁺) №№81, P-5879 и *V. cholerae* O1 El Tor (ctx⁻ tcp⁻) №20000. В качестве гетерологичных бактерий при получении полимикробных биопленок использовали штаммы *Klebsiella* spp. и *V. cholerae* nonO1/nonO139 №30 (ctx⁻ tcp⁻).

Моделирование моно- и полимикробных биопленок *in vitro* проводили на фрагментах экзоскелета хитинового панциря широкопалого речного рака *Astacus astacus*, полученных по авторскому методу [5], которые помещали во флаконы с речной автоклавированной водой (50 мл), контаминированные взвесью 10⁴/мл микробных клеток бактерий и выдерживали при комнатной температуре (25±2°C) до 20 суток для получения зрелых биопленок.

Для определения антибиотикочувствительности пластинки хитина трехкратно промывали в физиологическом растворе и переносили в пенициллиновые флаконы, содержащие двукратные разведения антибактериальных препаратов в жидкой питательной среде (бульон Хоттингера, pH 7,7). В контрольные пробы с биопленкой антибактериальный препарат не добавляли. Через 24 ч инкубирования в термостате (37°C) делали отпечатки биопленок на пластинки с агаром Хоттингера (pH 7,7) и высев по 0,1 мл из планктонной культуры. Результат учитывали через 24 часа, определяя минимальные подавляющие концентрации (МПК) препаратов по наличию или отсутствию роста бактериальных клеток. Идентификацию культур в мазках-отпечатках биопленок производили по характерной морфологии колоний, используя тест на окислазу и реакцию агглютинации на стекле с O1-холерной сывороткой. Отношение штаммов к разряду чувствительных, устойчивых либо с промежуточной устойчивостью проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [6] и МУК 4.2.1890-04 [7].

Результаты и обсуждение. При сравнительной оценке антибиотикочувствительности установлено, что планктонные культуры *V. cholerae* O1 Classical 569 В, *V. cholerae* O1 Classical 1392, *V. cholerae* O1 El Tor P-5879, *V. cholerae* nonO1/nonO139 30 обладали чувствительностью ко всем антибактериальным препаратам, взятым в исследование (таблица 1).

Таблица 1. Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении планктонных, мономикробных био пленочных культур

№ п/п	Штамм микроорганизма	Антибактериальный препарат								
		Д	Т	Л	НК	С	А	Р	Ф	Т/С
Значения МПК для планктонных культур, мг/л										
1	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 569 B	0,25	0,5	1	1	4	4	1	4	2/10
2	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 1392	0,25	0,5	2	1	8	4	1	4	2/10
3	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879	0,25	0,5	1	1	4	4	1	4	2/10
4	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81	0,25	0,5	4	64	64	4	4	32	16/80
5	<i>V.cholerae</i> El Tor 20000	0,5	0,5	4	1	4	4	2	16	16/80
6	<i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	0,5	1	4	4	8	4	2	8	4/20
7	<i>Klebsiella</i> spp.	0,5	0,5	2	2	8	4	2	16	16/80
Значения МПК для био пленочных культур, мг/л										
8	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 569 B	32	16	32	512	32	32	16	64	1024/5120
9	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 1392	32	64	32	256	32	16	16	64	128/640
10	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879	64	16	256	512	128	128	64	512	1024/5120
11	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81	32	16	128	1024	256	128	128	512	1024/5120
12	<i>V.cholerae</i> El Tor 20000	16	32	128	512	32	16	128	64	1024/5120
13	<i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	8	32	32	64	32	16	16	64	1024/5120
14	<i>Klebsiella</i> spp.	32	16	256	1024	256	256	128	64	1024/5120

Примечание: Д – доксицилин, Т – тетрацилин, Л – левомецетин, НК – налидиксовая кислота, С – стрептомицин, А – ампициллин, Р – рифампицин, Ф – фуразолидон, Т/С – триметоприм/сульфаметоксазол.

Штаммы *V.cholerae* El Tor 20000 и *Klebsiella* spp. в планктонной форме были устойчивы к триметоприму/сульфаметоксазолу и фуразолидону, а *V.cholerae* O1 El Tor 81 еще и к налидиксовой кислоте и стрептомицину (таблица 1).

В отношении мономикробных био пленок этих штаммов наблюдалось повышение МПК всех антибактериальных препаратов до значений, соответствующих устойчивым (таблица 1).

Следующим этапом было исследование действия различных антибактериальных препаратов на полимикробные био пленки. Идентификация культур в мазках-отпечатках (см. материалы и методы) показала, что био пленки образованы двумя видами бактерий: *V.cholerae* O1 и *Klebsiella* spp., и *V.cholerae* O1 и *V.cholerae* nonO1/nonO139 в соотношениях 1:1 – 1:3.

Определение антибиотикочувствительности полимикробных био пленок показало, что в большинстве случаев значения МПК антибактериальных препаратов соответствовали их значениям для более устойчивого микроорганизма, находящегося в составе био пленки (таблица 2).

Таблица 2. Значения МПК антибактериальных препаратов в отношении полимикробных био пленочных культур

№ п/п	Штамм микроорганизма	Антибактериальный препарат								
		Д	Т	Л	НК	С	А	Р	Ф	Т/С
1	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 569 B+ <i>Klebsiella</i> spp.	32	64	32	512	32	32	128	64	1024/ 5120
2	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81+ <i>Klebsiella</i> spp.	32	16	256	1024	256	256	128	102 4	1024/ 5120
3	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879+ <i>Klebsiella</i> spp.	64	32	256	512	256	256	128	512	1024/ 5120
4	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 20000+ <i>Klebsiella</i> spp.	32	32	128	512	64	256	128	64	1024/ 5120
5	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 569 B+ <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	64	256	256	32	128	128	64	1024/ 5120
6	<i>V.cholerae</i> O1 Classical 1392+ <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	8	16	512	32	256	128	64	1024/ 5120
7	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 81+ <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	32	256	1024	256	256	128	64	1024/ 5120
8	<i>V.cholerae</i> O1 El Tor P-5879+ <i>V.cholerae</i> nonO1/nonO139 30	32	32	256	512	32	16	16	64	1024/ 5120

Примечание: то же, что к табл. 1.

По данным литературы, в полимикробных био пленках бактерии, более устойчивые к антибиотикам, защищают популяцию восприимчивых бактерий [8]. Однако, в сообществе *V.cholerae* O1 Classical 569 B + *Klebsiella* spp. увеличилась устойчивость культур к тетрациклину в 4-8 раз, а МПК левомицетина, ампициллина и стрептомицина оказалась на уровне значений, характерных для мономикробной био пленки, образованной штаммом *V.cholerae* O1 Classical 569, хотя био пленка *Klebsiella* spp. характеризовалась более высоким уровнем устойчивости к этим антибактериальным препаратам. Аналогично, для био пленки, образованной штаммами *V. cholerae* O1 El Tor P-5879 и *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 значения МПК стрептомицина, ампициллина, рифампицина и фуразолидона также соответствовали более низким значениям этих антибактериальных препаратов для культур *V. cholerae* nonO1/nonO139 30 в составе мономикробного сообщества.

При формировании био пленки токсигенным классическим штаммом *V.cholerae* O1 Classical 1392 совместно с *V. cholerae* nonO1/nonO139 30 в 8-32 раза, в сравнении со значениями для мономикробных био пленок этих культур, возросла устойчивость к ампициллину и рифампицину, а в био пленке *V. cholerae* O1 Classical 569 B + *V.cholerae* nonO1/nonO139 30 – еще и к левомицетину.

Таким образом, в нашем исследовании эффективность антибактериальных препаратов в составе полимикробных сообществ оказалась разной и зависела от вида бактерий, образующих био пленку.

Одним из механизмов, благодаря которым повышается антибиотикоустойчивость бактерий в биопленке, является горизонтальный перенос генов [9]. В биопленках *V. cholerae* системы секреции VI типа обеспечивают альтернативный механизм горизонтального переноса генов. Эти системы секреции требуют межклеточного контакта, что является еще одним примером того, почему близость и высокая плотность клеток, присущие биопленкам, важны для горизонтального переноса генов. Интересно, что *V. cholerae* использует свою систему секреции VI типа для получения ДНК других клеток путем их лизиса и захвата высвобождаемой ДНК с помощью механизмов компетентности и/или естественной трансформации [10]. Кроме того, состав матрикса полимикробной биопленки сильно варьирует в зависимости от вида бактерий и условий окружающей среды, и соответственно, может обеспечить более сильную защиту против антимикробных средств [11]. Другой механизм состоит в способности бактерий в рамках полимикробной биопленки синтезировать различные вещества, помогающие выжить им в агрессивной среде и обеспечивающие условия, способствующие выживанию других членов биопленки [12].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селянская Н.А., Титова С.В., Головин С.А. и др. Действие антибактериальных препаратов на биопленки холерных вибрионов ЭльТор // ЖМЭИ. - 2017. - №2. - С.8-15.
2. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С. и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // ЗНИСО. - 2017. - №3 (288). - С.51-54.
3. Водопьянов С.О., Веркина Л.М., Водопьянов А.С. и др. Анализ внутривидовой конкуренции в биопленке *Vibrio cholerae* классического и эльтор биоваров с помощью Indel-маркеров // Молекулярная диагностика. - 2017. -Том 1. - С. 300-301.
4. [Burmølle M.](#), [Webb J. S.](#), [Rao D.](#) et al. Enhanced Biofilm Formation and Increased Resistance to Antimicrobial Agents and Bacterial Invasion Are Caused by Synergistic Interactions in Multispecies Biofilms // [Appl Environ Microbiol.](#) 2006. – Vol.72, №6. - P. 3916–3923.
5. Способ моделирования биопленок, формируемых *V.cholerae* O1 серогрупп на поверхности хитина: Патент РФ 2018103604 от 6.03.2019.
6. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сепсис, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.2495-09. – М., 2009.
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. –

М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.

8. Harriott M.M., Noverr M.C. *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* form polymicrobial biofilms: effects on antimicrobial resistance // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2009. – Vol. 53(9). – P. 3914-22.

9. Mah T.-F. Biofilm-specific antibiotic resistance // *Future Microbiol.* – 2012. – Vol.7. – P.1061–1072.

10. Borgeaud, S., Metzger L.C., Scignari T., Blokesch M. The type VI secretion system of *Vibrio cholerae* fosters horizontal gene transfer // *Science.* – 2015. – Vol.347. – P.63–67.

11. Flemming H.C., Wingender J. The biofilm matrix // *Nat Rev Microbiol.* – 2010. – Vol.8, №9. – P. 623-33.

12. Bradshaw D.J., Marsh P.D., Watson G.K., Allison C. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community // *Lett. Appl. Microbiol.* – 1997. – Vol.25. – P.385–387.

ГИС: ИНТЕРНЕТ-ПЛАТФОРМА МОНИТОРИНГА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ

Селянская Н.А., Тришина А.В., Березняк Е.А., Егиазарян Л.А.,
Симонова И.Р., Водопьянов А.С.

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

Сообщения о циркуляции устойчивых к антимикробным препаратам штаммов *Vibrio cholerae* в различных странах, завозы холеры с выделением возбудителей от больных и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации [1, 2] свидетельствуют о необходимости проведения мониторинга антимикробной резистентности в рамках эпидемиологического надзора за холерой с целью получения информации о распространении, характере и динамике резистентности в конкретный период времени на данной территории, что необходимо для разработки и внедрения более эффективных подходов к лечению, сдерживанию появления и распространения антимикробной резистентности на локальном, региональном, национальном и международном уровнях.

Развитие IT-технологий позволило создать «интерактивные» системы мониторинга антибиотикорезистентности, такие как EARS-Net, CDDEP ResistanceMap, SGSS, NNIS system, ATLAS, SMART, WHONET, в которых

заложена возможность интерактивного анализа и/или представления данных [3-9]. В Российской Федерации разработан интернет-ресурс AMRmap (map.antibiotic.ru) по мониторингу антибиотикорезистентности клинически значимых микроорганизмов [10].

Представление информации в понятной и удобной для пользователя форме является одной из основных функций любой системы обработки данных. Компьютерные географические информационные системы (ГИС), благодаря возможности комбинировать пространственные и эпидемиологические данные, способны визуализировать обработанную информацию в виде различных карт, картодиаграмм, трехмерных и анимированных изображений, позволяя пользователю делать быстрые интерактивные запросы о свойствах того или иного объекта. Создание онлайн-версий ГИС, размещаемых на интернет-сайте, делает их доступными широкому кругу пользователей.

Цель настоящей работы – разработка интегративной онлайн-пополняемой и обновляемой ГИС, содержащей информацию об антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных на территории Российской Федерации.

Материалы и методы. В работе использовано 285 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor различной эпидзначимости, выделенных от людей и из водных объектов на территории Российской Федерации в период с 2005 по 2016 гг., хранящихся в Музее живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт. Чувствительность / устойчивость штаммов к 22 антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [11].

Разработку интернет-версии ГИС проводили с использованием языков программирования HTML, JavaScript и PHP. В качестве ядра использовали свободнораспространяемую библиотеку Leaflet, написанную на языке JavaScript. В качестве картографических данных использовали карты, полученные от корпорации Ростелеком (Россия) и сообщества OpenStreetmap.

Результаты исследования. Результаты изучения антибиотикочувствительности штаммов *V. cholerae* были внесены в электронные таблицы, которые послужили основой для создания авторской пополняемой базы данных ГИС «Антибиотикорезистентность холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации» [12], интегрированной в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора (http://gis.antiplague.ru/s_vibrio_antibiotic.php).

Информация, представленная в ГИС, включает: род и вид микроорганизма (*V. cholerae* O1 El Tor), наличие либо отсутствие генов *ctx* и *tcp*, год выделения, источник выделения, наименование территории, на

которой были изолированы культуры, №№ штаммов, присвоенные в Музее живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, чувствительность либо устойчивость к антибактериальным препаратам (тетрацилин, доксицилин, левомицетин, рифампицин, полимиксин, ампициллин, цефтриаксон, цефотаксим, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, пefлоксацин, офлоксацин, норфлоксацин, левофлоксацин, ломефлоксацин, моксифлоксацин, триметоприм/ сульфаметоксазол, фуразолидон, стрептомицин, гентамицин, канамицин, амикацин).

Главная страница ГИС представляет собой интерактивную карту с обозначенными на ней местами выделения штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. Несколько штаммов, сгруппированных вместе, отображаются кружком, при этом в центре указывается, сколько именно штаммов входит в эту группу. Работа с ГИС позволяет выбирать для отображения «административные границы регионов Российской Федерации», либо «Ростовскую область».

ГИС содержит параметры для поиска штаммов, которые включают год выделения (либо несколько лет), название антибактериальных препаратов, резистентность к которым интересует пользователя. После указания необходимых параметров на экране появятся штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, резистентные к данному антибактериальному препарату, выделенные в определенный период времени. Например, при выборе для поиска «2005-2016 гг.», «триметоприм / сульфаметоксазол», «фуразолидон» на экране появляются только штаммы, соответствующие выбранным параметрам. Указанными свойствами обладают штаммы, выделенные в Краснодарском и Ставропольском краях, в республиках Крым и Калмыкия. А наибольшее количество таких штаммов было изолировано в Ростовской области (73 штамма). Рассматривая характеристики каждого штамма более детально, можно определить число культур, изолированных от людей и из водных объектов, а также наличие или отсутствие в них генов *ctx* и *tcp*.

Заключение. Разработанная ГИС предназначена для сбора и анализа информации об антибиотикорезистентности *V. cholerae* с целью оптимизации мониторинговых исследований. Она позволяет отслеживать динамику антибиотикоустойчивости штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, учитывая время, объект выделения штаммов, территорию, а также устойчивость к тому или иному антибактериальному препарату, определять сходства и различия штаммов по заданным параметрам. Информация, представленная в ГИС, может быть полезна при прогнозировании эффективности этиотропной терапии, а также в эпиднадзоре за холерой в России. Кроме того, имеется возможность ее пополнения за счет включения новых охарактеризованных штаммов *V. cholerae*. Создание и развитие подобных специализированных интернет-ресурсов открывает новые возможности для организации комплексного оперативного мониторинга состояния антибиотикорезистентности различных возбудителей на территории Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Селянская Н.А., Тришина А.В., Веркина Л.М. и др. Чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов холерных вибрионов Эль Тор, выделенных из объектов окружающей среды в России 2005-2012 гг. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2014. - № 5. – С.82-86
2. Титова С.В., Кругликов В.Д., Ежова М.И. и др. Анализ динамики выделения и биологических свойств штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных из водных объектов на территории Ростовской области в 2003-2014 гг. // ЗНиСО. – 2015. - № 2. – С. 39-41.
3. Зуева Л.П., Поляк М.С., Кафтырева Л.А. и др. Эпидемиологический мониторинг антибиотикорезистентности микроорганизмов с использованием компьютерной программы WHONET: Методические рекомендации. – М., 2004. – 69 с.
4. CDC. Antibiotic Resistance Patient Safety Atlas – Data on Antibiotic-Resistant Healthcare-Associated Infections. Available at: <http://gis.cdc.gov/grasp/PSA/MapView.html>. Accessed: 09.12.2016.
5. CDDEP. ResistanceMap. Antibiotic Resistance. Available at: <https://resistancemap.cddep.org/AntibioticResistance.php>. Accessed: 12.12.2015.
6. ECDC. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARSNet). Available at: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobialresistance-and-consumption/antimicrobial_resistance/EARS-Net/Pages/EARS-Net.aspx. Accessed: 11.07.2016.
7. MSD. SMART: Study For Monitoring Antimicrobial Resistance Trends. Available at: <http://www.globalSMARTsite.com>. Accessed: 11.07.2016.
8. Pfizer. ATLAS: Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance. Available at: <https://atlas-surveillance.com>. Accessed: 01.05.2017.
9. Public Health England. Second Generation Surveillance System (SGSS). Available at: <https://sgss.phe.org.uk/Security/Register>. Accessed: 09.12.2016.
10. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А. и др. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. // Клиническая микробиология и антибактериальная химиотерапия. - 2017. - Том 19. - №2. - С.84-90.
11. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сепсис, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам 4.2.2495-09. – М., 2009. – 59 с.

12. Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2017621246. Геоинформационная система. Антибиотикорезистентность холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации (2005-2016 гг.). – 2017.

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ
ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП,
ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ
ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ**

Тришина А.В., Березняк Е.А., Архангельская И.В., Симонова И.Р.,
Ренгач М.В.

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

Штаммы холерных вибрионов неО1/неО139 являются автохтонными обитателями водной среды и имеют такую же экологическую нишу, что и патогенные вибрионы. В последнее десятилетие от 5 до 10% всех случаев заболеваний в год вызываются штаммами *V. cholerae nonO1/nonO139* и связаны с употреблением загрязненных морепродуктов [1, 2]. Во всем мире регистрируются вспышки заболеваний, связанные с *V. cholerae nonO1/nonO139*, которые могут вызывать кишечные инфекции, такие как гастроэнтерит и холероподобная диарея, а также внекишечные инфекции, такие как раневые инфекции, средний отит, наружный отит и бактериемия, которые иногда могут вызывать смерть больного, что подчеркивает их клиническую значимость [3, 4].

Водоёмы, располагаемые в черте крупных городов, характеризуются активным рекреационным использованием. Интенсивное микробиологическое загрязнение водоёмов в результате сброса сточных вод делает их потенциальным биореактором для генетического обмена между бактериями. Взаимодействие устойчивых к АБП бактерий с автохтонной микрофлорой способствует селекции резистентных штаммов и преобладанию устойчивых бактерий, приводящему к глобальному нарушению экосистемы. Как сообщалось ранее Бакеро и др., «Изучение устойчивости к антибиотикам у местных водных организмов является важным, поскольку оно может указывать на степень изменения водных экосистем в результате действий человека» [5]. В настоящее время во многих

работах отмечено нарастание числа резистентных и полирезистентных штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп [6,7].

Широкое распространение штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139*, устойчивых к антимикробным соединениям, вариабельность и непредсказуемость спектра антибиотикоустойчивости, вызывают интерес и требуют проведения комплексных региональных исследований.

Цель исследования: оценить состояние антимикробной резистентности штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139* в водных объектах г. Ростова-на-Дону в 2018 г.

Материалы и методы. Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь 2018 г. в водоемах города Ростова-на-Дону. Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2870-11. [8]. Серологическую идентификацию изолированных штаммов *V. cholerae nonO1/nonO139* осуществляли с помощью набора сывороток диагностических холерных неO1/неO139 серогрупп моноспецифических кроличьих против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп в реакции слайд – агглютинации [9].

Чувствительность к антибактериальным препаратам (АБП) определяли методом серийных разведений на агаре Мюллера-Хинтона pH (7,3±0,2) HiMEDIA (Индия). Интерпретацию результатов определения чувствительности культур вибрионов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09. Для определения чувствительности/устойчивости *V. cholerae nonO1/nonO139* использовали препараты, рекомендованные для экстренной профилактики и лечения холеры. Препараты первого ряда: доксициклин, ципрофлоксацин, ко-тримаксазол, фуразолидон, гентамицин, налидиксовая кислота. Препараты второго ряда: левомицетин, ампициллин, цефтриаксон.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel».

Результаты. Было выделено и проанализировано 90 штаммов *V.cholerae non O1/ nonO139*.

Все изолированные штаммы были типичны по культурально-морфологическим свойствам, обладали оксидазной активностью, ферментировали глюкозу в среде Хью-Лейфсона в аэробных и анаэробных условиях с образованием кислоты без газа, сахарозу, маннозу, манит и не расщепляли арабинозу, инозит, декарбоксилировали лизин и орнитин, а также не обладали дигидролазой аргинина, образовывали индол, не продуцировали сероводород. Гемолизопозитивны. При серотипировании *V.cholerae nonO1/nonO139* установлено, что в изучаемый период в водоемах г. Ростова-на-Дону преобладали штаммы *V. cholerae* O76 серогруппы.

Анализ чувствительности/устойчивости штаммов *V. cholerae non O1/ non O139* к 11 АБП показал, что чувствительными ко всем, используемым в

работе АБП, были 2,2 % изолятов. Доля монорезистентных штаммов составляла 31,1 %. Полирезистентные (устойчивые к двум и более АБП) штаммы *V. cholerae non O1/non O139* встречались в 66,6 % случаев.

К гентамицину, доксициклину и меропенему резистентных штаммов не обнаружено. В группе β-лактамов наибольшее число резистентных штаммов регистрировали к ампициллину (41%). К цефтриаксону устойчивы оказались только 3,3% штаммов, к имипенему - 2,2%. В группе хинолонов 13,3 % штаммов были резистентны к налидиксовой кислоте, к ципрофлоксацину устойчивыми оказались 1,1 % изолятов. Среди АБП других групп устойчивость штаммов *V. cholerae non O1/ non O139* регистрировали к ко-тримоксазолу - 40%, фуразолидону – 97,7 %, левомицитину - 4,4%.

Таким образом, в 2018 г. показано присутствие и распространение среди вибриофлоры открытых водоемов штаммов *V. cholerae non O1/non O139* с множественной антибиотикорезистентностью. Наиболее высокая устойчивость штаммов холерных вибрионов регистрировалась к ампициллину, фуразолидону и ко-тримоксазолу. Этот факт следует учитывать, поскольку штаммы *V. cholerae nonO1/nonO139* могут служить резервуаром генов антибиотикорезистентности для вибрионов эпидемически значимых серогрупп.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newton A., Kendall M., Vugia D.J. et al. Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems // Clin Infect Dis 2012.54: p.391–395. doi:10.1093/cid/cis243.
2. Ottaviani D., Leoni F., Rocchegiani E. et al. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. Int J Food Microbiol. - 2009. – Vol. 132. - P. 47–53. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2009.03.014.
3. Schirmeister F., Dieckmann R., Bechlars S. et al. Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae non-O1, non-O139* isolated from German and Austrian patients // Eur J Clin Microbiol Infect Dis. – 2014. – Vol. 33. – P. 767–778. doi:10.1007/s10096-013-2011-9.
4. Trubiano J.A., Lee J.Y.H., Valcanis M. et al. Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in an Australian population // Intern. Med. J. - 2014. – Vol. 44. - P. 508–511. doi:10.1111/imj.12409.
5. Baquero F., Martínez J.L., Cantón R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments // Curr. Opin. Biotechnol. - 2008. - №19/ - P. 260–265. doi:10.1016/j.copbio.2008.05.006.
6. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций:

современная ситуация в России и в мире // Пробл. особо опасных инф. – 2016. - № 2. - С. 14–23.

7. Утепова И.Б., Сагиев З.А., Алыбаев С.Д. и др. Характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Казахстана // АСТА BIOMEDICA SCIENTIFICA. – 2017. - Том 2, № 5. - Часть 1. - С. 100-105.

8. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2870-11. - М.; 2011.

9. Авдеева, Е.П. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп: Автореф. Дис. ... канд. мед. наук по специальности 03.00.07 / Авдеева Елена Петровна. – Ростов-на-Дону, 2006. – 22 с.

О РЕЗИСТЕНТНОСТИ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* ПРИ ХИМИЧЕСКОЙ ДЕКОНТАМИНАЦИИ БАЛЛАСТНЫХ ВОД ДЕЗСРЕДСТВОМ ИЗ ГРУППЫ ПОЛИГУАНИДИНОВ

Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Сергиенко О.В., Кононенко А.А.,
Иванова Н.Г., Воловикова С.В.

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

В настоящее время развитие транспортного морского сообщения связано с риском завоза и распространения чужеродных видов зоопланктона и микроорганизмов балластными водами судов, что ведет к нарушению экологического равновесия различных акваторий и возможности возникновения болезней, передаваемых водным путем среди населения портовых городов, в частности, холеры. В связи с этим, Международной морской организацией в 2004 году принята Международная конвенция по контролю и управлению судовыми балластными водами и осадками (далее – Конвенция), которой определен стандарт качества сбрасываемых балластных вод [1].

В соответствии со стандартом качества балластных вод к индикаторным микробам относят токсигенный холерный вибрион О1 и О139 серогрупп в количестве менее одной колониеобразующей единицы (КОЕ) на 100 мл или менее 1 КОЕ на один грамм сырого веса образцов зоопланктона;

кишечную палочку – менее 250 КОЕ на 100 мл и кишечные энтерококки – менее 100 КОЕ на 100 мл.

Конвенция предписывает, что все суда, совершающие международные рейсы и имеющие балластные танки, должны быть снабжены специальными системами для обеззараживания судовых балластных вод различными методами, обеспечивающими требуемую минимальную концентрацию жизнеспособных организмов и удаление осадков.

Из всех методов наиболее доступным является химический, поэтому особый научный интерес представляет подбор химических веществ для обработки водяного балласта. Эти вещества должны обладать высокой бактерицидной активностью в отношении широкого спектра микроорганизмов, включая возбудителя холеры; соответствовать существующим требованиям по показателям безопасности их применения для человека и окружающей среды; иметь оптимальное соотношение «стоимость-качество».

В современный период имеются сотни зарегистрированных дезинфекционных средств разных групп химических соединений и различающихся по составу рецептур. При анализе различных классов химических веществ перспективным, на наш взгляд, препаратом является «Биопаг-Д» из группы полигексаметиленгуанидинов (ПГМГ-ГХ). В соответствии с сертификатами соответствия, гигиеническими заключениями и актами проведенных испытаний, представленными разработчиками и изготовителями, препарат активен в отношении грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов, относится к 3 классу умеренно опасных веществ и 4 классу малоопасных веществ по ГОСТ 12.1.007-76 [2], с успехом используется в медицинских организациях, на предприятиях пищевой промышленности и жилищно-коммунального хозяйства, что позволяет рассматривать его в качестве возможного препарата для деконтаминации балластных вод [3].

При исследовании действия различных концентраций на культуры штаммов *E. coli*, *S. aureus*, *V. cholerae* с помощью суспензионного метода установлено, что дезинфектант в интервале концентраций 0,001 – 0,1% приводит к быстрой гибели всех индикаторных микроорганизмов в регламентированное время - не более 30 мин в соответствии с Р 4.2.2543-10 [4]. В соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» (Приложение 1, пп.1.2, 1.31) [5], в которых регламентированы концентрации ПГМГХ 0,02 - 0,4% для обработки различных объектов, нами выбраны концентрации «Биопага – Д», обеспечивающие наиболее быстрое и эффективное обеззараживание - 0,01 – 0,1%.

Одной из важных характеристик дезсредств является показатель частоты возникновения у бактерий устойчивых форм, поэтому далее мы

продолжили исследования по показателю частоты возникновения у бактерий устойчивых форм к препарату ПГМГ-ГХ («Биопаг-Д»).

С этой целью для получения дополнительной информации об активности ПГМГ-ГХ («Биопаг-Д») в отношении холерных вибрионов были проведены специальные эксперименты.

В исследование были взяты 10 штаммов *Vibrio cholerae* O1 (classical, El Tor) и O139 серогрупп. С помощью метода серийных разведений в агаре Мартена изучена чувствительность указанных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 к дезинфекционному средству из группы ПГМГ-ГХ («Биопаг-Д»).

Установлено, что все штаммы, вне зависимости от серогруппы, характеризовались одинаково высокой чувствительностью к дезинфектанту - МПК препарата составляла 0,0005 %. При исследовании возможности появления спонтанных «Биопаг-Д» - резистентных форм выявлено, что у некоторых штаммов (4 из 10 исследованных) в популяции с частотой $10^6 - 10^7$ возникают варианты, устойчивые к 0,001 % препарата. Наши попытки дальнейшего увеличения резистентности успеха не имели, так как эти варианты утрачивали жизнеспособность на более высоких концентрациях ПГМГ-ГХ («Биопаг-Д»). Результаты проведенных экспериментов подтверждают тот факт, что ранее предложенная нами концентрация (0,01 %) для обработки балластных вод существенно превышает МПК препарата (0,0005 %), даже с учетом возможности появления более устойчивых мутантов (МПК – 0,001 %). Следовательно, применение дезсредства из группы ПГМГ-ГХ («Биопаг-Д») обеспечивает надежное обеззараживание балластных вод в случае обнаружения в них холерных вибрионов.

На основании полученных экспериментальных данных по бактерицидной активности дезсредства из группы ПГМГ-ГХ («Биопаг –Д») в отношении *V. cholerae* установлено, что «Биопаг –Д» является перспективным препаратом для деконтаминации судового балласта, т.к. обеспечивает надежное обеззараживание балластных вод в случае обнаружения в них холерных вибрионов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 г. – СПб.: ЗАО ЦНИИМФ, 2005. – 120 с.
2. ГОСТ 12.1.007-76 «Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности». М.: Издание (апрель 2007 г.) с изменениями № 1, 2, утвержденными в сентябре 1981 г., марте 1989 г. (ИУС 12-81, 6-90).
3. Инструкция № 1/08 по применению дезсредства «Биопаг-Д» (Региональная общественная организация – институт эколого-технических проблем, Россия). М., 2008. – 14 с.

4. Методы лабораторных исследований и испытаний средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство. - М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 615 с.

5. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиол. правила СП 1.3.3118-13. - М., 2013. - 195 с.

СИСТЕМАТИКА, НОМЕНКЛАТУРА, ТАКСОНОМИЯ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РОДА *VIBRIO*

Гальцева Г.В., Швец О.Г.

*ФКУЗ «Причерноморская противочумная станция» Роспотребнадзора,
Россия, г. Новороссийск*

Проблема классификации вибрионов имеет важное не только теоретическое, но и практическое значение. Наличие таксономических четких признаков в значительной степени облегчает идентификацию бактерий и способствует своевременной бактериологической диагностике заболеваний, обусловленных различными возбудителями. Касаясь истории вопроса таксономии холерных и других патогенных для человека вибрионов, следует отметить, что их систематика, положение отдельных таксономических групп нестабильное и постоянно пополняется новыми данными и обсуждается. Бактериологи, систематики пользуются несколькими классификационными схемами, которые демонстрируют различный подход как к группировке, так и к введению бактерий в сем. *Vibrionaceae*, что нередко приводило к таксономической путанице. Происходило это по причине нарушения правил и принципов систематики классификации бактерий.

Ортодоксальная таксономия за основу классификации принимала лишь один из признаков микроорганизмов, у вибрионов – морфологический. Адонсоновская (нумерическая) таксономия основывается на использовании максимального количества сопоставляемых признаков и математическом учете степени соответствия. Все фенотипические признаки признавались равноценными, что позволяет выразить между представителями семейства *Vibrionaceae* и рода *Vibrio* таксономические дистанции.

Американским бактериологом Дэвидом Бержи были предложены подходы к систематике «Определитель бактерий Бержи», которые впервые

были опубликованы в 1950 году и неоднократно переиздавались в 1974, 1984, 1994 и в 2004 гг. [1].

Современный этап развития таксономии характеризуется использованием фенотипических, генотипических и филогенетических исследований для установления родства микроорганизмов в историческом плане.

Систематика – научное исследование многообразия микроорганизмов, их описание и расположение по определенным группам с объяснением этого распределения.

Классификация – распределение (объединение) организмов по группам в соответствии с их общими свойствами (сходными генотипическими и фенотипическими признаками) или общности их происхождения по таксонам. Наука о биологической классификации известна как таксономия, включающая теорию, принципы и методы распределения (классификации) в соответствии с их иерархией. Часто используют таксономические единицы (таксоны) – штаммы, вид, род. Молекулярная таксономия с использованием методов определения нуклеотидного состава ДНК и изучения химической гибридизации нуклеиновых кислот оказала влияние на систематику, в т.ч. и вибрионов. Основной единицей признан таксон и в соответствии с положениями «Международного Кодекса номенклатуры бактерий» [2] таксономические категории делятся на обязательные и необязательные. Обязательные категории – вид, род, семейство, порядок, класс, царство; необязательные - подрод, подтриба, триба, подпорядок, подкласс в латинской транскрипции.

Основным таксоном в систематике бактерий служит род. Вид в современной микробиологии – совокупность микроорганизмов, общих по эволюционному происхождению, имеющих близкий генотип (высокая степень генетической гомологии, как правило, 75% - 95%). И близкие фенотипические характеристики.

В семействе *Vibrionaceae* определен типовой род *Vibrio Pacini* 1854. В пределах рода *Vibrio* - типовым видом является *Vibrio cholerae Pacini* 1854 и типовыми штаммами - ATCC 14035, CDC 9061-79, NCTC 8021. Замена или принятие новых типовых штаммов, изменение названий штаммов, предложение неотиповых взамен утраченного или изменившего свои свойства в процессе длительного хранения, проводится в соответствии с требованиями «Международного Кодекса номенклатуры бактерий» [2] при одобрении Международным комитетом систематической бактериологии. Неотиповой штамм может быть признан официально после двух лет его описания и опубликования в Международном журнале по систематике бактерий (*Intern. J. Syst. Bacterol.*) и утверждения Юридической Комиссией по номенклатуре бактерий. Информация должна поступать в комитеты государственные по таксономии.

Следовательно, вид - это группа штаммов, обнаруживающая высокую степень общего фенотипического сходства и отличающаяся от родственных групп штаммов по многим независимым признакам. В пределах каждой совокупности бактерий вида обнаруживается некоторая степень внутреннего фенотипического разнообразия, обусловленного генетической изменчивостью. Совершенствование таксономии вибрионов состоит в том, чтобы с учетом изменчивости как можно полнее описать и идентифицировать основные таксономические единицы или виды и разработать удобный способ расположения, систематического перечисления этих единиц.

Современные методы геносистематики выявили основы внутривидовой и межвидовой таксономии холерных и других патогенных для человека вибрионов. По нуклеотидному составу ДНК и результатам молекулярной гибридизации доказана высокая степень геномного родства штаммов вида *V. cholerae*: *V. cholerae* биотипов *classical* и *El Tor*, *V. cholerae* O139, *V. cholerae non O1/ non O139*, *V. cholerae biovar albensis* или *V. albensis* [3].

У всех представителей вида *Vibrio cholerae* O1, O139, не O1, *V. albensis* выявлена возможность применения ОТ-ПЦР для углубленной характеристики и геномов ДНК - содержащих холерных фагов [4].

Бактериологический метод – «золотой стандарт» микробиологической диагностики. Результаты микробиологических исследований позволяют точно установить факт наличия возбудителей в исследуемом материале объектов окружающей среды (ООС), от больных (группа) при подозрении на заболевание холерой или вибрионосителей.

Основные фенотипические и генотипические характеристики используют для идентификации, т.е. установления таксономического положения и, прежде всего, видовой принадлежности. Для этого существуют эталонные коллекционные или музейные штаммы (тест-штаммы) микроорганизмов, промышленные, штаммы-продуценты, стандартные антигены, иммунные сыворотки к известным прототипным штаммам.

Бинарная номенклатура микробактерий: первое слово - род микроба, который пишется с прописной буквы, второе слово - вид микроба (пишется со строчной буквы). Однако встречаются публикации в современных и зарубежных источниках, когда эти правила не соблюдаются. В определителях бактерий в различных изданиях вибрионы относятся к роду *Vibrio*, который обозначается одним словом (унитарно), видов двумя словами *Vibrio cholerae* (бинарно). Название подвидов, биотипов тремя словами *V. cholerae cholerae* и *Vibrio cholerae eltor* (триномиально).

Номенклатура теснейшим образом связана с классификацией. Группы естественные и искусственные. Номенклатура может быть определена как собрание названий всех реальных родов, классов, и т.д.

Внутри видов существуют варианты: штамм, клон, морфовары, фаговары, морфотипы, фаготипы, серовары - серотипы, геновары - генотипы, биовары-биотипы. Эти единицы не являются таксономическими и по фенотипическим признакам исследователями могут обозначаться по-разному. Паспортизация штаммов, полученных с помощью геномного анализа, также должны обозначаться в соответствии с Международным Кодексом по номенклатуре бактерий.

С 1893 года известен пресноводный вид *V. cholerae albensis*, который описали в 1896 г. Lehmann, Neumann. Для выявления биолюминесценции необходим окислительный фермент люцифераза, катализирующая реакцию испускания света при наличии окисляемого субстрата люциферина, кислорода и АТФ. При утрате вибрионами гена фермента люциферазы свечения при культивировании вибрионов не происходит и тогда они ничем не отличаются от *V. cholerae non O1/non O139*.

В основном во всех определителях, в том числе Bergey's (1957, 1974, 1984), доминирует название светящихся вибрионов «*V. albensis*» (al-ben-sis, относящийся к реке Эльбе). Светящиеся вибрионы выделяли не только от больных, вибрионосителей, но и от гидробионтов, водных объектов внешней среды (Ермольева, 1924; Штуцер, 1929; Чибрикоа с соавт.; Адамов с соавт., 1976; Гальцева с соавт., 1977, 1985, 1995; Хайтович с соавт., 1983 и т.д.) [8, 9]. Следует заметить, что в последние десятилетия вибрионы, не агглютинирующиеся холерной О-сывороткой, не просматривают в темноте и не выявляют функцию биолюминесценции и идентифицируют как *V. cholerae non O1*, что не является ошибкой. Признак биолюминесценции непостоянный, легко утрачивается и не восстанавливается. Нами было изучено более 2,5 тысяч штаммов из разных регионов СССР, выделенных как от людей, так и из ООС. Номенклатурная ревизия светящихся вибрионов коллекции МЖК РостНИПЧИ с использованием метода MALDI TOF масс-спектрометрии также подтвердила, что все изученные штаммы светящихся вибрионов правомерно относятся к виду *V. cholerae non O1* [5].

Светящиеся вибрионы, как и вибрионы, не агглютинирующиеся холерной О1 сывороткой, выделенные от больных или ООС, относятся к различным серологическим группам. Разновидность антигенной структуры светящихся вибрионов позволила выявить среди них типовые штаммы и получить авторские свидетельства на изобретение. В 70-е годы штаммы еще называли *V. phosphorescens*. Получены свидетельства на *V. phosphorescens* P-9504 (5 серотип), P-9510 (6 серотип), P-9506 (7 серотип), P-7402 (49 серотип), P-7401 (50 серотип), P-6373 (55 серотип), а в 90-е годы штаммы были зарегистрированы: *V. albensis* P-10188 (1 серотипа), P-9499, P-10034, P-10035.

Было установлено, что среди штаммов *V. cholerae non O1*, полученных от R. Sakazaki из Японии, выявлено серологическое родство серотипов 2, 8, 9, 18, 19, 38 и 39 с типовыми штаммами *V. albensis*.

Из СтавНИПЧИ поступили штаммы вибрионов не О1 серогруппы и среди них обнаружили 5 новых серотипов светящихся вибрионов (*V. albensis*), которые были депонированы в государственную коллекцию патогенных бактерий института РосНИПЧИ «Микроб» и получены приоритетные справки на авторские штаммы за №№ 1794/км140, 308/км141, 2369/км142, 2953/км143, 1799/км144. Светящиеся микроорганизмы являются перспективной моделью для биолюминесцентных анализов. Яркая экспрессия гена люциферазы делает штаммы *V. albensis* удобным объектом генетических исследований. Ген люциферазы буквально говорит о себе языком света. Набор мутантов по люциферазной системе позволяет создать информативные системы скрининга мутагенной активности [6]. Результаты наших исследований по светящимся вибрионам были доложены на симпозиуме по биолюминесценции, хемилюминесценции и термолюминесценции в Красноярском институте биофизики им. Кипренского в 1985 году и на таксономическом подкомитете в 1984 году.

Особого внимания заслуживает история становления таксономического положения вибрионов им. И.И Мечникова. Исходный штамм этих вибрионов выделен Н.Ф. Гамалеей от домашней птицы, погибшей от холероподобного гастроэнтерита в 1888 году и назван в честь выдающего русского ученого И.И. Мечникова. Штамм был передан в английскую коллекцию NCTC под номером 262, который в процессе хранения утерян. Неотиповой штамм *V. metschnikovii* NCTC 8443 отличался от исходного по фенотипическим свойствам и по геному, но описание этого штамма было включено в одобренные списки. Lee в 1973 г. [7] было предложено пересмотреть его таксономическое положение и выделить в самостоятельный вид. *V. metschnikovii* стал первым оксидазонегативным видом рода *Vibrio* и было предложено изменить описание и рода *Vibrio*, чтобы соответствовать свойствам нового типового штамма NCTC 8443, что неправомерно.

Существование различных по фенотипу штаммов *V. metschnikovii* имело место и у нас в стране. Мы изучили различные штаммы *V. metschnikovii* по фенотипическим признакам и нуклеотидному составу ДНК. По результатам молекулярной гибридизации ДНК-ДНК выявили высокую степень сходства *V. metschnikovii* 251-индофенолоксидазопозитивного и типового штамма *Vibrio cholerae* ATCC 40355 (95% гомологии), что соответствовало взглядам Н.Ф. Гамалеи (1888). Штамм *V. metschnikovii* 251 был получен из института «Микроб», который получил этот штамм в 1957 году из Одесского НИИ эпидемиологии и микробиологии. Результаты исследований мы доложили на таксономическом подкомитете в Москве, которые были одобрены (протокол 7 от 07.08.1982 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. [Bergey's](#) Manual of Systematic Bacteriology. Volume Two. The Proteobacteria. Epsilon Proteobacteria Part B The Gammaproteobacteria, 2004.- С. 490-546.
2. «Международный Кодекс номенклатуры бактерий» [Пер. с англ.] АН СССР. Всесоюзное микробиологическое общество. Институт биохимии и физиологии микроорганизмов. – М.: Наука, 1978. – 207 с.
3. Гальцева Г.В. Таксономия и идентификация холерных и других вибрионов: Дис. в виде науч. доклада ... д-ра мед. наук - Саратов, 1995. 66 с.
4. Кудрякова Т.А., Романова Л.В., Македонова Л.Д. и др. Бактериофаги патогенных вибрионов // Актуал. пробл. эпидемиол. безопасности: Матер. юбил. науч.-практ. конф. – Ставрополь, 2002. – С. 134-136.
5. Чемисова О.С., Смоликова Л.М., Рыковская Р.А. и др. Реклассификация коллекционных штаммов аэромонад и фосфоресцирующих вибрионов. // Холера и патогенные вибрионы для человека: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. –С. 88–92.
6. Чумакова Р.Н., Гительзон И.И. Светящиеся бактерии. – М.: Наука, 1975. – 108 с.
7. Светящиеся бактерии. – Новосибирск, 1984. – 288 с.
8. Гальцева Г.В., Хайтович А.Б., Голковский Г.М. и др. Светящиеся вибрионы и их этиологическая роль при кишечных инфекциях. // Тез. докл. V Всерос. съезда микробиол. и эпидемиол. – М., 1985. – С.185–188.
9. Хайтович А.Б., Гальцева Г.В., Голковский Г.М. Диагностика и биологические свойства светящихся вибрионов в связи с их ролью при диареях // Лабораторное дело. – 1983. – № 6. – С.63–64.

ОЦЕНКА СПОСОБНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И O139 СЕРОГРУПП К ДЕСТРУКЦИИ ДИБУТИЛФТАЛАТА

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В.

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

Использование в ряде отраслей промышленности различных классов химических веществ, включая фталаты (эфирьы фталевой кислоты),

являющихся стойкими органическими загрязнителями, ежегодно увеличивает антропогенную нагрузку на различные экосистемы. Известно, что фталаты и их метаболиты, вовлеченные в пищевые цепи, могут оказывать воздействие на биогеоценоз водных и других экосистем. Способность осуществлять разложение фталатов (дибутилфталата (ДБФ)) выявлена у некоторых микроорганизмов, включая *p. Comamonas*, *p. Pseudomonas*, *p. Bacillus* и др. Метаболические пути разложения ДБФ сочетают два процесса: первичная биodeградация дибутилфталата до монобутилфталата с последующей его деструкцией до орто-фталиевой кислоты (о-ФК), являющейся ключевым интермедиатом. Разложение о-ФК бактериями осуществляется через образование протокатеховой кислоты до основных продуктов жизнедеятельности микробной клетки [6].

В настоящее время известно, что холерный вибрион обладает способностью гидролизовать твины [1, 5], первичные алкилсульфаты (SDS) [2], спаны [4], а так же минеральные удобрения [3]. Гидролиз многих ПАВ осуществляют ферменты эстеразы /липазы. Показана их роль в деструкции ПАВ и в метаболизме. Более того, способность к деструкции некоторых субстратов ферментами твиназами и алкилсульфатазами лежит в основе дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы [2, 5]. В связи с интенсивным производством синтетических полимеров и широким их распространением в объектах окружающей среды (вода, почва и др.) представляет интерес оценка способности холерных вибрионов гидролизовать фталаты.

Цель исследования состояла в анализе способности штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctx AB* и *tcpA*), к деструкции дибутилфталата.

В работе использовали: 2 штамма *V. cholerae* O1 Эль Тор (*ctx+* *tcp+*); 4 дефектных по синтезу токсина и токсинорегулируемых пилей штаммов (*ActxAtcp*), выделенных из воды поверхностных водоемов; 12 штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы, из которых 6 (*ctx+* *tcp+*) были выделены из клинического материала; а 6 атоксигенных (*ActxAtcp*) - из проб воды поверхностных водоемов. Штаммы получали из музея живых культур с центром патогенных вибрионов ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Способность штаммов гидролизовать ДБФ выявляли на сконструированной нами среде [1] с добавлением ДБФ в концентрации 0.1%. В качестве отрицательного контроля использовали среду без добавления субстрата. Посев на поверхность среды осуществляли петлей «пяточками» из агаровой культуры. Чашки инкубировали при 37° С в течение 24-72 часов, периодически просматривая в проходящем свете. При наличии у испытуемых штаммов способности гидролизовать предложенный субстрат вокруг посевов четко просматривались прозрачные зоны различного диаметра.

В результате проведенного исследования с использованием сконструированной среды обнаружено, что среди изученных культур как токсигенных, выделенных от людей, так и нетоксигенных, изолированных из объектов окружающей среды, были обнаружены штаммы, которые обладали способностью гидролизовать предложенный субстрат, что выразалось в появлении вокруг макроколоний вибрионов прозрачных зон разного диаметра за счет деструкции ДБФ. Некоторые штаммы уже через 24 часа инкубации проявляли способность гидролизовать используемый субстрат, в то же время были обнаружены штаммы, не обладающие данной способностью, что можно объяснить как индивидуальными особенностями штаммов, так и разной активностью ферментов-деструкторов холерных вибрионов. Анализ полученных результатов показал, что используя сконструированную среду можно оценивать способность штаммов холерных вибрионов к деструкции ДБФ, однако дифференцировать штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью по способности гидролизовать исследуемый субстрат, не удалось.

Возможно, что в определенных условиях способность холерных вибрионов к деструкции фталатов в результате биотрансформации может обеспечивать им конкурентноспособность и возможность адаптации в различных экологических условиях, особенно в случае антропогенного загрязнения окружающей среды.

Таким образом, использованная среда для выявления способности штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп гидролизовать ДБФ открывает перспективы углубленного изучения этого признака и у других вибрионов, исследование ферментов, участвующих в деструкции фталатов у холерных вибрионов с оценкой их роли в процессах адаптации/персистенции и биоремедиации.

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. Дуванова, О.В. К вопросу о метаболизировании и трансформации минеральных удобрений некоторыми штаммами холерных вибрионов O1 и

О139 серогрупп/ О.В. Дуванова, Е.С. Шипко., Б.Н. Мишанькин, Р.В.Писанов, А.Л. Галичева //Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2018. - Вып.31. - С.75-77.

4. Дуванова О.В., Способность холерных вибрионов гидролизовать спаны /О.В. Дуванова, Е.С. Шипко, Б.Н. Мишанькин //Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2017. - Вып.30. - С.76-78.

5. Дуванова О.В., Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов О139 серовара различного происхождения/ О.В. Дуванова, Н.Я. Шиманюк, Б.Н. Мишанькин //Клин.лаб. диагностика. - 2000.-№5, С.48.

6. Корсакова Е.С. Бактерии - деструкторы стойких органических загрязнителей-эфиров фталиевой кислоты как основа для создания новых экобиотехнологий / Е.С. Корсакова, А.А. Пьянкова, Е.Г. Плотникова// Известия Самарского научного центра Российской академии наук.-2013.-Т.15.-№ 3 (5).-С. 1633-1636.

СПЕКТР ЭКЗОМЕТАБОЛИТОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 EL TOR

Шипко Е.С., Дуванова О.В., Захаров М.В.

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Россия, Ростов-на-Дону*

Бактериальные экзометаболиты – это низкомолекулярные органические соединения различной химической природы, секретируемые бактериальными клетками в окружающую среду. Их спектр зависит от экологических факторов, воздействующих на микробную популяцию – температуры, рН, осмолярности, концентрации питательных веществ и т.д. Установлено, что многие экзометаболиты обладают биологической активностью. В частности они могут выступать ауторегуляторами, обеспечивающими внутри- и межпопуляционные взаимодействия, в том числе контролирующие рост, развитие и стрессоустойчивость микроорганизмов [2, 3]. Низкомолекулярные метаболиты патогенных бактерий в качестве межклеточных сигналов участвуют в регуляции факторов вирулентности, образовании биопленок, морфофизиологических форм, связанных с патогенностью, оказывают антагонистическое воздействие на микробиоту хозяина и цитотоксический эффект на клетки

тканей [4]. В связи с этим, актуальным является изучение экзометаболизма возбудителей инфекционных заболеваний, его роли в адаптации, персистенности и реализации патогенетического потенциала.

Цель работы состояла в определении спектра экзометаболитов возбудителя холеры при различных температурах культивирования.

Материалы и методы. В работе использовали штамм *Vibrio cholerae* O1 El Tor P-5879 (ctx⁺ tcp⁺), полученный из музея живых культур с центром патогенных вибрионов ФКУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора. Клетки выращивали в 1% пептонной воде (рН 7,8) при разных температурных режимах – 22⁰, 28⁰, 37⁰, 42⁰С. Отбор клеток на метаболомный анализ осуществляли через сутки, на 3 и 5 сутки. Клетки осаждали центрифугированием при 14000 об/мин в течение 10 мин на холоду (4⁰С). Экзометаболиты экстрагировали из культуральной жидкости по методу Белобородовой Н.В. с соавт. [1]. Экстракты высушивали при 40⁰С и подвергали силилированию бис-(триметилсилил)-N,O трифторацетамидом. Триметилсилил производные ЖК анализировали методом газожидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией на приборе «Мазетро 2-7802» (ИнтерЛаб, Россия) с использованием программного обеспечения «MSD ChemStation» и библиотеки масс-спектров NIST16.

Результаты. В результате ГХ-МС анализа среды роста штамма *V. cholerae* P-5879 биовара El Tor был получен широкий спектр экзометаболитов, представленный как простыми органическими соединениями: аминокислотами, летучими жирными кислотами, так и сложными соединениями терпенового ряда. При температурах 22⁰, 28⁰С культивирования фиксировали такие короткоцепочечные жирные кислоты, как молочная, уксусная, пропионовая, метил малоновая, янтарная и валериановая, тогда как при температуре 42⁰С преобладали фенольные, аминопроизводные и разветвленные изомеры этих кислот. Из аминокислот при росте в условиях пониженной температуры в основном фиксировались изолейцин, лейцин и циклолейцин, в то время как при повышенной температуре β-аланин. При всех температурных режимах детектировали образование пироглутаминовой кислоты, которая является метаболитом в синтезе глутатиона, а также может оказывать влияние на рост бактериальной популяции. При пониженных и повышенных температурах культивирования обнаруживали появление в среде роста терпенов и производных кумарина, которые возможно играют роль адаптогенов.

На 3-5 сутки культивирования вследствие старения культуры, увеличения плотности клеток, продолжительного воздействия неоптимальной температуры роста наблюдали изменения в экзометаболизме возбудителя холеры. Наиболее выраженные изменения фиксировали при 10⁰ и 42⁰ С. Так, при температуре 10⁰С детектировали накопление в среде роста короткоцепочечных ЖК – изомаляной, метил малоновой, янтарной, 4-гидроксibenзойной (увеличение в 2-10 раз по сравнению с суточной

культурой), а также свободной арахидоновой ЖК (увеличение в 30 раз). При температуре 42⁰С наоборот наблюдалось резкое сокращение содержания летучих ЖК (вплоть до полного исчезновения некоторых представителей) и накопление альдегидов, ароматических гидроксикислот. При всех температурах культивирования наблюдали увеличение содержания пироглутаминовой кислоты и появление в значительном количестве метаболитов, связанных с реакцией на стресс - циннаматов и аминокислот, участвующих в катаболизме лизина.

Таким образом, температура культивирования оказывала влияние на метаболизм возбудителя холеры, что отражалось на спектре экзометаболитов. Некоторые из обнаруженных нами метаболитов, возможно, играют существенную роль в процессах адаптации патогена к условиям окружающей среды, увеличивая его потенциал персистенции.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белобородова Н.В. Экзометаболиты некоторых анаэробных микроорганизмов микрофлоры человека / Н.В. Белобородова, Байрамов И.Т., Оленин А.Ю., Федотчева Н.И. // Биомедицинская химия. – 2011. – Том 57, Вып.1.- С. 95-105.
2. Казацкая Ж.А. Влияние алкилоксибензолов на функциональную активность клеток крови *in vitro* / Ж.А. Казацкая, М.А. Шаров, В.В. Новиков, Г.И. Эль-Регистан // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. – 2012. –№2(3). – С. 191-195.
3. Audrain B. Role of bacterial volatile compounds in bacterial biology / B. Audrain, M.A. Farag, Ryu Ch-M., Chigo J-M. // FEMS Microbiol. Reviews. – 2015. – Vol 39. – P. 222-233.
4. Dufour N. Secondary metabolites and other small molecules as intercellular pathogenic signal / N. Dufour, R.P. Rao // FEMS Microbiol. Lett. – 2011. - Vol.314. – P. 10–17.

ВЫЯВЛЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ХИТИНАЗ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ ЭНЗИМ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА С КОЛЛОИДНЫМ ХИТИНОМ

Козлов С.Н., Николаев В.Б., Марков Е.Ю., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В.
*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Россия, г. Иркутск*

Хитиназы (ЕС. 3.2.1.14) – это подкласс ферментов, ответственный за гидролиз β -1,4 гликозидных связей хитина – природного биополимера, являющегося основным структурным компонентом экзоскелета ракообразных, представителей зоопланктона и клеточных стенок большинства патогенных грибов. Продукты гидролиза хитина являются важным источником энергии и питательных веществ для холерного вибриона, что имеет значение для его сохранения в объектах окружающей среды [1, 2, 3]. Одним из методов для изучения состава хитиназ и, соответственно, косвенной оценки адаптационной и персистентной способности штаммов холерного вибриона, является зимографический анализ, заключающийся в проведении электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем сополимеризованный субстрат – коллоидный хитин, в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). По стандартной схеме зимографию хитинолитических ферментов в ПААГ проводят без прогревания исследуемого материала в несколько этапов: электрофорез в разделяющем геле, содержащем гликольхитин или коллоидный хитин; отмывка от ДСН в растворе Тритона X-100 с восстановлением ферментативной активности; инкубация в буфере и гидролиз субстрата; фиксация и окраска гелей [4, 5].

Цель настоящей работы – оценить пригодность метода субстратного электрофореза с коллоидным хитином для детекции хитиназ из штаммов холерных вибрионов разного происхождения.

Материалы и методы. Объектом для исследования послужили супернатанты культуральной жидкости (СКЖ), полученные из 10 штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп, выращенных на агаре Хоттингера (рН 7,6) в течение 18 часов, смытых физиологическим раствором и после определения концентрации микробной взвеси разлитых во флаконы с МПБ (рН 7,6) в объеме 55 мл в дозе 2×10^8 м.к./мл каждого штамма. После 2-х часовой инкубации флаконов со штаммами холерного вибриона в МПБ при комнатной температуре с целью обеззараживания в них добавляли мертиолят натрия (до 0,01 % конечной концентрации) согласно [6]. После прохождения контроля специфической стерильности материал подвергали центрифугированию при 10000 об/мин, полученный СКЖ диализовали и лиофильно высушивали. Образцы для электрофоретического анализа готовили по Laemmli [7] без прогревания. Зимографию проводили с помощью ДСН-электрофореза в блоках 8 % ПААГ, содержащих коллоидный хитин, в течение 16 часов в двух вариантах: как стандартным методом с отмывкой и инкубацией гелей, так и без них. Коллоидный хитин получали по методу R. Balasubramanian [8] и добавляли в разделяющий ПААГ в конечной концентрации 0,1 % [9]. Чувствительность внеклеточных хитиназ холерного вибриона к действию детергентов (ДСН, Твин-20, Тритон X-100, Тритон X-114) определяли в энзим-электрофорезе, добавляя их в исследуемые образцы в концентрации 2,5 %, а также исключением этапа отмывки ПААГ от

детергента. Влияние повышенной температуры на активность хитиназ определяли прогреванием исследуемых образцов перед анализом при 56 °С, 65 °С, 75 °С в течение 10 мин. О наличии хитиназной активности судили визуально по образованию неокрашенных полос гидролиза хитина на фоне геля, окрашенного Кумасси ярко синим R-250.

Результаты. В ходе проведенных исследований с помощью энзим-электрофореза по стандартной схеме (с использованием отмывки и инкубации) установлено, что большинство препаратов СКЖ обладают хитиназной активностью за исключением СКЖ, полученных от трех клинических токсигенных штаммов: *V. cholerae cholerae* 569В (*ctx*⁺, *tcpA*⁺, *toxR*⁺), *V. cholerae* El Tor М-878 (*ctx*⁺, *tcpA*⁺, *toxR*⁺) и *V. cholerae* El Tor И-1334 (*ctx*⁺, *tcpA*⁺, *toxR*⁺). Анализ зимограмм выявил наличие от двух до шести полипептидов с хитиназной активностью, относительная молекулярная масса которых располагалась в диапазоне от 140 до 50 кДа. При проведении субстратного электрофореза, минуя этапы отмывки и инкубации, различий в профиле хитиназ в сравнении с проведением зимографии по стандартной схеме отмечено не было. При прогревании образцов при 56 °С и 65 °С с последующим субстратным электрофорезом хитиназы выявлены в СКЖ пяти нетоксигенных штаммов холерного вибриона, в то время как при обработке образцов при 75 °С – в СКЖ семи штаммов.

Выводы. Проявление зон активности хитиназ сразу же после проведения субстратного электрофореза с фиксацией и окраской гелей свидетельствует об устойчивости выявляемых хитиназ к действию ДСН и активном процессе гидролиза субстрата во время проведения электрофореза. Хитиназы холерного вибриона проявили относительную термостабильность, сохраняя свою активность при различных режимах прогревания образцов. Отмеченные изменения в спектрах хитиназ, возникших при термическом воздействии, можно связать с процессом диссоциации полипептидов, обладающих ферментативной активностью и возникновением новых белковых комплексов вследствие длительности электрофореза. Полученные данные указывают на пригодность проведения энзим-электрофореза для изучения хитиназ в альтернативных условиях, однако для устранения сопутствующих артефактов рекомендуется проведение переноса исходного ПААГ на агарозные субстрат-содержащие реплики. Анализ хитинолитической активности холерного вибриона указывает на устойчивость хитиназ к воздействию детергентов и повышенной температуры, что может объяснить высокую приспособляемость нетоксигенных штаммов холерных вибрионов к разным неблагоприятным условиям окружающей среды и их нередкую высеваемость в местах сброса хозяйственно-бытовых сточных вод.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Дуванова О.В. Хитинолитический комплекс *Vibrio cholerae*: состав и роль в персистенции / О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин, Л.В. Романова, С.В. Титова // Журн. микробиол. – 2016. – № 5. – С. 94–101.
2. Заднова С.П. Выявление в природных популяциях холерных вибрионов клонов с различной экспрессией факторов вирулентности и их фенотипический анализ / С.П. Заднова, Л.Ф. Ливанова, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Пробл. особо опас. инф. – 2009. – Вып. 101. – С. 39–42.
3. Марков Е.Ю. Хитин и продукты его гидролиза в экологии *Vibrio cholerae* / Е.Ю. Марков, Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, В.С. Вишняков, С.В. Балахонов // Биохимия. – 2015. – Т. 80, № 9. – С. 1334–1343.
- A4. sril M. Partial purification of bacterial chitinase as biocontrol of leaf blight disease on oil palm / M. Asril, N.R. Mubarik, A.T. Wahyudi // Res. J. Microbiol. – 2014. – Vol. 9, N 6. – P. 265–277.
5. Liu C.L. Isolation and identification of two novel SDS-resistant secreted chitinases from *Aeromonas schubertii* / C.L. Liu, C.R. Shen, F.F. Hsu, J.K. Chen // Biotechnol. Prog. – 2009. – Vol. 25, N 1. – P. 124–131.
6. “Инструкция по контролю специфической стерильности экспериментальных препаратов, приготовленных из культур чумного и холерного микробов”. – Саратов, 1982.
7. Laemmli U.K. Maturation of the head of bacteriophage T4. I. DNA packaging events / U.K. Laemmli, M. Favre // J. Mol. Biol. – 1973. – Vol. 80, N 4. – P. 575–599.
8. Balasubramanian R. Cytosolic and membrane-bound chitinases of two mucoraceous fungi: a comparative study / R. Balasubramanian, M.S. Manocha // Canadian J. Microbiol. – 1992. – Vol. 57. – P. 331–338.
9. Trudel J. Detection of chitinase activity after polyacrylamide gel electrophoresis / J. Trudel, A. Asselin // Anal. Biochem. – 1989. – Vol. 178, N 2. – P. 362–366.

БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОФАГОВ *preSTX*, ИНТЕГРИРОВАННЫХ В ГЕНОМЫ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Монахова Е.В., Ежова М.И., Водопьянов А.С., Архангельская И.В.,
Писанов Р.В.

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

Филаментозные фаги *preSTX*ф содержат в своем однокитовом геноме гены факторов патогенности *ser*, *ase* и *zot*, и, интегрируя в геном в двукитовой форме профагов *preSTX*, могут повышать патогенетический потенциал холерных вибрионов. Структура геномов *preSTX* весьма разнообразна, в особенности это касается генов RS2-элемента [5, 6, 8, 9]. Они могут присутствовать как в одной копии, так и образовать тандемные повторы, в том числе и с полноценными профагами *STX*, а также сосуществовать с последними в разных участках генома одного штамма [1, 2, 6, 7, 10]. Результаты сравнительного анализа их структуры свидетельствуют о множественном происхождении как *STX*, так и *preSTX* [7]. Штаммы, содержащие *preSTX*, выделенные в России и Узбекистане, ранее были изучены нами, показана их выраженная энтеропатогенность для кроликов-сосунков [1, 3], а также способность некоторых из них к виrogenии [1]. Однако присутствие профагов было установлено с помощью ПЦР и блот-гибридизации [1, 2], тогда как структура входящих в их состав генов осталась неизвестной. В дальнейшем нам удалось идентифицировать эти гены в полногеномных сиквенсах пяти штаммов O1 и четырех неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионов) и собрать геномы *preSTX*. Целью настоящей работы явился сравнительный биоинформационный анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей их продуктов. В анализ также были включены гены и белки некоторых штаммов, найденные в NCBI GenBank.

На рисунке 1 показана дендрограмма, построенная по результатам анализа полных последовательностей *preSTX* (гены *rstR-zot*), интегрированных в геномы исследуемых штаммов, с использованием алгоритма UPGMA. По общему числу однокитовидных полиморфизмов (SNP) одни оказались ближе соответствующим участкам геномов полноценных профагов *STX* классических штаммов, другие отличались от таковых обоих биоваров, а также токсигенного НАГ-вибриона 16150, который оказался ближе к Эль Тор. Интересно, что тогда как два штамма НАГ-вибрионов (18362 и 183630), содержащие идентичные профаги, были выделены в Узбекистане в одно время и в одном регионе, другие два штамма

O1 (15500 и 9661) с идентичными профагами – в разное время и в разных регионах.

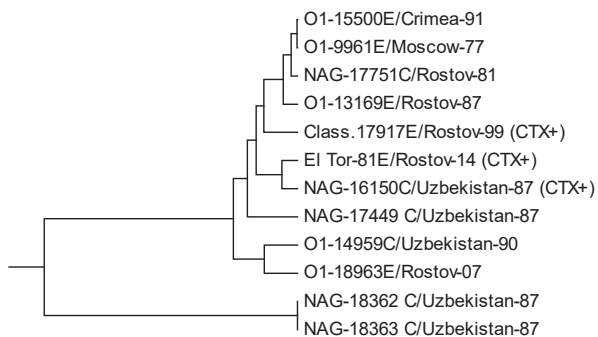


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная по результатам UPGMA анализа полных последовательностей preCTX (гены *rstR-zot*), интегрированных в геномы исследуемых штаммов. Для сравнения включены соответствующие участки профагов CTX трех токсигенных штаммов (CTX+). С – клинический штамм, Е – выделенный из ООС.

Ранее с помощью блот-гибридизации у части штаммов было установлено присутствие тандема из двух preCTX [1,2], однако в сиквенсах удалось обнаружить только одну копию (что связано с ограничениями программы-сборщика). Однако для одного из штаммов (O1-13767) полную последовательность одной и той же копии preCTX собрать не удалось, зато в полном геноме был найден контиг, включающий участки двух копий профага (рис.2), что подтвердило присутствие тандема.

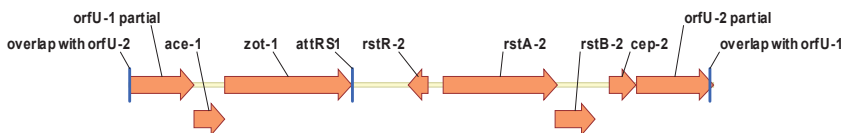


Рисунок 2. Участок тандема из двух preCTX штамма O1-13767.

Представленная дендрограмма отражает сходство и различия профагов preCTX по общему числу однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в их геномах. Далее был проведен AlignX-анализ отдельных входящих в их состав генов. В ряде из них были выявлены существенные различия. Наибольшая гетерогенность наблюдалась среди генов *rstR*. Всего у одного штамма O1-18963 он относился к типу Эль Тор, у O1-15500, 9961, 13169 и O8-17751 – к классическому типу, у O13 17449 – к типу environmental, а у двух штаммов НАГ-вибрионов (18362, 18363) отличался от всех известных типов и был обозначен как *rstR-like*. Интересно, что у этих же штаммов были сильно изменены гены *rstA* и *rstB*, также обозначенные как *rstA-like* и *rstB-*

like. Аналогичные данные были получены и зарубежными авторами для RS2-элементов некоторых штаммов из других регионов мира [4,6,8-10]. Гены коровой области также оказались весьма разнообразными. Однако поскольку далеко не все SNP являются миссенс-мутациями, при дальнейшем анализе мы ориентировались в основном на белки – продукты трансляции искомых генов, аминокислотные последовательности которых анализировали с помощью программ AlignX и BlastP. Их варианты показаны в таблице, куда для сравнения включены белки других штаммов, представленных в NCBI.

Таблица. Варианты продуктов разных аллелей генов preCTX

с/гр.	штамм	происхождение	белки							
			RstR	RstA	RstB	Сep	OrfU	Ace	Zot	
O1	13169	Ростов-87	111 ^{class}	359	125	82	427	97	399	
O1	18963	Ростов-07	112 ^{elt}	359	125	82	433	97	399	
O1	15500	Крым-91	111 ^{class}	359	126	82	427	97	399	
O1	9961	Москва-77	111 ^{class}	359	126	82	427	97	399	
O1	13767	Узбек.-88	63	359	125	82	433 ⁵	97	399	
O1	14959	Узбек.-90	63	359	125	82	321	97	399	
O1	86015	Китай	111 ^{class}	359	126	82	395	97	399	
O1	VC06-18¹	Китай	117 ^{Zj}	709	106	82	395	96	399	
O8	17751	Ростов-81	111 ^{class}	359	126	82	427	97	399	
O13	17449	Узбек.-87	86 ^{env}	359	125	82	427	97	399	
NAG	18362	Узбек.-87	117	709	106	82	427	97	399	
NAG	18863	Узбек.-87	117	709	106	82	427	97	399	
O4	VCE232+²	Индия	114	709	106	nd	nd	nd	nd	
O36	VCE22+³	Индия	86 ^{env}	nd	115	82	395	96	nd	
O139	JS9803	Китай	117	nd	nd	82	395	96	399	
	prototype		112 ^{elt} 111 ^{class}	359	126	82	427	97	399	
O27	SCE223+⁴	Индия-98	86 ^{env}							
O10	SCE263⁴	Индия-98	64 ^{env}							
O42	SCE264⁴	Индия-98	67 ^{env}							
O44	SCE188+⁴	Индия-97	59 ^{calc}							
O44	506-94+	Тайланд-94	63							

Примечания: Клинические штаммы обозначены красным шрифтом, штаммы из OOC – синим, + –наличие у штамма полноценного профага CTX; идентичные белки выделены заливкой одного цвета.

¹Штамм, содержащий тандем из двух preCTX^{Zj} нового типа в составе малой хромосомы (KP768424), описан в [10].

²Штамм, содержащий тандем из двух preCTX в составе большой хромосомы и двух CTX – в малой [6], ID RS2-like элемента preCTX в NCBI – ABC47902 .

³ Штамм, содержащий preCTX в составе малой хромосомы (AY145124, AF414368) [4].

⁴Белки RstR штаммов SCE223 (AF133309_1), SCE264 (AF133308_1), SCE188 (AF133310_1) найдены в NCBI, кодирующие их гены описаны в [8].

⁵ Ген *orfU* штамма O1-13767 собран «искусственно» из *orfU1* и *orfU2*, фрагменты которых представлены в участке тандема (см. рис.2)

Наибольшим разнообразием обладали продукты генов *rstR* (рис.3), причем, в отличие от $RstR^{eltor}$ и $RstR^{class}$, содержащих домены регуляторов транскрипции, все остальные имели совершенно другую структуру и эти домены полностью утратили. Программой Blastp в них вообще не было идентифицировано никаких активных доменов, что не позволяет предположить приобретение этими белками каких-либо новых функций и наводит на мысль о неспособности содержащих их штаммов препятствовать трансдукции гомологичных фагов, в т.ч. и СТХφ. Wang H. et al. [10] такая трансдукция была показана в эксперименте *in vivo* для одного штамма с измененным геном *rstR^{Zj}* (а также *rtsA* и *rstB*), в связи с чем авторы сочли возможным приобретение СТХ штаммами, содержащими *preCTX*, не только в кишечнике, но и во внешней среде, например, в составе биопленки.

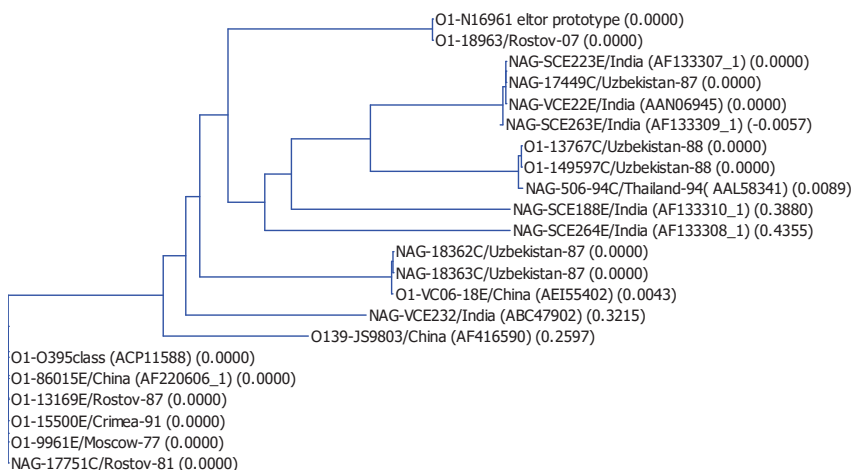


Рисунок 3. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа *RstR* и *RstR*-like.

Продукты генов коровой области обладали меньшим разнообразием, кроме *OrfU* (PШ^{CTX}) – минорной субъединицы капсида фаговой частицы. Тем не менее, все они, в том числе и усеченный за счет делеции С-942 в кодирующем гене и преждевременного стоп-кодона белок штамма O1-14959, сохранили характерный N-концевой домен, обеспечивающий контакт с *ToIA*, необходимый для успешного проникновения фага в бактериальную клетку. Сер и Асе оказались более консервативными и у большинства штаммов были идентичны прототипу. Белки *Zot* имели одинаковую длину и другую С-концевую последовательность, что характерно для *preCTX*, однако активный домен AT1002 (FCIGRL), ответственный за биологическую активность, остался без изменений.

Для многих измененных белков в NCBI были найдены полные

гомологи, принадлежащие штаммам, выделенным в разные сроки в разных странах. В целом результаты проведенного анализа свидетельствуют о мозаичной структуре и множественности путей эволюции preCTX и CTX. Тем не менее, результаты SNP-анализа в основном совпали с таковыми AlignX-анализа как генов, так и их продуктов (ср. рис.1, 3 и данные таблицы).

Штаммы, содержащие preCTX, на территории России встречаются редко и имеют явно заносное происхождение. Тем не менее, они могут представлять повышенную опасность для здоровья населения за счет экспрессии детерминант дополнительных факторов патогенности Сер, Асе и Zot. Кроме того, они, как правило, имеют остров патогенности VPI с генами, ответственными за продукцию пилей TCP, а также различные сочетания других факторов. Один из изученных штаммов (O1-18963) является представителем клона, включающего 4 штамма, выделенные из разных водоемов Ростова в течение 2 недель, что свидетельствует о способности к сохранению и распространению в ООС. Другой штамм, O1-14959 – представитель клонального комплекса, вызвавшего локальную вспышку в Узбекистане. Таким образом, preCTX⁺ штаммы разных серогрупп, обладающие как патогенетическим, так и персистентным потенциалом, требуют особого внимания со стороны санэпидслужб в случаях их выделения в нашей стране, и полученные нами данные будут использованы для их исследований в целях установления возможного происхождения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *Vibrio cholerae*: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Ростов-на-Дону, 2012.
2. Монахова Е.В., Ломов Ю.М., Михась Н.К., Писанов Р.В. Структура и изменчивость неполного CTX-элемента холерных вибрионов // Пробл. особо опасных инф. – 2007. – Вып.1(93). – С.58-61.
3. Монахова Е.В., Миронова А.В., Алексеева Л.П., Мазрухо А.Б. Вирулентность холерных вибрионов, содержащих pre-CTXφ: генотипическая и фенотипическая характеристика // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2008. – №4. – С.27-32.
4. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D. et al. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains // Environ. Microbiol. – 2006. – Vol.8, No.3. – P.526-634.
5. Li M., Kotetishvili M., Chen Y., Sozhamannan S. Comparative genomic analyses of the *Vibrio* pathogenicity island and cholera toxin prophage regions in nonepidemic serogroup strains of *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol.69, No.3. – P.1728-1738.

6. Maiti D., Das B., Saha A. et al. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain // Microbiology. – 2006. – Vol.152, Pt 12. – P.3633-3641.
7. Mantri C.K., Mohapatra S.S., Colwell R.R., Singh D.V. Sequence analysis of *Vibrio cholerae* *orfU* and *zot* from pre-CTX Φ and CTX Φ reveals multiple origin of pre-CTX Φ and CTX Φ // Environ. Microbiol. Rep. – 2010. – Vol.2, No.1. – P.67-75.
8. Mukhopadhyay A. K., Chakaraborty S., Takeda Y. et al. Characterization of VPI pathogenicity island and CTX ϕ prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae* // J. Bacteriol. – 2001. – Vol.183. – P.4737-4746.
9. Wang H., Pang B., Xiong L. et al. The hybrid pre-CTX ϕ -RS1 prophage genome and its regulatory function in environmental *Vibrio cholerae* O1 strains // Appl. Environ. Microbiol. – 2015. – Vol. 81, No.20. – P.7171–7177.
10. Wang D., Wang X., Li B. et al. High prevalence and diversity of pre-CTX Φ alleles in the environmental *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains in the Zhujiang River estuary // Environ. Microbiol. Rep. – 2014. – Vol.6, No.3. – P.251-2518.

СТРУКТУРА И ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ СИСТЕМЫ СЕКРЕЦИИ ШЕСТОГО ТИПА (T6SS) У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕО1/НЕО139 СЕРОГРУПП

Монахова Е.В., Архангельская И.В., Демидова Г.В., Левченко Д.А.,
Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В.

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

Контакт-зависимая система секреции шестого типа (T6SS) является признанным фактором патогенности/персистенции холерных вибрионов, в особенности представителей неO1/неO139 серогрупп (НАГ-вибрионов). С одной стороны, ее экспрессия в макроорганизме приводит к обездвиживанию и гибели макрофагов, а также развитию воспалительной диареи [2], с другой – обеспечивает проявление «хищничества» по отношению к другим бактериям (т.е. способности убивать их и использовать в качестве источников питания) в разных экологических нишах [5,6]. T6SS кодируется тремя кластерами генов – большим и двумя меньшими, дополнительными. Кроме детерминант структурных компонентов, каждый из

них включает гены эффекторов, из которых наиболее существенными являются деградирующий пептидогликан VgrG3, деполимеризующий и ковалентно связывающий актин VgrG1, порообразователь VasX и липаза TseL [1,7]. Поскольку НАГ-вибрионы на протяжении полувека вызывают кишечные инфекции у людей в Ростовской области, представляет интерес, могут ли они использовать T6SS для реализации патогенетического потенциала. Поэтому мы провели анализ структуры ее генетических детерминант, идентифицированных в полных геномах 19 клинических штаммов, выделенных на данной территории, и одного из Калмыкии, в сочетании с фенотипическим изучением антагонистической активности на моделях *in vitro*.

У всех изученных штаммов был выявлен основной (большой) кластер генов, кодирующих структурные компоненты, однако не для всех удалось собрать полную последовательность входящего в его состав гена *vgrG3*: у 4 штаммов (6, 9798, 950, 19261) он был представлен в контигах лишь частично. Гены *vgrG3* всех остальных штаммов, кроме 912, имели разную длину, отличную от таковой прототипа, и содержали различные вставки/делеции, либо были в разной степени усечены за счет преждевременных стоп-кодонов. Тем не менее, в продуктах этих измененных генов (рис. 1), программой Blastp все же был идентифицирован С-концевой пептидогликан-связывающий домен PBD. Следует отметить, что при детекции кодирующей его последовательности с помощью ПЦР были получены отрицательные результаты. Оказалось, что эти последовательности были изменены настолько, что не узнавались обратным праймером.

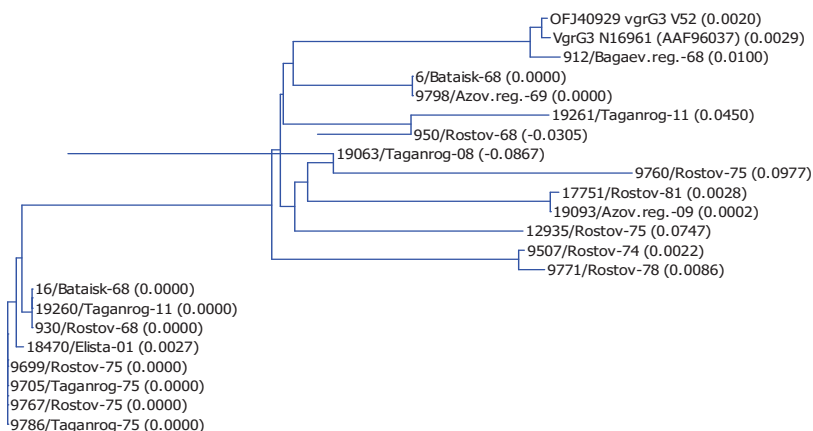


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная по по результатам AlignX-анализа белков VgrG3 20 штаммов НАГ-вибрионов.

Из-за высокой степени гомологии проксимальных участков трех генов *vgrG* (1, 2 и 3) собрать *vgrG1* не представлялось возможным. Исключение составил единственный штамм 12935. Тогда мы провели Blast-поиск

последовательности, кодирующей ключевой актин-связывающий домен ACD (acd-vgrG1) и обнаружили, что она присутствовала в полных геномах всего семи штаммов, что совпало с результатами ПЦР. У них же и еще четырех (лишенных acd-vgrG1) имелся и ген *vasX*, тогда как в остальных геномах не было обнаружено даже небольших фрагментов этой последовательности. Этот ген также был представлен несколькими отличными от прототипа аллелями; соответственно различались и их продукты (рис. 2).

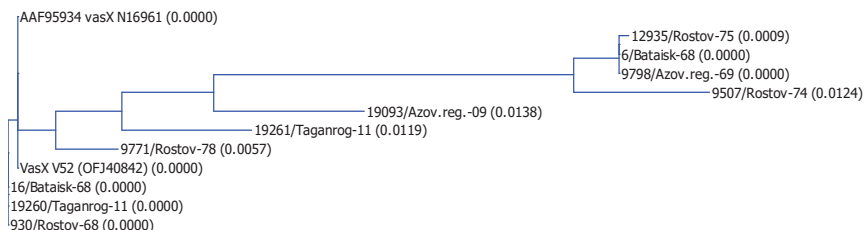


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная по по результатам AlignX-анализа белков VasX 10 штаммов НАГ-вибрионов.

Последовательность, первые 574 п.н. которой на 94-96% гомологичны таковой *tseL*, были выявлены только у трех штаммов, у остальных она вовсе не обнаруживалась. При этом ген *tseL* имел длину 2024 п.н., и его дистальный участок существенно отличался от прототипа (1926 п.н.). Тем не менее, продукты этих генов были идентифицированы программой Blastp как белки семейства липаз и содержали те же домены, что и у прототипа. В NCBI найдены их 99%-ные гомологи (WP_069212757, WP_002043856, EMQ52757). Выявленные нами различия в структуре генов *tseL*, *vasX* и дистального участка *vgrG3* не удивительны, поскольку их вариабельность характерна для холерных вибрионов не только неO1/неO139, но и O1 серогруппы [7].

Из данных литературы известно, что для проявления антагонизма по отношению к модельному организму *Dictyostelium discoideum* (служащих «имитацией» макрофагов) необходимы VasX и VgrG1 [4], а по отношению к бактериям – VasX, VgrG3 и TseL [7], тогда как ACD-VgrG1 не оказывает никакого влияния [3]. Мы провели соответствующие испытания исследуемых штаммов на обоих моделях, как описано в [8]. Результаты представлены на рисунках 3, 4 и в таблице.

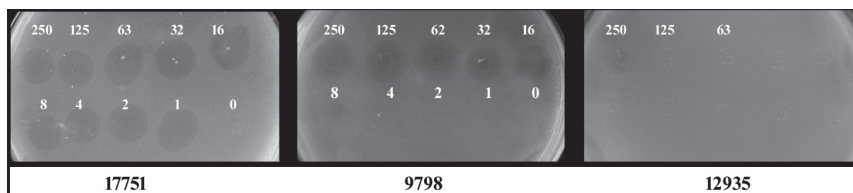


Рисунок 3. Примеры результатов изучения Dictyo-фенотипов исследуемых штаммов НАГ-вибрионов. Цифрами обозначено число спор, нанесенных на чашки.

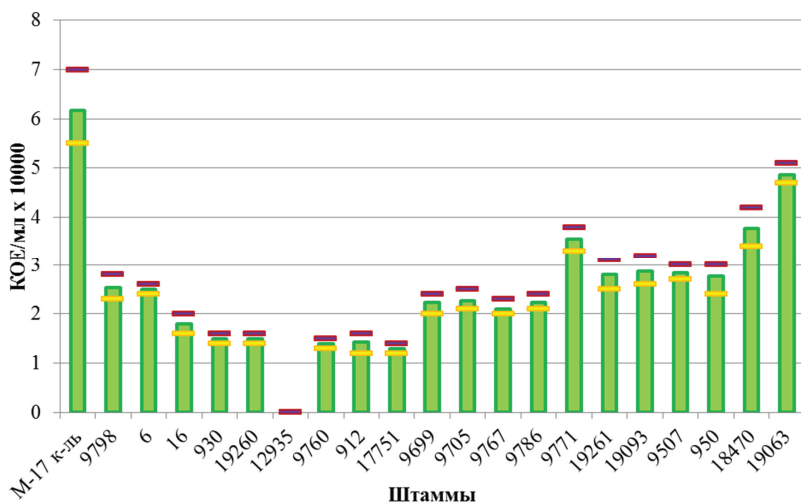


Рисунок 4. Антагонистическая активность 20 штаммов НАГ-вибрионов по отношению к *E.coli* M-17.

Из таблицы можно видеть, что штаммы, содержащие *acd-vgrG1* и *vasX*, обладали выраженным либо умеренным Dictyo^R фенотипом, тогда как у содержащих только *vasX* он был выражен значительно слабее. Это согласуется с данными Miyata S.T. et al. [4], показавшим, что VgrG1 оказывает большее влияние на антагонизм по отношению к *D. discoideum*, чем VasX, однако определенная устойчивость к малым концентрациям амёбы все же сохраняется, а штаммы, лишённые обоих генов, становятся чувствительными. В этом процессе участвует еще и VasK, однако у наших штаммов повреждений кодирующего его гена выявлено не было.

Антагонистическая активность в отношении *E.coli* M-17 у разных штаммов проявлялась неодинаково. Наиболее выраженной она была у штаммов, содержащих все три гена – *tseL*, *vasX* и *vgrG-3*, и практически отсутствовала у штамма 19063, лишённого этих детерминант. Это не противоречит данным Unterweger D. et al. [7], согласно которым мутанты,

содержащие даже один из вышеперечисленных генов, все же убивали кишечную палочку, хотя и менее эффективно, чем исходный штамм V52. Кроме того, бактерицидная активность вибрионов зависит еще от целого ряда факторов, которые мы не учитывали в настоящем исследовании.

Таблица. Dictyo-фенотипы и антимикробная активность НАГ-вибрионов

№	штаммы	Генетические детерминанты					Устойчивость к <i>D. discoideum</i>		Антимикробная активность	
		T3SS	<i>acd-vgrG1</i>	<i>vasX</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>tseL-like</i>	минимальное число спор для образования бляшки	Dictyo-фенотип	Число КОЕ <i>E. coli</i> после инкубации с НАГ-вибрионами в 1 мл (x10 ⁴)	p
	К-ль						1	S	6,17±0,76	0,001
1	9798	-	+	+	+	-	16-32	R	2,53±0,25	0,001
2	6	-	+	+	+	-	16-32	R	2,5±0,1	0,000
3	16	-	+	+	+	-	>250	R	1,8±0,2	0,000
4	930	-	+	+	+	-	>250	R	1,5±0,1	0,000
5	19260	-	+	+	+	-	250	R	1,5±0,15	0,000
6	12935	-	+	+	+	+	250	R	0	0,000
7	9760	+	+	+	+	+	250	R	1,4±0,1	0,000
8	912	-	-	-	+	+	1	S	1,43±0,2	0,000
9	17751	-	-	-	+	-	1	S	1,3±0,1	0,000
10	9699	+	-	-	+	-	1-2	S	2,23±0,21	0,001
11	9705	+	-	-	+	-	1	S	2,27±0,21	0,001
12	9767	+	-	-	+	-	1	S	2,13±0,15	0,000
13	9786	+	-	-	+	-	1-2	S	2,23±0,15	0,000
14	9771	+	-	+	+	-	125	R	3,57±0,25	0,005
15	19261	+	-	+	+	-	62-125	R	2,8±0,3	0,002
16	19093	-	-	+	+	-	62-125	R	2,87±0,31	0,002
17	9507	-	-	+	+	-	125	R	2,83±0,15	0,002
18	950	-	-	-	+	-	1	S	2,77±0,32	0,002
19	18470	+	-	-	+	-	1	S	3,77±0,4	0,009
20	19063	+	-	-	-	-	1	S	4,87±0,21	0,047

Полученные данные позволяют полагать, что далеко не все НАГ-вибрионы используют T6SS для проявления патогенетического потенциала. При этом большинство Dictyo^S вибрионов содержат интактный кластер T3SS (см. табл.), и вполне вероятно, что использование обеих систем «нецелесообразно» с энергетической точки зрения. Из изученных T3SS-

позитивных штаммов только 9760 активно экспрессировал T6SS, однако вопрос о его реальной способности к экспрессии T3SS остается открытым. Это же относится еще к двум лишенным *acd-vgrG1* штаммам (9771, 19261), которые проявляли антагонизм по отношению к *D. discoideum* гораздо слабее. Что касается бактерицидной активности, то на данном этапе нами показана принципиальная возможность использования некоторыми НАГ-вибрионами T6SS против всего одного штамма кишечной палочки, причем в условиях *in vitro*, тогда как для определения спектра чувствительной кишечной микрофлоры необходимы дальнейшие исследования. Активную экспрессию этой системы секреции по двум показателям можно считать доказанной для штаммов, содержащих все четыре последовательности, приведенные в таблице.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Joshi A., Kostiuk B., Rogers A. et al. Rules of engagement: the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* // Trends Microbiol. – 2017. – Vol. 25, No.4. – P.267-279.
2. Ma A.T., Mekalanos J.J. In vivo actin cross-linking induced by *Vibrio cholerae* type VI secretion system is associated with intestinal inflammation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, No.9. – P. 4365-4370.
4. MacIntyre D.L., Miyata S.T., Kitaoka M., Pukatzki S. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system displays antimicrobial properties // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2010. – Vol. 107, No.45. – P.19520-19524.
5. Miyata S.T., Kitaoka M., Brooks T.M. et al. *Vibrio cholerae* requires the type VI secretion system virulence factor VasX to kill *Dictyostelium discoideum* // Infect. Immun. – 2011. – Vol. 79, No.7. – P.2941-2949.
5. Pukatzki S., Provenzano D. *Vibrio cholerae* as a predator: lessons from evolutionary principles // Front. Microbiol. – 2013. – Vol. 4. – P.384.
6. Vezzulli L., Guzmán C.A., Colwell R.R., Pruzzo C. Dual role colonization factors connecting *Vibrio cholerae*'s lifestyles in human and aquatic environments open new perspectives for combating infectious diseases // Curr. Opin. Biotechnol. – 2008. – Vol.19, No.3. P.254-259.
7. Unterweger D., Miyata S.T., Bachmann V. et al. The *Vibrio cholerae* type VI secretion system employs diverse effector modules for intraspecific competition // Nat. Commun. – 2014. – Vol. 5. – P.3549.
8. Zheng J., Ho B., Mekalanos J.J. Genetic analysis of anti-amoebae and anti-bacterial activities of the type VI secretion system in *Vibrio cholerae* // PLoS One. – 2011. – Vol. 6(8). – e23876.

ВЫЯВЛЕНИЕ ШТАММОВ «ГАИТЯНСКОЙ» ГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ INDEL-МАРКЕРА

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П.

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

Расследование вспышек опасных инфекционных заболеваний требует разработки эффективных методик внутривидовой дифференцировки различных штаммов возбудителя. Одним из простых и надежных методов генотипирования с помощью ПЦР является изучение полиморфизма INDEL-маркеров. Так, например, были разработаны схемы INDEL-генотипирования возбудителя туляремии [1], холеры [2-4]. Недавно была предложена схема генотипирования штаммов *Y.pestis* на основе INDEL-маркеров, позволяющая быстро проводить определение биовара с помощью ПЦР [5]. В этом аспекте большое значение представляет поиск генетических маркеров уникальных для отдельных групп штаммов, которые имеют большое эпидемиологическое значение.

Масштабная вспышка холеры на о. Гаити в 2010 году была вызвана штаммами холерного вибриона, имевшими несколько новых точечных мутаций в гене холерного токсина [6]. Разработка методик, позволяющих идентифицировать этот высокопатогенный «гаитянский» тип гена *ctxB7*, позволила оценить дальнейшее распространение штаммов этой группы во всем мире.

Вместе с тем, использование для дифференциации штаммов всего лишь нескольких единичных нуклеотидных замен (SNP) представляет собой определенные сложности, связанные как с трудоемкостью этого процесса, так и с возможностью появления новых нуклеотидных замен, что осложняет трактовку результатов.

В связи с этим **цель** настоящего исследования состояла в целенаправленном поиске генетического INDEL-маркера «гаитянской» группы штаммов, позволяющего проводить надежную идентификацию штаммов этой группы в ПЦР.

Материалы и методы. Для поиска INDEL-маркеров использованы данные полногеномного секвенирования «гаитянских» штаммов *V.cholerae* №№ HC-38A1, HC-06A1, HC-23A1, HC-28A1, HC-43A1, HC-61A1, HC-48B2 и геномы штаммов, изолированных на разных континентах ранее (*V.cholerae* №№ N16961, O395, A186, A60, A217, CRC1106, E506, E1162, M2140, E9120, 16241D, 41D, 169D, 1270D). Для анализа использовали авторское программное обеспечение GeneExpert, PrimerM и VirtualPCR, написанное на языке программирования Java.

Результаты и обсуждение. Первый этап работы состоял в попарном сравнении всех INDEL-маркеров в открытых рамках считывания в геномах штаммов, обусловивших эпидемические осложнения по холере на о. Гаити и имеющих ген *ctxB7* по классификации [6]. По итогам этого этапа для дальнейшего анализа были оставлены INDEL-полиморфизмы стабильные у всех изученных «гаитянских» штаммов.

Второй этап работы заключался в сравнительном анализе INDEL-маркеров, отобранных на первом этапе, с аналогичными маркерами токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных до 2010 года. Это позволило установить, что делеция 8-нуклеотидов в гене VCA1095, расположенном на малой хромосоме и кодирующим *chemotaxis protein CheA*, есть у всех «гаитянских» и отсутствует у всех «не гаитянских» штаммов.

На третьем этапе работы с помощью авторской программы PrimerM нами были сконструированы праймеры (прямой 5'- ccatcagctctgcctctgacac -3', обратный - 5'- ttcgacaatcgtcagtagcg -3'), фланкирующие обнаруженную делецию, что дало возможность выявлять ее в ПЦР. На наш взгляд, использование сконструированных нами праймеров является более простым и надежным методом выявления штаммов «гаитянской» группы по сравнению с секвенированием или аллель-специфичной ПЦР.

Весьма интересным нам представлялось изучение штаммов холерного вибриона, для которых ранее были получены противоречивые результаты при проведении исследования разными группами авторов. Так, например, ранее анализ данных полногеномного секвенирования позволил выявить, что изоляты *V. cholerae* O1 №№ 19187 и 19188, выделенные в 2010 году в Москве, относятся к штаммам «гаитянской группы» [2]. Однако, при анализе с использованием другого набора SNP указанные штаммы попали в группу «непальских штаммов», дистанцированную от штаммов, вызвавших вспышку на о. Гаити [7]. Проведение как виртуальной ПЦР *in silico*, так и ПЦР *in vitro* позволило установить у данных штаммов наличие «гаитянской» делеции в гене VCA1095. В пользу правомочности такого результата свидетельствует наличие гена холерного токсина типа *ctxB7* у данных штаммов, что так же является признаком «гаитянских» штаммов.

Таким образом, в ходе проведенного исследования апробирована методика целенаправленного поиска INDEL-маркеров для выявления заранее известной группы штаммов. Найдена делеция, являющаяся отличительным признаком штаммов, обусловивших эпидемические осложнения по холере на о. Гаити в 2010 году. Сконструированы праймеры и подобраны условия, позволяющие выявлять указанную делецию в ПЦР, что позволило подтвердить принадлежность штаммов *V. cholerae* O1 №№ 19187 и 19188, выделенные в 2010 году в Москве, в «гаитянской» группе.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Larsson P., Svensson K., Karlsson L. et al. Canonical insertion-deletion markers for rapid DNA typing of *Francisella tularensis* // *Emerg Infect Dis.* – 2007. – Vol. 13(11). – P. 1725-32. doi: 10.3201/eid1311.070603.
2. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О. и др. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* - разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* - 2016. - Т. 21, № 3. - С. 146-152.
3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации // *Здоровье населения и среда обитания.* - 2015. - № 5. - С. 41-44.
4. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae* // *Эпидемиология и инфекционные болезни.* - 2017. - Т. 22, № 4. - С. 195-200.
5. Kuttyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L. et al. Phylogeny and Classification of *Yersinia pestis* through the Lens of Strains From the Plague Foci of Commonwealth of Independent States // *Front. Microbiol.* - 2018. - N 9. – P. 1106. doi: 10.3389/fmicb.2018.01106.
6. Safa A., Nair G. B., Kong R. Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // *Trends Microbiol.* – 2010. - N. 18. - P. 46–54. 10.1016/j.tim.2009.10.003.
7. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G. et al. Travel-Associated *Vibrio cholerae* O1 *El Tor*, Russia // *Emerg. Infect. Dis.* – 2016. - 22(11). – P. 2006-2008. doi: 10.3201/eid2211.151727.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СТАБИЛЬНОСТИ ДНК *VIBRIO CHOLERAЕ* В ВОДАХ ЕСТЕСТВЕННЫХ ВОДОЕМОВ

Сорокин Р.А., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Головин С.Н.

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

Важным способом предотвращения заболеваний, позволяющим обеспечить правильное планирование и развертывание противоэпидемических мероприятий, является постоянный мониторинг возбудителя в объектах внешней среды. Существующая на сегодняшний день

система диагностики холеры основана на прямом выделении возбудителя бактериологическим методом. Такой алгоритм включает в себя ряд этапов, требующих значительных затрат времени и труда. Однако, в связи с развитием молекулярной биологии и оснащением учреждений Роспотребнадзора современным оборудованием, появилась возможность использования высокочувствительных молекулярно-генетических технологий. В настоящее время широко применяется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), обладающий высоким уровнем чувствительности, информативности и оперативности. Применение ПЦР-скрининга для анализа выделенных культур повышает эффективность мониторинга вибриофлоры водных объектов за счет оперативного выявления специфических генов *Vibrio cholerae*, возможности целевого поиска патогена в пробе и может быть направлено на сокращение объемов и времени бактериологического анализа.

Совершенно очевидно, что прямой анализ воды поверхностных водоемов методом ПЦР на наличие генов возбудителя холеры позволит ускорить получение ответа при проведении мониторинга [1]. Однако, при трактовке положительных результатов ПЦР в пробах из объектов окружающей среды необходимо учитывать, что присутствие специфических генов холерных вибрионов не означает наличия в указанной пробе жизнеспособных вибрионов. Специфическая ДНК может находиться либо в составе погибших клеток, либо в некультивируемой форме возбудителя, неспособной вызвать заболевание без реверсии в вегетативную форму [2]. Кроме того, нельзя исключить наличие фрагмента генома вибрионов в составе фагов [3]. К тому же использование прямой ПЦР-диагностики объектов окружающей среды требует знания времени сохранения ДНК возбудителя в различных условиях.

Диагностический потенциал метода прямой ПЦР-диагностики можно раскрыть полностью, если наряду с выявлением ДНК проводить выявление специфических РНК, обладающих гораздо меньшим сроком жизни, и поэтому присутим лишь вегетативным, жизнеспособным формам возбудителя.

В доступной литературе содержатся только единичные сведения о сохраняемости в объектах окружающей среды специфической ДНК холерных вибрионов, находящихся в жизнеспособных и погибших клетках. Целью большинства работ является, например, изучение сохранения жизнеспособных клеток и влияние условий культивирования на сроки персистенции холерных вибрионов [4], проведение сравнительного анализа выживаемости различных по генотипам штаммов *in vitro* и *in vivo* [1,5] и т.п. Поэтому проблема сохранения нуклеиновых кислот возбудителя холеры в объектах окружающей среды требует изучения.

Цель работы заключалась в определении устойчивости генетического материала *V. cholerae*, находящегося в жизнеспособных и погибших клетках в водной среде естественных водоемов.

Материалы и методы. В данной работе был использован штамм *V. cholerae* O1 5879. Для проведения эксперимента были отобраны пробы воды из следующих источников: река Темерник, река Дон (р-н Кумженской рощи), река Свислочь (Республика Беларусь), Черное море (бухта Абрау, Краснодарский край), родник (место выхода грунтовых вод, Ворошиловский район г. Ростова-на-Дону). Пробы воды, отобранные в стерильную тару, хранили при температуре +4°C.

Исследования проводили на модели штамма *V. cholerae* биовара O1 5879, культивируемого при температуре 37°C на агаре Мартена. Через 12 часов из полученных колоний приготовили две взвеси $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. В качестве стандарта мутности использовали отраслевой стандартный образец ОСО 42-28-59-86П. Для получения погибших клеток суспензию обработали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01 %), затем прогревали при 56°C в течение 30 минут. Гибель клеток при воздействии мертиолята натрия подтвердили путем бактериологического посева. При электронно-микроскопическом изучении данного образца установлена морфологическая целостность погибших вибрионов.

В стерильные флаконы объемом 100 мл внесли по 50 мл воды из каждого источника. Бактериальные взвеси живых и погибших клеток вносили в подготовленные флаконы с пробами воды до концентрации $1 \cdot 10^9$ КОЕ/мл. В различные интервалы времени из микрокосмов отбирали пробы в объеме 100 мкл для выделения ДНК с использованием коммерческого набора «Проба-НК» согласно инструкции производителя. Определение специфической ДНК возбудителя холеры определяли в ПЦР в формате реального времени с праймерами и зондом к гену *hlyA* холерного вибриона [6,7].

Результаты и обсуждение. Полученные данные по стабильности сохранения ДНК, находящихся в жизнеспособных и погибших клетках *V. cholerae* на модели воды из разных природных источников, представлены в таблице 1.

Полученные данные говорят о том, что погибшие клетки вибрионов могут длительное время сохраняться в окружающей среде без значительной деградации специфической ДНК. На наш взгляд, исследование проб воды на наличие возбудителя холеры целесообразно сочетать с обнаружением специфической РНК, свойственной только жизнеспособным клеткам.

Интересным феноменом является более длительное сохранение ДНК в бактериях погибших вследствие обработки мертиолятом натрия. Возможно этот феномен «консервации ДНК» обусловлен инактивацией гидролитических ферментов клетки под воздействием иона тяжелого металла. Этот феномен следует учитывать при трактовке результатов анализа специфической ДНК в пробах окружающей среды, загрязненных промышленными стоками, содержащих ионы тяжелых металлов.

Таблица 1. Динамика содержания специфической ДНК гена *hlyA* *V. cholerae* в составе живых и погибших клеток в моделированных микрокосмах (в процентах от исходного количества, внесенного в пробу)

Объект изучения	% остаточного содержания ДНК после инкубации												
	1	3	5	7	9	11	13	15	19	23	25	31	35
р. Темерник (живые клетки)	100	91	78	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
р. Темерник (мертвые клетки)	100	55	33	21	12	16	11	3	2	-	2	-	-
р. Свислочь (живые клетки)	100	90	77	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-
р.Свислочь (мертвые клетки)	100	54	151	75	17	15	41	34	23	11	17	16	17
река Дон (живые клетки)	100	112	150	30	2	1	1	1	-	-	-	-	-
река Дон (мертвые клетки)	100	79	79	24	41	19	42	24	22	3	8	9	12
родник (живые клетки)	100	114	148	70	12	-	1	-	-	-	-	-	-
родник (живые клетки)	100	49	32	14	12	9	2	7	14	19	12	2	3
Черное море (живые клетки)	100	113	160	165	147	60	4	3	2	1	1	-	1
Черное море (мертвые клетки)	100	86	90	76	48	70	47	62	25	10	10	9	5

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Миронова Л.В. Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга: Автореф. дис... докт. биол. наук. - Иркутск, 2017. - 46 с.
2. Colwell R.R., Seidler R.J., Kaper J. et al. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype O1 in Maryland and Louisiana estuaries // Appl. Environ. Microbiol. - 1981. - Vol. 41, № 2. - P. 555 - 558.
3. Faruque S.M., Asadulghani, Alim A.R. et al. Induction of the Lysogenic Phage Encoding Cholera Toxin in Naturally Occurring Strains of Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 // Infection and Immunity. - 1998. - Vol. 66, № 8. - P. 3752 - 3757.
4. Титова С.В., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М. и др. Влияние условий культивирования на сроки персистенции и некоторые свойства холерных вибрионов // Проблемы ООИ - 2016. - Вып. 3. - С. 76 - 80.
5. Заднова С.П., Кульшань Т.А., Челдышова Н.Б. и др. Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара эль тор in vitro и in vivo // Проблемы ООИ. - 2015. - Вып. 4. - С. 65-69.
6. Lyon W.J. TaqMan PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, Non-O1, and Non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater // Appl. Environ. Microbiol. - 2001 - Vol. 67, № 10. - P. 4685 - 4693.

7. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С. и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // ЗНИСО. - 2017. - № 3 (288). - С. 51-54.

ДЕТЕКЦИЯ И ПЕРЕНОС SXT-ЭЛЕМЕНТА У ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ

Селянская Н.А., Водопьянов С.О.

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

Среди известных механизмов антибиотикорезистентности основная роль в формировании устойчивости к антибактериальным препаратам у бактерий принадлежит мобильным генетическим образованиям (ICE). Интегративные конъюгативные элементы SXT представляют собой подвижные линейные участки ДНК, которые могут интегрироваться в бактериальный геном и переноситься посредством конъюгации. Они способны включать гены, кодирующие многие функции: от устойчивости к лекарственным средствам до биопленкообразования и репарации ДНК. Полученные в последние годы данные свидетельствуют о широком распространении SXT-элементов у холерных вибрионов различных серогрупп [1-4].

Целью данной работы явилось обнаружение SXT-элемента в холерных вибрионах O1 и не O1/ не O139 серогрупп и изучение его конъюгативного переноса из клеток *Vibrio cholerae* в клетки *Escherichia coli*.

Материалы и методы. В работе использовали множественноустойчивые штаммы *V. cholerae* O1 El Tor (3 штамма) и *V. cholerae* nonO1/nonO139 (3 штамма), выделенные на территории РФ, а также *V. cholerae* O1 El Tor 5879 и *E. coli* QD 5003 Rif. Все штаммы получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Чувствительность / устойчивость штаммов к 22 антибактериальным препаратам определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде в соответствии с МУК 4.2.2495-09 [5].

Конъюгативную передачу г-детерминант резистентности в составе SXT от штаммов-доноров клеткам штаммов-реципиентов осуществляли путем совместного культивирования 18-часовых бульонных культур штамма-донора и штамма-реципиента (в соотношении 1:2) в течение 3-4 ч при 37°C с последующим высевом на плотные питательные среды, содержащие

антибактериальные препараты для селекции трансконъюгантов и контрселекции донора. Частоту передачи подсчитывали отношением числа выросших трансконъюгантов к общему числу живых бактерий, использованных для посева. Выделение ДНК, проведение ПЦР и учет результатов проводили, как описано ранее [6]. В качестве маркера для обнаружения SXT в штаммах использовался ген интегразы *int* [7]. Для подтверждения переноса генов антибиотикорезистентности трансконъюганты тестировали на чувствительность к антибиотикам и с помощью ПЦР [8].

Результаты исследования. Штаммы холерных вибрионов, взятые в исследование, обладали устойчивостью к левомицетину, триметоприму/сульфаметоксазолу, налидиксовой кислоте, фуразолидону и стрептомицину в разных сочетаниях (таблица).

Сравнительное изучение антибиотикограмм доноров, реципиентов, R⁺-трансконъюгантов показало, что в опытах конъюгации от *V. cholerae* к *E. coli* QD 5003 *Rif*^r и обратно к *V. cholerae* O1 El Tor 5879 *Nal*^r с частотой $2,1 \times 10^{-9}$ - $7,1 \times 10^{-9}$ происходила передача маркеров устойчивости к левомицетину, триметоприму/сульфаметоксазолу, стрептомицину, при отсутствии передачи устойчивости к налидиксовой кислоте и фуразолидону.

Детекция генов антибиотикорезистентности выявила, что фенотипическая устойчивость штаммов к триметоприму/сульфаметоксазолу коррелировала с наличием в них генов устойчивости *dfrA1*. Ген устойчивости к левомицетину (*floR*) был обнаружен в четырех штаммах холерных вибрионов (*V. cholerae* O1 El Tor 19667, 19241, 19242; *V. cholerae* nonO1/nonO139 372), однако фенотипом левомицетинорезистентности обладал лишь штамм *V. cholerae* O1 El Tor 19667. Генов устойчивости к тетрациклину в исследованных штаммах не обнаружено. В экспериментах, проведенных нами ранее, было показано, что устойчивость к левомицетину и тетрациклину у холерного вибриона может не проявляться фенотипически даже при наличии в геноме генов резистентности к этим препаратам [9]. Гены *floR* передавались в опытах конъюгации клеткам *E. coli* QD 5003 *Rif*^r и в обратных кроссах к *V. cholerae* O1 El Tor 5879 *Nal*^r.

Также выявлено наличие генов устойчивости к фторхинолонам (*qnr*) в штаммах *V. cholerae* nonO1/nonO139 375 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 117, которые не передавались трансконъюгантам. В литературе описаны трансферабельные гены *qnr*, расположенные в SXT-элементе холерного вибриона [10], однако в нашем эксперименте в этих штаммах не был обнаружен ген интегразы (*int*), что может свидетельствовать либо об отсутствии SXT, либо о наличии нового типа этой генетической структуры, как было показано в предыдущих исследованиях [6, 11]. Остальные штаммы *V. cholerae*, взятые в исследование, содержали ген *int*, который передавался клеткам *E. coli* QD *Rif*^r и в обратных кроссах *V. cholerae* O1 El Tor 5879 *Nal*^r.

Таблица. Способность маркеров резистентности штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и *V. cholerae* nonO1/nonO139 к трансмиссивной передаче *E. coli* QD₅₀₀₃ *Rif*

Штаммы микроорганизмов	Фенотипы*	Частота передачи	Гены**				
			<i>qnr</i>	<i>dfrA1</i>	<i>floR</i>	<i>tet</i>	<i>int</i>
Реципиент <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i>	<i>Rif</i>	-	-	-	-	-	-
Донор <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 372	<i>Nal^rTmp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> +R ₃₇₂	<i>Rif^rTmp/Smz</i>	2,1×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 375	<i>Fur^rSm Tmp/Smz</i>	-	+	+	-	-	-
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₃₇₅	<i>Rif^rSm Tmp/Smz</i>	2,5×10 ⁻⁹	-	+	-	-	-
Донор <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 117	<i>Fur^rSm Tmp/Smz</i>	-	+	+	-	-	-
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₁₇	<i>Rif^rSm Tmp/Smz</i>	3,8×10 ⁻⁹	-	+	-	-	-
Донор <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19242	<i>Nal^rFur^rSmTnp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₂₄₂	<i>Rif^rSm Tmp/Smz</i>	4,1×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19667	<i>Nal^rFur^rSmCm Tmp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₆₆₇	<i>Rif^rCmTnp/SmzSm</i>	3,3×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19241	<i>Nal^rFur^rSmTnp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₂₄₁	<i>Rif^rCmTnp/SmzSm</i>	2,5×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Реципиент <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i>	<i>Nal^r</i>	-	-	-	-	-	-
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₃₇₂	<i>Rif^rTmp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₃₇₂	<i>Nal^rTmp/Smz</i>	4,8 × 10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₃₇₅	<i>Rif^rSm Tmp/Smz</i>	-	-	+	-	-	-
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₃₇₅	<i>Nal^rSm Tmp/Smz</i>	3,2×10 ⁻⁹	-	+	-	-	-
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₁₇	<i>Rif^rSm Tmp/Smz</i>	-	-	+	-	-	-
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₁₁₇	<i>Nal^rSm Tmp/Smz</i>	4,1×10 ⁻⁹	-	+	-	-	-
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₂₄₂	<i>Rif^rSmTnp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₁₉₂₄₂	<i>Nal^rSmTnp/Smz</i>	6,0×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₂₄₁	<i>Rif^rSmTnp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₁₉₂₄₁	<i>Nal^rSmTnp/Smz</i>	2,8×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+
Донор <i>E. coli</i> QD <i>Rif</i> + R ₁₉₆₆₇	<i>Rif^rCmSmTnp/Smz</i>	-	-	+	+	-	+
Трансконыюгант <i>V. cholerae</i> O1 El Tor 5879 <i>Nal^r</i> + R ₁₉₆₆₇	<i>Nal^rCmSmTnp/Smz</i>	7,1×10 ⁻⁹	-	+	+	-	+

Примечание: * – маркеры устойчивости: *Nal^r* – к налидиксовой кислоте, *Rif^r* – к рифампицину, *Sm* – к стрептомицину, *Cm* – к левомицетину, *Tmp/Smz* – к триметоприму/сульфаметоксазолу; ** – гены: *int* – интегразы, *qnr* – устойчивости к фторхинолонам, *dfrA1* – устойчивости к триметоприму, *floR* – устойчивости к левомицетину, *tet* – устойчивости к тетрациклину; «+/-» – наличие либо отсутствие признака.

Таким образом, обнаружение *SXT*-элемента в изученных штаммах *V. cholerae* и его успешный горизонтальный перенос подчеркивает необходимость детекции таких мобильных генетических элементов для контроля над распространением антибиотикорезистентности у *V. cholerae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Подшивалова М.В., Захарова И.Б., Лопастейская Я.А. и др. Молекулярная детекция ICEs элементов семейства SXT/R 391 в штаммах *Vibrio cholerae*, выделенных на территории РФ // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2014. - № 25. – С.152-154.
2. Захарова И.Б., Кузютина Ю.А., Подшивалова М.В. и др. Детекция и анализ интегративных конъюгативных элементов в штаммах *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2016. - Т. 6, № 21. – С. 347-351.
3. Замарин А.А., Захарова И.Б., Подшивалова М.В. и др. Характеристика интегративных конъюгативных элементов штаммов нехолерных вибрионов, выделенных на территории Волгоградской области // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. - 2016. – Т. 58, № 2. - С. 104-106.
4. Водопьянов С.О., Водопьянов А. С., Олейников И.П., Титова С.В. Распространенность ICE элементов различных типов у *V. cholerae* // Здоровье населения и среда обитания. - 2018. - № 1 (298). - С. 33-35.
5. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: МУК 4.2.2495-09. – М., 2010. – 59 с.
6. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. - № 5 (266). - С. 41-44.
7. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Colombo M.M. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants // J. Microbiol. Methods. – 2012. – Vol. 88, №1. – P. 98-102.
8. Крицкий А.А., Челдышова Л.Б., Заднова С.П. и др. Способ одновременного выявления штаммов *Vibrio cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в режиме реального времени. // Биотехнология. – 2018. - Т.34, №2. - С. 70-72.
9. Селянская Н.А., Рыжко И.В., Веркина Л.М. и др. Индукция in vitro трансмиссивной устойчивости к тетрациклину, левомицетину и ампициллину у культур *Vibrio cholerae* не O1/ не O139 серогрупп, выделенных в 1990-2005 гг. // Антибиотики и химиотерапия. - 2011. - Т. 56, №7-8. - С.16-21.
10. Kim H.B., Wang M., Ahmed S. et al. Transferable Quinolone Resistance in *Vibrio cholerae* Antimicrob. ag. chemother. – 2010. – Vol. 54 (2). –

11. Ceccarell D., Spagnoletti M., Hasan N.A. et al. A new integrative conjugative element detected in Haitian isolates of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 // *Res Microbiol.* – 2013. – Vol.164, №9. – P. 891–893.

РАЗРАБОТКА СХЕМЫ ПОЛНОГЕНОМНОГО МУЛЬТИЛОКУСНОГО СИКВЕНС-ТИПИРОВАНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ*

Бочалгин Н.О., Миронова Л.В., Беляева А.С., Балахонов С.В.

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

Арсенал методов идентификации патогенных микроорганизмов значительно расширился за последнее время. В первую очередь это связано с уменьшением стоимости и увеличением качества высокопроизводительного секвенирования. Во вторую очередь это определяется распространением эффективных подходов к динамической обработке полногеномных последовательностей и накоплением обширных баз данных структур и функций биополимеров. Классические методы генотипирования микроорганизмов (PFGE, MLST, MLVA) не только не утратили своей актуальности, но получают новое осмысление в свете достижений постгеномного этапа развития биологической науки.

Будучи удобным инструментом, генерирующим наглядные данные об исследуемых изолятах, классическое мультилокусное сиквенс-типирование долгое время оставалось в большой степени зависимым от объекта исследования. Даже для генетически разнообразного вида *Vibrio cholerae* схемы MLST, основанные на анализе 7–9 генов домашнего хозяйства, в определенный момент исчерпывают свою разрешающую способность. Логичным усовершенствованием MLST является расширение количества генов, по которым происходит типирование. В настоящее время для работы используется мультилокусное сиквенс-типирование на основе корового генома (core genome MLST – cgMLST), общего для большей части штаммов выборки (от 95% до 100%). Вариантом реализации данного подхода является wgMLST (whole genome MLST), при котором анализируется пангеном исследуемой популяции.

Несмотря на очевидное удобство для исследований в области эпидемиологии, простоту стандартизации подхода и небольшие, по сравнению с другими методами филогенетического анализа, вычислительные

затраты, далеко не для всех патогенных микроорганизмов разработаны и опубликованы базы данных локусов cgMLST. Портал <https://www.cgmlst.org> предлагает обширные курируемые схемы для 13 патогенов, среди которых *Mycobacterium tuberculosis/bovis/africanum/canettii*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Francisella tularensis* и др.; портал <https://enterobase.warwick.ac.uk> поддерживает схемы типирования для 7 патогенов: *Salmonella*, *Escherichia/Shigella*, *Yersinia*, *Helicobacter*, *Clostridioides*, *Vibrio* и *Moraxella*, однако, для анализа доступны только первые пять из них, качество данных и количество проанализированных штаммов остальных двух, по мнению авторов сайта, недостаточны для их опубликования.

Цель работы: разработка схемы cgMLST для углубленной идентификации холерного вибриона.

В работе проанализированы полногеномные последовательности 50 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы и R-варианта, выделенных при различных эпидемических ситуациях из клинического материала и объектов окружающей среды на территории Сибири и Дальнего Востока. Выделение тотальной ДНК проводили набором QIAGEN DNeasy Blood & Tissue Kit в соответствии с протоколом для грам-отрицательных микроорганизмов. Секвенирование выполнено на платформе illumina MiSeq, библиотеки подготовлены с использованием набора Nextera XT DNA Library Preparation Kit согласно инструкции производителя. Сборку ридов в контиги проводили при помощи геномного ассемблера SPAdes v.3.13.0, аннотацию последовательностей осуществляли в программе Prokka v.1.12. Для создания схемы типирования извлечение и анализ пангенома и пула коровых генов проводили с использованием программы Roary v.3.12 и языка программирования R [1].

Непосредственно для проведения аллельного профилирования штаммов использовались специализированные модули программных комплексов chewBBACA v.2.0.17 и MentaLiST, в основе которых лежат алгоритмы выравнивания BLAST [3, 5].

Для визуализации филогенетических взаимоотношений между штаммами и оценки соответствия результатов применяемых подходов эпидемиологическим данным были сконструированы MST-деревья на основе алгоритма goeBURST v.3 в программе Phylloviz v.2.0.

Для дополнительной проверки исследуемой выборки и схем типирования построена филогенетическая сеть расщепления [2].

В работе проведено сравнение двух подходов к cgMLST: полноценный программный конвейер chewBBACA и программа для определения аллельных вариантов MentaLiST в комбинации с R- и bash-скриптами [3].

Немаловажным фактором в cgMLST является база данных аллельных

вариантов, а точнее, ее размер и разнообразие. Так, с ростом числа проанализированных штаммов, растет точность типирования вновь исследуемых изолятов. Как было упомянуто выше, в настоящее время не существует глобальной базы данных, пригодной для типирования микроорганизмов рода *Vibrio* и холерного вибриона, в частности. В связи с этим, на первом этапе создавался локальный набор выравниваний открытых рамок считывания, относящихся к пангеному исследуемой выборки. Против этого набора, являющегося базой данных, в последующем, на этапе аллельного профилирования, происходит выравнивание штаммов с присвоением аллельного профиля, соответствующего порядковым номерам конкретных вариантов генов.

Для построения пангенома модуль `chewBBACA CreateSchema` использует возможности `Prodigal` (PROkaryotic DYnamic programming Gene-finding ALgorithm – алгоритм динамического программирования для поиска генов прокариот) с дальнейшим множественным выравниванием `clustalw` [4]. В результате его работы обнаружено 5647 открытых рамок считывания (ОРС), из которых 1797 сверхконсервативны (т. е., в популяции представлены одной аллелью) и 45 локусов значительно вариабельны по длине. В работе на текущем этапе использовались достаточно строгие параметры для определения принадлежности ОРС к коровому геному: к анализу принимались только гены, присутствующие у 100% изолятов, что определило размер корового генома при данном подходе в 2612 локусов.

`MentaLiST` в качестве базы данных потенциально может использовать любой предоставленный ему набор выравниваний. Данная задача была решена с использованием программного конвейера `Roary`, который, помимо непосредственно базы данных, на выходе предоставляет данные для анализа пангенома с возможностью корректировки списка генов-кандидатов в коровый геном. При этом подходе пангеном составил 7073 ОРС, 1670 из которых представлены одной аллелью в популяции. В коровый геном в этом случае вошли 2698 локусов.

Значительные различия в величине пангеномов и незначительные различия в количестве коровых генов, определенных `chewBBACA` и `Roary`, объясняются инструментами, лежащими в основе данных программ [1, 5]. Стоит отметить, что недостатком обоих подходов является высокий уровень шума в выходных данных, недопустимый для построения минимальных остовных деревьев и наглядной визуализации `cgMLST`. Решение данной проблемы и финализирование схемы осуществлялось средствами `R`- и `bash`-скриптов.

При использовании `chewBBACA` для проведения `cgMLST` выборка исследуемых штаммов разделилась на 49 сиквенс-типов (СТ) (Рис. 1), 2 штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенные из поверхностных водоемов г. Иркутска в 2017 году, были отнесены к 5 сиквенс-типу, каждый из оставшихся 48 изолятов обладает уникальным аллельным профилем.

MentaLiST кластеризовал изоляты в 41 сиквенс-тип (Рис. 2): 2 нетоксигенных штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенные из поверхностных водоемов г. Иркутска в 2017 году были отнесены к четвертому сиквенс-типу; 3 токсигенных штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенные от людей, и один токсигенный штамм *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенный из воды поверхностного водоема во время вспышки в 1999 году в Южно-Сахалинске, были отнесены к 14 сиквенс-типу; 4 токсигенных штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенные в 1999 году от людей во Владивостоке и Уссурийске, и один токсигенный штамм *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенный во Владивостоке из морской воды тогда же, сформировали 18 СТ. 2 штамма *V. cholerae* R-варианта, выделенные в 1990 году из поверхностных водоемов гг. Уссурийск и Находка, сформировали 33 сиквенс-тип. Остальные 37 штаммов имели уникальный СТ.

Важно отметить, что в ситуации, где аллельный вариант приписывается каждый раз, когда гены различаются хотя бы по одному нуклеотиду, существенно возрастает разрешающая способность метода, и есть риск получить избыточные ветвления остоного дерева. В соответствии с рекомендациями данное ограничение можно обойти, если принимать во внимание не только и не столько принадлежность группы штаммов к одному СТ, но дистанцию между кластерами плотно расположенных изолятов, хотя последнее все же менее информативно.



Рисунок 1. Минимальное остовное дерево, построенное по результатам cgMLST, проведенного в chewBBACA.

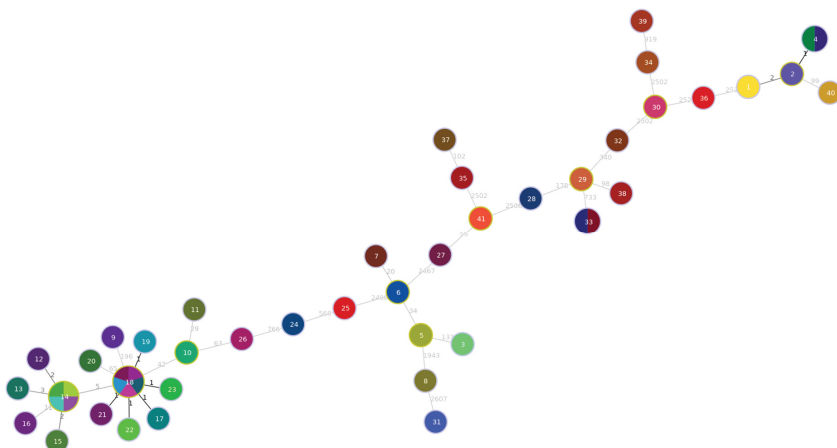


Рисунок 2. Минимальное остовное дерево, построенное по результатам cgMLST, проведенного в MentaLiST.

Результаты сопоставления эпидемиологических данных с расщепленной филогенетической сетью и cgMLST говорят о преимуществе подхода с применением MentaLiST, поскольку в этом случае в большей степени прослеживается временная и территориальная приуроченность группировки штаммов на сиквенс-типы. К тому же, информация об основных подгруппах и узлах ветвления подтверждается данными анализа филогенетической сети NeighbourNet, построенной для данной выборки штаммов [2].

Таким образом, проведенный анализ позволяет заключить, что применение MentaLiST для разработки схемы cgMLST *V. cholerae* наиболее эффективно, поскольку результаты кластеризации штаммов согласуются с эпидемиологическими характеристиками и подтверждаются данными дополнительных методов филогенетического анализа. В перспективе необходимо более детальное исследование корового генома холерного вибриона с оценкой информативности отдельных локусов в схеме типирования для совершенствования подходов к cgMLST *V. cholerae*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., Wong V.K., Reuter S., Holden M.T.G., Fookes M., Falush D., Keane J.A., Parkhill J. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis // Bioinformatics. – 2015. – Vol. 31, № 22. - P. 3691–3693.

2. Bryant D., Moulton V. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks // Mol. Biol. and Evol. – 2004. – Vol. 21, № 2. P. 255–265

3. Feijao P., Yao H., Fornika D., Gardy J., Hsiao W., Chauve C., Chindelevitch L. MentaLiST – A fast MLST caller for large MLST schemes // Microbial Genomics. – 2018. – Vol. 4, № 2

4. Hyatt D., Chen G.L., Locascio P.F., Land M.L., Larimer F.W., Hauser L.J. Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification // BMC Bioinf. – 2010. – Vol.11. P. 119

5. Silva M., Machado M., Silva D., Rossi M., Moran-Gilad J., Santos S., Ramirez M., Carriço J. chewBBACA: A complete suite for gene-by-gene schema creation and strain identification // M. Gen. – 2018. – Vol. 4, № 3

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ БИОПЛЕНКООБРАЗОВАНИЯ У ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

Гладких А.С., Федотова И.С., Миронова Л.В.

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

Vibrio cholerae, этиологический агент пандемического особо опасного инфекционного заболевания холеры, способен развиваться в двух различных экологических нишах: кишечнике человека и водной среде. Одним из ключевых факторов выживания и длительной персистенции *V. cholerae* в окружающей среде служит способность микроорганизма образовывать биопленки, представляющие собой конгломерацию микробных клеток, погруженных в полисахаридный матрикс, коим для *V. cholerae* является вибриоидный экзополисахарид (VPS) [1]. Продуктируемые патогенами в составе биопленок гликополисахариды обладают защитным эффектом от воздействия неблагоприятных факторов, что приводит к смене фенотипа в популяции, т.е. она переходит в гетероморфизм, характеризующийся сниженным метаболизмом, что объясняет феномен персистенции в организме восприимчивых животных и окружающей среде [2,3]. Этапы жизненного цикла патогенных бактерий, в их числе и *V. cholerae*, а также регулирующие молекулярные механизмы формирования биопленок, начиная с процесса адгезии до образования плотных агрегатов, изучены недостаточно.

В нашем исследовании предпринята попытка изучения молекулярных

механизмов биопленкообразования в динамике у штаммов *V. cholerae* разных серогрупп. Изучение процесса биопленкообразования штаммов *Vibrio cholerae* было осуществлено путем сравнения морфологии биопленок в динамике, оценкой экспрессии структурных и регуляторных генов, а также их белковых спектров. В исследование были взяты семь штаммов, выделенные из различных водоемов Сибири и Дальнего Востока в рамках мониторинга вибриофлоры: *V. cholerae* O1-серогруппы 137-17-Б (Забайкальский край, г. Борзя, р. Борзя); *V. cholerae* O1-серогруппы 1-17 (Иркутская область, г. Иркутск, р. Ушаковка); *V. cholerae* R-варианта 102-16-Н (Приморский край, г. Находка, оз. Соленое); *V. cholerae* R-варианта 156-16-Н (Приморский край, г. Находка, оз. Соленое); *V. cholerae* R-варианта И-1426 (Приморский край, г. Находка, р. Литовка); *V. cholerae* не O1/O139-серогруппы 25-13 (Иркутская область, г. Иркутск, р. Ушаковка) и *V. cholerae* не O1/O139-серогруппы 77-17 (Иркутская область, г. Иркутск, р. Ушаковка). Штаммы культивировали на жидкой питательной среде (1% пептонная вода) при 37°C, изучение морфологии и динамики формирования биопленок на границе раздела фаз вода-воздух проводили в эксперименте, учитывая результат через 6, 24, 48 и 72 ч. В качестве маркерных были выбраны два структурных (*vpsA*, *vpsL*) и два регуляторных гена (*vpsR*, *vpsT*), участвующих в синтезе вибриоидного полисахарида (VPS) [4,5]. Экспрессию изучали методом ПЦР в режиме реального времени, в качестве референсного использовали ген *gyrA*, кодирующий синтез гиразы, для оценки изменения экспрессии был использован метод 2^{-ΔΔCT} [6]. Получение пептидных спектров проводили методом масс-спектрометрии MALDI-ToF на приборе MALDI Biotyper Microflex (Bruker Daltonics, Германия), анализ спектров исследуемых штаммов проводили в программе Mass-Up 1.0.13.

Исследование морфологии и скорости формирования биопленок штаммов *V. cholerae* разных серогрупп выявило ряд особенностей. Так, штаммы *V. cholerae* O1-серогруппы и R-варианта образовывали видимую биопленку уже через 6 часов от начала эксперимента с последующим наращиванием биомассы. В свою очередь штамм *V. cholerae* не O1/O139 25-13 не сформировал устойчивой биопленки даже спустя 72 часа, тогда как у другого штамма не O1/O139-серогруппы (*V. cholerae* не O1/O139 77-17) суховатая, плотная, неоппадающая, зрелая биопленка была образована через 24 ч. Биопленкообразование штаммов *V. cholerae* R-варианта протекало быстрее, в отличие от штаммов O1- и не O1/O139-серогрупп, при этом биопленка была более упругой и плотной.

В ходе эксперимента были отмечены изменения экспрессии генов синтеза полисахаридов всех изучаемых штаммов. Анализ полученных результатов выявил, что у штаммов O1-серогруппы и R-вариантов в наибольшей степени экспрессировались структурные гены (*vpsA* и *vpsL*). У штаммов не O1/O139 серогруппы колебания экспрессии генов *vpsA*, *vpsL*, *vpsR* были незначительными, при этом наибольшая экспрессия наблюдалась

у гена *vpsA*, максимальное значение экспрессии в клетках наблюдалось через 6, 48 и 72 часа. Уровень изменения экспрессии изученных генов для штаммов R-варианта не превышал 4,5 раз, в то время как экспрессия у штаммов O1 серогруппы *vpsA* достигала 60-кратного увеличения по сравнению с исходным значением. У штамма *V. cholerae* не O1/O139 25-13 серогруппы гены *vpsA* и *vpsL* не претерпели изменения экспрессии в ходе эксперимента, что коррелирует с отсутствием плотной сформированной биопленки в эксперименте.

Гены-регуляторы биопленкообразования *vpsR*, *vpsT* также испытывали изменения экспрессии в ходе эксперимента, формы кривых структурных и регуляторных генов коррелировали. У пяти штаммов в наименьшей степени экспрессировался ген положительной регуляции *vpsR*, у двух других – ген *vpsT*, регулирующий активацию транскрипции оперона *vps*-II. К концу эксперимента у четырех штаммов наблюдалось снижение уровня экспрессии генов *vpsT*, *vpsA*, *vpsL*. У штаммов *V. cholerae* не O1/O139 25-13 и *V. cholerae* не O1/O139 77-17 экспрессия генов *vpsR*, *vpsA*, *vpsL* на всем протяжении эксперимента почти не менялась. Через 24 ч у штамма *V. cholerae* R-варианта 102-16-Н биопленка была полностью сформирована, в связи с чем, отмечалась репрессия изучаемых генов в дальнейших точках эксперимента.

Масс-спектрометрический профиль исследуемых пептидов в диапазоне 2-20 кДа показал зависимость белкового спектра штаммов в большей степени от времени культивирования, нежели от принадлежности к серогруппе. На основании масс-спектрометров штаммы были объединены в кластеры согласно времени отбора проб (0, 6, 24, 48, 72 ч).

Таким образом, показаны различия в морфологии и динамике формирования биопленок, прослежены закономерности изменения экспрессии генов синтеза вибриоидного полисахарида у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп. Изучены изменения в пептидных спектрах штаммов при биопленкообразовании. Полученные данные расширяют представление об адаптивной вариабельности штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор и молекулярных механизмах образования биопленок. В дальнейшем планируется изучение вариабельности генных детерминант, участвующих в биопленкообразовании, в составе геномов штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fernandez-Delgado, M. Biofilm formation of *Vibrio cholerae* on stainless steel used in food processing / M. Fernandez-Delgado, H. Rojas, Z. Duque et al. // Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. – 2016. – Vol. 58, № 47. – <http://dx.doi.org/10.1590/S1678-9946201658047>
2. Павлова, И.Б. Атлас морфологии популяций патогенных

бактерий / И.Б. Павлова, Е.М. Ленченко, Д.А. Банникова. М.: Колос, 2007.

3. Мальцев, С.В., Что такое биопленки? / С.В. Мальцев, Г.Ш. Мансурова // Практическая медицина. – 2011. – № 5. – С. 5–10.

4. 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. // Nature Reviews Microbiology. – 2015. – № 13. – P. 255–268.

5. Zamorano-Sanchez, D. Identification and characterization of VpsR and VpsT binding sites in *Vibrio cholerae* / D. Zamorano-Sanchez, J.C. Fong, S. Kilic et al. // Journal of Bacteriology. – 2015. – V. 197, № 7. – P. 1–50.

6. Rao, X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis / X. Rao, X. Huang, Z. Zhou et al. // Biostat Bioinforma Biomath. – 2013. – № 3 (3). – P. 71–85.

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ КАВКАЗА В ПЕРИОД С 1970 ПО 1998 ГОДЫ

Бобрышева О.В., Шапаков Н.А., Ковалев Д.А., Писаренко С.В.,
Кузнецова И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Ульшина Д.В., Сирица Ю.В.,
Жиров А.М., Куличенко А.Н.

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
Россия, г. Ставрополь*

Введение. Возбудитель холеры (*Vibrio cholerae*) вызывает особо опасное острое инфекционное заболевание с водянистой диареей, рвотой и нарушением водно-электролитного баланса, относящееся к инфекциям, борьба с которыми регламентируется Международными медико-санитарными правилами [1].

Согласно принятой классификации внутри вида *Vibrio cholerae* выделяют три эпидемически опасных варианта – холерные вибрионы O1 (два биовара) и O139 серогрупп. В настоящее время насчитывается семь пандемий холеры: возбудителем первых шести считается *Vibrio cholerae* классического биовара, но с 1961 г. произошла смена биовара на Эль Тор, явившегося причиной 7-й пандемии, продолжающейся в настоящее время. Начиная с 1991 г. по всему миру распространились генетически измененные высокопатогенные геноварианты *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор [2, 3].

В России эпидемические вспышки холеры фиксировались в периоды каждой из пандемий. Проблема холеры, связанная с заносом инфекции,

является актуальной и для территорий Кавказа [4, 5, 6].

Современные достижения в области использования молекулярных методов исследования позволяют ретроспективно провести генетическую характеристику штаммов возбудителя холеры, выделенных на различных территориях в разные годы.

Анализ распределения единичных нуклеотидных замен (SNP) является одним из информативных методов генотипирования, в том числе для изучения возбудителя холеры. Если ранее для SNP-анализа проводили секвенирование одного или нескольких небольших участков ДНК (мультилокусное секвенирование-типирование), то в последнее время все чаще используется полногеномное секвенирование. С одной стороны, прочтение полного генома микроорганизма существенно повышает разрешающую способность используемого метода генотипирования, но с другой стороны, это усложняет проведение сравнительного анализа, особенно если не удастся собрать полный геном, и все данные представлены в виде контигов различной длины [7].

Материалы и методы. В работе были исследованы геномные последовательности 16 штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор из коллекции ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Ростпотребнадзора, которые были выделены из клинического материала во время эпидемических вспышек холеры на территории Кавказа с 1970 г. по 1998 г. Из них 7 – типичные холерные вибрионы, выделенные в: Республике Дагестан – *V. cholerae* 180Д (1970 г.), Азербайджане – *V. cholerae* 123Аз (1977 г.), 353Аз (1985 г.), 4017Аз (1989 г.); г. Ставрополе *V. cholerae* С347 (1980 г.), 454 (1990 г.). Остальные 9 – генетически измененные варианты биовара Эль Тор выделены на территории: Республики Дагестан – *V. cholerae* 157Д (1993 г.), 169Д (1993 г.), 1270Д (1994 г.), 17332 (1994 г.), 10213Д (1994 г.), 16241Д (1994 г.), 41Д (1998 г.); Краснодарского края – *V. cholerae* 2278 (1987 г.) и 286 (1994 г.); Ставропольского края – *V. cholerae* С347 (1980 г.), 454 (1990 г.) и 8048 (1994 г.).

Все штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор являются токсигенными и гемолитрицательными. Штаммы, выделенные до 1993 г., лизировались в ДРТ бактериофагом эльтор и бактериофагами ХДФ 3, ХДФ 4, ХДФ 5 в различных сочетаниях последних. Штаммы, изолированные после 1993 г., не лизировались фагами и были резистентны к ряду антибиотиков.

Полногеномное секвенирование. Подготовку геномных библиотек проводили с использованием набора «Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit» («Life Technologies», США), моноклональную амплификацию выполняли на микросферах – набор «Ion OneTouch 400 Template Kit» («Life Technologies», США) в соответствии с протоколами производителя. Секвенирование геномов проводили на секвенаторе «Ion Torrent PGM» и чипах «Ion 316 Chips Kit V2» («Life Technologies», США).

Поиск SNP и филогенетический анализ. Поиск SNP в геномах осуществляли с помощью программного обеспечения BioNumerics 7.6 («Applied Maths», Бельгия), используя в качестве референсной последовательности геном штамма *V. cholerae* N16961 (GCF_000006745.1). Построение филогенетического дерева проводили методом UPGMA.

Основные результаты. Сравнительный анализ геномов изученных штаммов позволил выявить 542 SNP, пять из которых локализованы на хромосоме I в значимых генах факторов патогенности (табл. 1): ген VC0817, относящийся к острову патогенности VPI-I, кодирует транспозазу; ген VC0983 обеспечивает синтез регуляторного белка ToxS, ген VC0984 – активатора транскрипции холерного токсина, ген VC1318 – белка наружной мембраны OmpV, ген VC1451 кластера RTX – белка RtxA.

Таблица 1. Несинонимичные SNP в штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных на территории Кавказа с 1970 г. по 1998 г.

Ген/Позиция нуклеотида Название штамма	VC0817/ 874185	VC0983/ 1047013	VC0984/ 1047578	VC1318/ 1401870	VC1451/ 1551627
	SNP				
N16961	A	A	G	A	C
41D	A	A	G	T (phe→leu)	C
123Az	A	A	G	A	C
157D	A	G (ser→pro)	G	T (phe→leu)	C
169D	A	A	G	T (phe→leu)	C
180D	A	A	G	A	C
286	A	A	G	T (phe→leu)	C
353Az	A	A	G	A	C
454	A	A	G	T (phe→leu)	C
1270D	A	A	G	T (phe→leu)	C
2278	A	A	T (tyr→ stop-codon)	A	C
4017Az	A	A	G	T (phe→leu)	C
8048	A	A	G	T (phe→leu)	C
10213D	G (lys→arg)	A	G	T (phe→leu)	C
16241D	A	A	G	T (phe→leu)	C
17332	A	A	G	T (phe→leu)	C
S-347	A	A	G	A	T (thr→ileu)

На основе полученных данных была построена дендрограмма (рис. 1), на которой изоляты *V. cholerae* сформировали 2 кластера – А и В. В кластере А можно выделить 3 группы: в 1-ю вошли штаммы, выделенные в Республике Дагестан и Краснодарском крае в 1993-1998 годах, во 2-ю – изоляты из Азербайджана (1989 г.) и г. Ставрополя (1990 г.), 3-ю группу составили штаммы из Азербайджана (1997 г.), г. Ставрополя (1980 г.) и Республики Дагестан (1970 г.). В кластер А также вошли два штамма, выделенных на территории Краснодарского края в 1987 г. и Азербайджана в 1985 г.

Кластер В образован одним штаммом из Республики Дагестан (село Новая Кара, Бабаюртовский район), выделенным в 1994 г.

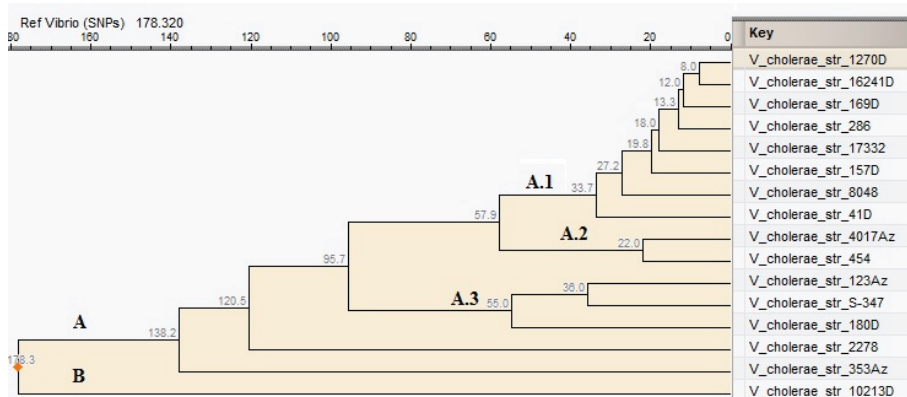


Рисунок 1. Дендрограмма штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Кавказа с 1970 г. по 1998 г.

Кроме того, следует отметить, что группа А.1 полностью состоит из генетически измененных штаммов, а группы А.2 и А.3 – из типичных токсигенных штаммов Эль Тор.

Заключение. Использование метода полногеномного секвенирования позволило описать, в том числе, несинонимичные однонуклеотидные замены в значимых генах факторов патогенности штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории Кавказа в период с 1970 г. по 1998 г.

В связи с вышеизложенным, представляется актуальным дальнейшее применение полногеномного SNP-анализа с целью изучения генетических свойств штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор и последующего эволюционного анализа геномов. Внедрение в практику современных методов молекулярной биологии позволяет проводить эпидемиологическое расследование вспышек холеры на качественно новом уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международные медико-санитарные правила (2005 г.), второе издание https://www.who.int/ihr/IHR_2005_ru.pdf.
2. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh / G.B. Nair [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2006. – V. 44. – P. 4211–3.
3. Evolution of new variants of *Vibrio cholera* O1 / A. Safa [et al.] // Trends Microbiol. – 2010. – V. 18 (1). – P. 46–54. – DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
4. Investigating the virulence genes and antibiotic susceptibility patterns of *Vibrio cholerae* O1 in environmental and clinical isolates in Accra, Ghana. // D. Abana [et al.] // BMC Infect Dis. – 2019. – V. 19(1):76. – DOI: 10.1186/s12879-019-3714-z.
5. Genetic Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates from outbreaks between 2011 and 2015 in Tanzania / Y. Kachwamba [et al.] // BMC Infect Dis. – 2017. – V. 17 (1). – P. 157–162. – DOI: 10.1186/s12879-017-225.
6. Long-Read-Based Genome Sequences of Pandemic and Environmental *Vibrio cholerae* Strains. / N. Matthey [et al.] // Microbiol. Resour Announc. – 2018. – V. 7 (23). – e01574-18. – DOI: 10.1128/MRA.01574-18. eCollection 2018 Dec.
7. Evaluation of Whole-Genome Sequencing for Identification and Typing of *Vibrio cholerae*. / D. Greig [et al.] // J Clin Microbiol. – 2018. – V. 56 (11). – e00831-18. – DOI: 10.1128/JCM.00831-18. Print 2018 Nov.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ SNP-АНАЛИЗ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Писаренко С.В., Бобрышева О.В., Ковалев Д.А., Васильева О.В.,
Кузнецова И.В., Савельев В.Н., Куличенко А.Н.

*ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора, Россия, г. Ставрополь*

Vibrio cholerae является глобально распространенным патогеном, вызывающим ежегодно от 1 до 4 миллионов случаев заболевания холерой [1]. История распространения холеры насчитывает семь пандемий. Считается, что первые шесть пандемий холеры были вызваны классическим биотипом возбудителя. Нынешняя седьмая пандемия холеры,

продолжающаяся более 50 лет и охватившая многие регионы Южной, Юго-Восточной Азии, Африки и Латинской Америки [2], обусловлена распространением нового биотипа Эль-Тор, заменившего классический биотип возбудителя [3-4]. До сих пор заболеваемость холерой остается важной проблемой общественного здравоохранения, имеющей международное значение, особенно в развивающихся странах.

В Российской Федерации случаи заболевания холерой в конце XIX начале XX века были обусловлены заносом возбудителя из стран Азии и Ближнего Востока. Мы использовали баевсовский метод филогенетической реконструкции, основанный на анализе SNP полных геномов возбудителя холеры для построения эволюционно-филогенетической реконструкции и определения географических регионов происхождения штаммов, вызвавших случаи заболевания холерой в Российской Федерации. В нашем исследовании были использованы полногеномные последовательности 380 штаммов *V. cholerae*: геномные последовательности 17 штаммов, выделенных из клинического материала от больных людей с 1970 по 1998 гг. на территории Российской Федерации, которые были секвенированы в рамках этой работы, и геномы 363 штаммов возбудителя, которые были получены из международной базы данных GenBank.

Секвенирование геномов проводили с помощью секвенатора Ion Torrent PGM и чипов Ion 318 Chips Kit V2 по стандартным протоколам. Оценку качества полученных данных проводили с помощью программы FastQC. Риды, содержащие нуклеотиды с низким качеством прочтения ($Q < 15$), а так же риды длиной менее 50 нуклеотидов были удалены. Сборку геномов проводили в программном обеспечении Newbler v 3.0. Оценку качества сборки геномов выполняли с использованием программы Quast 5.0. Для аннотации геномных проектов применяли NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAAP). Все полученные полногеномные последовательности были депонированы в базу данных GenBank. Поиск SNP проводили в гомологичных регионах нуклеотидных последовательностей с использованием программы REALPHY 1.10. Повторяющиеся и паралогичные последовательности были удалены в процессе множественного выравнивания геномов. Построение филогенетической реконструкции на основе полногеномного SNP анализа таксонов проводили с использованием программного пакета BEAST 2.3.0. Параметры эволюционной модели были определены с помощью программы jmodeltest2. Байесовский MCMC анализ был проведен с использованием модели general time reversible +I +G (GTR +I +G): осуществлены три независимых запуска с длиной цепи 350 000 000 поколений каждый и частотой записи каждые 1000 поколений. Оценка сходимости топологии и параметров филогенетического дерева была проведена в программе Tracer v1.6 путем визуальной проверки параметров MCMC между запусками. Все значения параметров ESS составили >200 . Деревья были объединены с использованием компонента TreeAnnotator из

пакета BEAST. Для получения консенсусного дерева, параметр burn-in для каждой цепи был определен как 20 %, полученный файл филогенетического дерева визуализировали в программе Figtree.

Анализ филогенетического дерева позволяют сделать вывод о том, что все изоляты *V. cholerae* формируют два отдельных кластера А и Б. В кластере А отдельную ветвь образует штамм, выделенный в Индии в 1940 г. Остальные штаммы вошли в состав двух групп: в группу 1А – штаммы из Индии и Индонезии, выделенные в 1957 – 1977 гг., штамм из Китая (1962 г.) и два из Ирака (1966 г.). Группа 2А состоит из подгрупп, образованных штаммами холерного вибриона, выделенными на территории стран Африки, Южной и Северной Америки. Образуя отдельную подгруппу ветви 2А, занимают так же штаммы, изолированные на территории России в 1970, 1972 и 1994 гг.

Кластер Б образован большим количеством групп и подгрупп, по которым штаммы, выделенные на территории России, расположены бессистемно. Штамм *V. cholerae* S-347, выделенный в 1994 г., вошел в одну подгруппу с изолятами из Королевства Бахрейн. Штамм *V. cholerae* I-1300 образует одну ветвь со штаммом, выделенным в Китае в 1997 г. Большая часть штаммов, изолированных на территории Российской Федерации с 1970 г. по 1998 г., образует на филогенетическом дереве отдельную подгруппу, куда вошли штаммы из Украины, а также Мозамбика и стран Южной Африки.

В 1997 г. на территории России выделены штаммы, входящие в одну группу с изолятами из Восточной Африки, но образующие отдельную подгруппу. В большую группу, состоящую в основном из штаммов, выделенных на территории Индии и Бангладеш, образуя отдельную ветвь, вошел штамм *V. cholerae* I-1187.

Штаммы, выделенные в России с 2012 г., обладают наибольшим сходством с изолятами из Республик Мозамбик, Бангладеш, Камерун и Гаити.

Проведенный SNP-анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 380 штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории России и других стран мира в разные периоды 7-й пандемии холеры, позволил описать эволюционную модель распространения возбудителя, установить филогенетические связи основных генетических линий возбудителя, определить географические регионы происхождения отдельных штаммов, а так же выявить однонуклеотидные полиморфизмы, служащие маркерами для оценки генетической однородности. Полученные данные согласуются с результатами ранних эпидемиологических расследований случаев заноса холеры на территорию Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. World Health Organization 2016. Cholera. In: Fact Sheet №107. (Электронный ресурс]. — URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/> (дата обращения 20.03.2019).
2. Molecular tools in understanding the evolution of *Vibrio cholera* / M.H. Rahaman [et al.] // Front. Microbiol. – 2015. – Vol. 6. – P. 1040.
3. Mukhopadhyay, A.K. Cholera outbreaks in the El Tor biotype era and the impact of the new El Tor variants / A.K. Mukhopadhyay, Y. Takeda, G.B. Nair // Curr. Top. Microbiol. Immunol. – 2014. – Vol. 379. – P. 17–47.
4. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes / A. Safa [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 55. – P. 1563–1569.

ИММУНОЛОГИЯ И ПАТОГЕНЕЗ

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИММУНОМОДУЛЯТОРА ЛИКОПИДА ПРИ ПРОТИВОХОЛЕРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ

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

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

Угроза использования возбудителя холеры в качестве агента биотерроризма, постоянная изменчивость холерных вибрионов из-за активной миграции населения [1, 2], высокая восприимчивость людей к холере, наличие относительно большого количества вибрионосителей делают обоснованным поиск препаратов, обладающих иммуотропной активностью, которые, снижая антигенную нагрузку на организм, повышают качество оказываемой профилактической медицинской помощи при вакцинации.

Целью исследования являлось усиление протективной активности единственной лицензированной в России вакцины холерной бивалентной химической (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) с помощью иммуномодулятора ликопида, который является активатором врожденного и приобретенного иммунитета.

Материалы и методы. Мы использовали «Ликопид®» (глюкозаминилмурамилдипептид) – синтетический аналог структурного

фрагмента оболочки (пептидогликана) бактериальных клеток, который усиливает защиту организма от вирусных, бактериальных и грибковых инфекций и оказывает адьювантный эффект в развитии иммунологических реакций.

Перед пероральной иммунизацией взрослых кроликов однократно поили 2 мл 5% раствора пищевой соды для снижения повреждающего действия желудочного сока на противохолерную вакцину. Затем однократно иммунизировали противохолерной вакциной, дозу которой рассчитывали согласно весу вакцинируемых животных (1,8-2,0 кг), исходя из человекодозы, рекомендованной разработчиком. Опытной группе кроликов одновременно с вакциной однократно перорально вводили по 0,285 мг ликопида в 0,5 мл забуференного физиологического раствора (ЗФР), что соответствовало заявленной производителем человекодозе. Контрольные интактные животные получали по 2,5 мл ЗФР.

Способность иммуномодулятора повышать протективную активность холерной вакцины оценивали, заражая животных в изолированную петлю тонкого кишечника вирулентным штаммом *Vibrio cholerae 569B* через месяц и семь месяцев после вакцинации. О развитии заболевания у кроликов судили по количеству жидкости в опытных перевязанных петлях тонкого кишечника, определяя коэффициент растяжения петли (К) по формуле: $K = \text{объем жидкости} / \text{длина петли}$ ($K > 1$ свидетельствует о развитии холерогенного эффекта), а также наличие/выраженности отека слизистой и подслизистой оболочек, кровоизлияний, свидетельствующих об энтеропатогенном эффекте.

Статистический анализ материалов осуществляли с помощью таблиц для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала [3]. Определяли значения доверительных интервалов (L) среднеарифметического (M) для уровня достоверности (P) 95%.

Результаты и обсуждение. При оценке патологоанатомической картины в перевязанных петлях тонкого кишечника у всех интактных зараженных животных контрольной группы выявлены ярко выраженные энтеропатогенный и холерогенный эффекты ($K = 1,14 \pm 0,06$) (табл. 1).

Таблица 1. Влияние ликопида на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у кроликов через месяц после вакцинации

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная	100	1,14±0,06	100	сильная
вакцина	25	1,1±0,08	0	отсутствует
вакцина + ликопид	0	0,12±0,06	0	отсутствует

У вакцинированных животных после заражения патоморфологических изменений в опытных петлях не выявлено в 75 % случаев, у 25 % кроликов наблюдался только холерогенный эффект ($K=1,1\pm 0,08$). У всех инфицированных вакцинированных животных, получавших ликопид, признаки развития заболевания отсутствовали, что указывало на формирование более напряженного противохолерного иммунитета.

Оценка результатов заражения кроликов через семь месяцев после вакцинации свидетельствовала о снижении протективного эффекта вакцины: только у 25 % животных в изолированных петлях тонкого кишечника регистрировались признаки инфекции (табл.2). За указанный период напряженность противохолерного иммунитета уменьшилась и у кроликов, получавших одновременно с вакциной ликопид, но при этом была в три раза выше, чем у только вакцинированных. Что касается контрольной группы (зараженных интактных кроликов), то холерогенный и энтерогенный эффекты присутствовали у всех животных.

Таблица 2. Влияние ликопида на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у кроликов через семь месяцев после вакцинации

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (К)	% животных	степень проявления
контрольная	100	$1,18\pm 0,06$	100	сильная
вакцина	75	$1,12\pm 0,08$	75	слабая
вакцина + ликопид	25	$1,05\pm 0,02$	0	отсутствует

Эксперименты по изучению возможности снижения рекомендуемой дозы противохолерной вакцины показали, что у всех вакцинированных половинной дозой животных после заражения через месяц после иммунизации развивались холерогенный (опытные перевязанные петли тонкого кишечника были растянуты и заполнены красноватым средней степени мутности содержимым) и энтеропатогенный (наличие отека и кровоизлияний) эффекты (табл. 3). Применение ликопида в аналогичных условиях постановки эксперимента препятствовало развитию признаков инфекции в тонком кишечнике у всех кроликов этой группы.

Таблица 3. Влияние ликопида на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов, вакцинированных сниженной дозой вакцины

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная	100	1,25±0,08	100	сильная
вакцина	100	1,12±0,02	100	средняя
вакцина + ликопид	0	0,19±0,02	0	отсутствует

Таким образом, одним из подходов совершенствования специфической профилактики холеры, на наш взгляд, может являться сочетанное применение иммуномодулятора ликопида с вакциной холерной бивалентной химической, что позволит увеличить ее протективность в отдаленные сроки поствакцинального периода и снизить антигенную нагрузку при вакцинации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang S. C., Matte M., Matte J. et al. Genetic diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* determined by amplified fragment length polymorphism fingerprinting // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2000. – Vol. 66, N 1. – P. 148–153.
2. Nusrin S., Gil A. I., Bhuiyan N. A. et al. 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 // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – Vol. 58, Pt 3. – P. 342–354.
3. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. Обнинск. - 1980. – 16 с.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ БЕСПОЗВОНОЧНЫХ В ИЗУЧЕНИИ ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА

Демидова Г.В.

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

В последние десятилетия в качестве моделей для идентификации и

изучения факторов вирулентности различных патогенных бактерий довольно широко используют беспозвоночные организмы. Авторы многочисленных экспериментальных работ и обзоров выделяют целый ряд преимуществ таких моделей и рассматривают их в качестве альтернативы традиционным моделям млекопитающих. Примером таких моделей могут служить нематода *Caenorhabditis elegans* и амeba *Ducltyostelium discoideum*.

Нематода *C. elegans* – свободноживущее многоклеточное беспозвоночное. В естественных условиях она паразитирует на многих видах бактерий и грибов. Для научных исследований был выделен штамм *C. elegans* N2 Bristol, который культивируют на специальной среде NGM с газонм кишечной палочки OP50. Нематода в качестве модельного организма имеет целый ряд преимуществ: легкость выращивания, короткое время генерации (3-4 дня), полностью секвенированный геном. Гермафродиты, составляющие большинство особей в популяции нематод, при оптимальной температуре выращивания (20-25⁰ C) продуцируют от 250 до 300 яиц за время генерации. Время жизни нематод в лабораторных условиях около трех недель, за это время они проходят 4 стадии развития, которые отличаются только размерами. *C. elegans* могут быть заморожены в жидком азоте. Преимуществом этой модели перед млекопитающими также является отсутствие этических проблем при работе с ними [1, 2].

В настоящее время *C. elegans* используют для изучения факторов вирулентности особо опасных инфекций, к которым относится холерный вибрион. *Vibrio cholerae* проводит большую часть своего жизненного цикла за пределами хозяина-человека в эстуарных и прибрежных водоемах с географическим ареалом от тропиков до умеренных широт во всем мире. Способность вибриона выживать в различных экологических нишах требует адаптации к ряду меняющихся условий, включая температурные сдвиги, осмотический стресс, ограничения питательных веществ. Холерный вибрион для того, чтобы пережить эти неблагоприятные факторы, использует различную стратегию: формирование биопленок на абиотических и биотических поверхностях, переход в жизнеспособное, но некультивируемое состояние, приобретение и хранение питательных веществ. Помимо абиотических факторов, биологические хищники, такие как свободноживущие простейшие и нематоды, являются постоянной угрозой для бактерий в окружающей среде [3]. В ответ на биологические угрозы бактерии в свою очередь выработали защитные механизмы. Нематода *C. elegans* является незаменимой естественной биологической моделью, для изучения взаимоотношения между *V. cholerae* и беспозвоночными хищниками водной среды.

Основными детерминантами вирулентности *V.cholerae* являются холерный токсин (СТ) и пили адгезии (TCP), но к настоящему времени описан целый ряд дополнительных факторов, продуцируемых штаммами различных серогрупп. Эти штаммы могут вызывать заболевания с

поражением желудочно-кишечного тракта различной степени тяжести. Роль таких факторов остается недостаточно изученной [4]. *C.elegans* оказалась идеальной моделью для понимания роли некоторых дополнительных факторов вирулентности. В качестве такого фактора рассматривают экстрацеллюлярную протеазу PrtV. В 2006 году Vaitkevicius et al. обнаружили факт гибели нематоды при высеве на штаммы *V.cholerae* различных серовариантов в том числе *ctx*⁺ *tcp*⁺. *C. elegans* погибала в течение 5 дней, тогда как на газоне референтного штамма сохраняла жизнеспособность в течение 2-х недель. Гибель нематоды зависела от регуляторов системы кворум-сенсинга. Делеция по *luxO* гену приводила к образованию гипerviрулентных штаммов, *hapR* мутанты обладали ослабленной вирулентностью. Анализ мутантов, дефектных по генам кворум-сенсинга, позволил установить, что за гибель нематоды отвечает протеаза PrtV [5]. Впоследствии, эти же авторы выделили и очистили протеазу из супернатанта клеток холерного вибриона. Фермент разрушал важные элементы в плазме крови: плазминоген, фибриноген, фибриноектин [6]. Анализ взаимодействия протеазы PrtV с плазминогеном предполагает возможную роль фермента в изменении стабильности экстрацеллюлярного матрикса. Биологически активная PrtV выделяется системой секреции 2 типа в составе везикул наружных мембран и в таком виде разрушает амфипатический пептид LL-27[7]. Таким образом, протеаза, возможно, обеспечивает устойчивость холерного вибриона к антимикробным пептидам, первому звену иммунного барьера неспецифической защиты человека от патогенов. Способность разрушать пептиды полезна холерному вибриону и при выживании в водной среде, PrtV может быть тем фактором, который защищает микроб от поедания хищными обитателями водоемов.

Гемолизин (Hly) также относят к дополнительным факторам вирулентности холерного вибриона. Это типичный порообразующий токсин, вызывающий коллоидно-осмотический лизис эукариотических клеток, путем образования трансмембранных гептамерных пор. Образование таких пор приводит к гибели клеток. На моделях *in vivo* препараты Hly вызывали накопление жидкости в кишечнике кроликов и мышей-сосунков, выделение экссудатов и воспалительные процессы [8]. Оценку патогенетических свойств гемолизина провели на нематоды *C. elegans*. Было установлено, что гемолизин ответственен за гибель нематоды, задержку развития и образование вакуолей в клетках кишечника [9]. Повреждения, вызываемые гемолизином, в свою очередь активируют гены врожденного иммунного ответа. На модели нематоды методом микрочипирования был определен целый ряд генов, которые экспрессировались под воздействием гемолизина, это гены лектинов С-типа, прион-подобные гены и др. Ранее эти гены рассматривали в качестве медиаторов врожденного иммунитета у других бактерий. Считают, что гемолизин является одним из дополнительных факторов вирулентности, которые запускают большое количество генов, отвечающих за иммунный ответ [10]. Важная роль в патогенности холерных

вibriонов принадлежит факторам адгезии. Маннозочувствительные пили адгезии (MSHA) рассматривают как фактор, который не играет существенной роли при развитии заболевания у человека, но обеспечивает большое преимущество для выживания *V. cholerae* в водной среде, благодаря его участию в формировании биопленок на биотических и абиотических поверхностях. Для более углубленного изучения роли MSHA в адаптации холерного вбриона к естественным условиям водоемов и противостоянии его к хищным обитателям (простейшим, нематодам) List et al. сконструировали мутант по гену *mshA*, кодирующий главную субъединицу этого фактора. Методом флюоресцентной микроскопии оценили степень прикрепления вбриона к хитину глотки *C. elegans*. Интенсивность флюоресценции была выше у нематод, которых культивировали на полноценном штамме по сравнению с мутантом. Ген *msh* не оказывал влияния на продолжительность жизни червей, но способствовал замедлению роста и задержке развития. Таким образом, пили MSHA имели решающее значение для прикрепления вбриона к глотке нематоды и инициации колонизации. Возможно это свойство является преимуществом при контакте с хищными *C. elegans* и способствует сохранению холерного вбриона в водной среде [11]. Недавно на модели *C. elegans* был идентифицирован новый фактор вирулентности вбриона цитотоксин МАКА. Цитотоксин вызывал гибель нематод и рыбок Данио рерио. Транслокация токсина происходила с помощью жгутика *V. cholerae*. Энергия перемещения через мембрану обеспечивалась движущей силой протонов. Цитотоксин может способствовать как распространению холерного вбриона в окружающей среде, обеспечивая выживание, так и его можно рассматривать в качестве потенциального фактора вирулентности, способствующего инфицированию человека [12].

Амебу *Dictyostelium discoideum* также используют для изучения факторов вирулентности бактерий в качестве модельного организма.

Амеба имеет большое сходство с макрофагами высших животных и человека. В природе этот вид обитает в почве и влажном листовом опаде, питается, в основном, бактериями. Относительно простое строение, короткий жизненный цикл, несложное выращивание в лабораторных условиях, отсутствие этических проблем – все это позволяет применять амебу в качестве модельного организма [13]. Большое значение во взаимоотношениях бактерий с организмом хозяина имеют специализированные системы секреции белков, участвующих в патологическом процессе. В 2006 году на модели *Dictyostelium* Pukatzi et al. выявили систему секреции 6 типа (T6SS) у штамма холерного вбриона не O1 /не O139 серотипа. Система состоит из мультипротеинового комплекса, напоминающего шприц, через который происходит транслокация белков - эффекторов из клетки патогена в клетку хозяина. Белок Vgr-1 вызывал ковалентное связывание цитоплазматических актинов у амебы и в

макрофагах мышей линии J774 [14]. Все исследованные до настоящего времени штаммы холерного вибриона содержат гены T6SS. Но только штаммы, выделенные из окружающей среды, имеют конститутивно-экспрессирующую систему, они постоянно встречаются с хищными обитателями водной среды, а система секреции б типа позволяет, видимо, конкурировать за более выгодные места обитания [15].

В своей естественной среде обитания, в различных водоемах, холерный микроб сталкивается с широким спектром неблагоприятных факторов, которые представляют угрозу его выживанию, как биотическими – хищные простейшие, мелкие ракообразные и др.; так и абиотическими – pH среды, изменение температуры, недостаток питания, осмотический шок. Селективное давление приводит к появлению защитных механизмов, которые, с одной стороны, позволяют вибриону персистировать в водном окружении, а с другой – при попадании в организм человека могут функционировать как факторы вирулентности. Объяснить возникновение таких факторов с двойной функцией, в настоящее время пытаются с помощью гипотезы «coincidental evolution» (гипотеза «эволюции совпадений»). Факторы, имеющие значение, для сохранения холерного вибриона в естественных условиях, потенциально могут участвовать в патогенезе человека [16]. Справедливость этого положения требует дальнейшего экспериментального подтверждения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kurz, C.L. *Caenorhabditis elegans* for the study of host-pathogen interactions /C.L. Kurz, J.J. Ewbank // Trends in Microbiol. – 2000. – Vol. 8, – P.142-144.
2. Sterken, M. The laboratory domestication of *Caenorhabditis elegans* /M.Sterken, L.Snock, J.Kammenza // Trends Genet. – 2015. – Vol. 31, №5. –P.224 – 231.
3. Khan, F. Bacteria and bacterial products: foe and friends to *Caenorhabditis elegans* /F. Khan, S. Oloketuyi // Microbiol.Res. – 2018. – Vol.215, – P.102-113.
4. Монахова, Е.В. Холерные вибрионы: не - О 1 /не - О139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. / Е.В. Монахова, И.В. Архангельская // Пробл. особо опасных инф. – 2016. – вып.2, – С.14-23.
5. Vaitkevicius, K. A *Vibrio cholerae* protease needed for killing of *Caenorhabditis elegans* has a role in protection from natural predator grasing / K.Vaitkevicius, B. Lindmark, G. Ou et al. //Proc Natl Acad Sci USA. – 2006. – Vol.103, №24. – P.9280 – 9285.
6. Vaitkevicius, K. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. /

K.Vaitkevicius, P.Rompikunta, B .Lindmark et al. // FEBS J. – 2008. – Vol.275, №12. –P.3167 – 3177.

7. Rompikuntal, P. Outer membrane vesicle-mediated export of processed PrtV protease from *Vibrio cholerae* / P.Rompikuntal, S.Vdovikova, M. Duperthuy et al. // PLoS One. – 2015. – 10 (7):e0134098.

8. Saka H.A. *Vibrio cholerae* cytolysin is essential for high enterotoxicity and apoptosis induction produced by a cholerae toxin gene negative *Vibrio cholerae* non-O1,non-O139 strain. / H.A. Saka, S. Bidinost, P. Carranza et al. // Microb. Pahtogen. – 2008. Vol.44,№2. – P.118 - 128.

9. Cinar, H.N. *Vibrio cholerae* hemolysin is required for lethality, development, delay,and intestinal vacuolation in *Caenorhabditis elegans* / H.N. Cinar, M.Kothary, A.Datta et al. // PLoS One. – 2010. 5(7):e11558 – doi: 10.1371/journal.pone.0011558.

10. Sahu,S. Genomic analysis of immune response against *Vibrio cholerae* hemolysin in *Caenorhabditis elegans*/ S. Sahu, J. Levis, I.Patel et al. // PLoS One.2012. 7 (5) e 38200 – doi: org/10.1371/ journal.pone oo38200.

11. List, C. Genes activated by *Vibrio cholerae* upon exposure to *Caenorhabditis elegans* reveal the mannose –sensitive hemagglutinin to be essential for colonization/ G. List, A. Grutsch, C. Radler et al. // doi: 10.1128/m Sphere Direct.00238-18.

12. Dongre, M. Flagella-mediated secretion of a novel *Vibrio cholerae* cytotoxin affecting both vertebrate and invertebrate hosts / M. Dongre, B. Singh, K. Aung et al. // doi:10. 1038/s42003-018-0065 –z .e Collection 2018.

13. Steinert, M. Dictyostelium as a host model for pathogenesis/M. Steinert // Cell Microbiol. – 2005. – Vol.7, №3. –P.307- 314.

14. Pukatzki, S. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the Dictyostellium host model system / S. Pukatzki, A.T. Ma, A.T. Revel // Proc. Natl. Acad. Sci .USA. – 2006. – Vol.103, №5. – P.1528 – 1533.

15. Bernardy, E.E. Diversity of clinical and environmental isolates of *Vibrio cholerae* in natural transformation and contact-dependent bacterial killing indicative of type 6 secretion system activity/ E.E. Bernardy, M.A. Turnsek, S.K. Wilson et al. // Appl. and Environmen Microbiol. – 2016. -Vol.82, №9. – P.2833 – 2842.

16. Diard, M. Evolution of bacterial virulence /M. Diard, W-D. Hardt // FEMS Microbiology Reviews. – 2017. – Vol.41. – P. 679.

ДИАГНОСТИКА

АНАЛИЗ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗАЦИОННЫХ ВОПРОСОВ ПРОВЕДЕНИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ, НОМЕНКЛАТУРЫ И ОБЪЕМОВ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЛАБОРАТОРИЯХ РАЗЛИЧНОГО УРОВНЯ В СУБЪЕКТАХ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ, НА ТЕРРИТОРИЯХ КОТОРЫХ ВЫДЕЛЯЛИСЬ ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ В ПЕРИОД С 2013 ПО 2018 ГОДЫ

Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Левченко Д.А.,
Архангельская И.В., Ежова М.И., Ренгач М.В., Янович Е.Г.

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

Референс-центром по мониторингу холеры (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) был осуществлен анализ состояния организации и проведения лабораторной диагностики холеры, номенклатуры и объемов исследований в лабораториях различного уровня в субъектах Российской Федерации. Мониторинговые исследования проводились на основе 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 уровней». В соответствии с Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 г. № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации» проведено функциональное реформирование учреждений, осуществляющих мониторинг холеры на территории страны.

Еженедельная информация об обнаружении штаммов холерных вибрионов O1 в водных объектах окружающей среды (ООС) и штаммов *V. cholerae* non O1/nonO139 от человека, выделенных на территории России, поступала в референс-центр по мониторингу холеры и во ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора. Референс-центром информация направлялась Руководителю Роспотребнадзора Российской Федерации в требуемый срок. Вместе с тем, в предыдущий шестилетний период (2013-2018 гг.) не всегда соблюдался порядок направления в референс-центр (для идентификации) нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, выделенных на территории субъектов России, в установленные нормативным

документом срок (один месяц): Республики Калмыкия и Татарстан, Забайкальский и Краснодарский край, Иркутская область). Референс-центр неоднократно обращал внимание руководителей учреждений, проводящих исследования на холеру в субъектах Российской Федерации, на данный вопрос. В итоге в 2018 г. все выделенные штаммы (37) поступили на идентификацию в референс-центр по холере в регламентированный нормативным документом (МУК 4.2. 2870-11) срок. По согласованию с ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах (в соответствии с Приказом Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 г. № 1116) в референс-центр сразу были направлены (и в ходе исследования подтверждены) нетоксигенные штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированные от людей на территориях двух субъектов (Республика Калмыкия и Ростовская область).

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, референс-центром по мониторингу холеры в период подготовки и проведения ЧМ-2018 была оказана консультативно-методическая и практическая помощь учреждениям и лабораториям различного территориального уровня: Управлению Роспотребнадзора по Ростовской области; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в г. Ростове-на-Дону; филиалам ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» в г. Азове, в г. Волгодонске, в г. Каменск-Шахтинском, в г. Таганроге; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Амурской области» в г. Благовещенске; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Волгоградской области»; ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Республики Калмыкия»; ФКУЗ «Противочумный центр» г. Москва. Основные вопросы касались лабораторной диагностики холеры и порядка ее проведения, а именно: уточнения схемы передачи информации о выделенных штаммах холерных вибрионов O1 из водных объектов и штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированных от людей; интерпретации результатов идентификации; вопросов организации проведения контроля питательных сред и ингибиторов роста посторонней микрофлоры и др.

Анализ осуществленной консультативно-методической помощи показал, что вопросы, касающиеся порядка контроля питательных сред для лабораторной диагностики холеры, преобладали. Проверка осуществляется в соответствии с требованиями МУК 3.3.2.2124-06. ФБУЗ «Центры гигиены и эпидемиологии» ежегодно контролируют плотные и жидкие питательные среды своих филиалов, используя тест-штамм *V. cholerae* nonO1/nonO139 № P-9741. Лаборатории ЛПО контролируют питательные среды и реактивы для лабораторной диагностики холеры в Центрах индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противозидемической готовности (противочумные учреждения). Вместе с

тем, при переработке МУК 4.2. 2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» необходимо уточнить периодичность проверок в Центрах индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности питательных сред и реактивов, приготовленных в ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах.

Проведенный референс-центром анализ организационных вопросов порядка проведения лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня в субъектах Российской Федерации позволил определить и сформулировать ряд положений, которые предлагаем учесть при составлении проекта МУК «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней»:

1) «Общие положения» - с акцентом на современные данные о молекулярно-генетической характеристике; вопросах персистенции и существования в биопленочной форме;

2) внесение изменений в функциональную градацию территориальных и региональных учреждений, осуществляющих мониторинг холеры на территории страны, учитывая, что в настоящее время к территориальным учреждениям относятся бактериологические лаборатории организаций, осуществляющих медицинскую деятельность, Центров гигиены и эпидемиологии и их филиалов, независимо от ведомственной подчиненности; а к региональным – Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности (противочумные учреждения и ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора);

3) корректировка номенклатуры и объема исследований лабораторий территориального уровня; уточнение формы ответов по результатам исследований на холеру для лабораторий ЛПО и Роспотребнадзора; приведение в соответствие с нормативной документацией номенклатуры и объема исследований лабораторий Центров индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности;

4) уточнение порядка информирования об обнаружении и порядка передачи для идентификации выделенных в ходе мониторинга штаммов *V. cholerae* O1, O139, а также *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированных от человека, из территориальных и региональных учреждений – в федеральные – Референс-центр по мониторингу холеры (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора) и Национальный Центр верификации диагностической деятельности (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Для соблюдения оперативности при получении результатов отметить

необходимость согласования для параллельного направления для идентификации штаммов холерных вибрионов O1, O139, а также *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированных от человека, как в референс-центр, так и в региональные учреждения;

5) уточнение порядка передачи информации о результатах идентификации изолированных на территориях субъектов штаммов холерных вибрионов O1, O139 от человека и из ООС, а также штаммов не O1/неO139 от людей в Роспотребнадзор Российской Федерации; ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора; Центры индикации возбудителей инфекционных болезней I-II групп патогенности и обеспечения противоэпидемической готовности; а также в ФБУЗы «Центр гигиены и эпидемиологии» субъектов Российской Федерации;

6) отразить порядок и организацию межведомственного взаимодействия лабораторий различного уровня, проводящих мониторинг холеры на территории Российской Федерации, с использованием современных информационных технологий, (включая ГИС-информационный портал референс-центра по холере), в плане осуществления референс-центром консультативно-методической и практической помощи;

7) продолжить выполнение работы, связанной с оценкой состояния порядка и организации мониторинга холеры в стране для адаптационной переработки МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней» и создания проекта документа.

ИММУНОГЛОБУЛИНОВЫЕ ПЕРОКСИДАЗНЫЕ КОНЬЮГАТЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ O1, O139*

Алексеева Л.П., Якушева О.А.

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

На сегодняшний день имеется немало отечественных и зарубежных публикаций, в которых нашли отражение исследования, направленные на разработку эффективных методов детекции холерного токсина (ХТ). Причем среди современных иммунодиагностических тест-систем наибольшее распространение получили иммунохроматографические тест-полоски (ИХ-тест) и различные варианты иммуноферментного анализа (ИФА), хорошо зарекомендовавшие себя на разных уровнях лабораторной диагностики инфекционных болезней, в том числе опасных.

В институте «Микроб» Михеевой Е.А. с соавт. [1] разработана «Тест-система иммуноферментная для определения продукции холерного токсина штаммами *V. cholerae*», на которую получено регистрационное удостоверение. Баранова Е.В. с соавт. [2] сконструировали на основе моноклональных антител (МКА), специфичных к ХТ, «ИХ-диагностические тест-полоски *V. cholerae* tox+», предназначенные для обнаружения токсигенных холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп. Однако они пока не получили широкого применения в отечественной лабораторной практике. ИХ-тест полоски экспрессный, простой в постановке метод, позволяющий получить результат в течение 20 минут, но его чувствительность ниже, чем варианта сэндвич-ИФА, который отличается большей продолжительностью и большим числом манипуляций. Нами предпринята попытка разработать «прямой» вариант ИФА, т.е. исключить этап сорбции в лунки планшета антител, связывающих ХТ, как это предусмотрено в «сэндвич ИФА». Несмотря на наличие отечественных иммунодиагностикомов для выявления ХТ, проблема конструирования новых высокочувствительных и специфичных тест-систем, в наибольшей степени отвечающих требованиям экспрессности, простых в постановке с визуальным учетом результатов, сохраняет актуальность. В связи с этим **цель** работы - получение иммуноглобулиновых пероксидазных конъюгатов для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, O139 в «прямом» варианте ИФА.

Материалы и методы. В работе был использован штамм *Vibrio cholerae classical* 569В, серовара Инаба. Очистку ХТ осуществляли методом ионообменной хроматографии на FPLC Pathfinder Duoflow (Bio-Rad). Для этого препарат наносили на катионообменную колонку monoS (Pharmacia).

Количество ХТ и иммунохимическую активность определяли иммуноферментным методом с моносиалганглиозидами в реакции- GM1-ИФА [3].

Электрофорез очищенного энтеротоксина проводили по U.K. Laemmli [4] в 12%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в системе Bio-Rad (США). Биологическую активность ХТ оценивали на перевиваемой клеточной линии СНО-К1 (овариальные клетки китайского хомячка) [5]. Нейтрализацию действия ХТ осуществляли с помощью антитоксической сыворотки.

Результаты и обсуждение. Очевидно, что эффективность тест-систем для детекции ХТ зависит от качества используемых специфических иммунореагентов. В первую очередь это касается самого ХТ, его чистоты, биологической активности, способности индуцировать специфические антитела. Поэтому в качестве первоочередной задачи было получение чистого препарата токсина и затем гипериммунных антитоксических сывороток.

Штамм-продуцент *Vibrio cholerae* 569В, серовара Инаба, выращивали

при 32° С в течение 18 часов с дополнительной аэрацией в среде, состав которой был разработан Нуан [6].

Для выделения ХТ в препаративных количествах были получены значительные объемы обеззараженного супернатанта *V.cholerae* 569В, концентрирование которого на первых этапах осуществляли путем мембранной ультрафильтрации на установке Amicon. В концентрированном токсинсодержащем препарате вначале определяли содержание О-антигена ЛПС. Его количество, как примесного компонента, может быть значительным. Контроль наличия ЛПС на всех этапах очистки осуществляли с помощью Набора реагентов «Иммуноглобулины диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом ИФА, дот-ИФА», разработанного в Ростовском ПЧИ. Моноспецифические иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой, направлены к эпитопам О-антигена ЛПС *V. cholerae* O1, и поэтому его можно выявлять с помощью вышеупомянутой тест-системы. Количественное определение О-антигена в различных по степени очистки токсинсодержащих образцах показало, что в исходном супернатанте он выявляется до разведения 1:8, в концентрате после ультрафильтрации этот показатель равняется 1:32, т.е. необходимость его удаления, как и других примесных веществ, была очевидна.

Дальнейшую очистку концентрата токсина проводили методом ионообменной хроматографии на приборе FPLC Pathfinder Duoflow (Bio-Rad). Токсин элюировали линейным градиентом NaCl от 0 до 0,5 М в 10 мМ фосфатном буфере pH 7,0 и определяли его наличие в колоночных фракциях методом GM1-ИФА.

В процессе очистки холерного токсина хроматографическим методом регистрировали 4 пика; токсин содержался во 2-ом и элюировался после увеличения молярности NaCl до 0,25-0,3 М, что подтверждено положительной реакцией с антитоксической сывороткой в GM1-ИФА.

Качество хроматографической очистки холерного токсина анализировали в 12%-ном полиакриламидном геле для того, чтобы оценить, остались ли в его составе белки-контаминанты и О-антиген. Электрофореграмма показала, что очищенный препарат имеет одну белковую полосу на уровне маркеров Мм примерно 24-26 кДа, что соответствует субъединице А, субъединица В ХТ представлена мономерами с Мм около 11-12 кДа.

В последние годы появились сообщения о возможности использования MALDI-TOF MS для идентификации и характеристики биологических токсинов [7]. Определение масс-спектра коммерческого препарата ХТ (Sigma-Aldrich, USA) показало наличие спектральных пиков с определенным значением m/z: 2899±1, 3868±1, и 5803±4, 7738±6, 11603±7. Предположительно спектральный пик с m/z, равным 11603±7, соответствует

мономеру субъединицы В с молекулярной массой приблизительно 11,6 кДа. Сбор спектров очищенного холерного энтеротоксина, полученного нами вышеописанным методом, был осуществлен с использованием масс-спектрометра Autoflex speed III Bruker Daltonics (Германия) с программным обеспечением Biotyper. В результате проведенного масс-спектрометрического анализа холерогена выявлены масс-спектры, имеющие следующие m/z : 2730, 3605, 5804, 11605 и, как видно, они сопоставимы с показателями коммерческого ХТ, т.е. мы располагаем препаратом высокой степени очистки и, вероятно, этот метод можно рассматривать в качестве дополнительного для выявления специфических пиков масс-спектров. Одновременно с холерогеном определяли и масс-спектры токсинсодержащих образцов различной степени очистки. В исходном супернатанте штамма *V. cholerae* 569В и концентрированном путем ультрафильтрации наряду с большим числом пиков выделяются масс-пики со значениями m/z 3766, 6200, 7536, 11627.

Известно, что биологическая активность холерогена существенно зависит от метода очистки и оценить ее можно на модели лабораторных животных. Альтернативной моделью является культура клеток СНО-К1, которая позволяет дать количественную и качественную оценку токсинопродуцирующей способности холерных вибрионов, и мы ее использовали в процессе очистки холерогена. Клетки-мишени СНО-К1 реагируют на действие холерного токсина удлинением. Оценка биологической активности очищенного ХТ показала, что он вызывал удлинение клеток до разведения (10нг/мл), т.е. при этой дозе еще регистрируются морфологические изменения СНО-К1. Доказательством действия ХТ на клетки СНО-К1, было отсутствие эффекта удлинения после нейтрализации реакции специфической антитоксической сывороткой.

Поскольку задачи работы предусматривали получение кроличьих поликлональных антитоксических сывороток, то для иммунизации кроликов использовали очищенный холерный токсин. Было получено 4 экспериментальные серии антитоксических сывороток. Определение активности взаимодействия их с холерогеном в GM1-ИФА показало наиболее высокие показатели ОП в отношении 1- и 2-ой серий сывороток. С помощью этих сывороток в GM1-ИФА детекцию токсина в исследуемых образцах можно осуществлять до разведения сывороток 1:40000-1:800000, так как соответствующие им значения ОП в 5-6 раз превышают отрицательный контроль. Серии сывороток 3-я и 4-я отличаются более низкими титрами специфических антител, токсин в GM1-ИФА выявляется на уровне титров 1:10000- 1:20000 и их показатели ОП в 2-3 раза ниже. Применение сывороток в GM1-ИФА как диагностических реагентов обусловило необходимость установления минимальной дозы холерогена, которую с их помощью можно обнаружить в различных токсинсодержащих образцах. Оказалось, что при рабочем разведении сывороток 1: 20000-

1:40000 чувствительность метода составляет 10-20 пг, то есть это предельное количество токсина, которое можно обнаружить в опытных пробах. Сыворотки 1- и 2-ой серий в реакции преципитации с препаратом ХТ образовывали преципитат в виде комплекса антиген-антитело, начиная с цельного до разведения 1:16 – 1:32, что указывало на высокий пул специфических иммуноглобулинов в их составе. Специфичность антитоксических сывороток была подтверждена их отрицательной реакцией в GM1-ИФА с бесклеточными супернатантами нетоксигенных штаммов представителей *V. cholerae* O1 и O139 и препаратами ЛПС O1 и O139.

Для получения пероксидазных конъюгатов необходимо было выделить из иммунных сывороток фракции специфических иммуноглобулинов. Мы сравнили несколько методических приемов выделения иммуноглобулинов - с помощью каприловой кислоты, сульфата натрия, метанольной воды и насыщенного сульфата аммония, чтобы выбрать наиболее оптимальный, обеспечивающий их достаточный выход и сохранность нативной структуры. Большой выход по белку отмечен при осаждении иммуноглобулинов из сыворотки метанольным методом. Однако в реакции GM1 – ИФА самые высокие показатели ОП зарегистрированы при взаимодействии ХТ с фракцией иммуноглобулинов, осажденных с помощью сернокислого натрия или 50%-ного насыщения сульфатом аммония, что свидетельствовало о содержании в них значительного пула специфических антител и сохранности структурной организации. Поэтому в последующих экспериментах иммуноглобулины из иммунных сывороток осаждали этими методами. Специфические иммуноглобулины конъюгировали с пероксидазой хрена по методике Nakane Р.К. [8] с некоторыми модификациями. Технология получения поликлонального пероксидазного конъюгата включала несколько этапов: активация ПХ, иммобилизация активированной ПХ с Ig, очистка от несвязавшихся компонентов, контроль активности, хранение. Было установлено, что наиболее оптимальным является соотношение ПХ и Ig 1:2, т.к. в этом случае получены конъюгаты с рабочим титром, равным 1:80-1:160. Экспериментальные серии полученных пероксидазных поликлональных конъюгатов исследовали в прямом варианте планшетного ИФА и в дот-ИФА на наборе штаммов, включающем 10 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, из них 3 *V. cholerae classical* и 7 *V. cholerae* El Tor, 4 штамма *V. cholerae* O139, 6 нетоксигенных *V. cholerae* El Tor, 4 штамма non O1/non O139, выращенных на среде по прописи Нуан [6]. Положительную реакцию конъюгатов регистрировали только с супернатантами токсигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139, что свидетельствует об их специфичности. Установлено также, что взятые в опыт генетически измененные вибрионы Эль Тор отличаются повышенной продукцией ХТ и тому подтверждение – интенсивно коричневые пятна в дот-ИФА и высокие показатели ОП в ИФА. В настоящее время работа продолжается в направлении создания экспериментальных серий моноклональных пероксидазных конъюгатов. Согласно данным литературы

[9, 10, 11], диагностические тест-системы, включающие 2 типа антител – поли- и моноклональные, отличаются высокой чувствительностью порядка 0,001 мкг/мл. Это важно, поскольку холерные вибрионы O1 и O139 обычно продуцируют незначительное количество токсина, и повысить продукцию можно только за счет сред определенного состава и условий культивирования. Нам представляется, что применение одновременно моно- и поликлональных пероксидазных конъюгатов способствует повышению качества и достоверности серологического анализа за счет расширения спектра выявляемых эпитопов ХТ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Михеева, Е.А. Получение и применение моноклональных антител для обнаружения холерного токсина / Е.А. Михеева, З.Л. Девдариани, Н.Е.Терешкина и др. // Современ. технологии в совершенств. мер предупр. и отв. действий на ЧС в области обществ. здравоохран. сан.-эпид. характера: Матер. XI Межгос. науч.-практ. конф. – Саратов, 2012. – С. 162 – 164.
2. Баранова, Е.В. Разработка иммунохроматографического теста для обнаружения токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* / Е.В. Баранова, П.В.Соловьев, В.В. Агафонова и др. // Актуал. пробл. предупрежд. и ликвид. последствий чрезвыч. ситуаций в области сан.-эпид. благополучия населения госуд.-участ. СНГ: Матер. X Межгос. науч.-практ. конф. госуд.-участ. СНГ. - Ставрополь, 2010. - С. 165.
3. Маркина О.В. Изучение токсинопродуцирующей способности штаммов *Vibrio cholerae* O1 и *Vibrio cholerae* O139 с помощью иммуноферментного анализа и культуры клеток: автореф. дис. канд. биол. наук: 03.00.07 / Маркина О. В. – Ставрополь, 2008. - 22 с.
4. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227, № 5259 - P. 680-685.
5. Guerrant, R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxin of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*/ R.L. Guerrant, L.L. Burton, T.C. Schnaitman et al.// Infect. Immun. - 1974. - Vol.10, № 2. - P. 320-327.
6. Hyun, J. Improved purification process for cholera toxin and its application to the quantification of residual toxin in cholera vaccines / J. Hyun, Kim J.A., Kim J.H. et al. // J. Microbiol. Biotechnol. – 2009. –Vol.19, №.1. –P. 108–112.
7. Дубровский, Я. А. Определение токсинов пептидной природы методом М MALDI-MS (Обзор)/ Я.А. Дубровский, Е. П. Подольская // Научное проборостроени. – 2010. - Т. 20, № 4. - С. 21–35.
8. Nacane, P.K. Peroxidase-labeled anti a new method of conjugation /

P.K. Nacane, A.J. Kawaoi // Histochem Cytochem. – 1974. – Vol. 22. – P. 1084-1091.

9. Tuteja, U. Simultaneous direct detection of toxigenic and non-toxigenic *Vibrio cholerae* from rectal swabs and environmental samples by sandwich ELISA / Tuteja U., Kumar S., Shukla J. et al. // J. Med Microbiol. - 2007. - Vol. 56, № 10. - P. 1340-1345.

10. Yamasaki, E. Detection of Cholera Toxin by an Immunochromatographic Test Strip // E. Yamasaki, R. Sakamoto, T. Matsumoto et al. Methods Mol Biol. - 2017. - Vol. 1600. - P. 1-7. doi: 10.1007/978-1-4939-6958-6_1.

11. Bayat, M. Development of IgY-Based Sandwich ELISA as a Robust Tool for Rapid Detection and Discrimination of Toxigenic *Vibrio cholerae* / M. Bayat, A. Khabiri, B. Hemati // Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol. - 2018; 4032531. doi: 10.1155/2018/4032531. eCollection 2018.

ПОЛУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ ИММУНОФЕРМЕНТНЫХ КОНЪЮГАТОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА

Якушева О.А., Алексеева Л.П., Зюзина В.П., Яговкин М.Э.

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

Быстрая диагностика холеры имеет решающее значение для предотвращения перерастания вспышки в эпидемию. Устройства, предназначенные для диагностики холеры в местах оказания медицинской помощи, должны не только демонстрировать клиническую лабораторную чувствительность и специфичность, но и делать это портативным и недорогим способом [1]. Решить эту проблему можно с помощью прямых пероксидазных конъюгатов. В настоящее время в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора проводятся работы по конструированию поли- и моноклональных пероксидазных конъюгатов для детекции холерного токсина в прямом варианте планшетного ИФА и ДИА.

Материалы и методы. Препараты иммуноглобулинов получали высаливанием насыщенными растворами сернокислого аммония и сернокислого натрия, при помощи каприловой кислоты и метанольным методом. Рабочий титр полученных иммуноглобулинов определяли в GM₁-ИФА с ХТ (5мкг/мл) [2]. Количественное определение белка проводили методом сравнения поглощения белков при 260 и 280нм на приборе Bio-Rad

SmartSpec Plus. Конъюгаты получали методом перйодатного окисления пероксидазы из хрена с незначительными модификациями, сохраняя основные пропорции компонентов [3]. Разведение антигена и конъюгата готовили в фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,05% твина-20 и 0,5% БСА, рН 7,4. Результаты вычисляли по разнице экстинкций между опытом и контролем. Качество полученных конъюгатов оценивали по специфичности, чувствительности и величине рабочего разведения в результате шахматного титрования. Внутренним контролем для каждого разведения конъюгата служило отсутствие определяемого ХТ в системе. Чувствительность конъюгатов оценивали как минимально определяемую концентрацию ХТ. Рабочее разведение конъюгата выбирали как максимальное его разведение, обеспечивающее сохранение чувствительности системы.

Результаты и обсуждение. В настоящее время в литературе описано достаточное количество методов получения иммуноглобулиновой фракции, простых в исполнении и не требующих специального оборудования. Чаще всего применяют методы высаливания антител насыщенными растворами сернокислого аммония и сернокислого натрия, так как эти методы просты и обеспечивают наименьшую потерю антител. Для минимизации загрязнения иммуноглобулиновой фракции альбуминами используют каприловую кислоту. В производственных масштабах для фракционирования иммуноглобулинов применяют метанольный метод.

Мы сравнили несколько методических приемов выделения иммуноглобулинов: с помощью каприловой кислоты, сульфата натрия, метанольной воды и насыщенного сульфата аммония, – чтобы выбрать наиболее оптимальный, обеспечивающий их достаточный выход и сохранность нативной структуры. Как оказалось, при осаждении иммуноглобулинов из антитоксической сыворотки метанольный метод обеспечивал наибольший выход по белку. Однако в реакции GM1–ИФА зарегистрированы низкие титры фракции иммуноглобулинов с ХТ – 1:5000.

Фракционирование иммуноглобулинов с помощью каприловой кислоты показало, что титр антител с ХТ был равен – 1:20000. Самые высокие титры зафиксированы при взаимодействии ХТ с иммуноглобулинами, осажденными при помощи сульфата аммония и сернокислого натрия (1:40000 – 1:80000), что указывает на высокое содержание в полученных препаратах специфических антител без структурных изменений. Поэтому в последующих экспериментах иммуноглобулины из иммунных сывороток осаждали сульфатом аммония и сернокислым натрием. Специфические иммуноглобулины конъюгировали с пероксидазой хрена по методике Nakane P.K., Kawaoi A.J. (1974) с некоторыми модификациями. Технология получения поликлонального пероксидазного конъюгата включала несколько этапов: активация ПХ, иммобилизация его с Ig, очистка от несвязавшихся компонентов, контроль активности, хранение. Было установлено, что оптимальным является

соотношение ПХ и Ig 1:2, что позволяет получить конъюгаты с рабочим титром 1:80 – 1:160 и чувствительностью 10 – 20 пг. Специфичность экспериментальных серий полученных пероксидазных поликлональных конъюгатов оценили с помощью 10 токсигенных штаммов *V.cholerae* 01, из них 3 – *V.cholerae classical* и 7 *V.cholerae* El Tor, 4 токсигенных штамма *V.cholerae* 0139, 6 нетоксигенных *V. cholerae* El Tor, 4 штамма non 01/non 0139. Положительную реакцию конъюгатов регистрировали только с супернатантами токсигенных штаммов холерных вибрионов 01, 0139, что свидетельствует об их специфичности.

Обсуждение. В результате проведенных исследований по получению поликлональных иммуноферментных конъюгатов отработан ряд параметров: эффективный метод выделения иммуноглобулинов из гипериммунных сывороток с помощью сульфата натрия и сульфата аммония; концентрация белка при шивке с ферментом пероксидазой хрена – 10 мг/мл. Рабочий титр полученных таким образом иммуноферментных антитоксических конъюгатов составил 1:80 - 1:160. Чувствительность конъюгатов – 10-20 пг.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Valera, A.E. On-chip electrochemical detection of cholera using a polypyrrole functionalized dendritic gold sensor / Valera A.E., Nesbitt N.T., Archibald M. et al. // ACS Sens. – 2019. – Feb 18. doi: 10.1021/acssensors.8b01484.
2. Sack, D.A. Microtiter ganglioside enzyme-linked immunosorbent assay for *Vibrio* and *Escherichia coli* heat labile enterotoxins and antitoxins / D.A. Sack, S. Huda, P.K. Neog, R. Daniel, W.M. Spira // J. Clin. Microbiol. – 1980. – Vol.11, №1. – P. 25-45.
3. Nacane, P.K. Peroxidase-labeled anti a new method of conjugation / P.K. Nacane, A.J. Kawaoi // Histochem Cytochem. – 1974. – Vol. 22. – P. 1084-1091.

КОНСТРУИРОВАНИЕ *IN SILICO* ПЦР ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*

Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Миронова Л.В.

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

Отдельные представители рода *Vibrio* являются возбудителями ряда острых кишечных инфекций, включая особо опасное инфекционное заболевание холеру. *V. fluvialis*, *V. parahaemolyticus* являются частой причиной острых гастроэнтеритов, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* и *V. metschnikovii* могут быть этиологическими агентами раневых инфекций, септицемии и, в меньшей степени, кишечных расстройств [1,2]. Индикация данных возбудителей в клиническом материале и объектах внешней среды, быстрая их дифференциация на этапах бактериологического анализа имеет важное клинико-эпидемиологическое значение.

Цель исследования - конструирование *in silico* мультиплексной тест-системы для детекции микроорганизмов рода *Vibrio* в режиме реального времени.

В работе использованы последовательности геномов одиннадцати штаммов *V. cholerae* и двух штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока, а также геномов вибрионов из базы данных NCBI: 7 - *V. cholerae*, 3 - *V. parahaemolyticus* и по одному – *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, *V. vulnificus* и *V. metschnikovii*.

Полногеномное секвенирование штаммов проводилось на приборе Illumina MiSeq. Сборка *de novo* была произведена геномным ассемблером SPAdes v. 3.13.0 [3]. Выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществлялось в браузере Unipro UGENE ver. 1.31. Подбор праймеров и зондов производился в программе Fast PCR Professional ver. 6.6.35[4].

С целью поиска уникальных для каждой группы штаммов генов, перспективных в качестве специфических детерминант для детекции клинически значимых представителей рода *Vibrio*, был осуществлен анализ и аннотация полных геномов исследуемых штаммов. Наряду с этим проанализированы литературные данные по используемым для дифференциации микроорганизмов рода *Vibrio* генетическим мишеням. В результате в качестве потенциальных мишеней для дифференциации рода отобраны следующие гены: для *V. cholerae* – *dnaJ*, *toxR*, *lolB*, *gbpA*, *ompW*, *sodB*; для *V. parahaemolyticus* – *flaE*, *hutA*; *V. alginolyticus* – *dnaJ*, *heme-binding protein/hypothetical protein*; *V. fluvialis* – *toxR*, *dnaJ*; *V. metschnikovii* – *infC*, *lolB*; *V. vulnificus* – *groEL*, *hsp*, *dnaJ*, *V. mimicus* – *sodB* [5,6,7].

Далее в геномном браузере Unipro UGENE были определены консервативные участки генов, пригодные для конструирования праймеров и зондов, с этой целью проанализировано от 50 до 120 последовательностей фрагментов каждого гена из базы данных NCBI.

Для выбранных генетических мишеней в программе Fast PCR подобраны специфические праймеры и зонды, а также условия, обеспечивающие их амплификацию в мультиплексной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Праймеры анализировались на

образование димерных фрагментов в модуле «Primers List Analysis».

Подобранные праймеры и зонды проверены в комплексной *in silico* ПЦР с помощью программы Fast PCR и осуществлена проверка специфичности подобранных праймеров к *Vibrio spp.* Нарботка фрагмента в ПЦР *in silico* для детекции *V. cholerae* наиболее эффективно прошла с праймерами к генам *toxR*, *lolB*, *ompW*. Так же, в отношении других вибрионов, для конструирования тест системы были выбраны праймеры и зонды к генам или участкам геномов, показавшие лучшую эффективность *in silico*: *hutA* для детекции *V. parahaemolyticus*, *heme-binding protein/hypothetical protein* для *V. alginolyticus*; *infC*, *lolB* – *V. metschnikovii*; *dnaJ* - *V. fluvialis*; *infC*; *groel* - *V. vulnificus*; *sodB* - *V. mimicus*. Анализ амплифицированных фрагментов с использованием интернет ресурса Blast показал, что все фрагменты генов являются специфическими для соответствующих микроорганизмов рода *Vibrio*.

Таким образом, проведен биоинформационный поиск генетических мишеней, значимых в развитии ОКИ микроорганизмов рода *Vibrio*, к ним подобраны праймеры и зонды, с которыми проведена *in silico* ПЦР. В дальнейшем сконструированный вариант мультиплексной ПЦР с детекцией в режиме реального времени будет практически апробирован.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baker-Austin, C. *Vibrio spp.* Infections / C. Baker-Austin, J.D. Oliver, M. Alam, A. Ali, M.K. Waldor, F. Qadri, J. Martinez-Urtaza // Nat. Rev. Dis. Primers. – 2018. – Vol. 4(1):8.
2. Kaneko, T. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. T. Kaneko, R.R. Colwell // J. Bacteriol. – 1973. Vol. 113. – P. 24– 32.
3. Prjibelski, A.D. ExSPAnDer: a universal repeat resolver for DNA fragment assembly / A. D. Prjibelski, I. Vasilinetc, A. Bankevich et al. // Bioinformatics – 2014. – Vol. 30, № 12. – P. i293–i301
4. Kalendar, R. In Silico PCR tools for a fast primer, probe, and advanced searching / R. Kalendar, A. Muterko, M. Shamekova, K. Zhambakin // Methods Mol. Biol. – 2017. – Vol. 1620. – P. 1-32.
5. Tarr, C.L. Identification of *Vibrio* isolates by a multiplex PCR assay and *rpoB* sequence determination / C. L. Tarr, J. S. Patel, N. D. Puhr et al. // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, № 1. – P. 134–140.
6. Nhung, P.H. Rapid and specific identification of 5 human pathogenic *Vibrio* species by multiplex polymerase chain reaction targeted to *dnaJ* gene / P.H. Nhung, K. Ohkusu, J. Miyasaka et al. // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2007. – Vol. 59, № 3. – P. 271–275.
7. Chakraborty, R. Species-specific identification of *Vibrio fluvialis* by

PCR targeted to the conserved transcriptional activation and variable membrane tether regions of the *toxR* gene / R. Chakraborty, S. Sinha, A. K. Mukhopadhyay et al. // J. Med. Microbiol. – 2006. – Т. 55, № 6. – P. 805–808.

ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (ПГВС)

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахан Г.Д., Савельева И.К.,
Санамянц Е.М., Сагакянц М.М., Каминский Д.И., Ульрих Е.П.

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

Эпидемиологическая ситуация с пищевыми токсикоинфекциями (ПТИ) в последние годы продолжает вызывать законные опасения. Об этом свидетельствуют ежегодные обращения Роспотребнадзора (1). Немаловажную роль в поддержании заболеваемости ПТИ играет расширение употребления населением страны морепродуктов, в том числе – без термической обработки. Ряд отечественных исследователей констатируют значительное распространение галофильных вибрионов в морских промысловых объектах Дальневосточного региона и в пищевых продуктах из них [2, 3, 4]. При этом в условиях эпидрасследования случаев пищевых токсикоинфекций, связанных с импортными морепродуктами, особое значение приобретает использование унифицированных диагностических методов и применения препаратов, зарегистрированных в реестре медицинских изделий. В таких условиях значительно упрощается согласование результатов лабораторного контроля проб как продуктов питания, так и клинического материала от больных людей. Проблема связана также с отсутствием зарегистрированных специальных отечественных питательных сред, предназначенных для выделения и идентификации парагемолитических галофильных вибрионов.

Одно из решений данной проблемы найдено во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и представляет собой разработку комплексной питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов (ПГВС). Принцип действия Набора ПГВС основан на использовании двух этапов селекции микроорганизмов с целью выделения, дифференциации и первичной идентификации парагемолитических вибрионов.

На первом этапе используется вариант Набора ПГВС, включающий основу среды, селективную (алкилсульфаты натрия) и идентифицирующую

(натрия хлорид) добавки. С помощью данного варианта Набора в пробе клинического материала или объекта окружающей среды выявляют наличие *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. cholerae* по характерным морфологическим признакам выросших колоний: желтых, плоско-выпуклых полупрозрачных - у *V. alginolyticus*, *V. cholerae*; бесцветных или голубоватых плоско-выпуклых - у *V. parahaemolyticus*. На втором этапе выросшие колонии указанных микроорганизмов высевают на вариант Набора ПГВС, включающий основу среды и селективную добавку (без идентифицирующей добавки – натрия хлорида) с целью идентификации указанных микроорганизмов по признаку галофильности. На варианте Набора ПГВС без идентифицирующей добавки (натрия хлорида) вырастают только негалофильные вибрионы (в частности, *V. cholerae*).

Таким образом достигается цель – выделение, дифференциация от вибрионов других видов и первичная идентификация (в процессе отбора колоний) паразитических вибрионов, являющихся галофильными.

Учитывая многокомпонентность состава среды, авторами было принято решение назвать данный препарат как «Набор реагентов для приготовления питательной среды для выделения и первичной идентификации паразитических вибрионов (Набор ПГВС)».

С учетом действующих методических документов, назначения и сферы применения Набора ПГВС были определены технические требования к новому препарату [5,6]. Перечень нормативов включает 13 показателей: внешний вид, прозрачность и цветность, рН, аммонийный азот (%), хлориды (%), прочность студня (г), контроль чистоты розлива готовой среды, чувствительность среды и скорость роста микроорганизмов, показатель стабильности, показатель прорастания, ингибирующие и идентифицирующие свойства, проверка комплектности, упаковки и маркировки.

Высокая эффективность экспериментальных серий среды ПГВС продемонстрирована в ходе комиссионной проверки на тест-штаммах основных представителей пищевых вибрионозов - *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. mimicus*, *V. furnisii*, *V. vulnificus*, *V. damsela* и модельной смеси faeces с *V. parahaemolyticus* 13580 (ATCC 17802). Среда ПГВС обеспечивала чувствительность 10^{-7} , показатель прорастания тест-штаммов 70-85% и ингибирующие свойства в отношении контаминантов на уровне 10^4 - 10^5 . Новый препарат продемонстрировал четкую идентификацию галофильных паразитических вибрионов от негалофильного тест-штамма *V. cholerae* non O1 P-9741. Контрольная среда TCBS обладала более низкой ингибирующей способностью в отношении кишечной флоры чистых культур и в модельной смеси, а также отсутствием возможности идентификации тест-штаммов в тесте на галофильность. Таким образом, доказано полное соответствие параметров исследованной среды показателям, оговоренным в Технических условиях. После рассмотрения Ученым советом института директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт

Роспотребнадзора утверждены Технические условия на препарат (№ 20.59.52-001-01898316-2018) и Инструкция по применению препарата.

В рамках подготовки к проведению мероприятий по регистрации ПГВС в качестве изделия медицинского назначения авторами была реализована одна из заключительных задач исполняемой темы – исследование проб из объектов окружающей среды. В качестве исследуемого материала были использованы 3 наиболее распространенных объекта – вода открытых водоемов, рыба свежая, рыба мороженая, замороженные мидии и в качестве клинического материала – faeces. В связи с трудностями получения образцов, контаминированных ПГВ в естественных условиях, авторами были смоделированы смеси указанных объектов с тест-штаммами ПГВ с различными уровнями обсемененности. Результаты масштабного исследования показали, что во всех случаях анализа моделей полевого материала, содержащего 10^2 м.к./мл, удавалось выделить возбудителя.

По результатам технических испытаний, проведенных на базе испытательной лаборатории медицинских изделий ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России, и клинических испытаний в ГОУЗ МО МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского получены положительные решения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Официальное обращение Роспотребнадзора «О профилактике пищевых отравлений и инфекционных болезней, передающихся с пищей» от 04.05.2019.
2. Аленов А.В. Микробиологическая и эколого-эпидемиологическая характеристика вибриозов в Приморском крае: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Владивосток, 2000. – 27 с.
3. Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Воронок В.М. и др. Роль галофильных вибрионов в структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края // *Холера и патогенные для человека вибрионы: сб. статей проблемной комиссии.* – Ростов-на-Дону, 2017. – С. 95-98.
4. Рыковская О. А., Шалу, О.А., Монахова Е.В. и др. Комплексный метод оценки вирулентности параземолитических вибрионов // *Клиническая лабораторная диагностика.* – 2013. - №2. – С. 38-41.
5. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых параземолитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания МУК 4.2.1793-03. – М., 2003.
6. Методы контроля бактериологических питательных сред: МУК 4.2.2316-08. – М., 2008.

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ТРЕБОВАНИЙ К ДИАГНОСТИЧЕСКИМ ПИТАТЕЛЬНЫМ СРЕДАМ ДЛЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахян Г.Д., Савельева И.К.,
Санамянц Е.М., Сагакянц М.М., Каминский Д.И., Ульрих Е.П.

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

Пищевые токсикоинфекции продолжают оставаться значительной частью острой кишечной инфекционной патологией страны, особенно в регионах с массовым употреблением морепродуктов. Одним из наиболее распространенных этиологических агентов пищевых токсикоинфекций являются паразитические галофильные вирионы (ПГВ) [1]. Однако, не смотря на высокий технический уровень оснащения диагностических лабораторий, идентифицировать этого возбудителя удается лишь в 1/3 случаев [2]. В то же время в сводках центра CDC (США) фигурируют данные ежегодной заболеваемости, вызванной вибрионами, до 1250 человек (в 2014 г.), и о вспышках пищевой токсикоинфекции (в 2018 г.), вызванной ПГВ. [3, 4].

Важнейшей задачей совершенствования лабораторной диагностики инфекционных болезней является стандартизация требований к используемым диагностическим препаратам, в том числе питательным средам. Однако, действующие в настоящее время нормативные документы [5, 6] лишь частично касаются диагностических сред для паразитических вибрионов, дублируя основные подходы к контролю препаратов для диагностики холеры.

В связи с вышеизложенным, была поставлена **цель** – разработка требований к оценке качества всего перечня питательных сред для ПГВ с оформлением соответствующих методических рекомендаций. Этот документ в последствии должен стать основой нормирования показателей оценки качества при разработке новых специальных питательных сред для выделения ПГВ и диагностики вызываемых ими заболеваний.

На первом этапе исследований был сформирован перечень тест-штаммов, обеспечивающих адекватность показателей качества всего набора питательных сред, используемых при выделении, культивировании и идентификации ПГВ. В результате анализа данных отечественной и зарубежной литературы, а также основываясь на материалах собственных исследований, было определено:

Для контроля питательных сред выделения ПГВ необходимо использовать штаммы *V. parahaemolyticus* 13580 (ATCC 17802),

V. alginolyticus 16463 (ATCC 17749) и *V. furnissii* 16465 (ATCC 35016). В качестве представителя негалофильных вибрионов оптимально использовать тест-штамм *V. cholerae* non 01/non O139 P-9741. Сапрофитная микрофлора должна быть представлена тест-штаммами *E. coli* 18 и *P. vulgaris* НХ 19 № 222.

Для контроля сред культивирования и определения биохимических свойств - *V. parahaemolyticus* 13580 (ATCC 17802), *V. alginolyticus* 16463 (ATCC 17749) и *V. furnissii* 16465 (ATCC 35016), характеризующимися отличиями галофильности и различной способностью к ферментации углеводов и аминокислот.

Для контроля питательных сред определения гемолитической активности штаммов ПГВ (среда Вагатцума) использовать Канагава-позитивный штамм - *V. parahaemolyticus* КМ-187 и авирулентный штамм - *V. parahaemolyticus* КМ-215.

Для контроля питательных сред определения уреазной активности штаммов ПГВ - *V. parahaemolyticus* КМ-186 (уреазопозитивный) и *V. parahaemolyticus* КМ-215 (уреазонегативный).

Для контроля сред подготовки к ПЦР-тестированию *V. parahaemolyticus* КМ-204 (tdh,trh-позитивный) и *V. parahaemolyticus* КМ-215 (tdh,trh-негативный).

В соответствии с последними требованиями к бактериологическим питательным средам были определены перечни показателей, тест-штаммов, методы их подготовки и условия проведения контроля для всех групп питательных сред, используемых в диагностике вызываемых ПГВ инфекционных заболеваний. Для сред каждого назначения сформулированы критерии их пригодности, рекомендованы контрольные среды. Методические рекомендации «Контроль диагностических питательных сред для парегемолитических вибрионов по биологическим показателям» одобрены Ученым советом института и утверждены директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора 30.01.2019г. Основные положения данного документа были использованы при разработке нового диагностического препарата «Набор реагентов для приготовления питательной среды для выделения и первичной идентификации парегемолитических вибрионов (Набор ПВГС)», который в настоящее время проходит процедуру регистрации в качестве изделия медицинского назначения.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Воронок В.М. и др. Роль галофильных вибрионов в структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края // Холера и патогенные для человека

вибрионы: сб. статей проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону. – 2017. – Вып. 30. – С. 95-98.

2. Аленов А.В. Микробиологическая и эколого-эпидемиологическая характеристика вибрионозов в Приморском крае: Автореф. дис... канд. мед. наук. – Владивосток, 2000. – 27 с.

3. Weekly epidemiological record.2015.

4. Weekly epidemiological record. 2019.

5. Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами: Методические указания МУК 4.2.1793-03. – М., 2003.

6. Методы контроля бактериологических питательных сред. МУК 4.2.2316-08. – М., 2008.

ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТОК НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ ПРОТИВОЧУМНЫХ ИНСТИТУТОВ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2019 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

Щипелева И.А., Марковская Е.И., Кретенчук О.Ф., Титова С.В.,
Чемисова О.С., Алексеева Л.П.

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

В 2019 г. к обсуждению на Проблемной комиссии 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» сотрудниками Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института (НИПЧИ), Российского НИПЧИ «Микроб», Иркутского НИПЧИ, Ставропольского НИПЧИ, Волгоградского НИПЧИ, Противочумного центра, Противочумных станций, Управлений Роспотребнадзора в субъектах РФ, ФБУЗ «ЦГиЭ» субъектов РФ, ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора представлены промежуточные и окончательные результаты по 17 научно-исследовательским работам (НИР), из них 6 – завершаются в 2019 г., а выполнение 11 переходящих тем будет продолжено в 2020 г., к планированию на 2020 г. подано еще 2 новых разработки.

При планировании исследований, выполняемых в рамках Проблемы

«Холера ...», научными сотрудниками и специалистами вышеуказанных учреждений были заявлены следующие цели:

- Мониторинг за распространением холеры в мире с оценкой тенденций в динамике заболеваемости, рисков активизации эпидемического процесса – чрезвычайных ситуаций различного происхождения и экологических условий поверхностных водоемов;
- Совершенствование информационного обеспечения научных исследований по проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы» с использованием информационно-библиографической базы данных;
- Оценка структурной и функциональной вариабельности генома штаммов *V. cholerae* O1 с различными эпидемически значимыми свойствами для прогнозирования возникновения новых вариантов возбудителя холеры;
- Эволюционный и филогеографический анализ штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в разные годы на территории Северного Кавказа;
- Оценка значения образования холерными вибрионами моно- и мультивидовых (мультиродовых) биопленок на различных биотических субстратах и роли некоторых экологических факторов в адаптации и персистенции холерных вибрионов;
- Научное обоснование и разработка мероприятий по обеспечению выполнения Постановления Правительства РФ «О присоединении Российской Федерации к Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года»;
- Научное обоснование совершенствования организации и проведения лабораторных исследований на холеру в лабораториях Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения Российской Федерации;
- Совершенствование системы внутрилабораторного и внешнего контроля лабораторной диагностики холеры;
- Разработка метода оценки жизнеспособности клеток *V. cholerae* с помощью различных вариантов ПЦР на основании детекции транскрипции генов, выявленных при анализе транскриптома;
- Разработка алгоритма анализа газовой хромато-масс-спектрометрии в качестве метода для индикации и идентификации *V. cholerae* по спектру жирных кислот в рамках плановых мониторинговых исследований;
- Изучение роли жирнокислотного состава штаммов *V. cholerae* в адаптации/персистенции вибрионов;
- Усовершенствование диагностического холерного бактериофага для дифференциации холерных вибрионов O1 серогруппы;

- Создание диагностической ИФА тест-системы для детекции холерного токсина;
- Разработка набора питательных сред для выделения парагемолитических и других патогенных галофильных вибрионов из различных объектов окружающей среды и материала от людей;
- Разработка питательной среды для определения гемолитической активности парагемолитических и других патогенных нехолерных вибрионов из различных объектов окружающей среды и материала от людей;
- Разработка питательной среды для идентификации холерного вибриона по признакам ферментации сахарозы, отсутствия дегидролазы аргинина и продукции сероводорода;
- Изучение влияния различных факторов на передачу генов антибиотикорезистентности в различных экологических нишах у холерных вибрионов O1 и не O1/неO139 серогрупп;
- Создание фагового коктейля для профилактики холеры;
- Разработка методики использования технологии электронного обучения в заочной части цикла повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой.

По направлению 48.04.01 «Экология вибрионов, эпидемиология холеры и эпиднадзор» осуществляется разработка 5 научных тем, из которых выполнение 3 НИР будет продолжено в 2020 г.

В рамках НИР 204-4-18 «Мониторинг, оценка и прогнозирование эпидемиологической обстановки по холере в мире, странах СНГ и России с использованием информационных технологий и учетом чрезвычайных ситуаций различного происхождения» (срок выполнения темы: 2018-2021 гг., руководители НИР: Э.А. Москвитина, С.В. Титова) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

В 2019 г. дана оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире, странах СНГ и России с 2009 по 2018 г., представлен прогноз на 2019 г. При анализе и оценке эпидемиологической обстановки использованы сведения проблемно-ориентированных баз данных «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в мире», «Холера Эль-Тор. Эпидемиологический анализ заболеваемости в СНГ, России», «Холерные вибрионы. Россия». Анализ данных о выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды в России (2009-2018 гг.) проведен с учетом информации, поступающей в Референс-центр по мониторингу за холерой из противочумных учреждений, Управлений Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в субъектах Российской Федерации, паспортных данных на штаммы после их

окончательной идентификации. При мониторинге заболеваемости холерой на глобальном уровне выявлена тенденция роста в динамике заболеваемости (относительно 2009 г.); установлены ее круглогодичные проявления. В качестве инструмента для оперативного эпидемиологического анализа ситуации по холере была использована созданная в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора ГИС «Внешний эпидемиологический риск – заболеваемость».

В рамках 200-4-18 «Научное обоснование оптимизации порядка организации, объема и номенклатуры исследований на холеру в лабораториях территориального, регионального и федерального уровней» (срок выполнения темы: 2018-2020 гг., руководители НИР: В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина, С.В. Титова, О.С. Чемисова) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Проведенный референс-центром анализ организационных вопросов порядка проведения лабораторной диагностики холеры, номенклатуры и объемов исследований в лабораториях различного уровня в субъектах Российской Федерации, обобщение и систематизация полученных материалов позволили сформулировать тезисные направления для переработки нормативной документации – составления проекта МУК «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней».

В рамках НИР 201-4-18 «Экспериментальная оценка роли некоторых экологических факторов в адаптации и персистенции холерных вибрионов, выделяемых в процессе мониторинговых исследований» (срок выполнения темы: 2018-2021 гг., руководители НИР: С.В. Титова, С.О. Водопьянов) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Установлено, что формирование биопленки на хитиновом субстрате является защитным механизмом придающим холерным вибрионам устойчивость к фагоцитозу *D. discoideum* (клеточный слизевик), что позволяет холерным вибрионам выживать в различных экологических нишах. Кроме того, показано, что устойчивость холерных вибрионов в составе биопленок на хитиновом субстрате к фагоцитозу простейшими может способствовать распространению холеры за пределы эндемичных очагов.

Выполнение НИР 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) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

База данных «Холера и патогенные для человека вибрионы» включает рефераты научных публикаций из отечественных и зарубежных журналов, сборников научных трудов, материалов конференций и съездов,

авторефератов кандидатских и докторских диссертаций, монографий, некоторых реферативных журналов, официальных документов ВОЗ, а также описания нормативных и методических документов. В базу данных включены рефераты из базы данных «MEDLINE», PubMed. На основе использования базы данных осуществляется ежегодное формирование аннотированных библиографических указателей «Холера и патогенные для человека вибрионы»; ретроспективный поиск, получение и выдача информации по запросам в пакетном режиме или режиме теледоступа; выдача распечатки результатов поиска информации в базе данных; оперативное обеспечение поиска в базе данных по индивидуальным запросам научных сотрудников; выдача аннотированных указателей в электронном варианте. Аннотированные библиографические указатели являются ежегодной формой внедрения. Указатели включают библиографические описания и рефераты монографий, руководств, учебников, методических документов, авторефератов кандидатских и докторских диссертаций, статей из журналов, сборников и других документированных источников отечественной и зарубежной информации по различным направлениям исследований.

Выполнение НИР 197-4-17 «Научное обоснование реализации требований Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими (2004 г.) в Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководитель НИР: С.Ю. Водяницкая) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР специалистами Ростовского-на-Дону противочумного института представлены следующие результаты:

Усовершенствованы способы отбора балластной воды, достоинством которых является минимизация контакта с балластной водой и простота их исполнения; выбраны «пилотные» территории Российской Федерации для внедрения положений Конвенции; проведен анализ заходов судов заграничного плавания (путей распространения микроорганизмов), в т.ч. в страны, эндемичные по холере, и микробиологические исследования балласта судов в портах трех субъектов Российской Федерации. Результаты исследования балластных вод на соответствие микробиологическому стандарту и разработанные способы деконтаминации использованы для принятия управленческих решений при осуществлении эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации (оформлен проект МУК и отправлен в Роспотребнадзор). Разработаны обучающие программы для специалистов Роспотребнадзора с целью последующей надлежащей подготовки членов экипажей судов по вопросам обращения с судовым балластом; принципиальная схема взаимодействия для управления качеством балласта в Российской Федерации, которая включает участие специалистов портов, противочумных учреждений и Управлений Роспотребнадзора для внедрения положений Конвенции; дана оценка экономической эффективности затрат на мероприятия по деконтаминации судна в случае обнаружения *V. cholerae* O1

и O139.

Специалистами Иркутского НИПЧИ представлены следующие результаты:

Для оценки заноса возбудителя холеры с балластными водами международных судов проведен анализ международного сообщения в Приморском крае в период с 2016 г. по 2018 г. Показано, что наиболее значимым направлением судоходства является азиатское. Установлена равномерная в течение всего года интенсивность судоходства. В отдельных странах Азии, Америки, Австралии, которые посетили международные суда, отмечены эпидемические осложнения по холере в виде единичных или групповых случаев, что обуславливает возможность заноса возбудителя холеры. Также возможен занос галофильных вибрионов, широко распространенных в морских прибрежных водах, с балластными водами судов. Забор и сброс балластных вод осуществлялся в большинстве случаев в открытом море вдали от береговой линии. Половина судов, прибывших в Приморский край в 2016 г., не была оснащена системами обеззараживания балласта.

По направлению 48.04.02 «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов» осуществляется разработка 5 научных тем.

В рамках НИР 013-4-18 «Экологические, эволюционные и молекулярно-генетические аспекты адаптации и персистенции микроорганизмов рода *Vibrio* в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока» (срок выполнения темы: 2018-2020 гг., руководители НИР: С.В. Балахонов, Л.В. Миронова), выполняемой в Иркутском НИПЧИ, авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Проведено полногеномное секвенирование 10 штаммов *V. cholerae* (O1 серогруппы, R-варианта и не O1/O139 серогруппы), выделенных из р. Ангара в 2017-2018 гг. Выполнена сборка геномов в контиги и аннотация. Геномы депонированы в GenBank. Определена нуклеотидная последовательность восьми генов жизнеобеспечения шестнадцати штаммов R-варианта холерного вибриона, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке. Проведен анализ филогенетического родства изученной группы штаммов. Выполнены исследования по разработке схемы мультилокусного сиквенс-типирования на основе корового генома (cgMLST) *V. cholerae*. Подобраны праймеры для изометрической реакции амплификации к участкам видоспецифического гена *gfpA*, (отвечающего за синтез белка, посредством которого происходит прикрепление вибрионов к хитиновым поверхностям и кишечному муцину) и к участкам кластера генов *wbe*. Определены варианты программ амплификации. Идентифицированы выделенные в 2018 г. из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока штаммы холерного вибриона. База данных «*V. cholerae* Сибирь и Дальний Восток – PFGE генотип» пополнена макрорестрикционными профилями штаммов *V. cholerae*, выделенных в

2018 г. Проведено изучение адаптации к физико-химическому стрессу штаммов *V. cholerae* путем анализа фенотипических характеристик и экспрессии генов по комплексу маркеров жизнеспособности. Проведено изучение механизма и динамики процесса биопленкообразования у штаммов *V. cholerae* путем сравнения экспрессии структурных и регуляторных генов, участвующих в синтезе полисахарида холерного вибриона (VPS), обеспечивающего формирование матрикса биопленок. Прослежены закономерности изменения экспрессии генов синтеза полисахарида у штаммов *V. cholerae* в зависимости от серогруппы.

В рамках НИР 208-4-19 «Анализ транскриптома и разработка методических подходов для выявления жизнеспособности *Vibrio cholerae* по продукции специфической РНК» (срок выполнения темы: 2019 – 2022 гг., руководители НИР: С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Проведены исследования по подбору методики выделения из клеток *V. cholerae* препаратов РНК, свободных от примеси ДНК. Начаты исследования по определению сроков деградации ДНК холерного вибриона на модели поверхностных водоемов. Начата разработка системы выявления транскрибируемых генов *V. cholerae* с помощью различных вариантов ОТ-ПЦР. Отрабатывается метод выделения ДНК / РНК из холерных вибрионов в составе биопленок.

В рамках НИР 209-4-19 «Изучение спектров жирных кислот как биомаркеров штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп и возбудителей острых кишечных инфекций методом газовой хроматографии масс-спектрометрии» (срок выполнения темы: 2019 – 2021 гг., руководители НИР: Р.В. Писанов, О.В. Дуванова) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Подобраны типовые штаммы *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп, *V. parahaemolyticus* с различным набором детерминант патогенности и персистенности. Разработаны алгоритмы анализа данных масс-спектрометрии. Определен спектр жирных кислот штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп, *V. parahaemolyticus* в стандартных условиях культивирования. Оформлены методические рекомендации. Создана коллекция масс-спектров жирных кислот *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп и возбудителей ОКИ.

В рамках НИР 76-4-19 «Комплексный геномно-протеомный анализ варибельности эпидемически значимых свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации» (срок выполнения темы: 2019 - 2022 гг., руководитель НИР: Н.И. Смирнова), выполняемой в РосНИПЧИ «Микроб», авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Проведен биоинформационный и филогенетический анализ секвенированных полных геномов 38 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1

биовара Эль Тор с разным генотипом. Установлено, что штаммы, циркулирующие в Калмыкии, относятся к разным филогенетическим группам и имеют разное происхождение. Исследована устойчивость геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в разные периоды текущей пандемии, к полимиксину В и выявлено два полимиксин-чувствительных штамма, завезенных из Индии в 2012 и 2014 годах. Проведен сравнительный протеомный анализ типичного штамма M1062 (Астрахань, 1970) и геноварианта M1509 (Москва, 2012). Показано большое сходство их протеомов. Однако у геноварианта выявлена повышенная экспрессия белков, обеспечивающих вирулентные и адаптивные свойства, белков-транспортёров, участвующих в метаболизме жирных кислот, белковом и углеводном обменах, а также входящих в группу кофакторы, пигменты, витамины. Выделен очищенный белок ТсрА возбудителя холеры и получены мышинные антисыворотки к данному белку.

В рамках НИР 1-4-19 «Эволюционный анализ геномов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор и филогеография заносов возбудителя холеры на территорию Северного Кавказа с 1970 по 1998 гг.» (срок выполнения темы: 2019-2020 гг., руководитель НИР: А.Н. Куличенко), выполняемой в Ставропольском НИПЧИ, авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Подготовлены библиотеки геномной ДНК для последующего молекулярно-генетического анализа. Проведено полногеномное секвенирование 5 штаммов возбудителя холеры. До конца 2019 г. авторы предполагают провести многолокусный анализ областей генома с переменным числом тандемных повторов, INDEL-типирование и секвенирование геномов 10 штаммов холерного вибриона.

По направлению 48.04.04 «Разработка современных иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами» осуществляется разработка 6 научных тем, из которых – выполнение 3 НИР будет продолжено в 2020 г.

В рамках НИР 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) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Проведено сравнительное изучение зарегистрированных в Российской Федерации и используемых практическими лабораториями селективных дифференциальных питательных сред по основным биологическим показателям в модельных опытах и в ходе мониторинга объектов окружающей среды. Проведены сравнительные испытания стабильности при хранении, транспортировании и в процессе применения используемых лабораториями территориального уровня щелочных агаров и сред

обогащения. Подготовлен аналитический обзор «Основные направления разработки и совершенствования питательных сред для выделения и идентификации холерного вибриона». Подобраны, охарактеризованы и подготовлены к депонированию штаммы *V. cholerae* для контроля серологических методов лабораторной диагностики холеры. Проведен первый цикл внешнего контроля качества диагностики холеры методом флуоресцирующих антител. Подобраны, охарактеризованы и подготовлены к депонированию штаммы холерных вибрионов, включенные в панель контрольных образцов для внешнего контроля качества ПЦР-диагностики холеры. Проведен второй цикл внешнего контроля качества ПЦР-диагностики холеры. Проведено сравнительное изучение фенотипических свойств штаммов холерного и парагемолитических вибрионов на различных средах с целью отбора перспективных тест-штаммов для контроля питательных сред. Разработан регламент для осуществления внешнего контроля качества лабораторных исследований на холеру с учетом уровней бактериологических лабораторий.

В рамках НИР 203-4-18 «Разработка питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» для идентификации холерного вибриона» (срок выполнения темы: 2018-2020 гг., руководитель НИР: А.Б. Мазрухо) авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

Осуществлен подбор ингредиентов и определены их оптимальные концентрации в составе «Аргинин-железо-сахарозного агара», его физико-химические показатели. Проведена оценка дифференцирующих свойств среды в отношении 19 штаммов холерных вибрионов различных биоваров и серогрупп, 9 штаммов *Aeromonas caviae* и *P. vulgaris* НХ 19 (12932) (тест-штамм). Проводится изучение указанных свойств в отношении штаммов *V. cholerae* O1, O139 сероваров, *V. cholerae* nonO1/nonO139, представителей рода *Aeromonas* и некоторых бактерий из семейства *Enterobacteriaceae*. Дифференциация вибрионов от близкородственных сахарозопозитивных микроорганизмов, имеющих сходную морфологию колоний с помощью «Аргинин-железо-сахарозного агара» позволит сократить объем исследований на этапе идентификации выделенных культур.

Выполнение НИР 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) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Отработана двухэтапная технологическая процедура очистки холерного токсина из *V. cholerae classical* 569В с учетом требований биологической безопасности при работе с возбудителями II-III групп патогенности. За счет меньшей продолжительности технологического процесса и сокращения стадий очистки представляется возможным в короткие сроки получить холероген по своим характеристикам не

уступающий импортным дорогостоящим коммерческим препаратам в контексте реализации стратегии импортозамещения на территории РФ. Определен масс-спектр холерного токсина, выявлены специфические пики масс-спектров, оценена возможность его определения в различных токсинсодержащих препаратах. Метод MALDI-TOF MS можно рассматривать, как дополнительный, для оценки чистоты ХТ. Установлена возможность использования прямого варианта ИФА и дот-ИФА на основе моноклональных и пероксидазных конъюгатов для детекции токсигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп.

Выполнение НИР 196-4-17 «Усовершенствование диагностического препарата на основе бактериофагов для дифференциации холерных вибрионов O1 серогруппы на биовары» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководитель НИР: Н.Е. Гаевская) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Усовершенствован диагностический холерный бактериофаг Эльтор для дифференциации холерных вибрионов O1 серогруппы; разработана стабильная форма выпуска диагностического препарата. Полные геномы фагов Rostov-1 и Rostov-7 зарегистрированы и доступны в Genbank (NCBI) под инвентарными номерами MG957431 и MK575466 соответственно. Внедрение в производство и лабораторную практику усовершенствованного диагностического холерного бактериофага Эльтор для дифференциации холерных вибрионов O1 серогруппы позволит повысить эффективность эпидпрогнозирования и эпидемиологического надзора за холерой.

Выполнение НИР 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) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Проведены испытания питательной среды на модельных смесях тест-штаммов парагемолитических вибрионов и смывов с объектов внешней среды и материалов от людей, а также модельных смесях с пищевыми продуктами (рыбными и морепродуктами), показавшие эффективность данной среды для проведения данных исследований. На «Набор реагентов для приготовления питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов (Набор ПГВС)», зарегистрированный в установленном порядке как изделие медицинского назначения, получено регистрационное удостоверение.

В рамках НИР 207-4-19 «Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов и изучение иммунного ответа организма на введение холерных фагов» (срок выполнения темы: 2019-2022 гг., руководители НИР: Н.Е. Гаевская, И.А. Иванова)

авторами в 2019 г. получены следующие результаты:

В работу были отобраны из коллекции института три холерных фага, лизирующие вибрионы O139 и O1 серогруппы биоваров Classical и El Tor, из которых создана новая фаговая композиция. Перспективными для проведения исследования оказались холерные фаги, обладающие высокой литической активностью. Проведено электронно-микроскопическое исследование отобранных фагов и их секвенирование. В работе проведена сравнительная оценка применения *in vivo* фаговой смеси в отношении антибиотикорезистентного штамма холерного вибриона на модели генерализованной формы инфекции у белых мышей. Эксперимент показал высокую эффективность применения данной фаговой смеси для ее профилактического и лечебного использования.

По направлению 48.04.05 «Биологическая безопасность при холере и других заболеваниях, вызываемых патогенными вибрионами. Противодействие биотерроризму» осуществляется разработка 1 НИР.

Выполнение 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) завершается в 2019 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Впервые показана возможность использования электронных систем обучения специалистов Роспотребнадзора и ЛПО на очно-заочных курсах повышения квалификации по программе «Лабораторная диагностика и эпиднадзор за холерой». Разработаны документы: Дополнительная профессиональная образовательная программа повышения квалификации специалистов «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой», объемом 36 академических часов; Положение о дистанционном обучении по дополнительным профессиональным программам; Положение о промежуточной и итоговой аттестации по дополнительным профессиональным программам повышения квалификации специалистов; Требования к структуре, содержанию и оформлению электронных учебно-методических комплексов; Инструкция по работе с дистанционно-обучающими электронными технологиями; Учебное пособие «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой» для дистанционной части ДПО по дополнительной профессиональной программе повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций; Сборник квалификационных тестов.

РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

НАБОР РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (НАБОР ПГВС) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO

Мазрухо А.Б., Харабаджахан Г.Д., Савельева И.К., Каминский Д.И.,
Ульрих Е.П., Рожков К.К., Чемисова О.С., Санамянц Е.М., Сагакянц М.М.
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

Набор ПГВС предназначен для выделения парагемолитических вибрионов из образцов клинического материала, объектов окружающей среды и продуктов питания при проведении микробиологической диагностики гастроэнтеритов, раневой инфекции, септицемии, инфекций уха, менингитов, связанных с купанием в морской воде и употреблением в пищу морепродуктов. Принцип действия Набора ПГВС основан на использовании двух этапов селекции микроорганизмов с целью выделения, дифференциации и первичной идентификации парагемолитических вибрионов.

Регистрационное удостоверение № РЗН 2019/8472 от 10.06.2019 г.
Приказ Росздравнадзора РФ от 10.06.2019 г. № 4256.

**АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ В 2019 ГОДУ ПО
ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА»**

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ
ИДЕНТИФИКАЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ХОЛЕРНЫХ
ВИБРИОНОВ O1, O139 СЕРОГРУПП ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ
МЕТОДАМИ**

*(диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03. – микробиология)*

Евдокимова В.В.

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

В диссертационной работе расширен спектр имеющихся в лаборатории гибридом за счет получения новых, продуцирующих моноклональные антитела (МКА), направленные к эпитопам белков наружной мембраны холерных вибрионов O1, O139 серогрупп.

В работе показано, что многократное пассирование гибридом-продуцентов МКА в условиях *in vivo* и *in vitro* обеспечивает накопление культуральной и асцитической жидкостей, из которых были выделены и очищены моноспецифические иммуноглобулины, отвечающие в полной мере диагностическим требованиям. Модификация ряда этапов биотехнологической схемы получения пероксидазных конъюгатов позволила оптимизировать ее применительно к МКА и сконструировать диагностические препараты, с рабочим титром 1:128–1:256, строго специфичные в отношении холерных вибрионов O1, O139 серогрупп. А на основе МКА к эпитопам белков наружных мембран получены пероксидазные конъюгаты, которые позволяют выявлять холерные вибрионы O1/O139 серогрупп с генотипом *tcpA+* в прямых методах ИФА.

По результатам проведенных исследований разработан и утвержден директором института (протокол № 10 от 5.12.2016 г.) комплект нормативной документации (ТУ и Инструкция по применению) на набор реагентов «Имуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА». В схеме лабораторной диагностики холеры препараты могут быть использованы для обнаружения холерных вибрионов в пробах из объектов окружающей среды и из клинического материала после выделения чистой культуры для подтверждения серогруппы холерных вибрионов.

На гибридомы (ГХ-А5D8/Omp и ГХ-Н2F5/Omp) получены свидетельства о депонировании в «ГКПМ-Оболенск» (№ 179, № 180 от

12.12.2016) и патент «Штамм культивируемых гибридных клеток животного *Mus Musculus* – продуцент моноклонального антитела к мембранному белку, общему для *tcp+* штаммов холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп» (№ 2663003 от 31.07.2018 г.).

Диссертация защищена 20.09.2018 г. в диссертационном совете Д 208.078.02 на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ
АНАЛИЗ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ
ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1
БИОВАРА EL TOR**

(диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.03 – микробиология)

Крицкий А.А.

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

Исследована способность генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, завезенных на территорию Российской Федерации в разные временные периоды (с 1993 по 2014 гг.), образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра. Установлено, что данная диагностически значимая реакция изменена у всех изученных штаммов (у 72,2% – слабоположительна, у 27,8% – отрицательна). При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности структурных (*alsD*, *alsO*, *alsS*) и регуляторных (*alsR*, *aphA*) генов, кодирующих и контролирующих биосинтез ацетона, у природных типичных и генетически измененных штаммов выявлено, что причиной снижения (или отсутствия) продукции ацетона у геновариантов является делеция единичного нуклеотида (Т) в структурном гене *alsD* (позиция 315), кодирующем фермент ацетолактат декарбоксилазу. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона, что обуславливает биосинтез дефектного белка. Показано, что выявленные изменения диагностически значимого признака у изученных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor связаны также с повышенным (в среднем в 2,5 раза) уровнем экспрессии регуляторного гена *aphA*, негативно влияющим на продукцию ацетона.

Изучено влияние разных концентраций глюкозы на рост генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor и установлено, что

культивирование данных штаммов на богатых питательными веществами средах с высоким содержанием глюкозы (1% и выше) не влияет на их ростовые свойства, в то же время в условиях недостатка питательных веществ добавление глюкозы (0,5% и выше) в качестве единственного источника питания ингибирует рост геновариантов возбудителя холеры в отличие от типичных штаммов. Выявленная особенность геновариантов может быть использована в качестве дополнительного дифференцирующего признака типичных и генетически измененных штаммов.

Проведен сравнительный анализ жизнеспособности типичных и генетически измененных штаммов в водной среде методом конкурентной пробы и выявлен повышенный уровень выживаемости геновариантов (в среднем в шесть раз на 6-е сутки совместного культивирования). Установлено, что адаптационные преимущества генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor по сравнению с типичными штаммами в условиях дефицита питательных веществ обусловлены повышенной скоростью роста бактериальной популяции, а также более высоким уровнем экспрессии глобального регулятора стрессового ответа – белка RpoS (в среднем в 3 раза).

Диссертация защищена 14.03.2019 г. в диссертационном совете Д 208.078.02 на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

(диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.03 – микробиология)

Агафонова Е.Ю.

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

Проведен анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов из эндемичных (страны Юго-Восточной Азии) и неэндемичных (РФ, Украина, Грузия, Туркменистан) по холере территорий и определена современная структура популяций нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор. Выявлены три основные группы с генотипом *ctxA tcpA⁻ VSP⁻*, *ctxA tcpA⁺ VSP⁻* и *ctxA tcpA⁺ VSP⁺*, различающиеся организацией их

геномов. Нетоксигенные штаммы с неэндемичной по холере территории (изучено 29 штаммов) представлены двумя генетически различными группами $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$, отличающимися друг от друга по составу мобильных элементов, определяющих их патогенный потенциал. Характерной особенностью штаммов первой группы является отсутствие всех профагов вирулентности (CTXφ, RS1φ, TLCφ), острова патогенности VPI-1 и островов пандемичности VSP-I и VSP-II, а также нестабильность генетической структуры острова патогенности VPI-2, которая проявлялась в наличии делеций различной протяженности (от 33887-38081 п.н. до 47120-49986 п.н.). Кроме того, установлен высокий уровень варибельности 16 генов кластера *msh* острова персистенции EPI, участвующих в образовании биопленки. Количество однонуклеотидных замен в них достигало 54-252 в зависимости от штамма. Многочисленные несинонимичные и синонимичные замены обнаружены также в генах коровой области *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Полученные данные позволили на генетическом уровне подтвердить эпидемическую безопасность $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ штаммов. Геном второй группы вибрионов ($ctxA^-tcpA^+VSP^-$) отличался от первой наличием у всех изолятов острова патогенности VPI-1 с геном *tcpA^{ET}*. Нестабильность VPI-2 выражалась в делеции участка ДНК протяженностью 33965-34352 п.н. лишь у 33,3% изученных штаммов. Однако в сохранившемся гене *nanH* этих штаммов выявлено множество однонуклеотидных замен (17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных). Варибельность генов *msh*, а также генов *hlyA*, *hapA* и *rtxA* была относительно невелика (число однонуклеотидных замен в них составляло 0-43 в зависимости от штамма). Данные об отсутствии островов пандемичности среди всех изученных штаммов $ctxA^-tcpA^+$, циркулирующих на территории РФ и в других неэндемичных по холере регионах, являются приоритетными и позволяют сделать заключение о том, что такие штаммы не могут нести потенциальную эпидемическую опасность.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей восьми нетоксигенных штаммов с генотипом $ctxA^-tcpA^+$ из эндемичных по холере территорий (взяты из базы данных NCBI GenBank) установлено, что такие штаммы относились к третьей группе и отличались от первых двух присутствием островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Более того, эти $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ штаммы имели значительное сходство с токсигенными изолятами. Отсутствие только профага CTXφ при наличии в геноме всех других ключевых мобильных элементов с генами патогенности, эпидемичности и персистенции служит указанием на возможность их реверсии в токсигенные, вследствие чего они могут представлять потенциальную эпидемическую опасность.

Проведено SNP-типирование 47 токсигенных и нетоксигенных штаммов и показано, что нетоксигенные штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ имеют общее происхождение с токсигенными, тогда как

нетоксигенные *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻* и *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* штаммы относятся к двум отдельным филогенетически обособленным группам.

Разработан способ дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разной эпидемической значимостью на основе метода ПЦР-ЭФ. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены *ctxA*, *tcpA*, входящие в состав профага вирулентности СТХφ и острова патогенности VPI-1, а также гены *vc0180* и *vc0514*, локализованные на островах пандемичности VSP-I и VSP-II, соответственно. Новизна разработанного способа подтверждена получением патента РФ на изобретение (№2671412 приоритет от 10.01.2019 г.). Путем введения в клетки нетоксигенного генетически измененного штамма клонированного гена *ctxB1* в составе рекомбинантной плазмиды сконструирован авирулентный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, продуцирующий иммуногенную В-субъединицу холерного токсина.

Диссертация защищена 30.05.2019 г. в диссертационном совете Д 208.078.02 на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И ИНСТРУКЦИЙ

АЛГОРИТМ ЛАБОРАТОРНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ В ПЕРИОД ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ВОСЕМНАДЦАТЫХ ДЕЛЬФИЙСКИХ ИГР РОССИИ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ 19-24 АПРЕЛЯ 2019 ГОДА

Лабораторная диагностика инфекционных болезней в период проведения массового крупного форума в области искусств, направленного на поиск и поддержку талантливой молодежи, обеспечивает подтверждение инфекционного заболевания для своевременного проведения первичных противоэпидемических мероприятий и осуществляется в соответствии с утвержденным Алгоритмом лабораторного обеспечения диагностики инфекционных болезней в период проведения мероприятий.

Алгоритм определяет перечень контингентов, подлежащих обследованию, перечень лабораторий, уполномоченных осуществлять лабораторную диагностику инфекционных болезней в период Дельфийских игр, алгоритм обследования лиц с подозрением на инфекционные болезни и

начинает в отношении пребывающих на Дельфийские игры и действует до отъезда всех официальных делегаций.

В период действия алгоритма лабораторная диагностика инфекционных болезней осуществляется в круглосуточном режиме с использованием экспресс и ускоренных методов.

Объем лабораторных исследований, в соответствии с прогнозом, может составить до 1000 лабораторных исследований, в том числе 450 на острые кишечные инфекции, 500 на воздушно-капельные и другие группы инфекций.

Объем внеочередных обследований персонала, привлекаемого к организации питания участников и гостей на группу энтеропатогенных вирусов (рота-, норо-, астра-, энтеровирус) составляет 200 человек (800 исследований).

Документ составлен сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, утвержден директором института **С.В. Титовой**.

Согласован: Главный врач ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области» **Г.В. Карпушенко**; Директор ФБУН РостовНИИ микробиологии и паразитологии **Т.И. Твердохлебова**.

Утвержден: Руководитель Управления Роспотребнадзора по Ростовской области **Е.В. Ковалев**; Министр здравоохранения Ростовской области **Т.Ю. Быковская**.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 569 В»

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П.,
Зюзина В.П., Кретенчук О.Ф., Ларионова Л.П., Галичева А.Л.

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

В методических рекомендациях описаны методы получения и очистки холерного токсина *V. cholerae. cholerae* 569 В, включая ультрафильтрацию и ионообменную хроматографию на ситеме FPLC Pathfinder Duoflow Bio-Rad/ оценку биологической и иммунохимической активности холерогена проводили с помощью культуры клеток и иммунологических методов.

Методические рекомендации предназначены для специалистов

лабораторий, занимающихся медицинской биотехнологией и микробиологией, изучением структурных и функциональных особенностей токсинов, разработкой диагностических препаратов.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 1 от 30.01.2019 г.) и утверждены директором института.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ
«КОНТРОЛЬ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ
ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ПО БИОЛОГИЧЕСКИМ
ПОКАЗАТЕЛЯМ»**

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Титова С.В., Харабаджахан Г.Д.,
Савельева И.К., Каминский Д.И., Санамянц Е.М., Ульрих Е.П.

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

Методические рекомендации предназначены для контроля по биологическим показателям питательных сред промышленного и лабораторного приготовления, используемых при диагностике заболеваний, вызываемых парагемолитическими патогенными для человека вибрионами (ПГВ).

Данный документ рекомендуется к использованию специалистами бактериологических лабораторий учреждений, осуществляющих государственный санитарно-эпидемиологический надзор лечебно-профилактических учреждений при лабораторной диагностике вибриозов не холерной этиологии, а также работникам, изготавливающим и контролирующим питательные среды для вышеуказанных целей.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 1 от 30.01.2019 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БАЗЫ ДАННЫХ «ИНСПЕКТИРОВАНИЕ МОРСКИХ СУДОВ»

Водопьянов А.С.¹, Москвитина Э.А.¹, Водопьянов С.О.¹, Олейников И.П.¹,
Рыжков Ю.В.,² Беспалова С.А.², Косорукова О.Г.²

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

²*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области, Россия, г. Ростов-на-Дону*

База данных «Инспектирование морских судов» представляет онлайн-приложение, расположенное на общедоступном сайте в сети интернет. Это обеспечивает одновременную работу с единой базой различных удаленных пользователей (многопользовательский режим). Вся информация доступна для всех пользователей с момента ее внесения в базу данных.

Адаптивная верстка программной оболочки позволяет работать с базой данных не только с настольных компьютеров, но и мобильных устройств (планшеты и коммуникаторы). Это дает возможность вносить информацию и получать доступ к ней непосредственно в «полевых условиях».

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 8 от 06.12.2018 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ЛИОФИЛИЗАЦИЯ МИКРООРГАНИЗМОВ НА ЛИОФИЛЬНОЙ УСТАНОВКЕ КОЛЛЕКТОРНОГО ТИПА ALPHA 1-4 LSC MARTIN CHRIST С ПРИМЕНЕНИЕМ АДСОРБЕНТОВ»

Чемисова О.С., Сагакянц М.М., Голенищева Е.Н., Полеева М.В.,
Морозова И.В., Санамянц Е.М.

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

Предлагаемые методические рекомендации определяют комплекс мер, обеспечивающих биологическую безопасность в процессе лиофильного высушивания ПБА I-IV групп патогенности бактериальной природы на адсорбентах. В методических рекомендациях предложен способ лиофильного высушивания микроорганизмов с использованием адсорбентов, подобраны

носители (адсорбенты), обеспечивающие высокую выживаемость бактериальных клеток и стабильность их фенотипических свойств при длительном хранении, предложены меры биологической безопасности при лиофилизации ПБА I-IV групп патогенности бактериальной природы на установке коллекторного типа Alpha 1-4 LSC Martin Christ. Установлены режимы лиофилизации штаммов микроорганизмов на коллекторном аппарате Alpha 1-4 LSC Martin Christ.

Методические рекомендации предназначены для лабораторий, в которых проводится лиофильное высушивание возбудителей особо опасных инфекций на установке коллекторного типа Alpha 1-4 LSC Martin Christ; для специалистов научно-исследовательских институтов, занимающихся коллекционной деятельностью и лиофилизацией культур микроорганизмов.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 6 от 01.11.2018 г.) и утверждены директором института.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ АКТИВНОСТИ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ В ОТНОШЕНИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ДИКЛОФЕНАКА»

Селянская Н.А., Егиазарян Л.А., Березняк Е.А.

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

В настоящих методических рекомендациях предлагается способ повышения активности антибактериальных препаратов в отношении холерных вибрионов с использованием диклофенака, дана характеристика этого препарата, предложены эффективные дозы, кратность и продолжительность применения, позволяющие повысить эффективность антибактериальных препаратов в отношении *Vibrio cholerae* в опытах *in vitro* и *in vivo*.

В основу методических рекомендаций положены литературные и экспериментальные данные о влиянии диклофенака на активность антибактериальных препаратов в отношении множественнорезистентных штаммов холерных вибрионов *in vitro* и *in vivo* на модели генерализованной инфекции белых мышей.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол

№ 1 от 30.01.2019 г.) и утверждены директором института.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ИСПОЛЬЗОВАНИЕ
КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ДЛЯ АНАЛИЗА АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНОГО
ТОКСИНА НА ЭТАПАХ ПРОИЗВОДСТВА КОМПОНЕНТОВ
ХОЛЕРНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ»**

Гаева А.В., Дуракова О.С., Генералов С.В., Громова О.В., Ливанова Л.Ф.,
Волох О.А.

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

В методических рекомендациях изложен способ выявления холерного токсина и определения его активности при глубинном культивировании производственного штамма *Vibrio cholerae* 569В в биореакторе, основанный на использовании культуры овариальных клеток китайского хомячка (СНО-К1), специфически выявляющих присутствие токсина.

Рекомендации предназначены для специалистов, работающих в области производства иммунобиологических лекарственных препаратов (ИЛП), занимающихся разработкой и совершенствованием технологии производства ИЛП, а также сотрудников научно-исследовательских подразделений, использующих в работе перевиваемые клеточные культуры.

Одобрены Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» (протокол № 8 от 07.12.2018 г.), утверждены директором института в 2018 году.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ
ОЧИЩЕННОГО РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТСРА ХОЛЕРНОГО
ВИБРИОНА ИЗ ТЕЛЕЦ ВКЛЮЧЕНИЙ КОМБИНИРОВАННЫМ
МЕТОДОМ НА КОЛОНКАХ С НИКЕЛЬ-ХЕЛАТНЫМ СОРБЕНТОМ»**

Тучков И.В., Хопрова Е.В.

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

В методических рекомендациях изложен способ получения

рекомбинантного белка токсин-корегулируемых пилей адгезии (TcpA) из штамма-продуцента кишечной палочки *E. coli* BL21 Star™(DE3), содержащего плазмиду pET302/NT-His с клонированным участком гена tcpA холерного вибриона биовара Эль Тор размером 534 п.н. Очистка полученного рекомбинантного белка основана на избирательном связывании шести остатков гистидина рекомбинантного белка никель-хелатным сорбентом методом колоночной хроматографии.

Рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских и экспериментально-производственных подразделений, занимающихся конструированием химических, ДНК-вакцин, а также разработкой средств молекулярной диагностики.

Методические рекомендации оформлены в 2018 году, одобрены Ученым Советом РосНИПЧИ «Микроб» в 2019 году (протокол № 1 от 28.02.2019 г.) и утверждены директором института в 2019 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «VNTR-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *VIBRIO PARAHAEEMOLYTICUS*»

Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Фортунатова А.В., Балахонов С.В.

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, Россия, г. Ростов-на-Дону*

В Методических рекомендациях описаны методика и этапы проведения типирования парагемолитического вибриона методом VNTR-анализа по семи локусам тандемных повторов, учет и интерпретация полученных данных, а также перспективы использования метода.

Методические рекомендации одобрены Ученым советом института (протокол № 5 от 6.06.2019) и утверждены зам. директора института.

РАЗРАБОТАННЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ И ДРУГИЕ ПРОГРАММЫ

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ»

Сизова Ю.В., Бурлакова О.С., Балахнова В.В.

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

Дополнительная профессиональная программа повышения квалификации «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой» является учебно-методическим нормативным документом, регламентирующим содержание и организационно-методические формы дополнительного профессионального образования. Целью программы является совершенствование профессиональных знаний и компетенций по лабораторной диагностике и эпидемиологическому надзору за холерой, необходимых для профессиональной деятельности в рамках имеющейся квалификации. Содержание программы рассчитано на специалистов с высшим медицинским, биологическим и ветеринарным образованием: сотрудников Роспотребнадзора, медицинских организаций, а также учреждений других министерств и ведомств, участвующих в осуществлении эпиднадзора за холерой. Объем программы 36 академических часов.

Программа одобрена Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2019 г.) и утверждена директором института.

СБОРНИК КВАЛИФИКАЦИОННЫХ ТЕСТОВ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНОЙ ПРОФЕССИОНАЛЬНОЙ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЙ ПРОГРАММЕ ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ»

Бурлакова О.С., Балахнова В.В., Сизова Ю.В., Пичурина Н.Л.,
Архангельская И.В., Ежова М.И., Левченко Д.А., Чемисова О.С.

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

Документ предназначен для использования при повышении

квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций по дополнительной профессиональной программе «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой» (72 ч., 36 ч.), а также при профессиональной переподготовке врачей-бактериологов (биологов), эпидемиологов и лаборантов по основным и дополнительным профессиональным образовательным программам (свыше 500 ч.), на циклах повышения квалификации по профилю программ профессиональной переподготовки по опасным инфекционным болезням (144 ч., 72 ч., 36 ч.) для контроля освоения образовательной информации по лабораторной диагностике и эпидемиологическому надзору за холерой. Сборник включает 100 предметно-ориентированных тестов закрытого типа.

Сборник одобрен Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2019 г.) и утвержден директором института.

ПОЛОЖЕНИЕ О ДИСТАНЦИОННОМ ОБУЧЕНИИ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ

Сизова Ю.В., Бурлакова О.С.

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

Положение регулирует применение электронного обучения и дистанционных образовательных технологий при реализации программ дополнительного профессионального образования. Дистанционное обучение обеспечивается при использовании совокупности образовательных технологий, реализуемых с применением информационных и телекоммуникационных сетей.

В положении указаны цели и задачи дистанционного обучения, порядок организации образовательного процесса, приема и отчисления, учебно-методической работы, а также нормативная база.

Положение одобрено Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2019 г.) и утверждено директором института.

ПОЛОЖЕНИЕ О ПРОМЕЖУТОЧНОЙ И ИТОВОЙ АТТЕСТАЦИИ ПО ДОПОЛНИТЕЛЬНЫМ ПРОФЕССИОНАЛЬНЫМ ПРОГРАММАМ

Сизова Ю.В., Бурлакова О.С.

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

Положение разработано в соответствии с Российским законодательством и локальными актами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Положение регламентирует содержание, организацию, проведение и подведение итогов аттестации обучающихся по модулям учебного плана. Результаты промежуточной аттестации являются основанием для допуска к итоговой аттестации или отчисления. Результаты итоговой аттестации являются основанием для выдачи документа или отчисления.

Положение одобрено Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2019 г.) и утверждено директором института.

ТРЕБОВАНИЯ К СТРУКТУРЕ, СОДЕРЖАНИЮ И ОФОРМЛЕНИЮ ЭЛЕКТРОННЫХ УЧЕБНО-МЕТОДИЧЕСКИХ КОМПЛЕКСОВ

Сизова Ю.В., Бурлакова О.С.

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

Документ разработан в соответствии с Федеральным Законом «Об образовании в Российской Федерации» от 29. 12.2012 г. № 273 ФЗ и содержит требования к разработке учебно-методического обеспечения, к содержанию электронного учебного пособия. Включены также требования к организации тестирования, к повышению наглядности материалов и условия использования видеофайлов.

Требования одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2019 г.) и утверждены директором института.

**ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА
«БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ В МЕДИЦИНСКОЙ
ОРГАНИЗАЦИИ. ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ, ТРЕБУЮЩИЕ
ПРОВЕДЕНИЯ МЕРОПРИЯТИЙ ПО САНИТАРНОЙ ОХРАНЕ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»**

Бурлакова О.С., Сизова Ю.В., Пичурина Н.Л., Чемисова О.С.,
Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В.

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

Программа консультативного семинара создана для совершенствования профессиональных знаний и компетенций в области обеспечения вопросов биологической безопасности в медицинской организации в случае выявления больных с подозрением на опасную инфекционную болезнь, а также эпидемиологии, клиники, диагностики, профилактики инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории и другой актуальной природно-очаговой краевой патологии.

Программа предназначена для специалистов медицинских организаций, а также сотрудников учреждений других ведомств с высшим медицинским и биологическим образованием.

Программа консультативного семинара одобрена Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 2 от 05.03.2019 г.) и утверждена директором института.

**ПРОГРАММА ДЛЯ ПОДГОТОВКИ ЧЛЕНОВ ЭКИПАЖЕЙ ПО
ВОПРОСАМ ОБРАЩЕНИЯ С ВОДЯНЫМ БАЛЛАСТОМ**

Водяницкая С.Ю.

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

Разработана программа для членов экипажей судов по вопросам биологической безопасности при обращении с судовым балластом.

Цель: подготовка специалистов управлений Роспотребнадзора в области обеспечения биологической безопасности при обращении с балластом, обучение процедурам управления водяным балластом и осадками, ведению необходимой документации в соответствии с профессиональными компетенциями.

Программа содержит учебный план (срок освоения 36 академических часов).

Программа одобрена Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (30.11.2018 г., протокол № 7) и утверждена директором института.

ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ

ПАТЕНТ «РЕКОМБИНАНТНАЯ ПЛАЗМИДА, ЭКСПРЕССИРУЮЩАЯ КЛОНИРОВАННЫЙ ГЕН ГЕМОЛИЗИНА *VIBRIO CHOLERAЕ*, И ШТАММ *ESCHERICHIA COLI* – СУПЕРПРОДУЦЕНТ ГЕМОЛИЗИНА *V. CHOLERAЕ*»

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Непомнящая И.Б.

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

Изобретение относится к области биотехнологии, в частности к рекомбинантной плазмиде рНлуА. Плазида рНлуА экспрессирует клонированный ген hlyA (гемолизина) *Vibrio cholerae*, встроенный по сайтам BamHI-PstI в полилинкер векторной плазмиды рQE30 под контролем T5-промотора. Изобретение также относится к штамму *Escherichia coli* КМ 2028. Указанный штамм является носителем плазмиды рНлуА и предназначен для продукции прогемолизина (ргоНлуА) *Vibrio cholerae*. Настоящее изобретение позволяет получать прогемолизин с высоким выходом.

Патент на изобретение № 2671099 от 29.10.2018 г.

ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ»

Селянская Н.А., Егиазарян Л.А.

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

Изобретение относится к области медицины, а именно к медицинской микробиологии, и предназначено для лабораторных или экспериментальных

исследований при изучении антибиотикочувствительности холерных вибрионов. Для повышения чувствительности холерных вибрионов к антибактериальным препаратам используют средство, снижающее экспрессию генов к антибиотикорезистентности. В качестве экспрессирующего средства применяют диклофенак в количестве 500 мг/л. Использование изобретения позволяет повысить чувствительность холерных вибрионов к антибактериальным препаратам при их совместном применении с диклофенаком в отношении антибиотикорезистентных штаммов холерных вибрионов *in vitro* и *in vivo*.

Патент на изобретение № 2688165 от 20.05.2019 г.

ПАТЕНТ «СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ БИОПЛЕНОК, ФОРМИРУЕМЫХ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 СЕРОГРУППЫ НА ПОВЕРХНОСТИ ХИТИНА»

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.,
Титова С.В.

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

Изобретение относится к медицинской микробиологии. Описан способ моделирования биопленок, формируемых *Vibrio cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина. Способ включает использование хитина для формирования биопленки, образуемой клетками *V. cholerae*, с последующей инкубацией и анализом результатов в ПЦР. В качестве хитина используют пластины речного рака *Astacus astacus* в количестве 10-15 штук и размером 0,3×0,3 см, которые размещают во флакон емкостью 100 мл, содержащий 30 мл отстоянной речной воды. Флакон автоклавируют 10 минут при 120°C, а после охлаждения во флакон вносят взвесь культур *Vibrio cholerae* O1 серогруппы до конечной концентрации 10 м.к./мл. Инкубирование проводят при 10°C и 28°C. Анализ результатов образования как простых, так и сложных биопленок *V. cholerae* проводят в ПЦР с использованием праймеров к INDEL-локусу 1699: VC1699-1 GCTTAGCTATTTTTGGGTATAGGTT, VC1699-2 CGTTCATTTTTACTCAAACAGTCA. При этом атоксигенные штаммы *ctx- tcpA-* формируют ампликон массой 132 п.о., а токсигенные штаммы *ctx+tcpA+* образуют ампликон массой 116 п.о. Таким образом, подтверждают присутствие клеток токсигенного штамма в составе сложной биопленки и способность колонизировать поверхность хитина.

Патент на изобретение № 2685878 от 23.04.2019 г.

ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОТИВОХОЛЕРНОЙ ВАКЦИНАЦИИ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ»

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

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

Изобретение относится к области экспериментальной медицины, а именно к способу повышения эффективности противохолерной вакцинации на модели экспериментальных животных. Для этого первоначально иммунизируют животных по следующей схеме: однократно таблетированную дозу вакцины, а именно 1/3 человекодозы, растирают в ступке и суспендируют в 6,5 мл дистиллированной воды, получая суспензию, которую вводят перорально кроликам по 0,5 мл. Далее одновременно с вакцинацией также перорально дают иммуномодулятор ликопид в следующей дозе: таблетку весом 10 мг растворяют в 1 мл дистиллированной воды, отбирают 0,27 мл и добавляют к ним еще 4,73 мл дистиллированной воды, затем однократно вводят кролику 0,5 мл полученного раствора, включающего 285 мкг ликопида. После этого через месяц иммунизированных и контрольных животных заражают холерой, оценку повышения эффективности противохолерной вакцины определяют по наличию выраженности холерогенного и энтеропатогенного эффектов в тонком кишечнике кроликов. Изобретение позволяет усилить противохолерный иммунитет у экспериментальных животных за счет сочетанного применения химической таблетированной холерной бивалентной вакцины и иммуномодулятора ликопида.

Патент на изобретение № 2691411 от 13.06.2019 г.

ПАТЕНТ «СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР С РАЗЛИЧНОЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТЬЮ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ЕГО ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ»

Агафонова Е.Ю., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, Россия, г. Саратов

Разработан способ идентификации токсигенных эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выявления нетоксигенных штаммов и их дифференциации на потенциально эпидемически опасные и эпидемически безопасные по наличию или отсутствию генов, входящих в состав профага СТХφ (ген *ctxA*), острова патогенности VPI-1 (ген *tcpA*) и островов пандемичности VSP-I и VSP-II (гены *vc0180*, *vc0514*).

Патент на изобретение № 2671412 от 31.10.2018 г.

ПАТЕНТ «ШТАММ *ESCHERICHIA COLI* ПРОДУЦЕНТ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА ТсРА ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА БИОВАРА ЭЛЬ ТОР»

Тучков И.В., Хопрова Е.В.

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб" Роспотребнадзора, Россия, г. Саратов

Сконструирован штамм кишечной палочки, содержащий рекомбинантную плазмиду с клонированным участком гена *tcpA*Cirs холерного вибриона биовара Эль Тор. Использование сконструированного штамма позволяет получить рекомбинантный белок ТсРА и упростить его выделение и очистку. Полученный белок ТсРА может быть использован для разработки иммунодиагностических препаратов с целью оценки уровня продукции ТсРА у различных штаммов *V. cholerae* и определения антигенного состава холерных вакцинных препаратов.

Заявка на патент № 2018116980 от 07.05.2018 г.

БАЗА ДАННЫХ «ГЕНОВАРИАНТЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* – РОССИЯ И ПОГРАНИЧНЫЕ СТРАНЫ»

Писанов Р.В.¹, Кулешов К.В.², Монахова Е.В.¹, Ежова М.И.¹,
Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Демидова Г.В.¹, Непомнящая Н.Б.¹,
Кругликов В.Д.¹, Ковалев Д.А.², Писаренко С.В.³, Жиров А.В.³, Савельева
И.В.³, Васильева О.В.³, Савельев В.Н.³, Куличенко А.Н.³

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

²*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

³*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,
Россия, г. Ставрополь*

В базе данных приведены сведения о геновариантах штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории России и пограничных с ней стран. На сегодняшний день она включает 23 штамма (*V. cholerae* O1 классического и Эль Тор биотипов, а также *V. cholerae* non O1/ non O139 серогруппы). Область применения – база данных позволяет находить штаммы с заданными признаками – определенными сочетаниями маркеров эпидемического потенциала. Имеется возможность пополнения базы данными о свежeweделенных штаммах.

Свидетельство о государственной регистрации № 2018621784 от 12.11.2018 г.

БАЗА ДАННЫХ «ГИС МЕЖДУНАРОДНЫЕ ТРАНСПОРТНЫЕ СООБЩЕНИЯ. РОСТОВСКАЯ ОБЛАСТЬ»

Рыжков Ю.В.¹, Водопьянов А.С.², Москвитина Э.А.²

¹*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

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

ГИС включает сведения о странах и портах, их которых возможен занос возбудителей инфекционных болезней, в том числе, предусмотренных Международными медико-санитарными правилами (2005 г.), через различные санитарно-контрольные пункты пропуска на Государственной границе Российской Федерации, в Ростовской области. Предусмотрена

визуализация указанных данных с учетом стран мира, куда осуществляются заходы воздушных, морских и автомобильных транспортных средств и откуда может быть занос инфекций не только при прямых, но и непредусмотренных судозаходах. ГИС расположена на Геоинформационном портале ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Свидетельство о государственной регистрации № 2018621584 от 15.10.2018 г.

БАЗА ДАННЫХ «ПОТЕНЦИАЛЬНО МАЛЫЕ РНК ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1»

Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М., Захаров М.В.

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

В базе данных приведены сведения о не транслируемых последовательностей потенциальных малых РНК, не описанные ранее, характерных только для токсигенных штаммов *V. cholerae* классического и El Tor биотипов. Из них выявлены 8 последовательностей потенциальных малых РНК, характерных только для биотипа El Tor. На сегодняшний день она включает 46 последовательностей малых РНК токсигенных штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор биотипов. Область применения – создание диагностических тест-систем и химических холерных вакцин, научные исследования факторов патогенности холерных вибрионов.

Свидетельство о государственной регистрации № 2018621710 от 1.11.2018 г.

БАЗА ДАННЫХ «ИНСПЕКТИРОВАНИЕ МОРСКИХ СУДОВ»

Рыжков Ю.В.¹, Водопьянов А.С.², Москвитина Э.А.², Водопьянов С.О.²,
Олейников И.П.², Беспалова С.А.², Косорукова О.Г.¹

*¹Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

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

База данных включает сведения об инспектировании судов для определения и регистрации (накопления сведений) возможных эпидемиологических рисков на приходящих в морские порты Ростовской области судах, принятия решения о необходимости проведения санитарно-карантинного контроля прибывающего международного транспортного средства. База функционирует в онлайн режиме в сети «интернет» с обеспечением многопользовательского доступа.

Свидетельство о государственной регистрации № 2018621960 от 05.12.2018 г.

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ЕДИНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКАЯ КАРТА ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ»

Пичурина Н.Л.¹, Титова С.В.¹, Олейников И.П.¹, Водопьянов С.О.¹,
Ковалев А.В.², Конченко А.В.², Ненадская С.А.², Калинина М.В.²,
Слись С.С.², Полонский А.В.³, Водопьянов А.С.¹

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

²*Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

³*ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

ГИС «Единая эпидемиологическая карта г. Ростова-на-Дону» содержит данные о расположении эпидемически значимых объектов (медицинских организаций, объектов транспортной инфраструктуры, тренировочных баз, стадионов, фан-зон, гостиниц для размещения VIP-персон FIFA, спортсменов и гостей ЧМ-2018, рекреационных зон, точек отбора проб объектов окружающей среды, в том числе радиационного контроля) в г. Ростове-на-Дону. ГИС размещена на сайте, что позволяет обеспечивать многопользовательский доступ, используя сеть Интернет.

Свидетельство о государственной регистрации № 2019620311 от 22.02.2019 г.

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ВОДОЕМЫ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ»

Водопьянов С.О.¹, Водопьянов А.С.¹, Титова С.В.¹, Олейников И.П.¹,
Гаевская Н.Е.¹, Ковалев Е.В.², Ненадская С.А.², Коржов С.А.²,
Леоненко Н.В.², Слись С.С.², Полонский А.В.²

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

*²Управление Роспотребнадзора по Ростовской области,
Россия, г. Ростов-на-Дону*

ГИС «Водоемы г. Ростова-на-Дону» содержит данные о водных объектах г. Ростова-на-Дону, их расположение, площади водной поверхности и прибрежных зон, информацию о расположении точек отбора проб воды на вибриофлору и выделении бактериофагов. ГИС размещена на сайте, что позволяет обеспечивать многопользовательский доступ, используя сеть Интернет.

Свидетельство о государственной регистрации № 2019620389 от 13.03.2019 г.

БАЗА ДАННЫХ ГИС «ВНЕШНИЙ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ РИСК – ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ»

Москвитина Э.А., Водяницкая С.Ю., Водопьянов А.С., Янович Е.Г.,
Кононенко А.А., Сергиенко О.В., Мишанькин Б.П., Водопьянов С.О.,
Олейников И.П.

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

ГИС «Внешний эпидемиологический риск – заболеваемость» содержит данные по инфекционным болезням, на которые распространяются ММСП (2005 г.), и другим актуальным инфекциям в современный период, борьба с которыми регламентирована СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации» и Решением Комиссии Таможенного союза от 16 апреля 2010 года № 231. ГИС содержит сведения о количестве больных, в т.ч. о завозных случаях заболеваний, зарегистрированных с 2012 года. ГИС размещена на сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, что позволяет обеспечивать многопользовательский доступ, используя сеть Интернет.

Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2019620083 от 15.01.2019 г.

ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ «PHAGE-ANALYZER – ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА ДАННЫХ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ БАКТЕРИОФАГОВ»

Погожова М.П., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е., Писанов Р.В.,
Водопьянов С.О., Олейников И.П.

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

Компьютерная программа «PhageAnalyzer» позволяет проводить анализ данных полногеномного секвенирования бактериофагов. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз в фаговом геноме является полногеномное секвенирование.

Создана база данных различных генов интеграз, токсинов и антибиотикорезистентности, которые могут быть встроены в фаговый геном, а также разработано отечественное импортозамещающее программное обеспечение для их поиска. В результате работы программы можно определить тип жизненного цикла бактериофага (умеренный или вирулентный), а также установить носительство генов резистентности и токсинов. Эта информация позволяет оценить перспективы использования бактериофагов в практике. Программа не зависит от зарубежных баз данных и отличается быстротой анализа секвенированных геномов бактериофагов.

Свидетельство о государственной регистрации программы
№ 2019616060 от 17.05.2019 г.

ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ

Перечень штаммов *Vibrio cholerae*, депонированных в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в период с 15.06.2018 г. по 25.05.2019 г.

1. *V.cholerae* O139 КМ 2052 (P-17918). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ⁻ VP1 *chxAIII rtxA^{alt}, cef^{alt}, msh^{alt} vspI-rbm-vspII^{alt} VSPII^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Ежова М.И., Монахова Е.В., Титова С.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

2. *V.cholerae non O1/non O139 КМ 2053* (P-9771). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ⁻ VP1 T3SS⁺ *nanH^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

3. *V.cholerae non O1/non O139 КМ 2054* (P-9798). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ⁻ VP1 *chxAIII rtxA^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

4. *V.cholerae non O1/non O139 КМ 2055* (P-12935). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ⁻ VP1 *chxAI rtxA^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

5. *V.cholerae non O1/non O139 КМ 2056* (P-19093). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ⁻ VP1 *nanH^{alt} rtxA^{trunc}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

6. *V.cholerae* non O1/non O139 KM 2057 (P-19261). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: CTX⁻ VP1⁻ T3SS⁺ *chxA1 nanH⁺ rtxA^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

7. *V.cholerae* non O1/non O139 KM 2058 (P-20161). Положительный контроль для ПЦР-детекции гена термостабильного токсина (*st*) у холерных вибрионов

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

8. *V.cholerae* O1 KM 2059 (14157). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: CTX⁻ VP1⁻ VSPII⁺ *cefE1*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Левченко Д.А., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

9. *V.cholerae* O1 KM 2060 (19787). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: CTX⁻ VP1⁻ *rtxA^{alt} chxA1 cefE3 T6SS⁺ vasX^{alt} msh^{alt} vspl-rbm-vspl^{alt} VSPII^{alt}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Левченко Д.А., Монахова Е.В., Титова С.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

10. *V.cholerae* O1 KM 2061 (P-17917). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой, имеет все генетические признаки классического биовара. Генотип: CTX^{class} (*rstR^{class}, ctxB1*) RS1⁻ *tcpA^{class} RTXΔ (rtxA^{trunc} rtxB^{trunc} rtxC)* VSPII⁻ *cefE^{class} hlyA^{trunc} harR^{trunc}*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Ежова М.И., Монахова Е.В., Титова С.В., Непомнящая Н.Б., Писанов Р.В. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

11. *V.cholerae* O1 KM 2062 (P-18904). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: CTX⁻ VP1⁻ *cefE2 T3SS⁺*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Ежова М.И., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

12. *V.cholerae* O1 KM 2063 (P-19430). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: CTX⁻ VP1⁻ *cefE4 T3SS⁺*

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Ежова М.И., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

12. *V.cholerae* O1 KM 2064 (19758). Депонирован как штамм с известной генетической характеристикой. Генотип: СТХ VPI t3SS⁺ *cefE5* .

Форма депонирования – авторское. Дата депонирования: 19.11.2018 г.

Депозиторы: Левченко Д.А., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. - *ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*.

В МЕЖДУНАРОДНОЙ БАЗЕ ДАННЫХ GEN BANK депонированы нуклеотидные последовательности:

1. ДНК штаммов холерного вибриона, выделяемых в процессе мониторинга холеры:

- полного генома *V. cholerae* nonO1/nonO139, (RHMB0000000) 05.11.2018 г.

- профага pre-CTX *V. cholerae* nonO1/nonO139, (MH782192) 23.08.2018 г.

- острова VPI *V.cholerae* O, (MH782190) 23.08.2018 г.

- генов *tcpABQ* штамма неO1/неO139, (MH782191) 23.08.2018 г.

Депонированные нуклеотидные последовательности необходимы для проведения филогенетического анализа, определения аллелей отдельных генов штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории России и пограничных государств, предсказания возможности экспрессии детерминант факторов патогенности и персистенции.

Авторы: Монахова Е.В., Ежова М.И., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*)

2. полного генома *V. cholerae* strain 9760, (RHMB01000001-RHMB01001293), 05.11.2018 г.

Авторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*)

3. *V. cholerae* strain 20000, (CP036499, CP036500), 06.03.2019 г.

Авторы: Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Водопьянов С.О. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*)

4. *V. parahaemolyticus* strain 16763, (SPOT01000001 - SPOT01000073), 19.04.2019 г.

Авторы: Чемисова О.С., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сагакянц М.М., Полевая М.В. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора*)

5. полного генома *Vibrio phage Rostov-6*, (MH10577), 02.05.2018 г.
Авторы: Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожева М.П., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Иванов С.А. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора*)

6. полного генома *Vibrio phage Rostov 7*, (MK575466), 10.03.2019 г.
Авторы: Погожева М.П., Гаевская Н.Е. Писанов Р.В., Водопьянов А.С. (*ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора*)

7. полных геномов 3-х природных типичных токсигенных штаммов *V. cholerae* M893 (Астрахань, 1970), M1062 (Астрахань, 1970) и M1011 (Уфа, 1972) O1 серогруппы биовара Эль Тор. Номера доступа в GenBank: SSAA0000000; SSAB0000000; SSAC0000000.

Авторы: Крицкий А.А., Заднова С.П., Смирнова Н.И., Краснов Я.М., Альхова Ж.В., Нарышкина Е.А. (*ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора*)

8. 3 массива метагеномных данных под номером проекта PRJNA545017. Данные могут быть использованы для сравнительного анализа состава микробных сообществ поверхностных водоемов.

Авторы: Пономарева А.С., Гладких А.С., Миронова Л.В. (*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора*)

9. полных геномов 10 штаммов *V. cholerae* El Tor, выделенных из поверхностных водоемов (массив данных из десяти геномов под кодовыми номерами). Нуклеотидные последовательности могут быть использованы для проведения углубленного исследования структурной организации отдельных локусов, проведения филогенетического и филогеографического анализа.

Авторы: Гладких А.С., Бочалгин Н.О., Пономарева А.С., Миронова Л.В., Федотова И.С., Фортунатова А.В., Босов Е.А., Хунхеева Ж.Ю. (*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора*)

10. 5 штаммов возбудителя холеры, выделенных на территории России, с присвоением регистрационных номеров GCA_004358215.1, GCA_004358295.1, GCA_004358245.1, GCA_004358225.1, GCA_004358285.1, 19.03.2019 г.

Авторы: Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Савельев В.Н., Васильева О.В., Савельева И.В., Жилченко Е.Б., Коняева О.А. (*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора*)

ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

Сборник статей Проблемной комиссии (48.04)
Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической
охране территории Российской Федерации
Посвящается 85-летию Ростовского-на-Дону
противочумного института

Выпуск № 32

Подписано в печать 20.08. 2019 г.

Заказ № 70/19-ГК от 22.07.2019 г.

Обложка: картон с теснением «лен» 300 г./м²

Внутренний блок: офсетная 80 гр/м² Формат бумаги 60×90/16.

Усл. Печ.л. 14,5

Тираж 250 экз.

Отпечатано в типографии: ООО «Типография Продвижение»,

г. Новосибирск, ул. Кропоткина, 271, 3 этаж, офис 312.

Издательство : ООО «Типография Продвижение», г. Новосибирск, ул.

Кропоткина, 271, 3 этаж, офис 312.

