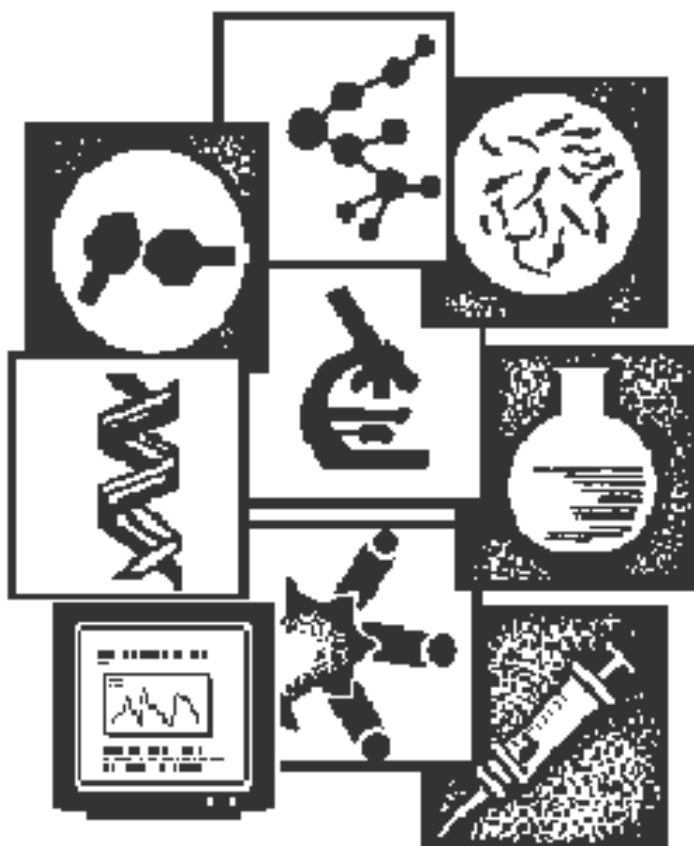




ФКУЗ РОСТОВСКИЙ-НА-ДОНУ  
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ  
РОСПОТРЕБНАДЗОРА

ХОЛЕРА И  
ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ  
ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ

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



**ВЫПУСК № 31**

РОСТОВ-НА-ДОНУ  
2018 г.

**УДК: 616.932:579.843.1:579.61:614.4.**

**ББК: 51.9**

**Редакционная коллегия:** Титова С.В. (ответственный редактор), Чемисова О.С., Алексеева Л.П., Марковская Е.И., (ответственный секретарь), Щипелева И.А., Кругликов В.Д., Кретенчук О.Ф., 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. – Саратов: Амирит, 2018, Вып. 31. – 206 с.

**ISBN 978-5-00140-057-8**

Сборник посвящён изучению широкого спектра вопросов по таким важным направлениям, как: совершенствование эпидемиологического надзора 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; разработка системы внешнего контроля качества при проведении мониторинга холеры; изучение экологии возбудителя холеры и других, патогенных для человека, 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; полногеномное секвенирование бактериофагов патогенных вибрионов; совершенствование лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий, разработка и внедрение новых современных импортозамещающих диагностических препаратов и питательных сред; создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов; создание новых эффективных фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов и профилактики холеры; анализ механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиск способов преодоления резистентности; поиск новых путей оптимизации специфической профилактики холеры; научное обоснование внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории РФ.

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

**ISBN 978-5-00140-057-8**

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

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ .....</b>	<b>12</b>
<b>НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЙОНИРОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АДМИНИСТРАТИВНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ПО КОМПЛЕКСУ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ, ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ И СОЦИАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ .....</b>	<b>12</b>
Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В.	
<b>АЛГОРИТМ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ПРИ КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ O1 И O139 СЕРОГРУПП .....</b>	<b>18</b>
Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова С.В.	
<b>ПЛАСТИСФЕРА МОРЕЙ, ОМЫВАЮЩИХ РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ, КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ГЛОБАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> .....</b>	<b>20</b>
Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Клешнина О.В., Головин С.Н., Москвитина Э.А.	
<b>ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ, FIFA 2018 В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ .....</b>	<b>22</b>
Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Титова С.В., Чемисова О.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Москвитина Э.А., Ковалев Е.В., Конченко А.В., Ненадская С.А., Калинина М.В., Слись С.С., Карпущенко Г.В., Поливенко В.А., Половинка Н.В., Полонский А.В.	
<b>ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ 2018 В ГОРОДЕ РОСТОВЕ-НА-ДОНУ .....</b>	<b>25</b>
Рыжова А.А., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В., Пичурина Н.Л.	
<b>РАЗРАБОТКА ГЕОИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ .....</b>	<b>30</b>
Титова С.В., Водопьянов А.С., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О., Олейников И.П.	
<b>МОНИТОРИНГ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ .....</b>	<b>33</b>
Карпущенко Г.В., Швагер М.М., Полонский А.В., Гончаров А.Ю., Логачева Е.Н., Половинка Н.В.	
<b>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» .....</b>	<b>36</b>
Водяницкая С.Ю., Сергиенко О.В., Баташев В.В., Рыжова А.А.	

<b>О НОВЫХ СПОСОБАХ ОТБОРА ПРОБ БАЛЛАСТНОЙ ВОДЫ НА СУДАХ.....</b>	<b>43</b>
Палилов М.Б., Лях О.В., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В., Черный М.А., Решетников В.И.	
<b>ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ СО СБРОСОМ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ В АКВАТОРИИ АЗОВСКОГО МОРЯ.....</b>	<b>46</b>
Лях О.В., Водяницкая С.Ю., Рыжова А.А., Сергиенко О.В.	
<b>МИКРОБИОЛОГИЯ .....</b>	<b>48</b>
<b>ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ О1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2017 ГОДУ.....</b>	<b>48</b>
Иванова С.М., Иванников В.В., Мискинова Т.А., Лопатин А.А. Титова С.В., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Чемисова О.С., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б.	
<b>АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 2013 ПО 2017 ГГ. С ПОМОЩЬЮ ПОПОЛНЯЕМОЙ БД ГИС «ХОЛЕРА 1989-2014» .....</b>	<b>52</b>
Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Ренгач М.В.	
<b>О КОРРЕЛЯЦИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ФАГОВ И ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ .....</b>	<b>54</b>
Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Гаевская Н.Е., Архангельская И.В., Тюрина А.В., Ренгач М.В.	
<b>ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> О1, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА В 2017 Г. ....</b>	<b>57</b>
Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Гладких А.С., Бочалгин Н.О., Урбанович Л.Я., Мошкин А.Б., Капко Н.А., Лауль З.Л., Алленов А.В., Борзов В.П., Хоменко Т.В., Солодкая Н.С., Балахонов С.В.	
<b>РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЁНКИ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ НА ХИТИНОВОМ ПАНЦИРЕ РЕЧНОГО РАКА.....</b>	<b>62</b>
Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Кругликов В. Д., Титова С.В.	
<b>ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ РАЗНЫХ ГРУПП НА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>65</b>
Селянская Н.А., Железняк Н.Г.	
<b>ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОПЛЁНОК <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> НА ХИТИНЕ .....</b>	<b>69</b>
Симонова И.Р., Головин С.Н., Титова С.В., Половцева В.С., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.	

<b>ОБНАРУЖЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ДЕТЕРГЕНТ-УСТОЙЧИВЫХ ПРОТЕАЗ У ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА O1 И O139 СЕРОГРУПП.....</b>	<b>73</b>
Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Миронова Л.В., Урбанович Л.Я.	
<b>К ВОПРОСУ О МЕТАБОЛИЗИРОВАНИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НЕКОТОРЫМИ ШТАММАМИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И O139 СЕРОГРУПП.....</b>	<b>75</b>
Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Писанов Р.В., Галичева А.Л.	
<b>АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> NON O1/NON O139, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ВОДОЁМОВ.....</b>	<b>77</b>
Тришина А.В., Березняк Е.А., Селянская Н.А., Архангельская И.В., Симонова И.Р.	
<b>ПОВЫШЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ.....</b>	<b>81</b>
Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожова М.П., Кочеткова А.О.	
<b>ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДОЁМАХ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ.....</b>	<b>83</b>
Березняк Е.А., Тришина А.В., Симонова И.Р., Полеева М.В.	
<b>КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВОДОЁМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА</b>	<b>86</b>
Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Сагакянц М.М., Кругликов В. Д., Титова С.В.	
<b>К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ МОЮЩИХ СРЕДСТВ В КАЧЕСТВЕ ПОВЕРХНОСТНО - АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ К РАБОЧИМ РАСТВОРАМ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ ХОЛЕРЫ И ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНАМИ.....</b>	<b>89</b>
Чекан Л.В., Тюрин Е.А., Храмов М.В.	
<b>ОРГАНИЗАЦИЯ КОНСУЛЬТАТИВНЫХ СЕМИНАРОВ ПО ВОПРОСАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ К ПРОВЕДЕНИЮ МАССОВОГО МЕЖДУНАРОДНОГО МЕРОПРИЯТИЯ, НА ПРИМЕРЕ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ 2018 В ГОРОДЕ РОСТОВЕ-НА-ДОНУ .....</b>	<b>93</b>
Пичурина Н.Л., Бурлакова О.С., Водяницкая С.Ю., Сизова Ю.В., Сокольская О.А., Чемисова О.С., Титова С.В.	
<b>ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОПЛЁНКИ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> НА ПОВЕРХНОСТИ ХИТИНА .....</b>	<b>96</b>
Захаров М.В., Водопьянов С.О., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И.	
<b>МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА.....</b>	<b>100</b>
<b>ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОСТРОВА RND У ШТАММА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i>, ВЫДЕЛЕННОГО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ.....</b>	<b>100</b>
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Бородина Т.Н., Олейников И.П., Титова С.В.	

<b>КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СИКВЕНСОВ ДНК-ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> НА НАЛИЧИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ .....</b>	<b>102</b>
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Клешнина О.В., Титова С.В.	
<b>ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОРТАТИВНОГО СЕКВЕНАТОРА ЧЕТВЁРТОГО ПОКОЛЕНИЯ MINION.....</b>	<b>106</b>
Сорокин Р.А., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Захаров М.В., Писанов Р.В.	
<b>ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ.....</b>	<b>109</b>
Архангельская И.В., Монахова Е.В., Ежова М.И., Левченко Д.А., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Титова С.В.	
<b>СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ (NANH) ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/НЕ O139 СЕРОГРУПП .....</b>	<b>112</b>
Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Дуванова О.В.	
<b>БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ <i>RTXA</i> КАК ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ <i>VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/NON O139</i> .....</b>	<b>116</b>
Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В.	
<b>INDEL-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2014-2017 ГОДАХ .....</b>	<b>120</b>
Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И.	
<b>РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ПОИСКА МАЛЫХ РНК И ИХ МИШЕНЕЙ У <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> .....</b>	<b>124</b>
Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Сорокин Р.А., Захаров М.В., Симакова Д.И., Олейников И.П., Сорокин В.М.	
<b>ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ТОКСИГЕННОГО ШТАММА <i>VIBRIO CHOLERAЕ</i> БИОВАРА ЭЛЬ ТОР 31, ВЫДЕЛЕННОГО В Г. МАРИУПОЛЕ В 2011 Г. ....</b>	<b>127</b>
Васильева О.В., Савельев В.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Писаренко С.В., Тихонов С.Н., Куличенко А.Н.	
<b>РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНТЕГРАЗ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ .....</b>	<b>131</b>
Погожова М. П., Водопьянов А. С., Гаевская Н. Е., Водопьянов С. О., Писанов Р. В., Романова Л. В., Тюрина А. В., Кочеткова А. О.	
<b>ИММУНОЛОГИЯ.....</b>	<b>135</b>
<b>ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА РАЗВИТИЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ХОЛЕРЫ У ВАКЦИНИРОВАННЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ.....</b>	<b>135</b>
Филиппенко А.В., Иванова И.А., Омельченко Н.Д., Пасюкова Н.И., Беспалова И.А., Труфанова А.А.	

**СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИОКСИДОНИЯ И ДЕРИНАТА НА ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ .....138**

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

**ДИАГНОСТИКА ..... 143**

**ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (ПГВС).....143**

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахян Г.Д., Савельева И.К., Каминский Д.И., Сагакянц М.М., Рожков К.К., Ульрих Е.П.

**РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, O139 СЕРОГРУПП ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ И ОЦЕНКА ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ .....144**

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В МОНИТОРИНГЕ ХОЛЕРЫ .....146**

Кретенчук О.Ф., Алексеева Л.П., Ежова М.И., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Яговкин М.Э.

**ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ХОЛЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА *IN VITRO* И *IN VIVO* .....149**

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Кочеткова А.О.

**ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ ..... 152**

**АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2018 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» .....152**

Щипелева И.А., Марковская Е.И., Титова С.В., Алексеева Л.П., Чемисова О.С., Кретенчук О.Ф.

**ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2018 ГОДУ .....165**

Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф.

**РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ..... 171**

**НАБОР РЕАГЕНТОВ «ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ *IN VITRO* ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УРОВНЯ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ *VIBRIO CHOLERAE* СЕРОГРУППЫ O1 С ПОМОЩЬЮ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ (ДИАГНОСТИКУМ ХОЛПИТОКС O1)» .....171**

Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.

**НАБОР РЕАГЕНТОВ «ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВИДА *VIBRIO PARAHAEEMOLYTICUS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (REAL-TIME PCR)» .....172**

Чемисова О.С., Полеева М.В., Трухачев А.Л., Рыковская О.А.

**НАБОР РЕАГЕНТОВ «ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ИЗ МАТЕРИАЛА ОТ ЛЮДЕЙ И ИХ ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ (ПГВС)» .....172**

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

**АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА» ..... 174**

**НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПОДХОДОВ К ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОМУ ТИПИРОВАНИЮ *VIBRIO CHOLERAЕ* В СИСТЕМЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА .....174**

Миροнова Л.В.

**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 1989 Г. ПО 2016 Г. ....176**

Левченко Д.А.

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА ТОКСИНОПРОДУКЦИЮ И ДРУГИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ .....177**

Сизова Ю.В.

**АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И ИНСТРУКЦИЙ ..... 179**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ» .....179**

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Егиазарян Л.А.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ВЫДЕЛЕНИЕ ОСНОВНОГО ПУЛА МАЛЫХ РНК И МАТРИЧНЫХ РНК БЕЗ ПРИМЕСИ ДНК ИЗ *VIBRIO CHOLERAЕ*» .....179**

Иванов С.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М.

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ ПОЛИГУАНИДИНОВ («БИОПАГ – Д») В ОТНОШЕНИИ ИНДИКАТОРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТОМ КАЧЕСТВА СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД» .....180**

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

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ МОНОДИСПЕРСНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР С АЛЬДЕГИДНЫМИ ГРУППАМИ» .....181**

Наркевич А.Н., Шубин Г.Г., Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Захаров М.В., Сорокин Р.А.



<b>МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ВЫЯВЛЕНИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ОЦЕНКА ТОКСИНОПРОДУКЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В РЕАКЦИИ АГЛОМЕРАЦИИ ОБЪЕМНОЙ (РАО) С ПОМОЩЬЮ ХОЛЕРНОГО ПОЛИМЕРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО АНТИТОКСИЧЕСКОГО ДИАГНОСТИКУМА ХОЛПИТОКС О1».....</b>	<b>182</b>
Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.	
<b>МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРЕПАРАТА ПРЯМОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH) <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i>» .....</b>	<b>183</b>
Полеева М. В., Чемисова О.С., Писанов Р. В., Рыковская О.А.	
<b>ИНСТРУКЦИЯ «ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ МЕРОПРИЯТИЙ ПО УТИЛИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ОТХОДОВ КЛАССА В» .....</b>	<b>184</b>
Меньшикова Е.А., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л.	
<b>ИНСТРУКЦИЯ ПО НАДЕВАНИЮ/СНЯТИЮ ЗАЩИТНЫХ КОСТЮМОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ МЕДИЦИНСКИХ ОРГАНИЗАЦИЙ И КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ЛАБОРАТОРИЙ .....</b>	<b>184</b>
Трухачев А.Л., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л.	
<b>РАЗРАБОТАННЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ .....</b>	<b>185</b>
<b>ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ БОЛЬНОГО/ПОДОЗРИТЕЛЬНОГО НА ЗАБОЛЕВАНИЕ ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ, ВЫЗВАННЫМИ ПБА НЕУСТАНОВЛЕННОГО СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ».....</b>	<b>185</b>
Бурлакова О.С., Пичурина Н.Л., Сизова Ю.В., Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Водопьянов А.С., Титова С.В., Чемисова О.С., Баташев В.В., Чигаева Е.В., Усаткин А.В., Валенцева А.А.	
<b>ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «ВЫЯВЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)» .</b>	<b>186</b>
Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В., Захаров М.В., Сорокин Р.А.	
<b>ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА «КАРТОГРАФИРОВАНИЕ И ОСНОВЫ РАБОТЫ С ГЕОИНФОРМАЦИОННЫМ ПОРТАЛОМ (ГИС-ПОРТАЛОМ) ФКУЗ РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО ИНСТИТУТА РОСПОТРЕБНАДЗОРА».....</b>	<b>187</b>
Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Водопьянов С.О., Водяницкая С.Ю., Титова С.В., Чемисова О.С., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В.	

<b>ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА «ОРГАНИЗАЦИЯ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ГОТОВНОСТИ К ПРОВЕДЕНИЮ МЕРОПРИЯТИЙ В СЛУЧАЕ ЗАНОСА ИЛИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ПРИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЯХ» .....</b>	<b>187</b>
Титова С.В., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В., Павлович Н.В.	
<b>ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА «ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ» .....</b>	<b>188</b>
Титова С.В., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л., Водяницкая С.Ю., Павлович Н.В., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В.	
<b>ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ.....</b>	<b>189</b>
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ <i>VIBRIO CHOLERAE</i> O1 EL TOR».....</b>	<b>189</b>
Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П.	
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БЕЛКА ОмРТ ДЛЯ МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ИММУНИТЕТА У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ».....</b>	<b>190</b>
Иванова И.А., Мишанькин Б.Н., Омельченко Н.Д., Шипко Е.С., Филиппенко А.В., Беспалова И.А.	
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ ПЦР ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ».....</b>	<b>190</b>
Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б.	
<b>ПАТЕНТ «ШТАММ <i>VIBRIO PARANAEMOLYTICUS</i>, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ПРЯМОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH)».....</b>	<b>191</b>
Чемисова О. С., Полеева М. В., Рыковская О. А., Сагакянц М. М.	
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ».....</b>	<b>192</b>
Селянская Н.А., Веркина Л.М., Титова С.В.	
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВИДА <i>VIBRIO PARANAEMOLYTICUS</i> МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (REAL-TIME PCR)» .....</b>	<b>192</b>
Чемисова О. С., Полеева М. В., Трухачев А. Л., Рыковская О. А.	

<b>ПАТЕНТ «ШТАММ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК ЖИВОТНОГО <i>MUS MUSCULUS</i> - ПРОДУЦЕНТ МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К МЕМБРАННОМУ БЕЛКУ, ОБЩЕМУ ДЛЯ TSP+ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И O139 СЕРОГРУПП»</b> .....	<b>193</b>
Алексеева Л.П., Евдокимова В.В.	
<b>ПАТЕНТ «СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАЗЦОВ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ»</b> .....	<b>194</b>
Симонова И.Р., Головин С.Н, Титова С.В.	
<b>БАЗА ДАННЫХ «КОЛЛЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ»</b> .....	<b>194</b>
Писанов Р.В., Монахова Е.В., Демидова Г.В., Непомнящая Н.Б.	
<b>БАЗА ДАННЫХ «ФЕНОТИПЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ»</b> .....	<b>195</b>
Селянская Н.А., Березняк Е.А., Егиазарян Л.А., Тришина А.В., Архангельская И.В., Веркина Л.М., Симонова И.Р.	
<b>БАЗА ДАННЫХ «ГИС МОНИТОРИНГ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»</b> .....	<b>196</b>
Водяницкая С.Ю., Лях О.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Иванова Н.Г., Рыжова А.А., Сергиенко О.В., Баташев В.В., Чемисова О.С., Сагакянц М.М., Ежова М.И., Архангельская И.В.	
<b>ГЕОИНФОРМАЦИОННАЯ БАЗА ДАННЫХ «АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (2005-2016 ГГ.)»</b> .....	<b>197</b>
Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М.	
<b>ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ «ГИС: КРЫМСКАЯ ГЕМОРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА. ЭПИЗООТИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ. РОСТОВСКАЯ ОБЛАСТЬ»</b> .....	<b>197</b>
Анисимова Г.Б., Москвитина Э.А., Кривошеев А.П., Дворцова И.В., Пичурина Н.Л.	
<b>ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ «CONTIGSEARCHER - ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ НАЛИЧИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОВ В КОНТИГАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ, ВЫЯВЛЕНИЯ INDEL-МУТАЦИЙ»</b> .....	<b>198</b>
Водопьянов А.С., Трухачев А.Л., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В.	
<b>ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ И КОЛЛЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД</b> .....	<b>200</b>

## ЭПИДЕМИОЛОГИЯ И ЭКОЛОГИЯ

### НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ РАЙОНИРОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭПИДЕМИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА АДМИНИСТРАТИВНЫХ ТЕРРИТОРИЙ ПО КОМПЛЕКСУ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИХ, ДЕМОГРАФИЧЕСКИХ И СОЦИАЛЬНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ

Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В.

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

Существование на глобальном и региональных уровнях внешних эпидемиологических рисков и вызовов, продолжение во времени и пространстве седьмой пандемии холеры; наличие существующих исторически (Азия) и формирование новых эндемичных очагов (Африка, страны Карибского бассейна) с угрозой активизации эпидемического процесса и выноса инфекции на сопредельные и другие территории; импорт инфекции в страны различных континентов, в том числе в Россию, за счет межконтинентальной, меж- и внутри- государственной миграции населения; различные по происхождению ЧС, способствующие активизации социальных и природных факторов риска, определяют, в целом, неблагоприятное состояние эпидемиологической обстановки по холере в мире. Это, в свою очередь, диктует необходимость совершенствования системы эпидемиологического надзора, в том числе в части, касающейся реализации одной из основных задач – районирования территории (на уровне стран, входящих административных территорий и других) с определением территорий риска, что имеет прогностическое значение. При этом необходимо отметить, что районирование в основе своей – это динамический, изменяющийся во времени и пространстве процесс, направленный на определение территорий с наиболее высоким эпидемическим потенциалом, что отвечает стратегии эпидемиологического надзора на национальном и международном уровнях [1,2].

**Цель исследования** – определение эпидемического потенциала субъектов (область, край, республика, автономный округ, автономная область, город федерального значения) по комплексу показателей для оптимизации эпидемиологического надзора за холерой.

**Материалы и методы.** Исследования проведены с использованием методических рекомендаций «Порядок определения эпидемического потенциала административной территории для районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры» [3], в которых

предусмотрены эпидемиологическая оценка с определением степени потенциальной эпидемической опасности (СПЭО) – высокой, повышенной и низкой – эпидемических проявлений, контаминации поверхностных водоемов *V. cholerae*, миграции населения, условий водоснабжения и водопользования.

При эпидемиологической оценке имевших место заносов или регистрации единичных случаев оценивали показатели (12), характеризующие интенсивность эпидемического процесса ( $_{0/0000}$ ) с учетом выделения *V. cholerae* O1/O139 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>, *V. cholerae* O1/O139 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>, длительность регистрации холеры по годам; тип эпидемического процесса (острый, хронический); пути передачи возбудителя (независимо от эпидемической значимости) по установленным факторам (2006-2016 гг.).

Сведения о выделении холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из поверхностных водоёмов (2006-2015 гг.) использованы из проблемно-ориентированной базы данных «Холерные вибрионы. Россия» [4], а также предоставленных Управлениями Роспотребнадзора по 67 субъектам (кроме территорий III типа В). Применены показатели частоты выделения *V. cholerae* O1 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup> и *V. cholerae* O1/O139 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup> из поверхностных водоёмов с учетом точек отбора проб, предусмотренных СП 3.1.1.2521–09 [5], а также оценены максимальная температура воды (16 – 32° С), при которой были выделены холерные вибрионы, длительность периода выделения их при ежегодной изоляции и наличие сбросов недостаточно очищенных и неочищенных сточных вод в поверхностные водоёмы (22 показателя).

Для оценки миграции населения использованы данные Управлений Роспотребнадзора по 85 административным территориям, в том числе по 63 субъектам с международными пунктами пропуска на воздушном (ВПП), морском (МПП), автомобильном (МАПП) транспорте и по 22 – без международных пунктов пропуска (2011-2015 гг.). Применены сведения о миграции населения через международные пункты пропуска на железнодорожном транспорте (ППЖД) Управления Роспотребнадзора по железнодорожному транспорту по 15 субъектам. Для определения СПЭО миграции населения в возможности заноса холеры использован показатель интенсивности прибытий через ВПП, МПП, МАПП, ППЖД; данные о странах, с которыми осуществляются международные транспортные связи, в том числе неблагополучных по холере; данные Федеральной службы государственной статистики о населении, прибывшем из-за пределов Российской Федерации, и численности населения в субъектах [6] (5 показателей).

Систематизация и анализ данных по условиям водоснабжения и водопользования выполнены за период с 2011 по 2015 г. с применением данных, предоставленных Управлениями Роспотребнадзора по 85 субъектам. Проведена оценка СПЭО поверхностных и подземных источников

централизованного питьевого водоснабжения по пяти и четырем показателям соответственно, качества воды в сети и водопотребления в системе централизованного питьевого водоснабжения – по пяти; нецентрализованного водоснабжения – по трем; рекреационного водопользования – по четырем показателям. При оценке учитывали обнаружение за анализируемый период в воде патогенных бактерий, маркеров вирусов и регистрацию заболеваемости ОКИ установленной этиологии, обусловленной реализацией водных факторов передачи возбудителей. Всего предусмотрено использование 60 показателей.

**Результаты и обсуждение.** На первом этапе определена СПЭО эпидемиологических данных, миграции населения, условий водоснабжения и рекреационного водопользования, как потенциальных и реальных рисков активизации эпидемического процесса, по предусмотренным показателям в 85 субъектах.

При определении СПЭО эпидемических проявлений инфекции с учетом предусмотренных показателей выявлена повышенная СПЭО в Москве (завоз из Индии, 2010 г.) с учетом интенсивности эпидемического процесса – 0,02<sub>0/0000</sub>; выделения от больных *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>; длительности ежегодной регистрации инфекции – 1 год; остроуго во времени типа эпидемического процесса, без распространения холеры; пищевого и контактного путей передачи возбудителя инфекции. При единичных заносах холеры в 2012 г. и в 2014 г. в Москву, в Мурманскую область (завоз из Индии, 2006 г.), в Республику Башкортостан (завозы из Индии, 2006, 2008 гг.) установлена низкая СПЭО. В Республике Калмыкия установлена повышенная СПЭО с учетом интенсивности эпидемического процесса – 0,342<sub>0/0000</sub>, выделения от больного *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>+</sup> (2011 г.) и других предусмотренных показателей.

С 2006 по 2015 г. из поверхностных водоёмов в России было изолировано 676 штаммов *V. cholerae* O1 *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>-</sup>, *ctxA*<sup>-</sup> *tcpA*<sup>+</sup> и *V. cholerae* O139 *ctxA*<sup>-</sup> и *tcpA*<sup>-</sup> в 30 субъектах Российской Федерации, а также два штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, *ctxA*<sup>+</sup> *tcpA*<sup>+</sup>. Высокая СПЭО по контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae* при наличии сбросов недостаточно очищенных и (или) без очистки сточных вод установлена в Республике Калмыкия, Ростовской области, Республике Татарстан, Приморском крае, Забайкальском крае, в Иркутской области и Республике Крым. К административным территориям с повышенной СПЭО отнесены 23 субъекта с учетом контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae* и сбросов недостаточно очищенных и (или) без очистки сточных вод. В 50 субъектах при мониторинге объектов окружающей среды не были обнаружены *V. cholerae* O1 при наличии сбросов недостаточно очищенных и (или) без очистки сточных вод в поверхностные водоёмы; в пяти субъектах отсутствовало выделение *V. cholerae* O1 и сбросы сточных вод (без очистки и недостаточно очищенных). СПЭО поверхностных водоёмов оценена как повышенная и низкая соответственно.

При эпидемиологической оценке миграции населения в возможности заноса холеры на территорию Российской Федерации установлено, что из 63 субъектов с пунктами пропуска в 19 установлена высокая СПЭО миграции населения, в 39 – повышенная и в 5 – низкая; в 22 субъектах без международных пунктов пропуска – 8, 12 и 2 соответственно. При анализе связи со странами, неблагополучными по холере, выявлены возможные пути заноса инфекции через воздушные пункты пропуска в Краснодарский край из Афганистана, Индии, Кении; Сахалинскую область и Приморский край – из Китая и Филиппин; Ростовскую, Астраханскую, Омскую, Оренбургскую, Белгородскую области и Красноярский край – из Индии; в Санкт-Петербург – из Конго, Либерии и Доминиканской Республики, в Москву – из Индии, Непала, Афганистана, Мьянмы, Доминиканской Республики, Уганды и в Республику Бурятия – из Индии и Филиппин [7].

Установлена высокая и повышенная СПЭО условий централизованного питьевого водоснабжения на 81 административной территории и рекреационного водопользования – на 69 административных территориях с учетом оценки микробиологических показателей качества проб воды на соответствие СанПиН 2.1.4.1074-01 и СанПиН 2.1.5.980-00 соответственно, обнаружения в некоторых субъектах патогенных бактерий и маркеров вирусов в распределительной сети и в поверхностных водоёмах, используемых для рекреационного водопользования, регистрации спорадических случаев и вспышек ОКИ установленной этиологии с реализацией соответствующих факторов передачи.

На основании комплексной оценки степеней потенциальной эпидемической опасности указанных составляющих определение эпидемического потенциала по холере 85 субъектов осуществлено по формуле:

$ЭПТ = СПЭО (ЭП_{ЭП1-ЭП3} + K_{K1-K3} + McПП + MbПП + ПВИВ + ПЗИВ + ЦВС + НЦВС + РВ + СтВ)$ , где:

ЭПТ – эпидемический потенциал территорий;

ЭП – СПЭО эпидемические проявления:

ЭП<sub>1</sub> – СПЭО эпидемических проявлений, обусловленных *V. cholerae* O1 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>,

ЭП<sub>2</sub> – СПЭО эпидемических проявлений, обусловленных *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>,

ЭП<sub>3</sub> – СПЭО эпидемических проявлений, обусловленных *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>.

K – контаминация поверхностных водоемов:

K<sub>1</sub> – СПЭО контаминации *V. cholerae* O1 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>,

K<sub>2</sub> – СПЭО контаминации *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>,

К<sub>3</sub> – СПЭО контаминации *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>.

McПП – СПЭО миграции в субъектах с пунктами пропуска;

МбПП – СПЭО миграции в субъектах без пунктов пропуска;

ПВИВ – СПЭО поверхностных водоёмов, используемых в качестве источников централизованного питьевого водоснабжения;

ПЗИВ – СПЭО подземных источников, используемых в качестве источников централизованного питьевого водоснабжения;

ЦВС – СПЭО условий централизованного водоснабжения по показателям, характеризующим качество воды и уровень водообеспечения населения;

НЦВС – СПЭО условий нецентрализованного водоснабжения;

РВ – СПЭО условий рекреационного водопользования;

СтВ – наличие сбросов без очистки или недостаточно очищенных сточных вод (для субъектов, в которых отсутствует контаминация холерными вибрионами).

Бальная оценка для степеней потенциальной эпидемической опасности территорий: I – низкая – 0,01; II – повышенная – 0,05; III – высокая – 0,1.

При определении эпидпотенциала субъектов установлено, что основными предпосылками, потенциальными и реальными эпидемиологическими рисками в активизации эпидемического процесса, являются миграция населения, контаминация поверхностных водоёмов *V. cholerae*, высокая и повышенная СПЭО условий водоснабжения и водопользования, регистрация вспышек ОКИ установленной бактериальной и вирусной этиологии с реализацией водного пути передачи возбудителей, сбросы недостаточно очищенных и (или) без очистки сточных вод в поверхностные водоёмы. Учитывая единичные заносы холеры без распространения, при определении эпидпотенциала административных территорий в качестве основной составляющей использована СПЭО контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae*. С учетом вышеизложенного сформированы следующие типы территорий:

Территории I типа. Эпидпотенциал повышенный - субъекты с высокой СПЭО по контаминации поверхностных водоемов *V. cholerae* O1ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>, *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup> и *V. cholerae* O1/O139 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>.

Территории II типа. Эпидпотенциал повышенный – субъекты с повышенной СПЭО по контаминации поверхностных водоемов *V. cholerae* O1 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup> и *V. cholerae* O1/O139 ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>

Территории III типа, подтип А. Субъекты с повышенной СПЭО при отсутствии контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae* O1/O139, наличии сбросов недостаточно очищенных и без очистки сточных вод в поверхностные водоёмы, используемые для водоснабжения и водопользования,



регистрации вспышек ОКИ установленной бактериальной и вирусной этиологии с реализацией водного пути передачи возбудителей.

Территории III типа, подтип Б. Эпидпотенциал повышенный – субъекты с повышенной СПЭО при отсутствии контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae O1/O139*, наличии сбросов недостаточно очищенных и без очистки сточных вод в поверхностные водоёмы, используемые для водоснабжения и водопользования, отсутствии регистрации вспышек ОКИ установленной бактериальной и вирусной этиологии с реализацией водного пути передачи возбудителей.

Территории III типа, подтип В. Эпидпотенциал низкий - при отсутствии контаминации поверхностных водоёмов *V. cholerae O1/O139*, отсутствии сбросов недостаточно очищенных и без очистки сточных вод в поверхностных водоёмы, используемые для водоснабжения и водопользования, отсутствии регистрации вспышек ОКИ установленной бактериальной и вирусной этиологии с реализацией водного пути передачи возбудителей.

Таким образом, установлен повышенный эпидемический потенциал для 80 (94,0 %) административных территорий, для 5 (6,0 %) – низкий. Получены данные для районирования Российской Федерации с учетом типов субъектов по их эпидемическому потенциалу в современный период.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов и др. // Вестник РАМН. – 2015. – № 70(2). – С. 249-256.
2. Cholera 2010 // Wkly Epidem. Rec. – 2010 – № 86(31). – Р. 325-340.
3. Порядок определения эпидемического потенциала административной территории для районирования Российской Федерации по типам эпидемических проявлений холеры: Методические рекомендации [одобрены Ученым советом (протокол № 2 от 08. 04.2016 г., утверждены директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора].
4. Москвитина Э.А., Анисимова Г.Б., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Свидетельство о государственной регистрации базы данных №2006620206. «Холерные вибрионы. Россия». 2006 г.
5. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521–09. – М, 2009.
6. Федеральная служба государственной статистики [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.gks.ru>

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

\*\*\*

## **АЛГОРИТМ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО РАССЛЕДОВАНИЯ ПРИ КОНТАМИНАЦИИ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ O1 И O139 СЕРОГРУПП**

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

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

При осложнении эпидемиологической ситуации по холере в России в период седьмой пандемии основным путем передачи был водный, реализуемый через различные факторы передачи возбудителя инфекции: воду поверхностных водоёмов при рекреационном водопользовании; воду централизованного и нецентрализованного водоснабжения. Это является обоснованием в настоящее время для мониторинга контаминации поверхностных водоемов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в стационарных точках отбора проб, предусмотренных действующей тактикой при эпидемиологическом надзоре («территория риска», «объект риска» и «время риска»). При выделении штаммов *V. cholerae* – характеристика их по фенотипическим и молекулярно-биологическим свойствам. Эффективно функционирующая система эпидемиологического надзора должна быть направлена на ликвидацию вероятных причин контаминации холерными вибрионами объектов окружающей среды в случае их обнаружения независимо от эпидемической значимости штаммов, выяснение причинно-следственных связей при проведении эпидемиологического расследования.

Во ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт разработан алгоритм эпидемиологического расследования, цель которого – установление источника контаминации *V. cholerae* водного объекта.

Алгоритм включает:

- характеристику штаммов *V. cholerae* по основным идентификационным свойствам с учетом наименования водоема, стационарной точки, даты отбора проб, температуры и рН воды; гидрологическую характеристику поверхностного водоема, в том числе в стационарной точке отбора проб, предусмотренную в паспорте [1];

- данные о микробиологических показателях водного объекта на соответствие СанПин 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод» по показателям: общие колиформные бактерии, термотолерантные колиформные бактерии, колифаги и патогенные возбудители кишечных инфекций для суждения об экологической ситуации, предшествующей контаминации холерными вибрионами;

- описание санитарно-гигиенического состояния на прилегающей к водному объекту территории напрямую направлено на выяснение возможных причин обнаружения холерных вибрионов – наличие несанкционированных сбросов сточных вод, поверхностно-ливневых сточных вод, наличие туалетов поглощающего типа, дренажной системы, аварий в системе водоотведения и других потенциальных факторов риска;

- природные условия (осадки, ливни, ураганы, штормы), предшествующие выделению холерного вибриона, рассматриваются как чрезвычайные ситуации, способствующие, прежде всего, контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов с последующей возможной активизацией эпидемического процесса при выделении *V. cholerae* O1 ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>;

- оценивается эпидемиологическая ситуация по ОКИ установленной этиологии, в том числе при вспышках или регистрации спорадических случаев с реализацией водного пути передачи с выделением *Campylobacter jejuni*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* A и B, *Shigella*, энтеровирусов, маркеров ротавирусов, норовирусов, вируса гепатита A и других патогенов.

- анализ обследования на холеру больных ОКИ, поступивших в инфекционные стационары и оставленных на дому, и другого контингента, предусмотренный СП 3.1.1.2521-09. «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», за период, предшествующий выделению холерного вибриона;

- систематизация данных о проведенных профилактических мероприятиях, направленных на предотвращение контаминации *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп поверхностных водоемов и других объектов окружающей среды.

Итогом эпидемиологического расследования являются его результаты по выявлению источников контаминации и предпосылок, как потенциальных эпидемиологических, экологических рисков контаминации холерными вибрионами поверхностных водоёмов, используемых в качестве источников для питьевого водоснабжения и рекреационного водопользования. Устранение вероятных рисков возникновения чрезвычайных ситуаций – стратегия в профилактике и борьбе с инфекционными болезнями, направленная на обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Профилактика холеры. Организационные мероприятия. Оценка противоэпидемической готовности учреждений к проведению мероприятий на случай возникновения очага холеры: МУ 3.1.1.2232-07. М., 2008. – С. 43-44.
2. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации»: СП 3.1.1.2521-09.

\*\*\*

### **ПЛАСТИСФЕРА МОРЕЙ, ОМЫВАЮЩИХ РОССИЙСКУЮ ФЕДЕРАЦИЮ, КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ГЛОБАЛЬНОГО РАСПРОСТРАНЕНИЯ *VIBRIO CHOLERAЕ***

Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С., Олейников И.П.,  
Клешнина О.В, Головин С.Н., Москвитина Э.А.

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

Одним из субстратов, на поверхности которых вибрионы способны формировать биоплёнки, является поверхность различных абиотических объектов [Lutz, 2013; Silva A.J., 2016]. Недавние исследования показали, что токсигенные холерные вибрионы на поверхности пластика в составе биопленок обладают устойчивостью к ингибирующей активности других гетерологичных микроорганизмов [Водопьянов С.О., 2017].

Поэтому плавающий пластиковый мусор морей и океанов может формировать новую экологическую нишу (пластисферу) не только для сохранения вибрионов [Zettler E.R., 2013], но и для переноса возбудителя течениями в новые регионы с вероятностью формирования новых очагов холеры.

**Цель** данного исследования заключалась в оценке возможного риска переноса возбудителя холеры, находящегося в составе биоплёнок на плавающих частицах пластисферы в морях, омывающих территорию Российской Федерации.

Российская Федерация омывается 14 морями, но, учитывая известную термофильность холерного вибриона, практическое значение, в плане переноса возбудителя холеры, имеют моря с теплой водой – Чёрное, Азовское и Японское моря.

Чёрное море является внутренним, без влияния крупных океанских течений. Циркуляция вод представлена прибрежным основным круговым черноморским течением и центральными циклоническими круговоротами, которые наиболее выражены зимой и летом. Основное круговое черноморское течение циркулирует с востока на запад (против часовой стрелки) вдоль всего северного побережья на расстоянии 15-25 км от берега со скоростью 5 км/ч и имеет среднюю ширину 60 км. Летом поверхность Чёрного моря прогревается до 23-26 °С, что является оптимальным для вибрионов [Бондаренко А.Л., 2012]. Учитывая этот факт, занос холерного вибриона на частицах пластисферы на территорию РФ (районы Сочи – Новороссийска - Крыма) возможен с территории Грузии. Менее вероятен занос с побережья Турции, учитывая длительный период циркуляции кругового черноморского течения.

Азовское море является самым мелким в мире: его глубина не превышает 13,5 метров, поэтому летом почти по всему морю устанавливается довольно однородная поверхностная температура, достигающая до 26 °С, что может благоприятствовать сохранению вибрионов. Морские течения находятся в зависимости от дующих здесь очень сильных северо-восточных и юго-западных ветров и поэтому весьма часто меняют направление. Основным течением является круговое течение вдоль берегов Азовского моря против часовой стрелки. В этом случае нельзя исключить возможность заноса холерного вибриона с побережья Украины на частицах пластисферы на территорию Крыма.

Японское море является частью Тихого океана и ограничено с запада материком Евразия, с востока Японскими островами и островом Сахалин. Оно целиком лежит в зоне муссонного климата умеренных широт. Циркуляция поверхностных вод Японского моря определяется двумя факторами: атмосферной циркуляцией воздушных масс над самим морем и водообменом через проливы с Тихим океаном. Течения представлены двумя основными потоками. С юга через Цусимский пролив в море заходит теплое Цусимское течение, которое является ветвью теплого течения Курисио. Оно тянется вдоль берегов Японии со скоростью 0,5-1 км/ч [Бондаренко А.Л., 2012].

Холодное Приморское течение (Лиманское течение, течение Шренка) берет свое начало в Татарском проливе, образуя петлю в северной части Японского моря между материком и островом Сахалин, и движется вдоль берегов Хабаровского и Приморского краев со скоростью 1 км/ч (местами до 2.5 км/ч), изгибаясь против часовой стрелки, образует также холодное Южно- Приморское течение. Течения во многом определяют температуру поверхностных слоёв Японского моря. Летом температура воды в северо-западной части моря, омывающего территорию РФ, достигает 13-18 °С, что делает проблематичным выживание вибрионов.

Таким образом, наибольший возможный риск заноса возбудителя

холеры, находящегося в составе биоплёнок на плавающих частицах пластисферы, возможен в Чёрном море, в районы Сочи – Новороссийска – Крыма. На наш взгляд данный фактор риска должен быть принят во внимание при проведении эпидемиологического расследования.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бондаренко А.Л. Крупномасштабные течения и долгопериодные волны. – М., 2012. – 163 с.
2. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С. и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биоплёнках // Здоровье населения и среда обитания. – 2017. - № 3. - С. 51-54.
3. A. C. Lutz, M. Erken, P. Noorian, S. Sun, and D. McDougald. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*.// Front Microbiol. – 2013. - № 4. – P. 375. Published online 2013 Dec 16. doi: 10.3389/fmicb.2013.00375
4. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and Cholera pathogenesis // PLOS Neglected Tropical Diseases | DOI:10.1371 /journal.pntd.0004330 February 4, 2016.
5. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris // Environ Sci. Technol. – 2013. - № 47(13). – P. 7137-46. doi: 10.1021/es401288x. Epub 2013 Jun 19.

\*\*\*

## ИНФОРМАЦИОННОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ И ПРОВЕДЕНИЯ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ, FIFA 2018 В Г. РОСТОВЕ-НА-ДОНУ

Водопьянов А.С.<sup>1</sup>, Пичурина Н.Л.<sup>1</sup>, Титова С.В.<sup>1</sup>, Чемисова О.С.<sup>1</sup>,  
Водопьянов С.О.<sup>1</sup>, Олейников И.П.<sup>1</sup>, Москвитина Э.А.<sup>1</sup>, Ковалев Е.В.<sup>2</sup>,  
Конченко А.В.<sup>2</sup>, Ненадская С.А.<sup>2</sup>, Калинина М.В.<sup>2</sup>, Слишь С.С.<sup>2</sup>,  
Карпущенко Г.В.<sup>3</sup>, Полиненко В.А.<sup>3</sup>, Половинка Н.В.<sup>3</sup>, Полонский А.В.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ростов-на-Дону

<sup>2</sup>Управления Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав  
потребителей и благополучия человека по Ростовской области,  
г. Ростов-на-Дону

<sup>3</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии» в Ростовской области,  
г. Ростов-на-Дону

Чемпионат мира по футболу FIFA 2018 - массовое мероприятия с международным участием, имеющее большое политическое, социальное и культурное значение. Успешность его проведения во многом определяется целенаправленностью и эффективностью комплекса санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и биологической безопасности, что требует не только высокого уровня профессиональной компетенции специалистов и их готовности к отражению различных рисков и угроз, но и использования ими методов современных информационных технологий. Важность информационной составляющей эпидемиологического надзора подчеркнута в решении заседания Учёного совета Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 14 декабря 2016 года «Использование ГИС-технологий в научных исследованиях и практике санитарно-эпидемиологического надзора».

Необходимость оптимизации информационного обеспечения и использования гео-информационных систем в оперативной и аналитической работе специалистов Роспотребнадзора и ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора регламентирована Протоколами Оперативного штаба по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и защиты прав потребителей в период подготовки и проведения ЧМ по футболу, которые в числе необходимых задач определили картографирование мест размещения эпидемиологически значимых объектов (медицинские организации, объекты транспортной инфраструктуры, тренировочные базы, стадионы, фан-зона, гостиницы для размещения VIP-персон FIFA, спортсменов и гостей ЧМ-2018, рекреационные зоны, точки отбора проб из объектов окружающей среды, в том числе радиационного контроля). Важно, что в план работы Оперативного штаба были включены разделы о создании ГИС «Единая эпидемиологическая карта г. Ростова-на-Дону» (ЕЭКР), необходимой для оценки эпидемиологических рисков.

Научная и техническая разработка ГИС «Единая эпидемиологическая карта г. Ростова-на-Дону» (ЕЭКР) осуществлялась специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». Работа по созданию ЕЭКР началась в 2016 году и включала решение следующих задач:

- выбор картографической основы;
- определение используемой системы координат и допустимой погрешности при картографировании объектов различного эпидемиологического риска;
- разработка алгоритма ввода и представления эпидемиологически значимой информации, имеющей географическую привязку, для

формирования оперативно пополняемых ГИС;

- определение эпидемиологически значимых объектов;
- оперативное пополнение ЕЭКР и обеспечение доступа специалистам Роспотребнадзора в режиме реального времени.

В качестве основы использовали «Единую картографическую основу», поставляемую Росреестром и картооснову «Спутник» (ПАО Ростелеком). Программное обеспечение разрабатывали на языке Java. Информацию, необходимую для картографирования эпидемиологически значимых объектов, получали из Управления Роспотребнадзора по Ростовской области.

Все сведения нанесены на карту в виде отдельных слоев, позволяя отображать только необходимые для пользователя данные, избегая информационной перегрузки.

К началу Чемпионату мира по футболу ГИС ЕЭКР содержала:

1. Объекты транспортной инфраструктуры – 6 объектов.
2. Объекты проведения массовых мероприятий - 5 объектов.
3. Объекты лечебной инфраструктуры – 6 объектов.
4. Объекты размещения клиентских групп – 6 объектов.
5. Рекреационные объекты - 13 объектов.
6. Точки отбора проб воды - 46 объектов.
7. Стационарные точки поверхностных водоемов для проведения исследований воды на вибриофлору в г. Ростове и прилегающих территориях – 164 точки.
8. Точки отбора проб атмосферного воздуха - нанесено 13 объектов.
9. Точки радиационного контроля для разработки маршрута автогамма съёмки – 35 точек.

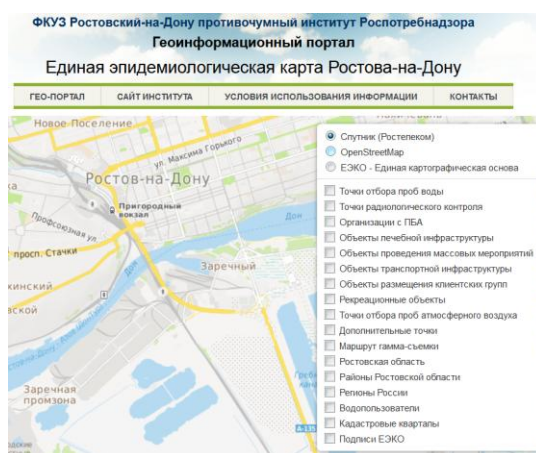


Рисунок 1 - Перечень слоев Единой Эпидемиологической Карты Ростова-на-Дону (ЕЭКР).



Оперативный доступ заинтересованных в работе с ГИС специалистов был обеспечен её размещением в сети Интернет на сайте института. Это способствовало бесперебойной работе в режиме онлайн в течение всего периода подготовки и проведения Чемпионата мира по футболу FIFA 2018. ГИС-портал позволяет работать с ГИС не только на настольных компьютерах, но и на планшетах и коммуникаторах.

Сотрудниками ФКУЗ «РостНИПЧИ» Роспотребнадзора, Управления Роспотребнадзора по Ростовской области, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области», ФКУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» разработаны Методические рекомендации по работе с ГИС-порталом (утверждены директором института), доступны для скачивания на ГИС-портале ФКУЗ «РостНИПЧИ» Роспотребнадзора и на сайте eLibrary.ru

С целью совершенствования профессиональных знаний и компетенций специалистов Роспотребнадзора в решении конкретных задач по подготовке и проведению Чемпионата мира во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт разработана программа консультативного семинара «Основы работы с геоинформационным порталом (ГИС-порталом) ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора». Теоретическая часть семинара позволила слушателям усовершенствовать навыки работы по организации и обеспечению картографирования эпидемиологически значимых объектов и визуализации результатов мониторинга. Практические занятия помогли специалистам Роспотребнадзора освоить особенности работы с онлайн-ГИС в сети «Интернет», необходимые для самостоятельной работы. Всего было обучено 16 человек.

Таким образом, создание и использование ГИС ЕЭКР явилось важным этапом информационного обеспечения мероприятий при подготовке и проведении чемпионата мира по футболу FIFA 2018 в г. Ростове-на-Дону, которое увеличило оперативность в получении данных, повысило эффективность межведомственного взаимодействия и качество проводимого мониторинга.

На наш взгляд, накопленный опыт может быть использован при подготовке иных массовых мероприятий, в том числе с международным участием.

\*\*\*

## **ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЕ ОБЕСПЕЧЕНИЕ ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ 2018 В ГОРОДЕ РОСТОВЕ-НА-ДОНУ**

Рыжова А.А., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В., Пичурина Н.Л.

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

Массовое мероприятие (ММ), согласно определению Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), - собрание лиц (число участников, как правило, превышает 25 тыс. человек), проходящее в определённом месте в течение определённого периода времени [1].

ММ характеризуются прибытием людей из различных регионов земного шара, в том числе из стран, неблагополучных по особо опасным болезням, и сосредоточением людей на одной территории. Проведение ММ способствует продвижению здорового образа жизни населения всех стран. Но с другой стороны, такие мероприятия представляют собой события, которые могут непосредственно поставить под угрозу здоровье населения как города-организатора, так и всей страны в целом [2].

На территории Российской Федерации уже проходили ММ такие, как Олимпиада в Сочи, XXVII Всемирная летняя Универсиада в городе Казани в 2014 году, Кубок Конфедерации в 2017 году в городе Казани. Чемпионат мира по футболу проходил впервые и имел всероссийский масштаб. Было задействовано 11 субъектов Российской Федерации, где проводились соревнования команд из 32 стран [3].

Город Ростов-на-Дону был включен в список городов-организаторов, где прошли пять игр в период с 17 июня по 2 июля [4].

При подготовке к ЧМ 2018, были проведены масштабные работы по противоэпидемическому обеспечению.

На первом этапе подготовки к проведению ММ специалистами Управления Роспотребнадзора по Ростовской области и ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были разработаны и утверждены детальные Планы организационных, санитарно-гигиенических и противоэпидемических (профилактических) мероприятий для предупреждения эпидемических осложнений, связанных с «внешними» и «внутренними» рисками [5].

Для предупреждения эпидемических осложнений «внутренних» рисков специалистами Управления Роспотребнадзора по Ростовской области и противочумного института проводился еженедельный и ежемесячный мониторинг наиболее актуальных инфекционных (паразитарных) болезней на территории Ростовской области.

Для предупреждения эпидемических осложнений, связанных с «внешними» рисками, сотрудниками Управления Роспотребнадзора по Ростовской области и специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт был разработан и выполнен комплекс мероприятий по санитарной охране территории на всех пунктах пропуска (автомобильных, морских и воздушных) Ростовской области в 2017 году.

Особое внимание уделялось повышению уровня знаний и умений

специалистов по вопросам профилактики ООИ среди различных групп населения (работники санитарно-карантинных пунктов пропуска (СКП), государственных контрольных органов (ГКО), волонтеры) для оказания первичных профилактических / противоэпидемических мероприятий при возникновении больного (либо подозрительного) на ООИ.

Также был разработан «Краткий курс популярных лекций по клинике, профилактике наиболее актуальных инфекционных заболеваний», в котором в доступной для представителей немедицинских профессий форме изложена информация об ООИ и мерах личной безопасности.

Содержание лекций было адаптировано для разных целевых аудиторий и включало лаконичную и емкую информацию о клинико - эпидемиологической характеристике и мерах профилактики наиболее актуальных инфекционных болезней, при выявлении которых необходимо проводить мероприятия по санитарной охране территории согласно Приложению I ММСП 2005 года и Приложению 1 СП 3.4.2318-08 «Санитарная охрана территории Российской Федерации».

Отдельно данный курс лекций был адаптирован для волонтеров, сотрудников полиции, экскурсоводов и других участников ММ. Для работников контрольных органов в пункте пропуска (пограничная и таможенная службы) сделан упор на сигнальные признаки опасных инфекционных болезней, при которых необходимо проводить мероприятия по санитарной охране территории.

В 2017 году в рамках реализации плана организационных мероприятий по подготовке к ЧМ по футболу Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области и сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора организовано обучение представителей ГКО и специалистов СКП во всех пунктах пропуска через государственную границу РФ (три морских, два воздушных и восемь автомобильных пунктов пропуска) в форме семинара, который состоял из теоретической и практической частей. В теоретической части основное внимание уделено сигнальным признакам и мерам профилактики лихорадок Эбола, Зика, Марбург, Ласса и других особо опасных болезней, представляющих опасность в области международного общественного здравоохранения. Не менее значимой была и практическая часть, в которой специалисты СКП и ГКО под руководством специалистов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора отрабатывали правила надевания и снятия средств индивидуальной защиты (СИЗ) (Рис. 1), порядок действий специалистов ГКО конкретно для каждого пункта пропуска при выявлении больного (подозрительного на болезнь) на различных этапах прохождения им государственной границы и действия сотрудников Роспотребнадзора при выявлении сигнальных признаков особо опасных инфекций.



Рисунок 1 – отработка навыков надевания и снятия СИЗ.

Основным направлением данной формы обучения было совершенствование взаимодействия специалистов СКП и ГКО в пунктах пропуска через государственную границу РФ в Ростовской области, а также работа специалистов СКП при проведении санитарно-просветительской работы среди членов экипажей транспортных средств по актуальным вопросам в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения.

В преддверии ЧМ 2018 сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора подготовлены памятки по сигнальным признакам и мерам профилактики инфекционных (паразитарных) болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории, на русском и английском языках (Рис 2), в удобной для практического использования форме. Также памятки были выставлены на информационных стендах всех пунктов пропуска Ростовской области, ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии по железнодорожному транспорту» и на информационных досках в Республике Крым, а также на официальном сайте ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

В соответствии с решением оперативного штаба Управления Роспотребнадзора по Ростовской области по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и защиты прав потребителей в период подготовки и проведения Чемпионата мира по футболу 2018 организована и проведена работа по повышению уровня знаний в области профилактики ООИ среди волонтеров-наставников согласно учебно-тематическому плану Программы гигиенической подготовки волонтеров. Перед матчами волонтеры получали необходимую для работы на объектах информацию и проходили специализированный курс по встрече и общению с гостями.

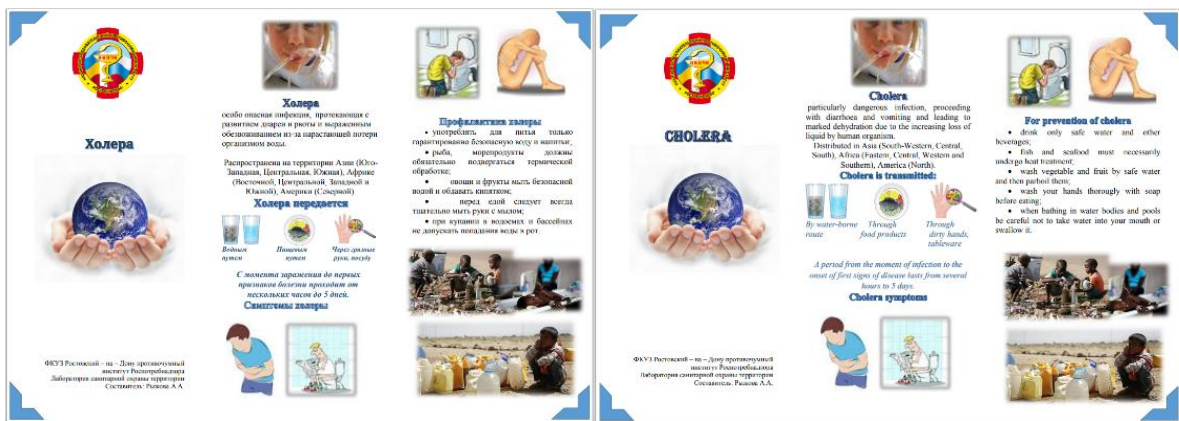


Рисунок 2 – Пример памяток.

Таким образом, повышение уровня знаний сотрудников СКП и ГКО, участвующих в обеспечении санитарно-эпидемиологического благополучия населения в период подготовки и проведения массовых мероприятий – одна из важнейших задач для безопасности населения Ростовской области и государства в целом. Подготовка сотрудников пограничной и таможенной служб Ростовской области, волонтеров и других участников ММ позволит приобрести и усовершенствовать знания и умения для применения в условиях чрезвычайной ситуации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Глобальные массовые мероприятия: их значение и возможности для обеспечения безопасности здоровья в мире: Доклад ВОЗ; 2011. 9 с. [Электронный ресурс]. URL: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/25910/1/B130\\_17-ru.pdf.2](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/25910/1/B130_17-ru.pdf.2).
2. МР 3.1.0079/2-13 «Организация санитарно-противоэпидемического обеспечения массовых мероприятий с международным участием». М: Минприроды России; НИА-Природа, 2013. – 30 с.
3. Онищенко, Г.Г. Санитарная охрана территории Российской Федерации в современных условиях / Г.Г. Онищенко, В.Ю. Смоленский и др. / Под ред. акад. РАН Г.Г. Онищенко, акад. РАН В.В. Кутырева. – Саратов: ООО «Буква», 2014. – 460 с.
4. <http://ru.fifa.com/worldcup/teams/index.html> [Электронный ресурс].
5. Удовиченко, С.К. Оценка внешних и внутренних угроз санитарно-эпидемиологическому благополучию населения в условиях проведения массовых спортивных мероприятий / С.К. Удовиченко, А.В. Топорков, И.Г. Карнаухов, и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2013. – № 2. – С. 26-32.

\*\*\*

# РАЗРАБОТКА ГЕОИНФОРМАЦИОННОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО НАДЗОРА ЗА ХОЛЕРОЙ

Титова С.В., Водопьянов А.С., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О.,  
Олейников И.П.

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

Одной из важных задач эпидемиологического надзора за холерой является актуализация и паспортизация точек отбора проб воды для бактериологического исследования. При этом, согласно СП 3.1.1.2521-09 «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации», на каждую точку оформляется Паспорт, в котором указываются различные факторы, такие, как обоснование ее выбора, так и различные характеристики самой точки (санитарно-гигиенические, гидрологические). Безусловно, данная информация является весьма важной для проведения актуализации точек отбора, но всё же она не позволяет оценивать пространственное расположение точек относительно друг друга и эпидемиологически значимых объектов.

Однако эта проблема может быть решена с помощью ГИС-технологий, позволяющих отображать на электронной карте различные географические данные, касающиеся эпидемиологически значимых объектов окружающей среды. При этом в последнее время всё чаще используются онлайн-варианты ГИС, располагаемые на серверах в интернете. Это позволяет обеспечивать доступ к отображаемой информации широкому кругу лиц, работающих не только в различных учреждениях, но и находящихся на значительном удалении друг от друга (в разных регионах).

**Цель исследования** - разработка и апробация онлайн ГИС, содержащей информацию о стационарных точках отбора проб воды при мониторинге холеры в субъектах (на уровне области, края, республики, города федерального подчинения и др.) Российской Федерации.

**Материалы и методы.** В качестве ядра использовали свободно-распространяемую библиотеку Leaflet, написанную на языке JavaScript, в качестве картографических данных - карты, полученные от корпорации Ростелеком (Россия) и сообщества OpenStreetmap. Данные о стационарных точках отбора проб из поверхностных водоемов получены из Управления Роспотребнадзора по субъектам Российской Федерации.

**Результаты и обсуждение.** Разработанная онлайн-ГИС расположена по адресу [gis.antiplague.ru](http://gis.antiplague.ru) и предназначена для работы на любом компьютере, включая мобильные устройства (планшеты, коммуникаторы).



Ввиду большого количества стационарных точек отбора проб для каждого субъекта создан отдельный электронный атлас. После выбора интересующего региона на исходном экране отображаются точки отбора проб воды на холеру в виде звездочек синего цвета.

Весьма важным при проведении эпидемиологического анализа являются места выделения штаммов холерных вибрионов, что отображается знаком биологической опасности, размер которого пропорционален числу выделенных штаммов в данной точке. При нажатии мышью в открываемом диалоговом окне отображается вся дополнительная информация о выбранной точке, о месте выделения штаммов холерных вибрионов, о дополнительных точках отбора проб и результатах их исследования (рисунок 1). Предусмотрено нанесение на карту эпидемиологически значимого (ых) объекта (ов), откуда возможен, в частности, сброс неочищенных и (или) недостаточно очищенных сточных вод, в том числе, при аварийных ситуациях или связанных с чрезвычайными ситуациями природного характера (паводки), ведущими к нарушению инфраструктуры (водоотведения) или других составляющих. После проведенного эпидемиологического расследования, уточнения - условия (сброс сточных вод), способствующие появлению потенциальных эпидемиологических факторов риска в реализации водного пути распространения при ОКИ, могут быть нанесены на карту.

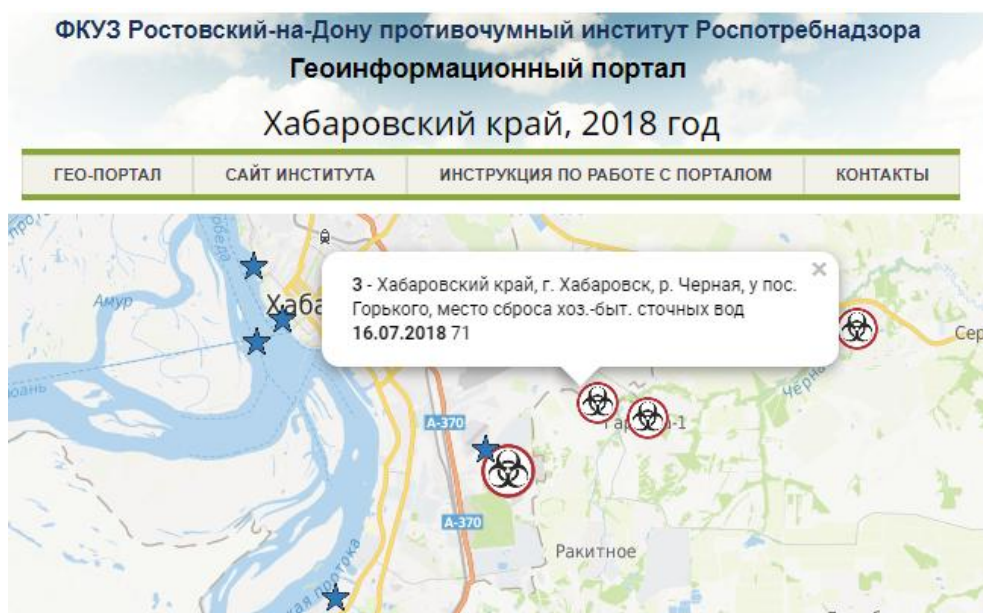


Рисунок 1 – фрагмент ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой». Точки отбора проб воды на холеру и места выделения штаммов холерных вибрионов в Хабаровском крае в 2018 году.

В качестве дополнительного слоя возможно отображение мест выделения штаммов в предыдущие годы, что отображается полупрозрачным

знаком биологической опасности.

Данный подход с отображением точек на электронных картах более удобен по сравнению с традиционным описанием точек в «табличной» форме, так как позволяет проводить анализ взаимного расположения точек относительно друг друга. Особую актуальность это приобретает в связи с возможным описанием практически одной и той же точки разными способами, чтобы избежать их дублирования. Так, например, в Ростовской области точка № 77, закрепленная за ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области (р. Темерник, в районе моста у КНС (место аварийного сброса сточных вод) и точка № 2, закрепленная за в/ч 1002 ЦГСЭН (р. Темерник, правый берег, 500 м ниже по течению от 1602 ВКГ), несмотря на отличающиеся описания, фактически дублируют друг друга (рисунок 2).

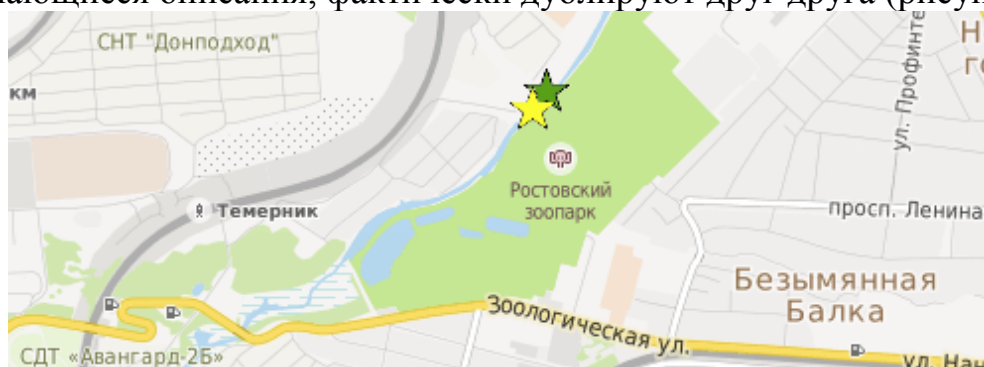


Рисунок 2 – фрагмент ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой». Точки отбора проб воды на холеру в Ростовской области: точка 77-ЦГиЭ обозначена желтым, а точка 2-«1002 ЦГСЭН» – зеленым цветом.

Таким образом, разработана ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой», содержащая актуальную информацию о точках отбора проб на холеру, местах выделения штаммов холерных вибрионов в них. Размещение ГИС на ГИС-портале института позволяет обеспечивать круглосуточный оперативный доступ к информации специалистов органов и организаций Роспотребнадзора, не требуя при этом какого-либо дополнительного программного обеспечения. Разработанная ГИС зарегистрирована в Федеральной службе по интеллектуальной собственности (Роспатенте), Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2017620636 от 9 июня 2017 г.

\*\*\*



## МОНИТОРИНГ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ КАК СОСТАВНАЯ ЧАСТЬ ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ

Карпущенко Г.В., Швагер М.М., Полонский А.В., Гончаров А.Ю.,  
Логачева Е.Н., Половинка Н.В.

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

В последнее десятилетие (2007-2017 гг.) отчетливо отмечается тенденция трансграничного передвижения большого количества населения с одного континента на другой, вызванное как геополитическими изменениями и конфликтами, так и глобализацией мировой экономики.

Седьмая пандемия холеры характеризуется интенсивным и широкомасштабным распространением заболевания в странах Африки, Азии, Америки с межконтинентальным и межгосударственным заносом инфекции в страны Европы. Мониторинг заболеваемости холерой, проводимый Всемирной организацией здравоохранения, показывает, что в настоящее время сохраняется тенденция к резервационному становлению возбудителя инфекции, то есть перехода предрезервационной фазы в первую фазу - резервации *Vibrio cholerae* El Tor. Отмечены заносы с распространением холеры в страны Американского континента (Доминиканская республика, Куба) и без распространения (США - штаты Флорида и Майами, Канада), а также в страны Африканского континента (Танзания, Малави). Эпидемический процесс во времени и пространстве в определенной мере обусловлен генетически измененными вариантами *V. cholerae* El Tor [1].

По поручению Управления Роспотребнадзора по Ростовской области ФБУЗ «ЦГ и Э в РО» (далее - Центр) проводит эпидемиологический мониторинг возбудителя холеры, в том числе в водных объектах окружающей среды. Для реализации поставленной задачи лабораторией особо опасных инфекций Центра и бактериологическими лабораториями филиалов ежегодно проводятся мониторинговые исследования воды поверхностных водоёмов в санитарно-защитных зонах водозаборов питьевого и хозяйственно-бытового водоснабжения, в местах сброса сточных вод, в местах организованного рекреационного водопользования, а также исследования клинического материала от больных ОКИ и другого контингента в соответствии с нормативными документами [2, 3].

Начиная с 2017 года Центром продолжается отбор проб воды на вибриофлору в соответствии с действующими нормативными документами [4, 5] в стационарных мониторинговых точках акватории р. Дон. С использованием маломерного судна и координатной системы осуществляется

эстафетная схема отбора проб на санитарно-микробиологические исследования с применением насосного оборудования. Реализация данной схемы позволила повысить качество отбора, сократить время транспортировки проб в лабораторию, что положительно повлияло на результативность исследований.

В рамках Государственного заказа с 02.05.2017 г. организован забор проб воды для бактериологического исследования на наличие холерных вибрионов из 166 основных стационарных точек открытых водоёмов Ростовской области. Взяты под особый контроль водоёмы, относящиеся к территориям I типа по эпидемическим проявлениям холеры и берущие начало на сопредельной территории Украины.

Стоит отметить, что за последние три года с 2014 г. по 2017 г. отбор проб воды из открытых водоёмов проводился на 35 административных территориях Ростовской области. На 18 из них были выделены штаммы *V. cholerae* non O1/ non O139 [6].

В мониторинговый период 2017 г. специалистами Центра были отобраны и исследованы 3613 проб воды (проведено 7226 исследований), из которых в 673 пробах, включая 280 проб из зон рекреаций, были выявлены штаммы *V. cholerae* non O1/ non O139, что составило 18,6%. В этот же период 2016 г. было зарегистрировано 516 положительных проб - 18,3 %.

В июне 2017 г. в точке № 59 (координаты: 47°10'367'' сш и 39°20'146'' вд) был выделен атипичный нетоксигенный штамм *V. cholerae* El Tor R-вариант (дата забора–26.06.2017 г.). По факту выделения были организованы заборы, как в указанной точке, так и в точках 500 м выше и ниже от неё по течению, и исследование проб до трехкратного получения отрицательных результатов.

В указанный период на территориях шести филиалов (в городах Волгодонске, Шахты, Миллерово, Орловском, Цимлянском и Шолоховском районах), где проводились исследования проб воды открытых водоёмов, не было зафиксировано положительных результатов в отношении *V. cholerae* O1.

Специалистами Центра внесены предложения в Комплексный план противохолерных мероприятий на территории Ростовской области и г. Ростова-на-Дону на период 2017 – 2022 гг., в котором отражены составы, структура и функции городских и районных медицинских штабов на случай выявления особо-опасных инфекционных заболеваний, оперативные планы проведения противоэпидемических мероприятий при выделении из объектов окружающей среды токсигенных холерных вибрионов O1 или O139 серогрупп и проведения профилактических и противоэпидемических мероприятий при выявлении больного (трупа) с подозрением на холеру на территории области.

Все лаборатории Центра имеют укладки для отбора проб из объектов окружающей среды на холеру с необходимым оборудованием и диагностическими препаратами в количестве ежемесячного не снижаемого запаса.

В муниципальных учреждениях здравоохранения совместно со специалистами филиалов Центра и лечебно-профилактических организаций области проведено 5 врачебно-сестринских семинаров по вопросам профилактики ОКИ, в том числе холеры, распространено 7500 памяток.

**Выводы:** 1. Систематическое проведение лабораторных исследований в стационарных мониторинговых точках акватории р. Дон позволило своевременно оценивать эпидемиологические риски и представлять данные в Управление Роспотребнадзора по Ростовской области для принятия управленческих решений. 2. Применение эстафетной схемы отбора проб для исследования на вибриофлору (при соблюдении регламентированной методики отбора проб на холеру) и на санитарно-микробиологические показатели позволило сократить время транспортировки отобранных проб в лабораторию и повысить эффективность мониторинговых исследований, а также статистическую достоверность полученных результатов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Опасные инфекционные заболевания за рубежом //г. Саратов, ФКУЗ «Противочумный центр» Роспотребнадзора. 2017-2018 гг.
2. Соловьёв М.Ю. Об усилении мероприятий по санитарной охране территории Ростовской области от заноса и распространения особо опасных болезней, в том числе, холеры, и основных задачах на 2015 год /М.Ю. Соловьёв, Е.В. Ковалёв, С.А. Ненадская и др. //Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып. 28. – С. 45-49.
3. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: Санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.1.2521-09. – М., 2009 г. – 24 с.
4. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: Методические указания МУК 4.2.2870-11. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011 г. – 83 с.
5. Лабораторная диагностика холер: Методические указания МУК 4.2.2218-07. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. – 87 с.
6. Киреев Ю.Г. Данные о выделении холерных вибрионов при эпидемиологическом надзоре, изолированных их поверхностных вод рек Дон и Темерник в 2013 году /Ю.Г. Киреев, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов и др. //

Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27. – С. 51-53.

\*\*\*

**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»**

Водяницкая С.Ю., Сергиенко О.В., Баташев В.В., Рыжова А.А.

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

Одной из серьёзных экологических проблем, которая в настоящее время носит глобальный характер, является биологическая инвазия, то есть вселение, несвойственных данной акватории, организмов в новые места обитания. Одним из способов попадания микроорганизмов в новые акватории осуществляется путем их сбрасывания с балластными водами. Чужеродные организмы могут перемещаться через океаны в водяном балласте судов, адаптироваться к новым условиям и в результате создавать значительные проблемы для морской среды, государственного имущества и здоровья человека.

Большое количество судов (пассажирских и грузовых) сбрасывает балласт при совершении морских перевозок. В водяном балласте этих судов, ежегодно составляющем до 10 млрд тонн, может находиться более 7 тысяч видов морских животных, растений и микроорганизмов. Этот факт вызвал обеспокоенность не только у Международной морской организации, но и Всемирной организации здравоохранения.

Существует множество зарегистрированных случаев, когда вторжение определенных морских организмов влияло на локальную экологию с серьезными последствиями для прибрежных и внутренних вод региона.

Три наиболее известных случая включают появление полосатой мидии в Великих Озерах, гребешковой медузы в Каспийском море и вспышку холеры в Перу в 1991 году [1].

Проблема предотвращения загрязнения вод Мирового океана стала решаться в 1960-е годы. До 2004 года не существовало строгих международных правил по контролю за переносом балласта. В 2004 году была проведена Международная конференция по управлению балластными водами судов с принятием нового документа «Международная конвенция о

контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими» (далее – Конвенция), вступившая в силу на территории Российской Федерации 8 сентября 2017 года.

Конвенция применяется в отношении всех российских судов, за исключением военных кораблей, плавучих установок, судов-земснарядов, а также если суда не спроектированы для перевозки балласта и суда эксплуатируются только в водах под юрисдикцией другого государства [2].

Для научного обоснования внедрения положений конвенции в РФ во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора запланирована НИР № 197-4-17 «Научное обоснование реализации требований международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими (2004 г.) в РФ».

С целью выявления заходов судов в страны, в т.ч. эндемичные по холере, и подсчета возможного объема балласта, ввозимого и сбрасываемого в порты Российской Федерации, первым этапом выполнения НИР является анализ судозаходов в порты субъектов РФ по следующим показателям:

- общее количество судозаходов за период 2015 -2017 гг.,
- принадлежность судна к стране,
- водоизмещение судна,
- порты убытия/прибытия в течение последних 30 дней до захода в порт,
- число выданных свидетельств об освобождении / прохождении судном санитарного контроля.

Территориями для проведения исследований выбраны субъекты Российской Федерации, где имеются международные морские порты (ММП), а именно: Ленинградская, Калининградская, Астраханская области, Республика Дагестан, Приморский край.

Установлено, что с 2015 по 2017 год включительно в порты Ленинградской области (Выборг, Высоцк, Приморск, Усть-Луга) было совершено 11183 захода судов, из них иностранными были 10575 судов, а 407 судов - российские. Число судов с водоизмещением до 10 тыс. тонн составило 232, от 10 до 30 тыс. тонн – 3031 судно, свыше 30 тыс. тонн – 7787. Заходы осуществлены из следующих стран Европы (Бельгия, Великобритания, Германия, Дания, Исландия, Испания, Латвия, Литва, Нидерланды, Норвегия, Польша, Португалия, Финляндия, Франция, Швеция, Эстония) и Африки (Марокко). (Таблица).

В ММП Калининград в период с 2015 года по 2017 год было зарегистрировано 294 захода судов, из них 195 иностранных и 99 российских; 269 судов были водоизмещением до 10 тыс. тонн, 25 - от 10 до 30 тыс. тонн. Заходы были из следующих стран Европы (Германия, Дания,

Испания, Нидерланды, Норвегия, Швеция, Фарерские острова), Южной Америки (Бразилия, Уругвай) и Африки (Мавритания).

В порты Астраханской области (Астрахань, Оля) в этот же период было совершено 4307 заходов судов, 3707 составили российские суда, 600 – иностранные; заходы зарегистрированы из следующих стран: Азербайджан, Иран, Туркменистан.

В Республику Дагестан в ММП Махачкала было зарегистрировано 1612 заходов судов, из них 1286 – иностранные, 326 – российские; 841 судно было водоизмещением до 10 тыс. тонн, 771 – водоизмещением от 10 до 30 тыс. тонн. Судозаходы осуществляются в порты Азербайджана, Ирана, Казахстана, Туркменистана.

В порты Приморского края (Владивосток, Зарубино, Находка, Ольга, Пластун, Посъет, Славянка) в этот же период было совершено 12496 заходов судов, 1568 составили российские суда, 11409 – иностранные; преобладали суда водоизмещением до 10 тыс. тонн. 1280 заходов зарегистрированы из следующих стран: Америки (Белиз, Канада, Колумбия, Мексика, Панама, Перу, США, Чили, Ямайка); Австралии с Океанией (Австралия, Новая Зеландия, Микронезия, Полинезия); Азии (Вьетнам, Индия, Индонезия, КНДР, КНР, Малайзия, ОАЭ, Сингапур, Таиланд, Тайвань, Ю. Корея), в т.ч. эндемичных по холере.

При анализе судозаходов в порты указанных субъектов РФ установлено, что число заходящих иностранных судов преобладает над числом российских судов в 3,94 раза. Суда водоизмещением до 10 тыс. тонн и 10-30 тыс. тонн заходят во все порты РФ, водоизмещением свыше 30 тыс. тонн заходят только в ММП Ленинградской области и Приморского края, и именно в этих портах осуществляется высокий грузооборот (практически в 10 раз выше, чем в других портах).

Среди стран, с которыми осуществляются международные сообщения выявлены «порты-доноры» холерных вибрионов стран, эндемичных по холере (Индия, Малайзия [3, 4]). «Портами-реципиентами» в РФ являются порты Приморского края. Также зарегистрированы судозаходы в страны, где регистрировались случаи холеры; к таким странам относятся в Европе (Бельгия, 2004-2005 гг., Германия, 2010 г., Нидерланды, 2008 г., Польша, 2005 г., Финляндия, 2008 г., Швеция, 2006 г., Эстония, 1993 г.), Азии (Азербайджан, 1994 г., Гонконг, 2004 г., Индонезия, 2010 г., Иран, 2008 г., КНР, 2010 г., ОАЭ, 2002 г., Сингапур, 2004 г., Таиланд, 2010 г., Туркменистан, 1997 г., Филиппины, 2010 г., Шри-Ланка, 2002 г., Япония, 2006 г.), Австралии с Океанией (Австралия, 2010 г., Новая Зеландия, 2005 г., Микронезия, 2001 г.), Африке (Мавритания, 2007 г., Марокко, 1994 г.) и Америке (Белиз, 1999 г., Канада, 2010 г., Колумбия, 2004 г., Мексика, 2010 г., Панама, 1993 г., Перу, 2002 г., США, 2010 г., Чили, 1998 г.), что представляет определенные эпидемиологические риски в области общественного

здравоохранения, имеющие международное значение.

Ещё одним показателем, учитываемым при анализе в нашей работе, было число выданных свидетельств об освобождении / прохождении судном санитарного контроля.

Для реализации поставленных целей ВОЗ создала перечень государств и назначенных в них международных пунктов въезда, имеющих право выдавать Свидетельство об освобождении от санитарного контроля / Свидетельство о прохождении судном санитарного контроля. Государства – участники определяют пункты въезда по функциональным назначениям и передают информацию об этом ВОЗ.

Согласно данным ВОЗ в 63 странах, расположенных на пяти континентах, размещено 1572 уполномоченных порта. В Европе в 20 странах находится 520 портов, Азии в 16 странах – 500, Африке в 7 странах – 65, Америке в 13 – 386, Австралии с Океанией на 7 территориях – 101. Однако не во всех случаях имеются порты, способные выдавать Свидетельства об освобождении судна от санитарного контроля, Свидетельства о прохождении судном санитарного контроля, осуществлять продление срока действия санитарного свидетельства. Так в Сирии, Марокко, Барбадосе, Панаме не осуществляется продление срока действия санитарного свидетельства. В Панаме из 14 портов только четыре уполномочены выдавать Свидетельства о прохождении судном санитарного контроля и др. Такая информация чрезвычайно важна при осуществлении государственного санитарно-эпидемиологического надзора, в части информирования международных морских транспортных средств РФ [5, 6].

В РФ располагается 47 портов, уполномоченных выдавать Судовые Санитарные Свидетельства [6].

При анализе процедуры выдачи свидетельств об освобождении/прохождении судном санитарного контроля нами установлено, что в портах (Таблица 1) преимущественно выдаются Свидетельства об освобождении судна от санитарного контроля, но также выдаются Свидетельства о прохождении судном санитарного контроля. Оба документа содержат [7] раздел «Балластные отсеки», заполнение которого не регламентировано в настоящее время.

Ростовский противочумный институт с 2010 года проводит исследования балластных вод; в рамках выполненных НИР разработаны нормативные документы по контролю и управлению балластными водами учрежденческого уровня.

Таким образом, проведен выборочный анализ судозаходов российских международных морских портов как первый этап реализации положений Конвенции в РФ. Установлено, что среди анализируемых портов наибольший грузооборот осуществляется в ММП Приморского края и Ленинградской

области, и именно в эти порты заходят суда водоизмещением более 30 тысяч тонн, которые сбрасывают наибольшие объемы балластных вод. Также порты Приморского края поддерживают регулярные торговые отношения со странами, эндемичными по холере, следовательно, возможность заноса холерных вибрионов с балластными водами и осадками в акватории этого региона РФ достаточно высока, что представляет эпидемиологическую опасность в плане возникновения острых кишечных инфекций среди населения портовых городов.



Таблица 1

Субъект РФ, Порт прибытия	Количество судозаходов			Количество судов			Водоизмещение судна (тыс. тонн)			Принадлежность к стране		Число выданных свидетельств о прохождении судном санитарного контроля	Число выданных свидетельств об освобождении судна от санитарного контроля	Количество		Страны убытия
	2015 год	2016 год	2017 год	сухо- грузы	танке- ры	контейне- ровозы	до 10	от 10 до 30	свыше 30	РФ	Иностран- ные			членов экипажа/ лиц, прибывших в Россию	из них больных или лиц с подозрением на ОКИ	
<b>Калининград- ская область</b> ММП Калининград	77	95	122	211	9	-	274	25		99	195	7	287	10350	-	Бразилия, Германия, Дания, Испания, Мавритавния, Нидерланды, Норвегия, Уругвай, Фарерские о-ва, Швеция
<b>Астраханская область</b> ММП Астрахань	1324	1334	1387	1358	988	1699	-	-	-	3483	562	48	790	-	-	Азербайджан, Иран, Туркменистан
ММП Оля	81	91	90	123	44	95	-	-	-	224	38	-	45	-	-	Азербайджан, Иран, Туркменистан
<b>Приморский край,</b> ММП Владивосток	1712	1643	2009	2265	282	2768	-	-	-	410	3624	12	625	165911	-	Австралия Вьетнам, Гонконг, Индонезия, Канада, Кипр, Китай, КНДР, КНР, Мексика, Новая Зеландия, Республика Корея, Сингапур, США, Тайвань
ММП Находка	1823	1340	1826	4586	345	496	-	-	-	390	4599	-	376	97957	-	Республика Корея, Турция, Панама, Уругвай, Филиппины, Ю. Корея Ямайка, Япония
ММП Посьет	237	321	2899	756	-	-	43	804	-	-	845	-	80	17151	-	
МТ «Славянка» ММП Посьет	178	125	167	126	147	197	2	152	154	94	376	-	14	9123		
ММП Зарубино	239	108	132	212	-	7	473	-	6	268	211	-	35	7722		
ММП Ольга	106	114	94	314	-	-	314	-	-	269	45	-	27	4311		
МТ «Пластун» ММП Ольга	141	151	156	448	-	-	448	-	-	183	265	-	78	4903		
<b>Ленинградская область</b> ММП Высоцк	418	457	556	458	973	-	-	-	1431	-	1431	-	14	25869	1	Бельгия, Великобритания, Германия, Дания, Исландия, Испания, Латвия, Литва, Марокко, Нидерланды, Норвегия, Польша, Португалия, Финляндия, Франция, Швеция, Эстония
ММП Выборг	457	375	439	1070	-	-	-	1070	-	-	1070	-	16	32810		
ММП Приморск	758	810	635	758	1445	-	-	758	1445	34	2169	758	56	43855		
ММП Усть-Луга	1916	2187	2175	2806	2942	530	232	1135	4911	373	5905	-	269	107789		
<b>Республика Дагестан</b> ММП Махачкала	580	646	386	319	1293	-	841	771	-	326	1406			21996		Азербайджан, Иран, Казахстан, Туркменистан
<b>ИТОГО</b>	<b>10047</b>	<b>9797</b>	<b>13073</b>	<b>15810</b>	<b>8468</b>	<b>5792</b>	<b>2627</b>	<b>4715</b>	<b>7947</b>	<b>6153</b>	<b>22741</b>	<b>825</b>	<b>2712</b>	<b>549747</b>	<b>1</b>	

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сиденко В.П., Пономаренко А.Н., Гоженко А.И., Кузнецов А.В. Санитарная охрана морских рубежей: Монография. – О.: Фенікс 2007. – 368 с.
2. Международная Конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. – СПб.: МОРСАР, 2005. – 120 с. [https://ru.wikipedia.org/wiki/Список\\_морских\\_портов\\_России](https://ru.wikipedia.org/wiki/Список_морских_портов_России) [Электронный ресурс].
3. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 гг., прогноз на 2015 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов и др. // Пробл. особо опасных инф. - 2015. - №1. - С.18-25.
4. Титова, С.В. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006-2015 гг. Прогноз на 2016 г. / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов и др. // Пробл. особо опасных инф. - 2016. - №1. – С. 20-27.
5. Прометной, В.И. Распространение в мире инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации: Справочник-кадастр / В.И. Прометной, С.Ю. Водяницкая, Ю.М. Пухов и др. – Ростов-на-Дону: Дониздат, 2012. – 194 с.
6. Прометной, В.И. Справочное пособие «Международные морские порты, уполномоченные выдавать судовые санитарные свидетельства» / В.И. Прометной, С.Ю. Водяницкая, Ю.М. Пухов и др. Одобрено и утверждено Учёным Советом РостНИПЧИ (протокол № 3 от 29.03.2011 г.).
7. Международные медико-санитарные правила ММСП (2005 г.). – 2007. – 79 с.

## Благодарности

Авторы выражают благодарность за активное участие при подготовке материалов данной работы специалистам управлений Роспотребнадзора в Астраханской области (Носкова Л.Н., Соколова А.Н.), Калининградской области (Бабура Е.А., Григорян Т.Ю.), Ленинградской области (Черный М.А., Палилов М.Б.), Приморского края (Детковская Т.Н., Селезнев В.А.), Республики Дагестан (Омаров А.Ш., Ахмадудинов Ш.Г.).

\*\*\*

## О НОВЫХ СПОСОБАХ ОТБОРА ПРОБ БАЛЛАСТНОЙ ВОДЫ НА СУДАХ

Палилов М.Б.<sup>1</sup>, Лях О.В.<sup>2</sup>, Водяницкая С.Ю.<sup>2</sup>, Баташев В.В.<sup>3</sup>,  
Черный М.А.<sup>1</sup>, Решетников В.И.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Управление Роспотребнадзора по Ленинградской области

<sup>2</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

<sup>3</sup>ФКУЗ Северо-Кавказская противочумная станция Роспотребнадзора

8 сентября 2017 года вступила в силу Международная конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года (далее – Конвенция), одной из участниц которой теперь полноправно является Российская Федерация. О важности данного документа говорит тот факт, что на сегодняшний день 73 страны присоединилось к Конвенции с общей валовой вместимостью всего торгового флота более 75 %.

В настоящее время практически все обязательные постановления по портам РФ гармонизированы с данной Конвенцией и все суда, заходящие в российские порты с балластом, должны выполнять эти требования.

Согласно Конвенции, балластные воды при сбрасывании в акватории портов должны соответствовать определенному стандарту качества, в который включены следующие индикаторные микробы, сброс которых не должен превышает установленных концентраций: токсигенный вибрион холеры (O1 и O139) с менее чем 1 колониеобразующей единицей (КОЕ) на 100 мл или менее 1 КОЕ на 1 грамм (сырого веса) образцов зоопланктона; кишечная палочка – менее 250 КОЕ на 100 мл, кишечные энтерококки – менее 100 КОЕ на 100 мл [1].

Для проверки балласта на соответствие/несоответствие данному стандарту необходимо проводить его отбор и исследование.

На судах отбор проб балластной воды может проводиться следующими способами: отбор проб через специальные люки (лазы) или лючки балластных ёмкостей, отбор проб через смотровые крышки балластных ёмкостей, отбор проб через замерные отверстия балластных цистерн или воздушные трубы, отбор проб при сбрасывании балластной воды (отливного водопровода) [2,3].

Решение об использовании какого-либо способа отбора проб воды принимается в присутствии члена экипажа, ответственного за контроль балластных вод на судне, который указывает специалисту Роспотребнадзора (ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии») место отбора в зависимости от конкретных условий и конструктивных особенностей судна.

При выполнении этапов НИР 197-4-17 «Научное обоснование

реализации требований Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими (2004 г.) в Российской Федерации» специалистами Управления Роспотребнадзора по Ленинградской области и Управления Роспотребнадзора по Ростовской области был выявлены ещё два способа отбора балластной воды на судне.

При проведении обследования балластной системы судов, например, проектов RST-27 год постройки 2012 (в нашем случае «ВФ Танкер-8» в порту Таганрог), было установлено, что в машинном отделении судна на трубах сброса балласта за борт (с правого и левого бортов) установлены датчики контроля нефтепродуктов в балластной воде, снабженные специальными кранами.



При наличии данных конструктивных особенностей балластной системы отбор проб балласта на таких судах не представляет каких-либо трудностей. Пробы балластной воды могут отбираться прямо в машинном отделении при открытии кранов и из любых балластных танков. Необходимо только прокачать определенное количество воды для слива её из трубопроводной системы балластных ёмкостей за борт. Количество прокаченной воды до отбора проб будет зависеть от мощности насоса, ширины и длины труб, идущих от нужной балластной ёмкости.

При отсутствии кранов на трубах сброса балласта их установка на судах не представляет каких-либо технических трудностей, поэтому данные изменения конструкций балластной системы теплоходов необходимо рекомендовать судовладельцам при постановке судов на текущий ремонт.

При обследовании балластной системы теплохода «Капитан Пермьяков» (год постройки 1987, проект 630, тип «Волгонефть») было установлено, что отбор проб балластной воды можно проводить, используя воздушные патрубки балластных цистерн.



Данный способ применим при полном заполнении балластных танков заборной водой. Перед отбором пробы воды из выбранного балластного танка механик судна включает балластные насосы на приём балласта. Заборная вода начинает поступать в нижнюю часть балластной цистерны, а из воздушного патрубка излишки заборной воды выливаются. Данный способ применим на всех судах, имеющих балластные цистерны.

### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Международная Конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. – СПб: МОРСАР, 2005. – 120 с.
2. Методические рекомендации «Отбор и микробиологическое исследование проб балластных вод морских (речных) судов, выполняющих международные рейсы». Одобрены Решением Ученого Совета Ростовского-на-Дону противочумного института и утверждены директором института, протокол № 7 от 21.05.2013 г.
3. Водяницкая С.Ю., Лях О.В. Разработка способов отбора балластной воды на судах смешанного «река-море» плавания для исследования на холеру // ЗНиСО. – 2014. - № 1. - С. 37-40.

\*\*\*

## **ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ РИСКИ, СВЯЗАННЫЕ СО СБРОСОМ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ В АКВАТОРИИ АЗОВСКОГО МОРЯ**

Лях О.В., Водяницкая С.Ю., Рыжова А.А., Сергиенко О.В.

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

Российская Федерация 28 марта 2012 г. присоединилась к «Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими 2004 года», разработанной в рамках деятельности Международной морской организации. Страны, подписавшие Конвенцию, «обязаны постоянно совершенствовать управление балластными водами и стандарты для предотвращения, сведения к минимуму и окончательной ликвидации переноса вредных водных и патогенных организмов посредством контроля судовых балластных вод и осадков и управления ими» (статья 2, часть 5 Конвенции).

Самым простым способом достижения микробиологически «чистого» балласта является трехкратная его замена в глубоководных акваториях, которая осуществляется при следующих условиях: замена проводится на расстоянии от ближайшего берега – не менее 200 морских миль и на глубине - не менее 200 м, что в условиях Российской Федерации невыполнимо из-за мелководности 60 % морей, в частности Азовского моря. Поэтому приемлемым способом является исследование балласта на наличие/отсутствие индикаторных микроорганизмов.

Как известно, в стандарт качества балластных вод включены индикаторные микроорганизмы: токсигенный вибрион холеры (O1 и O139) с менее чем 1 колониеобразующей единицей (КОЕ) на 100 мл или менее 1 КОЕ на 1 грамм (сырого веса) образцов зоопланктона; кишечная палочка – менее 250 КОЕ на 100 мл, кишечные энтерококки – менее 100 КОЕ на 100 мл.

С 2008 г. по 2016 г. в Таганрогском морском торговом порту ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и филиал ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области в г. Таганроге» проводили исследования проб балластных вод судов смешанного «река-море» плавания. Всего на наличие возбудителя холеры было исследовано 327 проб, на наличие кишечной палочки и кишечных энтерококков - 72 пробы. За указанный период также проведен анализ маршрутов движения 373 судов.

**Цель** данного исследования – установление связи между обнаружением холерных вибрионов, кишечной палочки и кишечных энтерококков в балластной воде судов с местами сброса балласта в Азовском море и определение эпидемиологически благополучных районов моря для

проведения балластных операций для судов, выполняющих рейсы в порт Таганрог.

**Результаты.** Азовское море было условно разделено на 3 участка: район Керченского пролива (до 45°30'с.ш.), центральный район (45°31'с.ш - 46°29'с.ш), район Таганрогского залива (после 46°30'с.ш). В ходе проведения анализа установлено, что *V. cholerae non O1/ non O139* серогрупп были выделены в 77 пробах из 327, что составило 23,5±4,8 %. Наибольшее количество находок было обнаружено в районе Керченского пролива – 43 из 143 проб (30,0±3,97 %), затем в районе Таганрогского залива – 15 из 54 проб (27,8±11,5 %). Наименьшее количество находок было обнаружено в центральной части Азовского моря - 19 из 130 проб (14,6±8,1 %).

Исследование проб балласта на наличие предельно допустимой концентрации кишечной палочки и кишечных энтерококков показали аналогичные результаты. Всего было исследовано 72 пробы, не соответствовали требованиям Конвенции – 18 (25±10,2 %). Наибольшее количество превышений КОЕ приходилось на Керченский район (исследовано 19 проб, не соответствовало требованиям 7, т.е. 36,8±18,2%) и район Таганрогского залива (исследовано 4 пробы, не соответствовало требованиям 3 пробы, т.е. 75±25 %). Наименьшее количество превышений КОЕ в пробах балластной воды пришлось на центральный район Азовского моря (исследовано 38 проб, не соответствовало требованиям 8 проб или 21,0±14,4%).

В 2014 – 2015 гг. исследовали пробы балластной воды, принятой во время балластировки судов в Черном море при удалении от берега более 50 морских миль. Всего исследовано 11 проб, превышений КОЕ индикаторных микроорганизмов выявлено не было.

Таким образом, эпидемиологически благополучными морскими районами для смены балласта является центральная часть Азовского моря и глубоководные районы Чёрного моря. Данные районы можно рекомендовать капитанам судов смешанного «река-море» плавания, выполняющих международные перевозки в Азовском море, для приёма балласта.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Международная Конвенция о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года. – СПб: МОРСАР, 2005. – 120с.
2. О присоединении Российской Федерации к Международной конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими 2004 года / Постановление Правительства Российской Федерации от 28.03.2012 г. № 256. [Электронный ресурс] /Режим доступа: <http://www.garant.ru/products/ipo/prime/doc/70054846/>.

\*\*\*

## МИКРОБИОЛОГИЯ

### ИНФОРМАЦИЯ О БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ В 2017 ГОДУ

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

<sup>1</sup>ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, г. Москва

<sup>2</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ростов-на-Дону

В течение 2017 года на территории семи субъектов Российской Федерации из поверхностных водоёмов изолировано 75 нетоксигенных гемолизположительных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor сероваров Ogawa, Inaba и R-вариант:

- Республика Бурятия – 1 штамм (Кяхтинский район, п. Наушки – река Селенга);
- Республика Калмыкия – 34 штамма (г. Элиста – пруд Заячий, пруд Колонский, река Элистинка, коллектор очистных сооружений; Целинный район – пруд села Вознесенка);
- Забайкальский край – 23 штамма (Борзинский р-н – река Борзя, озеро Харанор; г. Чита – река Ингода);
- Приморский край – 3 штамма (г. Находка – озеро Соленое);
- Иркутская область – 12 штаммов (г. Иркутск – река Ушаковка; Иркутский район, пос. Хомутово – река Куда; Усольский район, пос. Мишелевка – река Белая);
- Ростовская область – 1 штамм (г. Ростов-на-Дону – река Дон);
- Свердловская область – 1 штамм (г. Екатеринбург – пруд Калиновские разрезы).

В лабораториях противочумных учреждений Роспотребнадзора и центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора изолировано 56 (74,7%) и 19 (25,3%) штаммов соответственно.

Определяющими общую характеристику холерных вибрионов явились



штаммы, изолированные на территории Республики Калмыкия (34 штамма) и Забайкальского края (23) – суммарно 76% от всех изолированных на территории Российской Федерации.

Культуры изолированы из проб воды (62) и иловых отложений (11) поверхностных водоёмов, из сточной воды после очистки (2). Из проб воды и ила рек изолировано 36 штаммов (48,0%), прудов и озёр – 37 (49,3%), из сточной воды – 2 штамма (2,7%).

Наибольшая частота изоляции холерных вибрионов O1 Эль Тор отмечена в августе – 58,7% (44 штамма) и июле – 36% (27). В июне и сентябре изолировано 1,3% (1) и 4% (3) штаммов соответственно. Первый штамм был выделен в Ростовской области – в пробе от 26 июня, последний штамм – в Республике Калмыкия в пробе от 04 сентября.

Все штаммы, как при выделении, так и при последующей идентификации во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, агглютинировались до титра или  $\frac{1}{2}$  титра O1 холерной диагностической сывороткой и одной из серовароспецифических сывороток.

В числе изученных штаммов серовар Огава составил 45,3% (34 штамма), Инаба – 53,3% (40), R-вариант – 1,3% (1). При этом отмечено выделение на территориях отдельных субъектов Российской Федерации холерных вибрионов преимущественно одного серовара: на территории Забайкальского края – Инаба 23 из 23-х, Иркутской области – Инаба 11 из 12-ти, Республики Калмыкия – Огава 30 из 34-х.

Все штаммы протестированы в ПЦР, не содержали гена *stxA* и большинство гена *tcp A* (за исключением 1-го, выделенного в Республике Калмыкия), а также лизировали эритроциты барана в пробе Грейга, как при выделении, так и при последующем изучении в НИПЧИ.

Доля атипичных по биологическим свойствам культур составила 94,7% (в 2016 г. – 79,6%). Типичными по основным тестам при выделении или при последующей идентификации во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были штаммы, изолированные в Республике Калмыкия (1), Забайкальском крае (1) и Приморском крае (2).

Выделение атипичных культур регистрировалось на протяжении всего периода и отмечено в водоемах всех видов, показатель изменчивости одинаково высок для сероваров Огава и Инаба и составил 91,2 и 97,5% соответственно.

Среди атипичных (71) фоновыми были культуры, в различной степени резистентные к диагностическому фагу эльтор – 100% (по результатам окончательного исследования во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора). Показатель культур, атипичных по агглютинации холерными диагностическими сыворотками, составил 1,3%, атипичных по другим признакам не зарегистрировано. В результате на долю

измененных по комплексу признаков пришлось всего 1,3%.

В отношении к общему числу выделенных культур (75) эти показатели составили соответственно 94,7 – 1,3 – 1,3%.

Изоляты 2017 года, как и предыдущего, не лизировались фагами stx+ и stx- в 100% случаев.

По результатам типирования фагами Дрожевкиной-Арутюнова во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора принадлежность к фаготипу определена для 5-ти штаммов: Приморский край – озеро Соленое (1 ф/т), Забайкальский край – река Ингода (11 ф/т – 2 шт., 18 ф/т), Республика Калмыкия – пруд Колонский (11 ф/т).

При изучении чувствительности культур холерных вибрионов к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом не зарегистрировано устойчивых к цефтриаксону, имипенему, амикацину, налидиксовой кислоте, левофлоксацину, амоксициллину, фурадонину; минимальная резистентность отмечена к пefфлоксацину, цiproфлоксацину, хлорамфениколу, максимальная – к канамицину, ампициллину.

Случаев инфицирования людей возбудителем холеры в Российской Федерации в 2017 году не зарегистрировано.

Таблица 1. Характеристика культур холерных вибрионов O1 серогруппы, изолированных из ООС на территории Российской Федерации в 2017 году

№ п/п	Административная территория	Источник выделения	Всего изучено культур	В том числе по ТЕСТАМ ИДЕНТИФИКАЦИИ*														В том числе АТИПИЧНЫХ*								
				O1 СЕРОВАР				O139	ГЕМОЛИЗ*		ЭПИДЕМИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ						ВСЕГО**	по СЕРОВАРАМ**			по ТЕСТАМ**					
				Огава	Инаба	R-вариант	Гикошима		-	+	ПЦР				Комплексный метод			Огава	Инаба	R-вариант	фаг эльтор	агглютинация O1 сывороткой	желатина	Фогес-Проскауэр		
											ctx <sup>+</sup>	ctx <sup>-</sup>	tcp	изучено	лизис фагами											
1	Республика Бурятия	вода	1	-	1	-	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	
2	Республика Калмыкия	вода	32	30	2	-	-	-	-	32	-	32	1	31	32	-	-	31	29	2	-	31	-	-	-	
		стоки	2	-	2	-	-	-	-	2	-	2	-	2	2	-	-	2	-	2	-	2	-	-	-	
3	Забайкальский край	вода	20	-	20	-	-	-	-	20	-	20	-	20	20	-	-	19	-	19	-	19	-	-	-	
		ил	3	-	3	-	-	-	-	3	-	3	-	3	3	-	-	3	-	3	-	3	-	-	-	
4	Приморский край	вода	3	2	1	-	-	-	-	3	-	3	-	3	3	-	-	1		1		1	-	-	-	
5	Иркутская область	вода	4	1	3	-	-	-	-	4	-	4	-	4	3	-	-	4	1	3	-	4	-	-	-	
		ил	8	-	8					8		8		8	5	-	-	8	-	8	-	8	-	-	-	
6	Ростовская обл.	вода	1		-	1	-	-	-	1	-	1	-	1	1	-	-	1(1)	-	-	1	1(1)	1(1)	-	-	
7	Свердловская обл.	вода	1	1	-	-	-	-	-	1	-	1		1	1	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	
ИТОГО по Российской Федерации		Всего	75	34	40	1	-	-	-	75	-	75	1	74	71	-	-	71(1)	31	39	1	71(1)	1(1)	-	-	
		% 2017 г.		45,3	53,3	1,3				100,0		100,0	1,3	98,7					94,7	91,2	97,5	100,0	94,7	1,3	-	-
		% 2016 г.		55,6	37,0	7,4				100,0		100,0	7,4	92,6					79,6	93,3	60,0	100,0	66,7	11,1	16,7	-
Отношение 2017 г. / 2016 г.				-1,2	+1,4	-5,7				=		=	-5,7	+1,1				+1,2	=	+1,6	=	+1,4	-8,5			

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

\*\*\*

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МОНИТОРИНГА ХОЛЕРЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ С 2013 ПО 2017 ГГ. С ПОМОЩЬЮ ПОПОЛНЯЕМОЙ БД ГИС «ХОЛЕРА 1989-2014»

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

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

При проведении анализа результатов мониторинга холеры на территории России отмечается ежегодное выделение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 *El Tor* из объектов окружающей среды (ООС) [1-3]. В плане совершенствования информационно-аналитического обеспечения мониторинга холеры на территории нашей страны важную роль играет использование ГИС-технологий, которые применяют в целях комплексного мониторинга, что позволяет «привязать» любое явление к определенной местности [4]. Результаты микробиологического мониторинга на территории России (по параметрам фено- и генотипа) представлены в пополняемой ГИС «Холера 1989-2014» [5], которая интегрирована в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора – референс-центра по мониторингу холеры на территории Российской Федерации.

Цель исследования заключалась в анализе результатов мониторинга холеры на территории России с 2013 г. по 2017 г. с помощью пополняемой БД ГИС «Холера 1989-2014», содержащей информацию о фено- и генотипических свойствах штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогруппы различной эпидзначимости и интегрированной в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

В период с 2013 г. по 2017 г., включая работу в референс-центре по мониторингу холеры, в лаборатории микробиологии холеры был идентифицирован 321 штамм *V. cholerae* O1 *El Tor* различной эпидзначимости. Нами установлено, что за изучаемый период культуры холерных вибрионов O1 серогруппы были изолированы в 19-ти субъектах, входящих во все федеральные округа, причем наибольшее количество штаммов было выделено в Южном федеральном округе (Республика Калмыкия – 32,7%; Краснодарский край – 30,8%) и Сибирском федеральном округе (Забайкальский край – 14,0%).

Изоляты *V. cholerae* O1 *El Tor* были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам, относились к биовару Эль Тор. При изучении серологической принадлежности выявлено, что 57,6 % (185 штаммов) выделенных культур принадлежали к серовару Инаба; 40,4 % (130 штаммов) – к Огава; к R-варианту относилось 2,0 % (6

штаммов). Стоит подчеркнуть, что в 2014 г. на территории Южного федерального округа (Ростовская область, р. Темерник) был выделен один токсигенный штамм холерного вибриона O1 Эль Тор серовара Инаба (№81).

При проведении ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов по 14 генам-мишеням в соответствии со «Способом идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» (положительное решение о выдаче патента № 2017127665/10(047700), от 18.04.2018 г.) были определены кластеры / генотипы исследуемых штаммов. В результате установлено, что при исследовании 320 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* было выявлено 59 генотипов, объединенных в восемь кластеров.

По итогам мониторинговых исследований холеры за пятилетний период в России были изолированы нетоксигенные штаммы холерных вибрионов со следующими фаготипами: 4, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18 и 19. Далее, в ходе проведенного анализа удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 41 (12,8%) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor на десяти из 19 административных территорий. Атипичность по признаку фаголизабельности была выявлена у 290 штаммов, а именно: у 7 (2,2%) была выявлена чувствительность к фагу классический, 283 штамма (88,2%) были резистентными к фагам классический и эль тор.

Таким образом, с помощью пополняемой ГИС была дана расширенная фено- и генотипическая характеристика штаммов, изолированных из ООС на территории России в течение 2013-2017 гг. Полученные данные свидетельствуют об актуальности проведения мониторинговых исследований ООС и подчеркивают перспективы применения ГИС в системе эпидемиологического надзора за холерой, как инструмента информационного анализа (по различным задачам) для повышения его эффективности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Левченко, Д.А. ПЦР - генотипы нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, циркулирующих на территории Российской Федерации / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, М.И. Ежова // II Межрегиональный научно-практический форум «Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России». – Краснодар, 2017. – С. 81.
2. Москвитина, Э.А. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005-2014 г. Прогноз на 2015 г. / Э.А. Москвитина, О.Л. Адаменко, В.Д. Кругликов и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2015. – №1. – С. 18-25.
3. Онищенко, Г.Г. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации / Г.Г. Онищенко, А.Ю. Попова, В.В. Кутырев и др. // Журнал

микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2016. – № 1. – С. 89-101.

4. Кругликов, В.Д. Сравнительный анализ прикладного использования ПЦР и VNTR - генотипирования штаммов холерных вибрионов O1 ctxA-tcrA+ / В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, А.С. Водопьянов и др. // Молекулярная диагностика. – М., 2017. – С. 341-342.

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

\*\*\*

## **О КОРРЕЛЯЦИИ ВЫДЕЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ФАГОВ И ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ**

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

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

Территория Ростовской области занимает особое место при изучении возможности вовлечения водных объектов в эпидемиологический процесс при заносе холеры, что подтверждается практически ежегодным выделением штаммов холерных вибрионов O1 с разной генетической характеристикой из рек Дон и Темерник [1, 2]. При проведении ежегодных мониторинговых исследований на территории г. Ростова-на-Дону было отмечено сочетание обнаружения вибриофагов в пробах воды из рек Дон и Темерник с циркуляцией нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 [3-6].

Вместе с тем, вопросы динамики обнаружения холерных фагов в пробах воды из объектов окружающей среды и возможность использования их в качестве индикаторного показателя присутствия в водном объекте холерных вибрионов O1 остаются не уточненными.

Целью данного исследования явилось изучение взаимосвязи между выделением холерных фагов и штаммов холерных вибрионов O1 из проб воды стационарных точек (с.т.) г. Ростова-на-Дону в течение последних десяти лет (с 2008 г. по 2017 г.).

В ходе исследования 1681 проб воды из пресных поверхностных водоёмов и сточных вод г. Ростова-на-Дону было выделено 100 холерных фагов. В результате проведенной идентификации с использованием фагочувствительных тест-штаммов и серологического типирования все изолированные фаги были отнесены к I морфогруппе, XII серотипу. При

бактериологическом исследовании этих проб изолировано 33 культуры *V. cholerae* O1.

Исходя из указанных данных, представлял интерес анализ наличия и тесноты связи (по методу Спирмена [7]) между числом изолированных штаммов холерных вибрионов O1 и бактериофагов с 2008 г. по 2017 г. Однако корректный анализ можно провести только по результатам анализа проб воды по семи с.т., закрепленным за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, из которых проводились заборы и исследования в течение последующих 10 лет. В результате в работу по расчету коэффициента корреляции нами было взято 75 холерных бактериофагов (из выделенных 100) и 25 штаммов холерных вибрионов O1 различной эпидзначимости (из изолированных 33) (табл.).

Таблица. Расчет и оценка коэффициента корреляции ( $r^*$ ) между выделением из водных объектов г. Ростова-на-Дону штаммов *V. cholerae* O1 и бактериофагов холерных вибрионов с 2008 г. по 2017 г.

Год	Количество выделенных холерных бактериофагов из с.т. (x)	Количество штаммов холерных вибрионов, выделенных из с.т. (y)	Ранги		d	d <sup>2</sup>
			x	y		
2008	3	5	6	3	3	9
2009	6	6	4	2	2	4
2010	11	9	2	1	1	1
2011	9	0	3	6	3	9
2012	11	0	2	6	4	16
2013	0	2	8	4	4	16
2014	4	1	5	5	0	0
2015	4	1	5	5	0	0
2016	25	1	1	5	4	16
2017	2	0	7	6	1	1
n=10	75	25				$\sum d^2=72$

Примечание

$$r^* = 1 - (6 \sum d^2 / n(n^2 - 1)) = 0,57; p \geq p_{0,95}.$$

На основании рассчитанного нами коэффициента корреляции удалось установить прямую статистически достоверную связь между выделением штаммов *V. cholerae* O1 и изоляцией холерных фагов из водных объектов окружающей среды г. Ростова-на-Дону за изучаемый период, что дает нам основания предполагать, что обнаружение холерных фагов в воде может являться косвенным показателем присутствия вибрионов.

Таким образом, выявление холерных фагов можно расценивать как индикаторный признак, свидетельствующий о большей вероятности выявления *V. cholerae* O1 именно в этих пробах воды из водоёмов или стоков. Полученные данные свидетельствуют о перспективности проведения дальнейших исследований в выбранном направлении.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мединский, Г.М. Эпидемиологические аспекты холеры эльтор в Ростовской области / Г.М. Мединский, Ю.М. Ломов, Г.И. Кулов и др. // Холера: Материалы Российской науч. конф. – Ростов-на-Дону, 1992. – С. 16-20.
2. Кондратенко, Т.А. Экология, миграционные процессы и их влияние на эпидемическую ситуацию по холере в Ростовской области / Т.А. Кондратенко, М.М. Швагер, Б.Х. Антонян // Холера: материалы Российской научной конференции. – Ростов-на-Дону, 1995. – С. 56-57.
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. // Пробл. особо опасных инф. – 2017. – № 4. – С.99-102.
4. Зубкова, Д.А. О корреляции выделения холерных фагов с выделением штаммов холерных вибрионов из поверхностных водоемов и стоков в ходе мониторинга в г. Ростове-на-Дону / Д.А. Зубкова, Л.В. Григоренко, И.В. Архангельская и др. // Региональные проблемы окруж. среды, здоровья населения и сан.-эпид. благополучия. – Ростов-на-Дону, 2013. – №3. – С.132-133.
5. Зубкова, Д.А. Анализ свойств холерных вибрионов, выделенных при мониторинге водоемов и стоков г. Ростова-на-Дону с 2008 по 2012гг. / Д.А. Зубкова, В.Д. Кругликов, А.Б. Мазрухо и др. // Холера и патоген. для человека вибрионы: Матер. совещ. спец-ов Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. – С. 78-81.
6. Кудрякова, Т.А. Характеристика холерных фагов, выделенных из поверхностных водоемов и стоков г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга с 2008 по 2012 гг. / Т.А. Кудрякова, Л.Д. Македонова, Н.Е. Гаевская и др. // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. совещ. спец-ов Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26. – С. 168-172.
7. Методические разработки для учебных ординаторов медицинских институтов. Статистические методы в здравоохранении и медицине. – Ростов-на-Дону, 1978. – 109 с.

\*\*\*



## **ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЁМОВ СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА В 2017 Г.**

Миронова Л.В.<sup>1</sup>, Хунхеева Ж.Ю.<sup>1</sup>, Пономарева А.С.<sup>1</sup>, Басов Е.А.<sup>1</sup>,  
Гладких А.С.<sup>1</sup>, Бочалгин Н.О.<sup>1</sup>, Урбанович Л.Я.<sup>1</sup>, Мошкин А.Б.<sup>2</sup>,  
Капко Н.А.<sup>2</sup>, Лауль З.Л.<sup>2</sup>, Алленов А.В.<sup>3</sup>, Борзов В.П.<sup>3</sup>, Хоменко Т.В.<sup>3</sup>,  
Солодкая Н.С.<sup>3</sup>, Балахонов С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт  
Роспотребнадзора;*

<sup>2</sup>*ФКУЗ Читинская противочумная станция Роспотребнадзора;*

<sup>3</sup>*ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора*

На современном этапе седьмой пандемии холера, несмотря на усиленные меры борьбы с ней, остается одной из важнейших проблем здравоохранения в мире. Социально-экономические факторы (низкий уровень жизни, недостаток квалифицированной медицинской помощи, нехватка чистой питьевой воды, скученность беженцев в лагерях и т.д.) в отдельных эндемичных странах Африки, Азии, Карибского бассейна в сочетании с природно-климатическими факторами и особенностями биологии возбудителя обеспечивают условия для сохранения холерного вибриона, распространения и закрепления инфекции.

В 2017 г. в мире по информации Референс-центра по мониторингу холеры выявлено **1 191 403** случаев заболевания с подозрением на холеру и **231 687 – больных холерой** [1]. Высокий удельный вес заболевших приходится на страны Азии. В частности, в 2017 г. продолжалась крупная эпидемия холеры в охваченном войной Йемене, где по состоянию на середину декабря выявлено свыше 900 тыс. случаев (983 486) с подозрением на холеру и более 2 тыс. смертей (2218) [2].

На Африканском континенте неблагополучная ситуация сохранялась в Демократической Республике Конго, Сомали, Танзании, Кении, Замбии. Из Танзании зарегистрированы заносы холеры в Чешскую Республику [3].

В странах Карибского бассейна, в т.ч. в Республике Гаити, в 2017 г. выявлено более 13 тыс. случаев заболевания холерой, а с начала эпидемии в 2010 г. по 30.12.2017 г. – 816000 заболевших [4].

В 2018 г. по информации Федеральной службы Роспотребнадзора на основании данных ВОЗ в мире зарегистрировано более 25 тыс. случаев холеры и более 129 тыс. - заболевших с подозрением на холеру [5].

Высокий риск импорта возбудителя холеры и возможное накопление в поверхностных водоёмах с развитием острых вспышек обуславливают неблагоприятный прогноз по холере в Российской

Федерации. Необходимо отметить возможность опосредованного заноса холеры на территорию страны из эндемичных очагов через благополучные в отношении холеры страны. Так, в конце 2017 г. – начале 2018 г. зарегистрировано пять случаев заноса инфекции из Индии в Казахстан, имеющий активные туристические связи с Россией.

Ситуация по холере в субъектах Сибири и Дальнего Востока, как и в целом по России, сопряжена с возможностью заноса возбудителя инфекции из неблагополучных по холере стран. Это свидетельствует о необходимости проведения мероприятий в рамках эпидемиологического надзора за холерой – мониторинга поверхностных водоемов на наличие холерного вибриона и обследования на холеру контингентов в соответствии с требованиями нормативных документов.

В субъектах Сибири и Дальнего Востока в 2017 г. на наличие возбудителя холеры обследовано 8650 человек, из которых 8462 (97,8 %) – больные ОКИ, 14 (0,2 %) – умершие от острой кишечной инфекции и 174 (2 %) – обследованные на вибрионосительство. В одном случае в Магаданской области из клинического материала от больной ОКИ выделен штамм *V. cholerae* не O1/O139. Больная вернулась с отдыха во Вьетнаме (г. Муйне), где употребляла в пищу фрукты, купалась в море и бассейне.

В рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоёмов Сибири и Дальнего Востока в 2017 г. отобрано 18130 проб, из них воды – 17033, ила – 1097. В Приморском крае, относящемся ко II типу по эпидемическим проявлениям холеры, отобрано и исследовано 2977 проб (16,4 %). В субъектах III типа А и Б подтипов исследовано 55,5 % (10057 проб) и 24,9 % (4532 пробы), соответственно. В регионах подтипа В отобрано 3,1 % (564 пробы) от общего количества проб. Кроме этого, исследованию подвергались пробы нецентрализованного питьевого водоснабжения и хозяйственно-бытовые сточные воды.

В результате из поверхностных водоёмов изолировано 39 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы и 1135 – *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп. Штаммы *V. cholerae* O1 изолированы в Иркутской области (десять штаммов – из воды и ила р. Ушаковка, г. Иркутск; по одному – из воды рр. Куда и Белая, Иркутский и Усольский районы, соответственно), в Забайкальском крае (двадцать три штамма – из воды и ила рр. Чита, Ингода и озера Харанор), в Приморском крае (три штамма – из воды оз. Соленое) и в Республике Бурятия (один штамм – из р. Селенга).

*V. cholerae* не O1/O139 серогрупп выделены из поверхностных водоёмов и хозяйственно-бытовых сточных вод в 15 субъектах Сибири и Дальнего Востока, из которых значительная часть (88,6 %, 1006 штаммов) – в субъектах, относящихся к III типу А, Б подтипам по эпидемическим проявлениям холеры, 10,6 % (121 штамм) – на территории II типа (Приморский край).

Штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы из поверхностных водоёмов

типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, агглютинируются до титра холерной диагностической O1 сывороткой и до титра или 1/2 титра одной из вариантоспецифических: к Инаба сероварианту отнесено 36 штаммов (92,3 %), три (7,7 %) – к сероварианту Огава.

Выделенный от больной в Магаданской области *V. cholerae* не O1/O139 обладает типичными для холерного вибриона типичными, культурально-морфологическими, биохимическими свойствами, но не агглютинируется ни одной из холерных диагностических сывороток.

MALDI-ToF масс-спектрометрическая идентификация штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* не O1/O139 в 100 % случаев показала их принадлежность к *Vibrio cholerae* со значениями индекса «max score» от 2,252 до 2,574 (достоверная идентификация до вида).

При определении чувствительности к антибактериальным препаратам диско-диффузионным методом установлена резистентность изолированных *V. cholerae* O1 к канамицину (все штаммы), доксициклину (тридцать шесть штаммов), к стрептомицину (пять штаммов), к ампициллину (один штамм). Клинический штамм *V. cholerae* не O1/O139 характеризуется чувствительностью к широкому спектру антибактериальных препаратов за исключением фуразолидона, к которому отмечена устойчивость.

По результатам определения эпидемической значимости в ПЦР установлено отсутствие в геноме всех исследованных штаммов *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп детерминант основных факторов патогенности – холерного токсина *ctxA* и токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA*. Ген, детерминирующий синтез O1 антигена, присутствовал у всех 39 штаммов *V. cholerae* O1 и отсутствовал у клинического изолята холерного вибриона не O1/O139 серогруппы.

При выборочном генотипировании *V. cholerae* O1 по комплексу дополнительных факторов патогенности (*rtxA*, *rtxC*, *hlyA*, *hapA*), пандемичности (*tnp0183*, *pro0490*), персистенции (*mshA*, *mshQ*) установлена вариабельность их геномной организации. Так, фрагмент острова пандемичности VSP-I – *tnp0183* выявлен у одного штамма, выделенного в Иркутской области из р. Куда, и четырех – из р. Борзя и оз. Харанор. Ген основной структурной субъединицы маннозочувствительных гемагглютининов – *mshA* обнаружен в геноме штаммов из Иркутской области (рр. Куда, Белая), Приморья (оз. Соленое) и Забайкальского края (рр. Борзя, Ингода, оз. Харанор).

На основании VNTR-типирования по пяти локусам вариабельных тандемных повторов установлены аллельные профили изолированных из поверхностных водоемов в 2017 г. штаммов *V. cholerae* O1 (рисунок 1). Все выделенные в г. Иркутске из р. Ушаковки штаммы отнесены к одному VNTR-генотипу VcA18VcB0VcC8VcD4VcG1, который ранее на курируемой территории не встречался, что может указывать на возможный занос данного геноварианта вибриона в водоём. Необходимо отметить, что данные штаммы

были изолированы как из проб воды, так и из ила в стационарной точке, выше и ниже по течению реки, а также из ила непосредственно в месте сброса в водоём неочищенных ливневых стоков, обнаруженных при проведении эпидемиологического расследования.

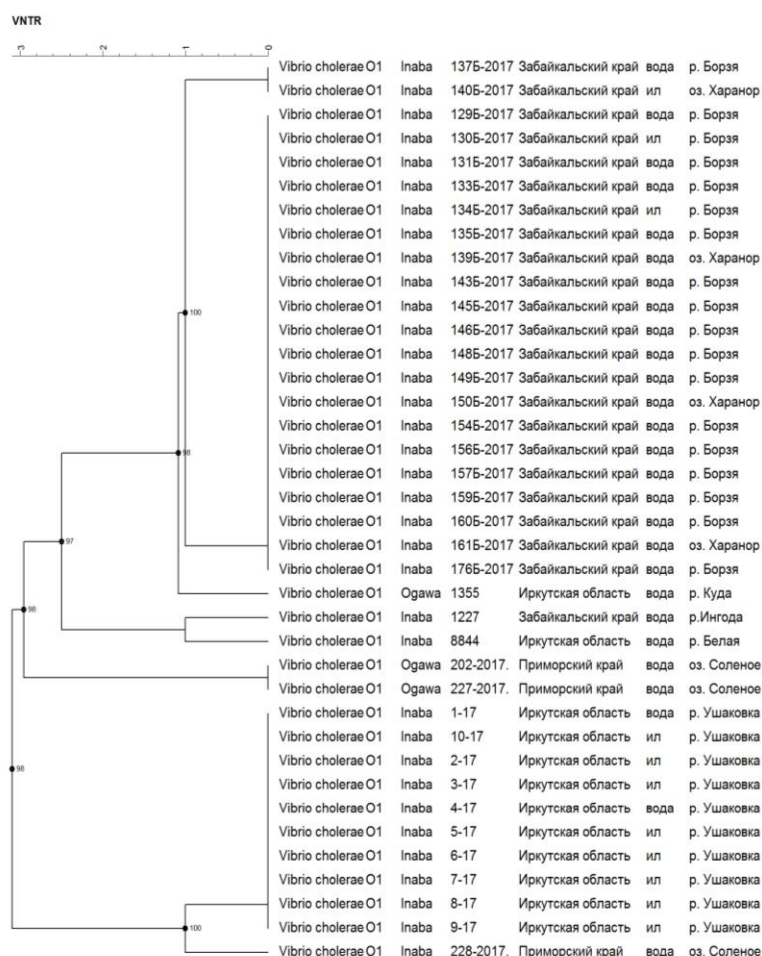


Рисунок 1 – Дендрограмма, построенная на основании структуры переменных тандемных повторов штаммов *V. cholerae* O1, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока в 2017 г.

Большая часть штаммов (20 из 23), выделенных в 2017 г. из поверхностных водоёмов Забайкальского края (р. Борзя, оз. Харанор), демонстрируют принадлежность к VNTR-генотипу VcA12VcB0VcC14VcD4VcG2. Наряду с доминирующим, идентифицирован однолокусный вариант данного генотипа – VcA10VcB0VcC14VcD4VcG2. Он определен у двух штаммов: один выделен из р. Борзя, другой – из о. Харанор. При этом однолокусные варианты были изолированы одновременно (14.08.2017) с вариантами доминирующего генотипа: в оз. Харанор в одной точке (доминирующий – из пробы воды, однолокусный вариант – из ила), а в р. Борзя – из проб воды в разных стационарных точках. Позднее, до 21.08.2017 г., обнаруживались только штаммы доминирующего генотипа. Следует сказать, что варианты штаммов холерного вибриона с подобным аллельным профилем в последние годы в Забайкальском крае не

обнаруживались. В сравнении с изолятами 2016 г. аллельная формула этих штаммов отличается по трем локусам. Вместе с тем, обнаруженный однократно в р. Ингода штамм *V. cholerae* O1 формирует отдельную ветвь на дендрограмме (рисунок 1) и при сравнительном анализе демонстрирует сходство VNTR-профиля с вибрионами O1 серогруппы, выделенными в Забайкальском крае в 2016 г.

Два штамма *V. cholerae* O1 сероварианта Огава из Приморского края (оз. Соленое) относятся к одному VNTR-генотипу и отличаются от выделенного в этой же точке в 2016 г. изолята на один повтор в локусе VcA и три повтора в локусе VcC. Аллельная формула *V. cholerae* O1 сероварианта Инаба, изолированного в этом же водоёме в 2017 г., отличается от таковой штаммов сероварианта Огава по всем имеющимся в геноме четырем локусам.

При кластерном анализе данных макрорестрикционного картирования установлена идентичность *NotI*-генерируемых паттернов рестрикции геномной ДНК штаммов *V. cholerae* O1 из р. Ушаковки, что согласуется с данными VNTR-анализа (рисунок 2). Штаммы из р. Борзя и оз. Харанор Забайкальского края отнесены к одному генотипу, а выделенный из р. Ингода *V. cholerae* O1, как и при MLVA-типировании, дистанцирован от данной группы изолятов.

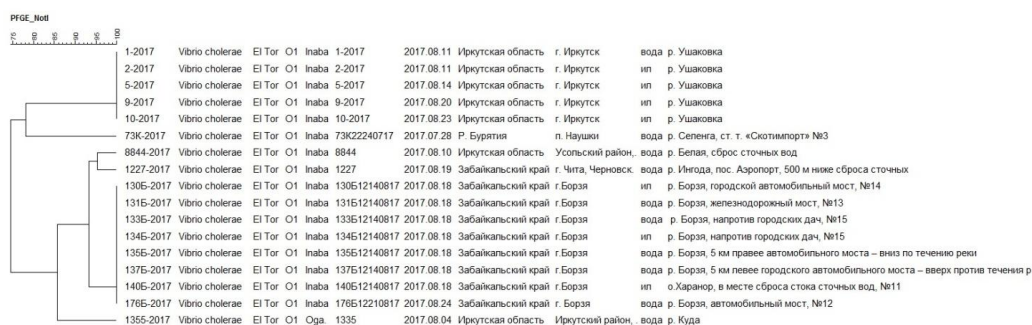


Рисунок 2 – Дендрограмма, построенная на основании анализа *NotI*-генерируемых паттернов рестрикции штаммов *V. cholerae* O1, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока в 2017 г.

Таким образом, изолированные из поверхностных водоёмов в 2017 г. штаммы холерного вибриона проявляют вариабельность по ряду фенотипических (агглютинабельность холерными сыворотками, чувствительность к бактериофагам и антибактериальным препаратам) и молекулярно-генетических свойств. При молекулярном типировании прослеживается территориальная приуроченность генотипов штаммов *V. cholerae* O1 и подтверждается предположение как о возможном заносе новых вариантов нетоксигенного холерного вибриона в водоёмы, так и персистенции микроорганизма с незначительной трансформацией генома.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Информационный бюллетень № 48 «Об эпидемиологической ситуации по холере в мире с 01.01.2017 по 22.12.2017 г.» [http://antiplague.ru/cholera\\_2017\\_12\\_22/#more-2924](http://antiplague.ru/cholera_2017_12_22/#more-2924) [электронный ресурс] дата обращения 1.07.2018
2. Cholera, diarrhea and dysentery update (135): Asia (Yemen) [Internet]. 16 Dec 2017 [cited 16 Dec 2015]. Archive number: 20171216.5505525. Available from: <http://www.promedmail.org>.
3. Cholera, diarrhea and dysentery update (36): Czech Republic ex Tanzania [internet]. 25 May 2017 [cited 25 May 2017]. Archive number: 20170525.5061755. Available from: <http://www.promedmail.org>.
4. Москвитина Э.А. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Тюленева, В.Д. Кругликов и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2018. – Вып. 1. – С. 36–43.
5. Об эпидемиологической ситуации по холере в мире [http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news\\_details.php?ELEMENT\\_ID=10280](http://rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=10280) [электронный ресурс] дата обращения 1.07.2018

\*\*\*

## **РОЛЬ ТЕМПЕРАТУРЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ В ФОРМИРОВАНИИ БИОПЛЁНКИ ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ НА ХИТИНОВОМ ПАНЦИРЕ РЕЧНОГО РАКА**

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

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

Попадая в окружающую среду, холерные вибрионы подвергаются воздействию огромного числа экологических факторов, наиболее значимым из которых является температура. Несмотря на широкое распространение *V. cholerae* по всему миру, только в некоторых регионах, в основном в тропиках и субтропиках, холера является эндемичным заболеванием. Но и на этих территориях случаи заболевания носят сезонный характер, высокая численность холерных вибрионов совпадает с периодами повышения температуры воды и массового развития зоопланктона [1]. Эволюционно сложившаяся ассоциация *V. cholerae* с хитином – самым распространенным биополимером в водной среде, обеспечила этим микроорганизмам



доступный источник питания, устойчивость к стрессовым воздействиям и защиту от хищников [2].

**Целью** работы явилось изучение роли температуры культивирования в формировании биоплёнки *V. cholerae* на хитиновом панцире речного рака.

Нами был разработан простой и удобный способ изучения формирования биоплёнки *V. cholerae* на хитине речного рака *Astacus astacus*. Фрагменты хитинового панциря без предварительной обработки весом 100 мг помещали во флаконы с 30 мл речной воды и автоклавировали при 132° С в течение 30 минут. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor №19613 *ctxAB+tcpA+* и №20000 *ctxAB-tcpA-*, выделенные из воды поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону, добавляли в среду культивирования до конечной концентрации 10<sup>4</sup> м.к./мл. Изучаемые пробы культивировали при трех температурных режимах (10° С - осень, 15° С - весна и 28° С - лето), период наблюдения - один месяц. Для постановки ПЦР фрагменты хитина вносили в пробирки эппендорф 1,5 мл с 1,0 мл физраствора. Лизис клеток биоплёнки проводили путем прогревания в течение 30 минут при 99° С. Полученные препараты использовали для постановки ПЦР в формате реального времени для выявления видоспецифичного гена *hlyA* [3, 4]. Данные по числу микробных клеток анализировали с помощью логистической модели с использованием сигмоидной кривой роста. Подбор параметров осуществляли с помощью программы «SigmoidalRegression», разработанной во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Программа написана на языке программирования Java и основана на алгоритме Левенберга – Марквардта [5]. Скорость роста вычисляли как арктангенс угла наклона касательной к точке перегиба кривой.

При культивировании в условиях осени *V. cholerae* O1 El Tor в планктонной форме (контроль) перестали высеваться на седьмые сутки. В опытных пробах было отмечено резкое снижение концентрации вибрионов, формирование биоплёнки на хитиновых пластинках не происходило, однако единичные колонии вибрионов в отпечатках на агаре Мартена отмечали до 14 (*ctxAB+tcpA+*) - 17 (*ctxAB-tcpA-*) суток. (рис. А).

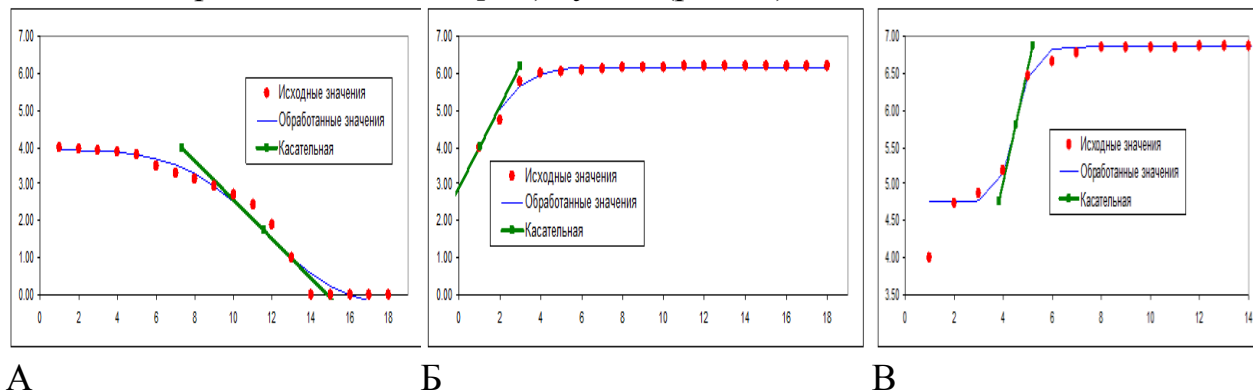


Рисунок. Логистическая модель кривой роста холерных вибрионов №19613 (*ctxAB+tcpA+*) в среде, содержащий хитин речного рака при температуре инкубации 10, 15 и 28° С (А, Б, В).

Примечания:

Синяя линия – вычисленная сигмоидная кривая;

Зеленая линия – касательная (арктангенс угла её наклона – это скорость).

В условиях, моделирующих температуру воды в водоёмах весной, холерные вибрионы независимо от наличия гена *ctx AB* формировали на поверхности хитина плотную биоплёнку на шестые сутки. Максимальное количество клеток холерных вибрионов достигало  $10^6$  м.к. на 100 мг хитина и сохранялось на этом уровне в течение месяца (рис. Б).

В ходе эксперимента установили, что при  $28^{\circ}\text{C}$  на хитиновом панцире холерные вибрионы с разной генетической характеристикой формировали биоплёнку на пятые сутки, что подтверждено ПЦР и бактериологическим методом, их количество доходило до  $10^7$  м.к. на 100 мг хитина. Через семь дней концентрация холерных вибрионов резко увеличилась и оставалась на высоком уровне весь период наблюдения (рис. В).

Используя логистическую модель с сигмоидной кривой роста холерных вибрионов, стало возможным проанализировать изменение скорости роста холерных вибрионов в биоплёнке на хитине речного рака (табл.).

При  $10^{\circ}\text{C}$  концентрация холерных вибрионов резко уменьшалась и формирование биоплёнки не наблюдалось, при  $15^{\circ}\text{C}$  разницы в скорости роста в биоплёнке и планктонной форме не было, однако при  $28^{\circ}\text{C}$  - скорость в опытах с хитином была выше в 1,4-1,9 раза, чем в планктонной форме.

Таблица. Изменение скорости роста *V. cholerae* O1 El Tor в биоплёнке на хитине речного рака в зависимости от температуры культивирования

Температура культивирования $^{\circ}\text{C}$	№№ штаммов	Скорость роста - угол наклона касательной к точке перегиба кривой (абс. цифры)	
		на хитине	планктонная форма (контроль)
10	19613	-0,5	-1,2
	20000	-1,0	-1,1
15	19613	1,1	1,2
	20000	0,7	0,7
28	19613	1,5	0,8
	20000	1,1	0,8

Таким образом, температура является важным экологическим фактором и влияет как на скорость биоплёнкообразования так и на сроки персистенции холерных вибрионов на хитиновом панцире речного рака. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что оптимальной температурой для формирования биоплёнки является температура от  $15^{\circ}\text{C}$  до



28 °С, а при 10°С холерные вибрионы на хитине биоплёнку не образуют.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mekalanos, J.J. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria / J.J. Mekalanos // J. Bacteriol. – 1992. – Vol. 174, № 1. – P. 1—7.
2. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin // Environ.Microbiol. – 2008, № 10. – P. 1400 – 1410.
3. Водопьянов, С.О. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках / С.О. Водопьянов, С.В. Титова, А.С. Водопьянов и др. // ЗНиСО. – 2017. – № 3.– С.51-54.
4. Lyon, W.J. PCR for detection of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 in pure cultures, raw oysters, and synthetic seawater / W.J. Lyon, M. Taq // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67, № 10. – P. 4685-4693.
5. Dimov, N. Growth characteristics of twenty *Lactobacillus delbrueckii* strains isolated from bulgarian home made yoghurts / N. Dimov, S. Kirilov, I. Peykov, I. Ivanova // Biotechnol. & biotechnol. – 2007. – № 2. –P.172-176.

\*\*\*

## ИЗУЧЕНИЕ ДЕЙСТВИЯ ПРЕПАРАТОВ РАЗНЫХ ГРУПП НА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ *IN VITRO*

Селянская Н.А., Железняк Н.Г.

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

В связи с распространением антибиотикоустойчивости, актуальным является изучение хорошо известных и широко используемых при лечении неинфекционных заболеваний препаратов разных классов с целью обнаружения возможности их применения для борьбы с инфекциями. В литературе описано увеличение активности антибактериальных препаратов в отношении резистентных бактерий в присутствии субингибирующих концентраций анилиновых красителей (метиленового синего, фуксина) [1], антигистаминного препарата супрастина [2], протамина сульфата [3-5], блокаторов эффлокс-систем омепразола и верапамила [6, 7], этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) [8, 9].

**Цель исследования:** оценка действия субингибирующих концентраций метиленового синего, фуксина, супрастина, протамина сульфата, омепразола, верапамила, ЭДТА на чувствительность к антибактериальным препаратам множественноустойчивых штаммов холерных вибрионов Эль Тор.

### **Материалы и методы.**

Из Музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора были взяты 50 штаммов *Vibrio cholerae El Tor* различной эпидзначимости, выделенных в 2001-2016 гг. от людей (14) и из объектов окружающей среды (36). Антибиотикочувствительный штамм *V.cholerae* O1 P-5879 *ctx+tcpA+toxR+* (1972 г., г.Таганрог) использовали в качестве контроля.

Значения минимальных подавляющих концентраций (МПК) препаратов определяли методом серийных разведений в плотной питательной среде [10].

Характер взаимодействия антибактериальных средств с субингибирующими концентрациями препаратов разных групп, исходя из расчёта фракционного индекса ингибиции (FIX), определяли как синергидный (FIX менее 0,5), индифферентный (FIX 0,5-4,0) либо антагонистический (FIX более 4,0) [11].

### **Результаты исследования.**

Для штаммов холерных вибрионов, взятых в исследование, МПК супрастина составляла 200,0-400,0 мг/л, протамина сульфата, омепразола и верапамила – более 800,0 - 1600,0 мг/л, метиленового синего и фуксина - 10,0-20,0 мг/л, ЭДТА – 500,0 мг/л. В качестве субингибирующих выступали концентрации, не подавляющие рост холерных вибрионов и соответствующие 1/2 – 1/8 МПК.

При проведении экспериментов было установлено, что типы действия субингибирующих концентраций препаратов на антибиотикочувствительность разных штаммов холерных вибрионов оказались неодинаковыми. В большинстве случаев они не изменяли антибиотикочувствительность исследуемых штаммов (индифферентный эффект), при этом не было выявлено антагонистического действия.

Из всех изученных субингибирующих концентраций препаратов разных групп, наибольшее синергидное действие в отношении 70% штаммов выявлено у комбинации левомецетина с верапамилем (50,0 мг/л) (таблица).

Синергидный эффект наблюдался при совместном действии стрептомицина, фуразолидона, триметоприма / сульфаметоксазола, налидиксовой кислоты, ципрофлоксацина с метиленовым синим (2-10% штаммов); стрептомицина, фуразолидона, налидиксовой кислоты, ципрофлоксацина, левомецетина с супрастином (10-30% штаммов); фуразолидона, триметоприма / сульфаметоксазола, налидиксовой кислоты,

ципрофлоксацина, левомицетина, гентамицина с протамина сульфатом (2-20% штаммов); ампициллина, тетрациклина, налидиксовой кислоты с верапамилем (10 % штаммов); фуразолидона, налидиксовой кислоты, цiproфлоксацина, триметоприма / сульфаметоксазола с ЭДТА (6-10 % штаммов).

Таблица. Удельный вес штаммов *V. cholerae El Tor* (%), в отношении которых наблюдался синергидный эффект комбинаций препаратов

Двукратные разведения антибактериальных препаратов	Препарат в субингибирующей концентрации						
	Метиленовый синий (5,0 мг/л)	Фуксин (5,0 мг/л)	Супрастин (50,0 мг/л)	Протамина сульфат (100,0 мг/л)	Омепразол (100,0 мг/л)	Верапамил (50,0 мг/л)	ЭДТА (200,0 мг/л)
Удельный вес штаммов, %							
Тетрациклин	0	0	0	0	0	10	0
Доксициклин	0	0	0	0	0	0	0
Левомецетин	0	0	30	20	0	70	0
Стрептомицин	2	0	10	0	0	0	0
Гентамицин	0	0	0	10	0	0	0
Налидиксовая кислота	2	0	10	10	0	10	6
Цiproфлоксацин	10	0	10	4	0	0	10
Ампициллин	0	0	0	0	0	10	0
Цефтриаксон	0	0	0	0	0	0	0
Фуразолидон	2	0	10	2	0	0	6
Триметоприм / сульфаметоксазол	2	0	0	2	0	0	6

Фуксин и омепразол оказались наименее активными. Они не изменяли значения МПК антибактериальных препаратов у всех исследованных штаммов *V. cholerae*.

Следует также отметить, что субингибирующие концентрации не повлияли на чувствительность возбудителя холеры к доксициклину и цефтриаксону.

Таким образом, в проведенном нами исследовании показано, что субингибирующие концентрации метиленового синего, супрастина, протамина сульфата, верапамила, ЭДТА в комбинации с некоторыми антибактериальными препаратами могут оказывать синергидное действие в отношении штаммов *V. cholerae El Tor*. По данным литературы эти препараты способны нарушать проницаемость клеточной стенки, инактивировать ферментные системы бактериальной клетки и синтеза белка и ДНК, элиминировать R-факторы, подавлять эффлюкс-насосы и экспрессию плазмидных генов антибиотикорезистентности в бактериальной клетке. Кроме того, они могут регулировать выработку адгезинов и токсинов, изменять энергетический обмен, рН и мембранный потенциал клетки [1-5, 12, 13].

Подводя итоги вышесказанному, необходимо отметить целесообразность изысканий, разработки и применения соединений, которые бы в субингибирующих концентрациях могли нарушать жизненно важные функции микробной клетки и усиливать бактерицидное действие антимикробных средств.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абдалкин М.Е. Новый универсальный способ преодоления лекарственной устойчивости микроорганизмов // *Фундаментальные исследования*. – 2011. - № 10. – С. 247-250.
2. Шевелёва Н.Е. Антимикробные свойства препаратов – блокаторов H1 – рецепторов гистамина. Автореф. дис... канд. биол. наук. - М., 1991.
3. Терешин И.М. Преодоление лекарственной устойчивости возбудителей инфекционных заболеваний. – Л.: Медицина, 1977. – 184 с.
4. Soboh F., Khoury A.E., Zamboni A.C. et al. Effects of ciprofloxacin and protamine sulfate combinations against catheter-associated *Pseudomonas aeruginosa* biofilms // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 1995. – Vol. 39, № 6. – P. 1281-1286.
5. Yakandawala N., Gawande P.V., Lovetri K., Madhyastha S.J. Effect of ovotransferrin, protamine sulfate and EDTA combination on biofilm formation by catheter-associated bacteria // *Appl Microbiol.* – 2007. – Vol. 102, № 3. – P. 722-727.
6. Бирюкова С.В., Ягнюк Ю.А., Бомко Т.В. и др. Экспериментальные исследования синергидного действия антибиотиков (обзор литературы) // *Annals of Mechnikov Institute.* – 2011. - № 3. – P. 5-10.
7. Aygül A. The importance of efflux systems in antibiotic resistance and efflux pump inhibitors in the management of resistance // *Mikrobiol. Bull.* – 2015. – Vol. 49, № 2. – P. 278-291.
8. Cavaliere R., Ball J. L, Turnbull L., Whitchurch C. B. The biofilm matrix destabilizers, EDTA and DNaseI, enhance the susceptibility of nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms to treatment with ampicillin and ciprofloxacin // *Microbiology Open.* – 2014. – Vol. 3, № 4. – P.557–567.
9. Lebeaux D., Leflon-Guibout V., Ghigo J.M., Beloin C. In vitro activity of gentamicin, vancomycin or amikacin combined with EDTA or L-arginine as lock therapy against a wide spectrum of biofilm-forming clinical strains isolated from catheter-related infections // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2015. – Vol 70, № 6. – P. 1704-1712.
10. Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам: Методические

указания 4.2.2495-09. – М., 2009. – 59 с.

11. Takashi S., Mami T., Tomonobu I. Antifungal activities of tacrolimus and azole agents against the eleven currently accepted malassezia species // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Vol. 43. – P. 2824-2829.

12. Kurnatovski P. Mikostatyczne wlasciwosci lekow o dzialaniu Przeciwhishaminowym // Polski tygodnik lekarski. – 1981. - № 17. – P. 21-24.

13. Boussard P., Devleeschouwer M., Dony J. Influence of protamine on the in vitro sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics // J.Pharm. Acta Helv. – 1994. – Vol. 68, № 3. – P. 161-167.

\*\*\*

## ТРАНСМИССИОННАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОПЛЁНОК *VIBRIO CHOLERAЕ* НА ХИТИНЕ

Симонова И.Р., Головин С.Н., Титова С.В., Половцева В.С.,  
Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.

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

Холерные вибрионы, являясь обитателями водной среды, используют хитин в качестве источника питания и как субстрат для биоплёнкообразования [1].

Одним из главных факторов, влияющих на способность к биоплёнкообразованию у *V. cholerae*, является наличие токсин-корректируемых пилей адгезии (TCP), активирующих способность холерных вибрионов колонизировать поверхности различных субстратов, в частности – хитина. Эту же роль играют маннозо-чувствительный гемагглютинин, хитин-регулируемые пили [2] и два хитин-связывающих белка (36 и 53 кДа) [3].

Для визуализации биоплёнок холерных вибрионов на хитине в настоящее время широко используется сканирующая электронная микроскопия и конфокальная лазерная сканирующая микроскопия [5]. В данной работе впервые была применена трансмиссионная электронная микроскопия для визуализации биоплёнок *V. cholerae* на хитине с целью изучения различий в структурных элементах биоплёнок штаммов холерных вибрионов *tspA*<sup>+</sup> и *tspA*<sup>-</sup>.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

В исследовании использованы культуры холерных вибрионов из коллекции музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: *V. cholerae* O1 El Tor Inaba штамм № 81 *ctxA*<sup>+</sup>,

*tspA*<sup>+</sup> и *V. cholerae* O1 El Tor Ogawa штамм № 278 *ctxA*<sup>-</sup>, *tspA*<sup>-</sup>.

Жизнеспособность микробных клеток определяли методом специфической флюоресценции и путем определения колониеобразующих единиц (КОЕ) из исходной концентрации микробной взвеси  $10^3$  м.к./мл с высевом на плотную питательную среду и подсчетом числа образовавшихся колоний через 24 ч.

Холерные вибрионы культивировали на агаре Мартена, инкубировали 24 ч при 37°C, после чего бактериальную массу суспендировали в стерильном натрий-фосфатном буфере до концентрации  $10^6$  м.к./мл.

В качестве субстрата для образования биоплёнок использовали фрагменты экзоскелета толстопалого речного рака (*Astacus pachypus*). Суспензию *V. cholerae* вносили во флаконы с фрагментами экзоскелета до конечной концентрации  $10^4$  м.к./мл и инкубировали при 28°C в течение 14 суток.

Затем проводили стандартную процедуру пробоподготовки для трансмиссионной электронной микроскопии, включавшую фиксацию фрагментов экзоскелета в 2,5 % растворе глутарового альдегида, постфиксацию и контрастирование 1% раствором тетраоксида осмия ( $OsO_4$ ), обезвоживание в растворах этанола восходящей концентрации (50°, 60°, 70°, 80°, абсолютный этанол), пропитывание эпоксидной смолой, заливку и полимеризацию блоков.

Из полученных блоков с образцами при помощи ультратома изготавливали ультратонкие срезы толщиной 60-70 нм, которые монтировали на медные сеточки и контрастировали в 1 % водном растворе уранилацетата и в 0,3% водном растворе цитрата свинца.

После высушивания образцы исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 («Jeol», Япония) при ускоряющем напряжении 100 кВ. Изображения получали при помощи CCD-камеры Olympus-SIS Veleta с применением программного обеспечения Olympus iTEM TEM Imaging Platform.

## РЕЗУЛЬТАТЫ.

На рис. 1 представлены срезы биоплёнок на хитине *V. cholerae* 81 *ctxA*<sup>+</sup>, *tspA*<sup>+</sup> (2А), и *V. cholerae* 278 *ctxA*<sup>-</sup>, *tspA*<sup>-</sup> (2Б). На поверхности хитина располагается слой межклеточного матрикса, в котором распределены холерные вибрионы. Межклеточный матрикс имеет неоднородную структуру, в его толще встречаются электронноплотные участки. Общий вид биоплёнок показывает их различие в объёме и плотности матрикса и клеточного состава.

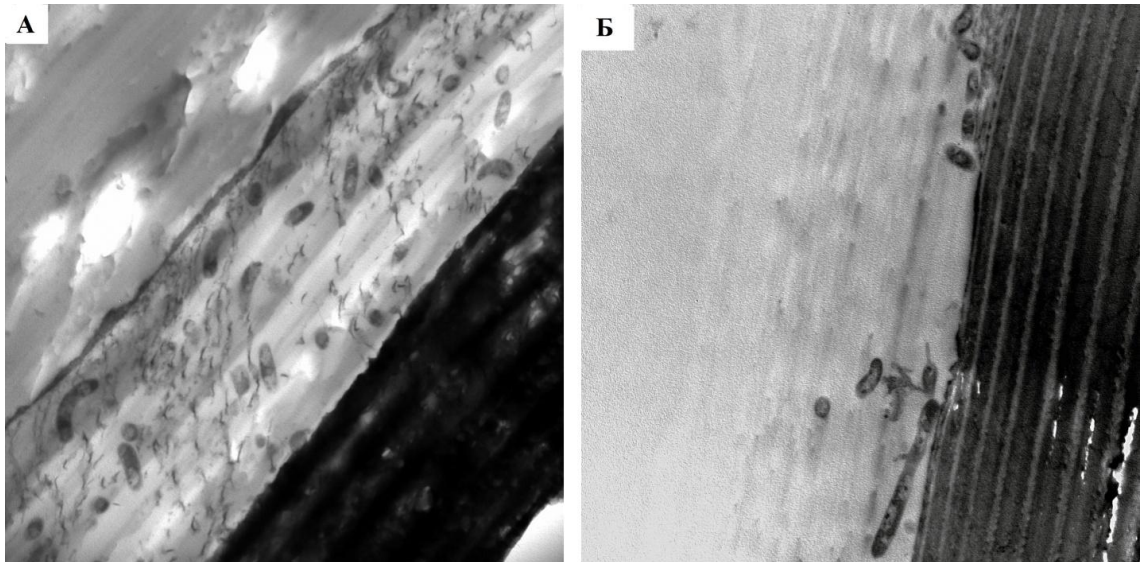


Рисунок 1: А – биоплёнка *V. cholerae* 81 на хитине, увеличение  $\times 10\,000$ , Б – биоплёнка *V. cholerae* 278 на хитине, увеличение  $\times 10\,000$ . ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), уранилацетатом и цитратом свинца.

На рис. 2. показано взаимодействие холерных вибрионов в составе биоплёнки с поверхностью хитинового экзоскелета. Клетки *V. cholerae* 81 (4А) адгезированы к поверхности хитина, целостность которого сохранена. Клетки *V. cholerae* 278 (4Б), активно лизируют хитин, разрушая его структуру.

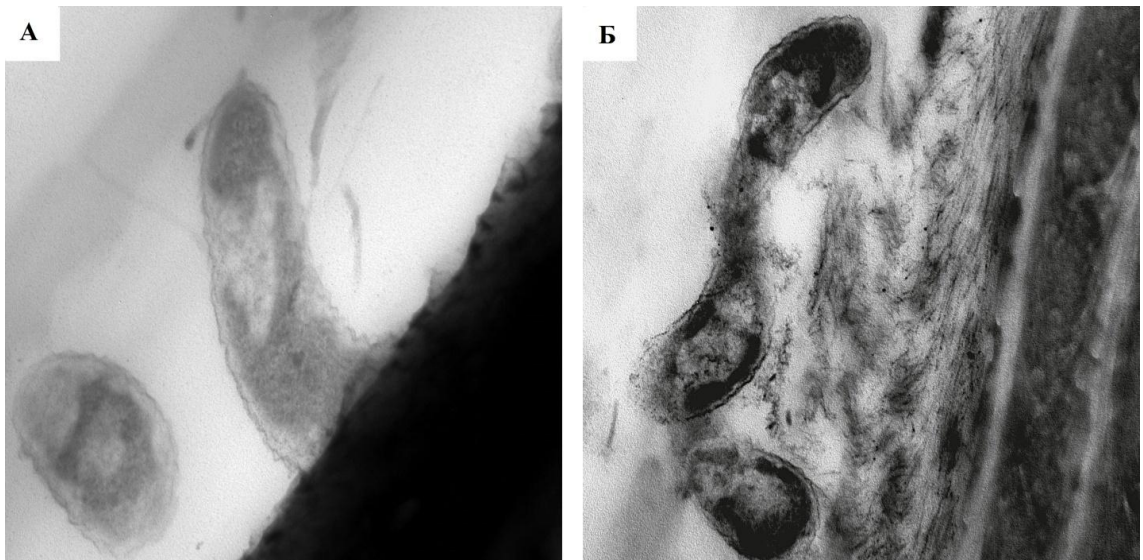


Рисунок 2: А – адгезия *V. cholerae* 81 к поверхности хитинового субстрата, увеличение  $\times 80\,000$ ; Б – деградация хитина *V. cholerae* 278, увеличение  $\times 60\,000$ . ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), уранилацетатом и цитратом свинца.

На рис. 3 представлены результаты измерения толщины биопленки *V. cholerae* 81 *ctxA*<sup>+</sup>, *tspA*<sup>+</sup> (5А), и *V. cholerae* 278 *ctxA*<sup>-</sup>, *tspA*<sup>-</sup> (5Б) при помощи программного обеспечения TEM imaging platform iTEM. Как показывает маркер на рис. 3А, толщина биоплёнки *V. cholerae* 81 составляет 5,6 мкм. На



рис. 3Б маркер показывает толщину биоплёнки *V. cholerae* 278 – 2,3 мкм.

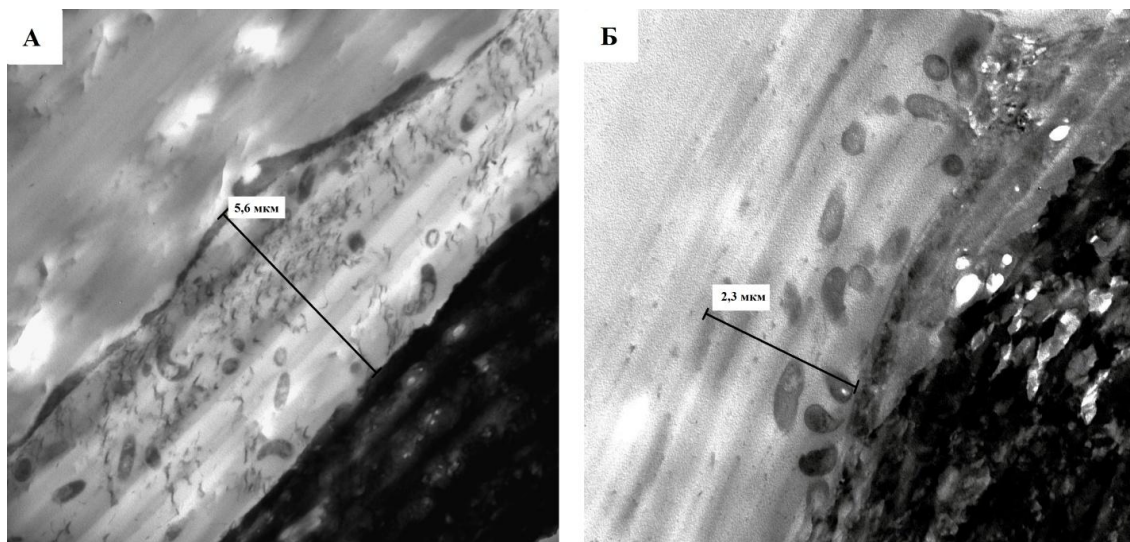


Рисунок 3: А – биоплёнка *V. cholerae* 81 на хитине, маркер показывает толщину биопленки (5,6 мкм), увеличение x10 000, Б – биоплёнка *V. cholerae* 278 на хитине, маркер показывает толщину биопленки (2,3 мкм), увеличение 12 000. ТЭМ, контрастирование тетраоксидом осмия (VIII), уранилацетатом и цитратом свинца.

#### ОБСУЖДЕНИЕ.

Получена серия микрофотографий, отражающих особенности биоплёнкообразования у штаммов *V. cholerae* O1.

Интенсивность биоплёнкообразования у *V. cholerae* 81 *ctxA*<sup>+</sup>, *tspA*<sup>+</sup> выше, чем у *V. cholerae* 278 *ctxA*<sup>-</sup>, *tspA*<sup>-</sup>. Об этом свидетельствует и разница в толщине биоплёнки (5,6 мкм и 2,3 мкм соответственно), а также объём и плотность матрикса, количество клеток в составе биоплёнки.

Активность вибрионов в составе биоплёнок также различна. Если клетки в составе биоплёнки *V. cholerae* 81 располагаются преимущественно одиночно и поверхность хитинового покрова, с которой они контактируют, интактна, то клетки в составе биоплёнки *V. cholerae* 278 образуют цепочки, указывающие на процессы деления, и активно лизируют поверхность хитинового субстрата.

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

Полученные данные подтверждают результаты других работ, показывающие, что холерные вибрионы, имеющие ген *tspA*, обладают большей биоплёнкообразующей способностью, что, в свою очередь, указывает на эпидемическую значимость феномена биоплёнкообразования.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pruzzo C., Vezzulli L., Colwell R.R. Global impact of *Vibrio cholerae* interactions with chitin // *Environ. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 1400-1410.



2. Meibom K.L., Li X.B., Nielsen A.T., Wu C.Y., Roseman S., Schoolnik G.K. The *Vibrio cholerae* chitin utilization program // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2004. – Vol. 101(8). – P. 2524-2529.

3. Kirn T.J., Jude B.A., Taylor R.K. A colonization factor links *Vibrio cholerae* environmental survival and human infection // Nature. – 2005. – Vol. 438, № 7069. – P. 863-866.

4. Meibom K.L., Blokesch M., Dolganov N.A., Wu C.Y., Schoolnik G.K. Chitin induces natural competence in *V. cholerae* // Science. – 2005 – Vol. 310, № 5755. P. 1824-1827.

5. Чеботарь И.В., Погорелов А.Г., Яшин В.А. и др. Современные технологии исследования бактериальных биопленок // Современные технологии в медицине. – 2013: Т.5, № 1. – С. 64-69.

\*\*\*

## **ОБНАРУЖЕНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ ДЕТЕРГЕНТ-УСТОЙЧИВЫХ ПРОТЕАЗ У ШТАММОВ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА O1 И O139 СЕРОГРУПП**

Козлов С.Н., Марков Е.Ю., Николаев В.Б., Миронова Л.В., Урбанович Л.Я.

*ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт  
Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора*

Протеазы (ЕС 3.4) – это большая группа ферментов, осуществляющих гидролиз пептидных связей в молекуле белка, многие из которых принимают участие в метаболических процессах микробной клетки и играют определённую роль в патогенезе заболевания, а также адаптации и персистенции в окружающей среде [1]. У некоторых бактериальных кишечных патогенов обнаружены детергент-устойчивые протеазы [2], роль которых предположительно состоит в инактивации таких неблагоприятных факторов как действие широко распространённых детергентов в поверхностных водоёмах и сточных водах с колебаниями в них рН и осмолярности. Наличие детергент-устойчивых ферментов у бактерий, по-видимому, может служить одним из механизмов их экологической пластичности. Сообщений о существовании таких ферментов у холерного вибриона в доступной литературе нет, однако известно о наличии устойчивых к действию детергентов протеаз у галофильных вибрионов [3].

**Цель работы** – оценить способность протеаз холерного вибриона O1 и O139 серогрупп разной эпидемической значимости сохранять свою активность при применении додецилсульфата натрия (ДСН) в разных концентрациях.

**Материалы и методы.** В работе использовано 10 штаммов *Vibrio*

cholerae O1 и O139 серогрупп, изолированных во время эпидемических вспышек и в благополучный по холере период. Бактерии выращивали на щелочном МПА при 37°C в течение суток. После суточной инкубации культуру смывали физиологическим раствором, определяли концентрацию взвеси и переносили во флаконы с МПБ (рН 7,6) с тем расчётом, чтобы в 1 мл находилось  $2 \times 10^8$  клеток. Через 2 часа содержания при комнатной температуре с целью стерилизации во флаконы с бактериальной взвесью добавляли мертиолят натрия в конечной концентрации 0,01 % и инкубировали их в течение двух суток на холоде. Далее после контроля специфической стерильности проводили центрифугирование материала при 10000 об/мин, супернатант культуральной жидкости (СКЖ) диализовали и лиофильно высушивали. Зимографию проводили с помощью ДСН-электрофореза в блоках 8 % ПААГ, импрегнированного желатином в конечной концентрации 0,1 % [4]. Реакцию радиальной энзимодиффузии проводили в 1 % агарозном геле с 0,5 % желатином. Чувствительность внеклеточных протеаз холерного вибриона к действию ДСН определяли в реакции энзимодиффузии, добавляя детергент в исследуемые образцы в концентрациях от 0,02 % до 10 %, а также в субстратном электрофорезе. О наличии протеолитической активности судили визуально по образованию неокрашенных полос гидролиза на фоне окрашенного субстрата в агарозном и полиакриламидном гелях.

**Результаты.** С помощью энзим-электрофореза в полиакриламидном геле с сополимеризованным желатином установлено, что большинство препаратов СКЖ холерного вибриона O1 и O139 серогрупп обладает протеазной активностью. Относительная молекулярная масса обнаруженных внеклеточных протеаз находится в районе 65–120 кДа. При использовании ДСН в концентрациях 2,5 % и ниже без этапа отмывки гелей от ДСН в растворе Тритона X-100 и последующей инкубации отмечается неизменная картина профиля экстрацеллюлярных протеаз холерного вибриона, что свидетельствует о сохранении процесса протеолиза субстрата во время энзим-электрофореза. Вместе с тем это указывает на наличие у холерного вибриона секретлируемых детергент-устойчивых протеаз. С помощью тестов радиальной энзимодиффузии препаратов СКЖ холерного вибриона обнаружено сохранение протеазной активности при воздействии 0,6 % концентрации ДСН, что также демонстрирует наличие у холерного вибриона детергент-устойчивых экзопротеаз.

**Заключение.** Таким образом, в ходе проведения экспериментов с помощью зимографии удалось обнаружить существование у холерного вибриона O1 и O139 серогрупп экстрацеллюлярных детергент-устойчивых протеаз. Их наличие может служить одним из механизмов формирования высокого адаптационного потенциала холерного вибриона в окружающей среде.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dang, H. Microbial surface colonization and biofilm development in marine environments / H. Dang, C.R. Lovell // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2016. – Vol. 80, N 1. – P. 91–138.
2. Wang, S.L. Two novel surfactant-stable alkaline protease from *Vibrio fluvialis* TKU005 and their applications / S.L. Wang, Y.H. Chio, Y.H. Yen, C.L. Wang // *Enzyme Microb. Technol.* – 2007. – Vol. 40, N 5. – P. 1213–1220.
3. Deane, S.M. Production and activation of SDS resistant alkaline serine exoprotease of *Vibrio alginolyticus* / S.M. Deane, F.T. Robb, D.R. Woods // *J. Gen. Microbiol.* – 1987. – Vol. 133, N 2. – P. 391–398.
4. Heussen, C. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates / C. Heussen, E.B. Dowdle // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 102, N 1. – P. 196–202.

\*\*\*

### **К ВОПРОСУ О МЕТАБОЛИЗИРОВАНИИ И ТРАНСФОРМАЦИИ МИНЕРАЛЬНЫХ УДОБРЕНИЙ НЕКОТОРЫМИ ШТАММАМИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И O139 СЕРОГРУПП**

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Мишанькин Б.Н., Писанов Р.В., Галичева А.Л.  
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ростов-на-Дону*

Регулярное использование человеком в ряде отраслей промышленности и народном хозяйстве различных классов химических веществ, включая минеральные удобрения, ежегодно увеличивает антропогенную нагрузку на различные экосистемы. При этом, вовлекаясь в пищевые цепи, эти вещества не могут не оказывать воздействия на биогеоценоз водных и других экосистем. В настоящее время сконструированы среды, позволяющие оценить способность холерных вибрионов гидролизовать различные поверхностно-активные вещества (ПАВ), а также показана роль ферментов, участвующих в их деструкции и метаболизме. Более того, эти ферменты используют для дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы с различной эпидемической значимостью и выделенных из различных источников [1,4]. Принимая во внимание наличие у холерного вибриона ферментов, участвующих в деструкции ПАВ [1,2,3], постоянно присутствующих в объектах окружающей среды, и в связи с возрастающим антропогенным воздействием, представляет интерес изучение особенностей метаболизма минеральных удобрений холерными вибрионами.

Цель исследования состояла в оценке особенностей метаболизма

некоторых минеральных удобрений штаммами холерных вибрионов разных серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcpA*).

В работе использовали 14 штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп (*ctx+* *tcp+* и  $\Delta$ *ctx* $\Delta$ *tcp*), выделенных из различных источников. Все культуры получены из музея живых культур ФКУЗ Ростовского НИПЧИ, где они находились в лиофилизированном состоянии.

Способность холерных вибрионов метаболизировать минеральные удобрения изучали на плотной среде, которая содержала 2% инстант агара Difco, 0.002% бромтимолового синего и в качестве субстратов азотные минеральные удобрения: сульфат аммония (Merk), карбамид (мочевина (Merk)), хлористый аммоний (Реахим); комплексные - нитрат калия (Serva) и калийные - хлористый калий (Merk) в концентрации 0.25, 0.5 и 0.75%. Посев на поверхность среды осуществляли петлей «пяточками» из агаровой культуры. Чашки инкубировали при 37°C в течение 24 часов -14 суток, периодически просматривая в проходящем свете. При наличии у испытуемых штаммов способности метаболизировать предложенные субстраты вокруг посевов четко просматривались прозрачные зоны различного диаметра.

В результате проведенного исследования с использованием сконструированной минимальной среды обнаружено, что среди исследованных культур как токсигенных, выделенных от людей, так и нетоксигенных, изолированных из объектов окружающей среды, были обнаружены штаммы, которые обладали способностью метаболизировать предложенные субстраты, что выражалось в появлении вокруг макроколоний вибрионов прозрачных зон разного диаметра. Механизм, лежащий в основе этого явления, предстоит изучить. Некоторые штаммы уже через 24 часа инкубации проявляли способность метаболизировать некоторые минеральные удобрения, в то время, как у ряда штаммов такая способность была выявлена спустя 7 и более суток инкубации, что можно объяснить индивидуальными особенностями штаммов. Анализ полученных результатов показал, что штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных из различных источников и с разной эпидемической значимостью (наличие/отсутствие генов *ctxAB* и *tcpA*) обладали способностью метаболизировать широкий спектр минеральных удобрений, включая азотные, калийные и комплексные. Дифференцировать штаммы по этому признаку не удалось.

Возможно, что в определенных условиях минеральные удобрения в результате биотрансформации могут использоваться холерными вибрионами в качестве источника азота, калия и др. химических элементов, обеспечивая им конкурентноспособность и возможность адаптации в различных экологических условиях, особенно в случае антропогенного загрязнения окружающей среды.

Таким образом, с помощью разработанной минимальной

синтетической среды выявлена способность некоторых штаммов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп метаболизировать предложенные субстраты с разной скоростью, что открывает перспективы углублённого исследования этого признака у других вибрионов, а также изучение роли ферментов, участвующих в этом процессе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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.
2. 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.
3. 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.
4. Дуванова, О.В. Способность расщеплять твин 20 как дифференциальный тест для вибрионов O139 серовара различного происхождения/ О.В. Дуванова, Н.Я. Шиманюк, Б.Н. Мишанькин // Клин.лаб. диагностика. - 2000. - №5. - С. 48.

\*\*\*

## АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ *VIBRIO CHOLERAЕ* NON O1/NON O139, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ВОДОЁМОВ

Тришина А.В., Березняк Е.А., Селянская Н.А., Архангельская И.В.,  
Симонова И.Р.

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

Проблема устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП) приобрела особую актуальность за последние 20 лет, снижая эффективность мероприятий по профилактике и лечению инфекционных болезней человека и животных [1, 2]. Микроорганизмы, обнаруживаемые в окружающей среде, имеют большое число разнообразных генов антибиотикорезистентности, а экологические места обитания,

особенно водоемы, реки и озера, являются идеальной средой для передачи этих генов среди бактерий, способствуя глобальному распространению устойчивости к АБП [3].

Холерные вибрионы не O1/не O139 известны как естественные обитатели открытых водоёмов, и как возбудители острых кишечных инфекций различной степени тяжести. Широкое распространение штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, устойчивых к антимикробным соединениям, позволили рассматривать эту группу микроорганизмов как источник ранее не встречавшихся комбинаций генов резистентности для эпидемически значимых серогрупп вибрионов [4, 5]. В последние годы такие микроорганизмы были зарегистрированы в Индии, Китае, Вьетнаме, Индонезии, Марокко, бассейне Карибского моря, Мексике, России [6, 7, 8]. Среди выделенных в 2011–2014 гг. в Ростовской области штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп были как чувствительные, так и штаммы с множественной устойчивостью (от 1 до 6 маркеров) [9].

В геноме холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп обнаружены специализированные мобильные структуры, содержащие гены антибиотикорезистентности, способные передаваться между штаммами. Наличие мобильных генетических элементов и мегаинтегрона создаёт благоприятные условия для успешного горизонтального переноса генов от штамма к штамму и не исключает дальнейшего нарастания числа резистентных микроорганизмов [10, 11, 12].

Цель исследования - оценить изменения чувствительности / устойчивости к АБП штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 в водных объектах г. Ростова-на-Дону в 2016-2017 гг.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь 2016 - 2017 гг. в стационарных точках водоёмов г. Ростова-на-Дону, закрепленными за ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07. Чувствительность к 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.

**РЕЗУЛЬТАТЫ.** Из открытых водоёмов г. Ростова-на-Дону были выделены штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139: в 2016 г. - 196 штаммов, в 2017 г. - 75 изолятов.

Все культуры не содержали генов холерного токсина *ctxA* и токсин-регулируемых пилей *tcrA*, были типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам.

Штаммы, выделенные в процессе мониторинга, были протестированы на чувствительность/устойчивость к противомикробным препаратам. В

результате проделанной работы установлено, что все микроорганизмы обладали устойчивостью к фуразолидону. Доли устойчивых к ко-тримоксазолу и ампициллину изолятов составили 35,2 % и 40 % в 2016 г. и 33,6 % и 28,3 % в 2017 г. соответственно.

Устойчивость холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп к левомицетину и гентамицину в 2016 г. составила 0,5 и 1,5 % соответственно, при отсутствии выделения таких штаммов в следующем году. В 2017 г. возросло число холерных вибрионов, устойчивых к налидиксовой кислоте до 2,6 % против 1 % в 2016 г. Все изолированные из водоёмов города штаммы *V. cholerae* non O1/non O139 показали чувствительность к доксициклину, ципрофлоксацину, цефтриаксону.

Чаще всего в 2016 г. встречались фенотипы: ко-тримоксазол / фуразолидон – 18,8 % и фуразолидон / ампициллин -15,8 %. В 2017 г. доля таких фенотипов возросла до 24,0 % и 28 %, соответственно. Множественной антибиотикорезистентностью (к трем и более препаратам) обладало в 2016 г. – 18,4 %, а в 2017 г. - 17,3 % штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139. К трем АБП часто встречающимся был фенотип ко-тримоксазол / ампициллин / фуразолидон. Такие штаммы в 2016 г. обнаружены в 16,4 %, в 2017 г. - в 13,4 % случаев. В 2016 и 2017 гг. зарегистрированы единичные случаи выделения штаммов *V. cholerae* non O1/non O139 с маркерами устойчивости к четырем АБП.

По результатам исследований зарегистрирована база данных «Фенотипы антибиотикорезистентности холерных вибрионов различных серогрупп, выделенных на территории Ростовской области». Свидетельство о государственной регистрации № 2018620078 от 12 января 2018 г.

Мониторинг резистентности к антибактериальным препаратам представителей *V. cholerae* non O1/non O139 дает возможность своевременно обнаруживать формирование штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bassetti M., Pecori D., Peghi M. Multidrug-resistant Gram-negative Bacteria-Resistant Infections: Epidemiology, Clinical Issues and Therapeutic Options // Italian Journal of Medicine. – 2016. – Vol. 10, № 4. – P. 364-375.
2. Curcio D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections: Are you Ready for the Challenge? // Current Clinical Pharmacology. – 2014. – Vol. 9, № 1. – P. 27 - 38. DOI: 10.2174/15748847113089990062.
3. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н. и др. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие. Антибиотики и химиотерапия. – 2013. - № 5-6. – С. 38-48.

4. Baron S., Larvor E., Chevalier S. et al. Antimicrobial Susceptibility among Urban Wastewater and Wild Shellfish Isolates of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary (Brittany, France) // *Front Microbiol.* – 2017. – Vol. 8. – P. 1637.
5. Rodríguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments // *Antimicrob. Ag. Chemother.* – 2012. – Vol. 56, № 5. – P. 2619-2626.
6. Diep T.T., Nguyen N.T., Nguyen T.N. et al. Isolation of New Delhi metallo- $\beta$ lactamase 1 (NDM-1)-producing non-O1, non-O139 strain carrying *ctxA*, *st*, and *hly* genes in southern Vietnam // *Microbiol Immunol.* – 2015. – Vol. 59, № 5. – P. 262–267. doi: 10.1111/1348-0421.122482015.
7. 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.
8. Shrestha U. T., Adhikari N., Maharjan R. et al. Multidrug resistant *Vibrio cholera* O1 from clinical and environmental samples in Kathmandu city // *BMC Infect Dis.* – 2015. – Vol. 15, № 1. – P. 104.
9. Селянская Н.А., Веркина Л.М., Архангельская И.В. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов неO1/не O139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области в 2011–2014 гг. // *Здоровье населения и среда обитания.* – 2015. – № 7. – С. 33–36.
10. Carraro N., Rivard N., Ceccarelli D. et al. IncA/C Conjugative Plasmids Mobilize a New Family of Multidrug Resistance Islands in Clinical *Vibrio cholerae* Non-O1/Non-O139 Isolates from Haiti // *mBio.* – 2016. – Vol. 7, № 4. – P.509-516. doi: 10.1128.
11. Spagnoletta M., Ceccarelli D., Rieux A. et al. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh pandemic *Vibrio cholerae* lineage // *mBio.* – 2014. – Vol. 5, № 4. – P. 1356-14.
12. Mala W., Faksri K., Samerpitak K. et al. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand // *Infect Genet Evol.* – 2017.

\*\*\*



## ПОВЫШЕНИЕ ЛИТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ХОЛЕРНЫХ БАКТЕРИОФАГОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫХ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ

Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожова М.П., Кочеткова А.О.

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

Продолжающееся широкое географическое распространение седьмой пандемии холеры усиливает интерес исследователей к вопросам оптимизации лабораторной диагностики возбудителя. Определение чувствительности исследуемых культур к специфическим фагам является одним из методов лабораторной диагностики холеры [1, 2, 3, 4], но исследователи столкнулись с фактом возникновения таких форм бактерий, когда при сохранении признаков вида и рода они становились устойчивыми к фагу.

Одной из причин полифагорезистентности, наблюдаемой у культур холерного вибриона, является накопление в популяции под действием одного фага мутантов, лишённых рецепторных зон, к нескольким фагам. Под действием фагов и других факторов у холерного вибриона наблюдается появление нетипирующихся и авирулентных форм, переход одного фаготипа в другой, потеря чувствительности к диагностическому фагу эльтор [5]. Приобретенная фагорезистентность диктует необходимость разработки новых диагностических фаговых препаратов.

Межучрежденческие испытания коммерческого препарата бактериофага эльтор, производства РосНИПЧИ «Микроб» и экспериментальных диагностических бактериофагов, разработанных ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора показали, что ни те, ни другие не обладают 100% литической активностью в отношении холерных вибрионов Эль Тор. Поэтому целью нашей работы было повысить литическую активность диагностических фагов для идентификации холерных вибрионов.

В работе использовано 19 музейных, устойчивых ко всем типам холерных фагов штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, выделенных в 2001-2017 гг. из различных источников.

В опытах были использованы бактериофаги, отобранные в межучрежденческих испытаниях как наиболее перспективные для нового состава диагностического бактериофага эльтор. В исследование взяты экспериментальный бактериофаг El 1 и фаг XV, который входит в состав

коммерческого бактериофага эльтор. Изучение свойств фагов проводили общепринятыми методами [6]. Питательные среды для экспериментов включали бульон и 0,7%, 1,5% агар Мартена (рН 7,6 – 7,8).

Для повышения литической активности фагов, было решено пропассировать их через организм животных, а именно кроликов (2-2,5 кг). Кроликов поили бактериофагами по 1 мл в течение 2 суток, титр фагов составлял  $n \times 10^9$  БОЕ/мл. На третьи сутки из испражнений выделяли фаги методом агаровых слоёв по Грациа на соответствующих индикаторных штаммах, а затем их наносили на испытуемые 19 штаммов. Бактериофаги пассировали на животных дважды.

В результате проведенной работы, после первого пассажа на животных, к фагам из 19 фагоустойчивых холерных штаммов стали чувствительны 10 штаммов (53%). После второго пассажа количество штаммов, которые лизировались бактериофагами возросло до 13 (69 %).

Таким образом, анализ полученных результатов показал, что литическую активность холерных бактериофагов, перспективных для создания нового диагностического коктейля, можно значительно увеличить. В настоящее время работа по поиску новых способов увеличения литической активности холерных бактериофагов продолжается.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Быстрый, Н.Ф. Метод дифференциации вирулентных и авирулентных вибрионов с помощью специфических бактериофагов / Н.Ф. Быстрый, В.Т. Середин, Н.В. Урюпина и др. // Пробл. особо опасн. инф. – 1970. – Вып.1. – С. 141-146.
2. Дрожжевкина, М.С. Типирование холерных вибрионов новым набором фагов / М.С. Дрожжевкина, Ю.И. Арутюнов // Журн. гигиены, эпидемиол., микробиол. и иммунобиол. – Прага, 1979. – Т.23, №3. – С. 306-312.
3. Коровкина, Г.И. К разработке фагового метода дифференциации эпидемических ( $ctx^+$ ) и неэпидемических ( $ctx^-$ ) вибрионов эльтор / Г.И. Коровкина, В.П. Мороз, Г.И. Грижебовский // Микробиол., лаб. диагн. и спец. проф. карант. инф. – Саратов, 1989. – С. 132-136.
4. Актуальные проблемы холеры. / Под ред. академика РАМН, проф. В.И. Покровского и чл.-корр. РАМН Г.Г. Онищенко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. – 384 с.
5. Овчинникова, М.М. Изучение некоторых причин фагорезистентности эпидемических неопасных штаммов *V. cholerae* eltor к бактериофагу диагностическому холерному  $ctx^-$  / М.М. Овчинникова, Т.В. Аленкина, Г.И. Коровкина, И.В. Грачева // Холера и патогенные для человека вибрионы. – Ростов-на-Дону, 2010. – С. 62-66.

6. Адамс М. Бактериофаги: Пер. с англ. – М., 1961. – 522 с.

\*\*\*

## **ИЗУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ УСЛОВНО-ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ В ВОДОЁМАХ ГОРОДА РОСТОВА-НА-ДОНУ**

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

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

Чрезмерное использование противомикробных средств для лечения как человека, так и животных вызвало накопление в природе этих соединений. Микроорганизмы с множественной лекарственной устойчивостью циркулируют в окружающей среде, указывая на то, что резервуары резистентных к антибиотикам бактерий присутствуют вне медицинских учреждений [1, 2]. Это является серьёзной проблемой, которая подрывает усилия по борьбе с инфекционными заболеваниями [3]. Среда обитания играет важную роль в селекции и передаче маркеров антибиотикорезистентности среди микроорганизмов, приводя к преобладанию устойчивых бактерий и глобальному нарушению экосистемы [4, 5].

Исследования распространенности в водоёмах микроорганизмов, обладающих множественной антибиотикорезистентностью, проводят в России и других странах мира [6, 7, 8]. Нарастающая антибиотикорезистентность микроорганизмов, обитающих в окружающей среде, требует проведения комплексных исследований и расширения сотрудничества и обмена информацией.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ.** Изучение и анализ распространенности в водоёмах г. Ростова-на-Дону резистентных к антибактериальным препаратам (АБП) условно-патогенных микроорганизмов (УПМ) для оценки масштаба биологической угрозы распространения антибиотикорезистентных штаммов.

**МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.** Отбор проб проводили ежемесячно с мая по сентябрь в 2016 - 17 гг. в водоёмах г. Ростова-на-Дону.

Для определения родовой и видовой принадлежности УПМ использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper.

Чувствительность к АБП определяли методом серийных разведений на Mueller-Hinton агаре (Hi-MEDIA, Индия). Использовали препараты: ампициллин, цефтриаксон, цефепим, цефоперазон/сульбактам, имипенем, меропенем, налидиксовая кислота, ципрофлоксацин, фурагин, гентамицин, доксициклин, левомицетин, ко-тримоксазол.

**РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.** В результате мониторинга в 2016 г. выделено 509, а в 2017 г. - 1013 штаммов УПМ, идентифицирован 101 вид микроорганизмов.

Анализ частоты выделения различных микроорганизмов показал, что в 2016 г. доля неферментирующих микроорганизмов (НФМ) в нашем исследовании составила 45,9 % от всех выделенных штаммов. Бактерии семейства *Enterobacteriaceae* выделяли в 28,6 % случаев, *Aeromonadaceae* - 24,9 %.

В 2017 г. доминировали представители семейства *Aeromonadaceae* (39,1 %) и *Enterobacteriaceae* (37,5 %), доля НФМ составила 23,0 %.

Все микроорганизмы были проанализированы на чувствительность/устойчивость к АБП. Чувствительными ко всем АБП в группе НФМ в 2016 г. были 35,5 % штаммов, монорезистентными - 43,2 % (табл. 1). В 2017 году наблюдалось значительное снижение доли чувствительных штаммов (до 12,9 %) и монорезистентных штаммов (до 26,3 %). При этом доля полирезистентных штаммов выросла за год более чем в четыре раза: с 9,4 % до 39,5% соответственно.

Таблица 1. Чувствительность к АБП доминирующих групп микроорганизмов (%).

	НФМ		Энтеробактерии		Аэромонады	
	2016 г.	2017 г.	2016 г.	2017 г.	2016 г.	2017 г.
Чувствительные	35,5 %	12,9 %	0	0,5 %	0,8 %	0,3 %
Монорезистентные	43,2 %	26,3 %	9,6 %	2,6 %	8,9 %	5,3 %
Полирезистентные	9,4 %	39,6 %	79,5%	79,5 %	72,6 %	81,8 %
Всего	234	232	146	381	127	396

В группе энтеробактерий и аэромонад (табл. 1) монорезистентных штаммов в 2017 году также стало меньше. Доля микроорганизмов, устойчивых к трём и более АБП среди энтеробактерий, осталась на том же уровне, среди аэромонад выросла с 72,6 % до 81,8 % по сравнению с 2016 г.

На протяжении двух лет сохранялся высокий уровень устойчивости энтеробактерий и аэромонад к ампициллину, ко-тримоксазолу, налидиксовой кислоте.

Следует отметить, что по сравнению с 2016 г. почти в пять раз выросло число штаммов, резистентных к меропенему (с 1,8 % до 8,2 %) и цефепиму (с 0,7 % до 3,7 %). Еще более изменилась частота встречаемости микроорганизмов, резистентных к имипенему - с 3,6 % до 27,5 %.

**Выводы.** В процессе проведенного мониторинга изучен широкий спектр условно-патогенных микроорганизмов, циркулирующих в водоёмах

города. Показано, что снизилась доля чувствительных и монорезистентных бактерий и возросло число штаммов с множественной антибиотикорезистентностью. Таким образом, природные резервуары устойчивых к АБП микроорганизмов необходимо рассматривать как возможные источники угрозы биологической безопасности.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wellington, E.M. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria / Wellington E.M., Boxall A.B., Cross P. et al. // *Lancet Infect Dis.* - 2013. - №13. - P.155-165.
2. Roca, I. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention / Roca I., Akova M., F. Baquero et al. // *New Microbes and New Infections.* - 2015. – Vol. 6. – P. 22 - 29.
3. Bassetti, M. The management of multi-drug resistant Enterobacteriaceae / Bassetti M., Pecori D., Peghin M. // *Curr. Opin. Infect. Dis.* - 2016. - Vol. 29. - P. 583-594.
4. Lupo, A. Origin and evolution of antibiotic resistance: the common mechanisms of emergence and spread in water bodies / Lupo A., Coyne S., Berendonk T. U. // *Front. Microbiol.* - 2012. - Vol. 3. - P. 1-13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00018>
5. Vaz-Moreira, I. Bacterial diversity and antibiotic resistance in water habitats: searching the links with the human microbiome Federation of European Microbiological Societies / Vaz-Moreira I., Nunes O.C., Manaia C.M. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2014. - № 38 (4). - P. 761-778.
6. Журавлёв, П.В. Антибиотикорезистентность бактерий, выделенных из воды открытых водоёмов / Журавлёв П.В., Панасовец О.П., Алешня В.В. и др. // *ЗНиСО.* - 2015. - № 5(266). - С. 24-26.
7. Cantas, L. A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota / Cantas L., Syed Q.A., Cavaco L.M. et al. // *Front. Microbiol.* - 2013. – Vol.4. - P.1- 14.
8. Narciso-da-Rocha C. Multidrug resistance phenotypes are widespread over different bacterial taxonomic groups thriving in surface water / Narciso-da-Rocha C, Manaia C.M. // *Science of The Total Environment.* - 2016. - Vol. 563-564. - P. 1-9.

\*\*\*

## **КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ И КАЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИКРОБИОЦЕНОЗА ВОДОЁМОВ Г. РОСТОВА-НА-ДОНУ В ТЕЧЕНИЕ ГОДА**

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

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

Город Ростов-на-Дону является административным центром Ростовской области и Южного федерального округа, где проводятся множество массовых мероприятий (форумы, конференции, симпозиумы, выставки), в том числе с международным участием. Поверхностные водоёмы города подвергаются воздействию множества абиотических и биотических факторов. Кроме того, геофизические исследования отмечают климатические изменения в регионе, в частности, мягкие малоснежные зимы, рост температуры в весенне-осенний период и снижение количества осадков, которые могут оказать благоприятный эффект на развитие патогенной микрофлоры [1,2].

Целью работы явилось изучение влияния сезонных колебаний температуры на видовой состав микробиоценоза природных водоёмов г. Ростова-на-Дону (2017-2018 гг.).

В работе использовали данные мониторинговых исследований проб воды в двух стационарных точках г. Ростова-на-Дону: река (р.) Дон (правый берег, Державинский спуск) и река (р.) Темерник (Ботанический сад у моста) места сброса аварийных стоков и неорганизованного водопользования, с мая 2017 г. по май 2018 г. В весенне-осенний период забор проб проводили один раз в две недели, зимой и ранней весной - один раз в сезон. Температуру воды измеряли непосредственно перед забором проб в водоёме. Выделение и идентификацию микроорганизмов проводили в соответствии с действующими нормативными документами [3-5]. Для родовой и видовой идентификации выделенных микроорганизмов использовали программно-аппаратный комплекс MALDI Biotyper [6, 7]. Серологическую идентификацию изолированных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 проводили с помощью набора сывороток диагностических холерных неO1/неO139 серогрупп моноспецифических кроличьих против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп в реакции слайд – агглютинации [6, 7].

В ходе проведения мониторинговых исследований микробиоценоза воды поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону за изучаемый период было выделено и идентифицировано 20 родов и 36 видов микроорганизмов. Анализ полученных данных показал, что микробиоценоз исследуемых

водоёмов значительно изменялся в зависимости от сезона и температуры воды. Стоит отметить, что в весенне-летний период 2017 г. погода была нехарактерной для нашего региона, а именно: в мае и июне шли ливневые дожди, кроме того, средняя температура в реках Дон и Темерник колебалась от 15<sup>0</sup> С до 21<sup>0</sup> С и от 16<sup>0</sup> С до 23<sup>0</sup> С, соответственно. Общее микробное число (ОМЧ) также зависело от температуры воды и менялось в реке Дон от максимальных значений - 3000 м.к./мл при температуре воды от 21<sup>0</sup> С (июль 2017 г.) до минимальных – 135 м.к./мл при 4<sup>0</sup> С (март 2018 г.). Общее представление о количественном соотношении между температурой воды и ОМЧ в пробах воды р. Дон (2017-2018 гг.), на территории города иллюстрирует рисунок 1, на котором видна убывающая линия тренда, т.е. тенденция пропорционального снижения температуры воды и ОМЧ.

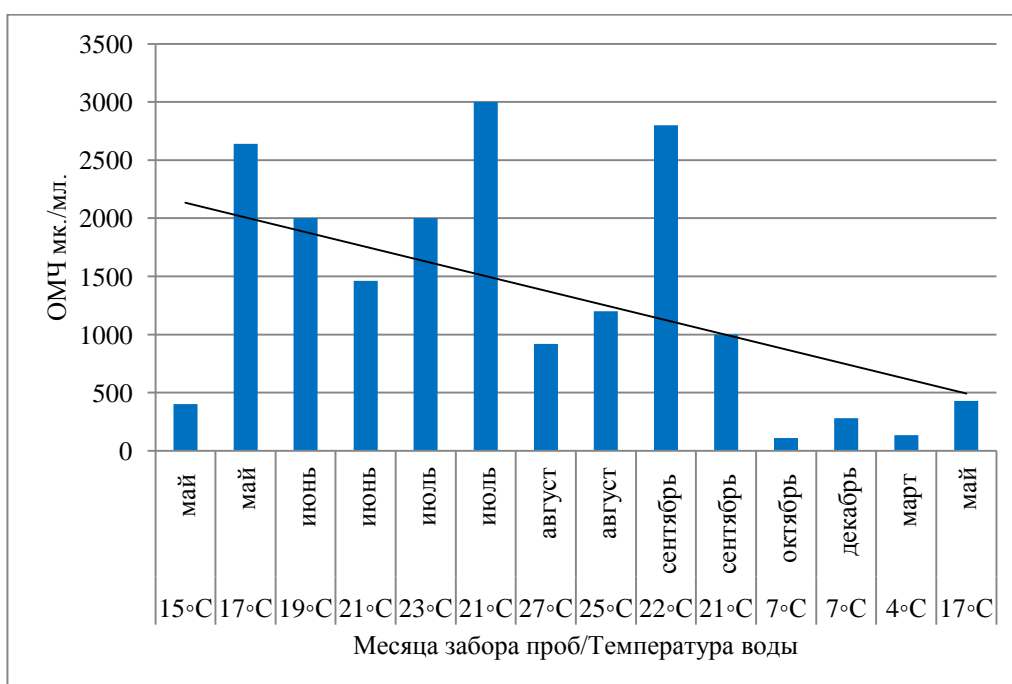


Рисунок 1. Динамика определения ОМЧ в стационарной точке – р. Дон, правый берег, Державинский спуск (2017-2018 гг.).

В р. Темерник минимальное количество микробных клеток (120 мк/мл) выявлено в октябре 2017 г., при этом, температура воды составила 8<sup>0</sup> С, а максимальное (3200 мк/мл) – в сентябре этого же года при температуре – 21<sup>0</sup> С. Что касается количественного соотношения между ОМЧ и температурой воды в стационарной точке, то нами отмечена убывающая линия тренда, которая аналогична общему представлению, сложившемуся при анализе температуры и микробной обсеменённости реки Дон (стационарная точка).

В процессе проведения дальнейшего анализа нами были определены представители доминирующих микроорганизмов. Так, при температуре воды от 16 до 19<sup>0</sup> С (май 2017 г.) в пробах воды р. Дон преобладали представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* – 41,0%) и *Bacillaceae* (*Exiguobacterium aurantiacum* – 31,8%), что, по нашему мнению, было связано

с ливневыми дождями и несанкционированным сбросом сточных вод. В этот же период в р. Темерник также преобладали представители семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli* – 40%). Установлено, что при повышении температуры воды до 20<sup>0</sup> С в обоих водоёмах доминировал род *Aeromonas* (от 50% до 76% от ОМЧ в пробах). Стоит подчеркнуть, что в таких климатических условиях не выделяли штаммы *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 из исследуемых точек.

Однако, при повышении температуры воды от 23 до 27<sup>0</sup> С в июле 2017 г. произошла смена доминирующих видов бактериального сообщества, при этом процентная составляющая представителей рода *Aeromonas* составила менее 50%. Обнаружено, что в августе доминировал род *Acinetobacter*, в это же время из исследуемых точек параллельно выделяли штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139. Штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139, изолированные в ходе мониторинга из водных объектов г. Ростова-на-Дону, не содержали в своем геноме *ctxAB* и *tcpA*. При проведении серотипирования выделенных штаммов холерных вибрионов неO1/неO139 серогрупп установлено, что в данных стационарных точках в 2017 г. циркулировали представители шести серогрупп: O6, O16, O24, O34, O41 и O76, среди которых преобладали вибрионы O76 серогруппы.

Понижение температуры воды исследуемых рек до 19<sup>0</sup> С в сентябре 2017 г. привело к очередной смене микробиоценоза в сторону доминирования микроорганизмов рода *Aeromonas*, при этом штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139 продолжали выделяться из исследуемых проб. При дальнейшем снижении температуры воды до 16<sup>0</sup> С – в сентябре, до 7-8<sup>0</sup> С – в октябре, до 7<sup>0</sup> С – в декабре и до 4-5<sup>0</sup> С – в марте в пробах воды по-прежнему преобладали представители рода *Aeromonas* (65% и 88% от ОМЧ, соответственно). Вместе с тем, результаты исследования проб воды из вышеуказанных водоёмов на наличие холерных вибрионов были отрицательны.

Таким образом, выявлена зависимость видового состава микробиоценоза поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону от температуры воды, сезонные изменения которой влияют не только на количественный и качественный состав бактериопланктона, но и на взаимоотношения в межмикробных ассоциациях.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Инвестиционный паспорт города Ростов-на-Дону. – Союз «Торгово-промышленная палата Ростовской области». Департамента экономики города Ростова-на-Дону. – 203 с.
2. Панов, В.Д. Климат Ростовской области: вчера, сегодня, завтра / В.Д. Панов, П.М. Лурье, Ю.А. Ларионов. – Ростов-на-Дону, 2006 – 488с.
3. Санитарно-микробиологический и санитарно-



паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов: Методические указания МУК 4.2.1884-04: – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 89 с.

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

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

6. Балахонов, С.В. MALDI-TOF масс-спектрометрическое определение видовой принадлежности патогенов в совершенствовании эпидемиологического надзора за опасными инфекционными болезнями / С.В. Балахонов, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, Е.С. Куликалова, А.С. Остяк // Бактериология. – 2016. – Т. 1, № 1. – С. 88–95.

7. Авдеева, Е.П. Совершенствование метода серологической идентификации холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп: Автореф. Дисс. ... канд. мед. наук: 03.00.07 / Авдеева Елена Петровна. – Ростов-на-Дону, 2006. – 22 с.

\*\*\*

## **К ВОПРОСУ ПРИМЕНЕНИЯ МОЮЩИХ СРЕДСТВ В КАЧЕСТВЕ ПОВЕРХНОСТНО - АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ К РАБОЧИМ РАСТВОРАМ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА ПРИ ПРОВЕДЕНИИ РАБОТ С ВОЗБУДИТЕЛЕМ ХОЛЕРЫ И ПАТОГЕННЫМИ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНАМИ**

Чекан Л.В., Тюрин Е.А., Храмов М.В.

*ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, п. Оболенск, Россия.*

Холера является карантинной инфекцией и по отечественной классификации возбудитель (*Vibrio cholerae*) относится ко второй группе патогенности (опасности) [1]. В соответствии с положениями нормативных документов [1] все работы (диагностические, экспериментальные, коллекционные) с данным возбудителем необходимо проводить в соответствии с требованиями биобезопасности и соблюдением правил режима дезинфекции. Универсальным дезинфицирующим средством при проведении работ с патогенными биологическими агентами (ПБА) I-II групп бактериальной природы является перекись водорода [1-7]. Для эффективного использования к рабочему раствору дезинфектанта (3,0 %) рекомендовано

добавлять поверхностно - активные вещества (0,5 % ПАВ) - различные моющие средства [1, 5, 8, 9]. В санитарно-эпидемиологических правилах рекомендовано использовать в качестве ПАВ моющие средства: «Прогресс», «Новость», «Лотос», «Астра» [1]. Однако производимые на сегодняшний день моющие средства имеют более сложный состав, включающий анионные и неионные ПАВ, добавки солей, соду, силикат натрия, фосфаты или цеолиты, отбеливатели, энзимы, отдушки и цветные добавки. Мониторинг применения рабочих растворов перекиси водорода в подразделениях ФБУН ГНЦ ПМБ при проведении работ с ПБА I-II групп, в том числе и с возбудителем холеры, показал, что использование некоторых современных ПАВ влияет на концентрацию рабочих растворов перекиси водорода, снижая её, что является актуальным.

**Цель работы.** Целью работы являлась оценка влияния современных ПАВ, добавляемых в рабочие растворы перекиси водорода, применяемых в коллекционной работе, с учетом температурного и временного факторов.

**Материалы и методы.** Использовали концентрации рабочих растворов (3,0 %), полученных из исходной концентрации 37,8 % маточного раствора перекиси водорода медицинской (по сертификату изготовителя), путем разведения его водопроводной водой до рабочей концентрации [1, 8]. Концентрацию рабочего раствора определяли колориметрическим перманганатным методом по ГОСТ 177 88 и выражали в процентах [10]. Также использовали индикаторные колориметрические полоски «Дезиконт Перекись Водорода» производства фирмы «ВИНАР», согласно инструкции изготовителя, на соответствие по прилагаемой цветовой шкале [11].

В качестве поверхностно - активной добавки использовали коммерческие моющие средства: сухие препараты порошков «Пемос» и «Сульфонол НП 1», а также жидкий препарат «Детергент 7X». В качестве контрольных образцов использовали рабочие растворы перекиси водорода в тех же концентрациях, но без добавления ПАВ.

Из свежеприготовленных опытных и контрольных рабочих растворов перекиси водорода отбирали образцы в объеме 100,0 мл соответственно. Отобранные образцы помещали в термостаты «ТС-80», при температуре плюс 18<sup>0</sup>С, плюс 24<sup>0</sup>С и плюс 30<sup>0</sup>С, что позволяло моделировать возможные колебания температурных условий. Спустя 2, 4 и 18 часов определяли конечную концентрацию опытных и контрольных образцов дезинфектантов указанными выше методами.

Для получения статистически достоверных результатов все эксперименты были проведены в пяти повторениях. Статистический анализ осуществлялся с помощью программы MS Excel на персональном однопроцессорном компьютере АСРІ с операционной системой Professional.

**Результаты и обсуждение.** Результаты исследований показали, что во всех исходных опытных и контрольных образцах концентрации рабочих растворов перекиси водорода соответствовали нормативным данным.

Концентрации рабочих растворов перекиси водорода и в контрольных образцах спустя 2 часа при температуре воздуха плюс 18<sup>0</sup>С и плюс 24<sup>0</sup>С, а также спустя 4 часа при плюс 18<sup>0</sup>С не изменились.

Снижение концентрации в рабочих растворах перекиси водорода отмечалось при использовании моющего средства «Пемос». Так, при температуре плюс 24<sup>0</sup>С значительное снижение отмечали уже через 4 часа (2,6 %, от начальной 3,0 %), а при плюс 30<sup>0</sup>С – через 2 часа (2,5 % от начальной 3,0 %). При 18-часовой экспозиции во всех опытных образцах отмечалось резкое снижение концентрации рабочих растворов перекиси водорода (1,1-1,7 %, от начальной 3,0 %). Вероятно, это связано с тем, что в состав средства «Пемос» входят энзимы и химический отбеливатель. Однако для того чтобы точно установить причины данного явления, необходимы специальные исследования в специализированной лаборатории. Вместе с тем, видно, что средство «Пемос» и, соответственно, препараты подобные ему по составу не рекомендуется использовать в качестве ПАВ для приготовления рабочих растворов перекиси водорода.

При проведении исследований по применению средства «Сульфонол НП 1» было установлено, что концентрации рабочих растворов перекиси водорода также снижались, но не так резко, как при добавлении препарата «Пемос». Так, при температурах плюс 18<sup>0</sup>С и плюс 24<sup>0</sup>С при экспозиции 2 часа концентрация раствора дезинфектанта практически оставалась на исходном уровне (2,9-3,0 % от начальной 3,0 %). Снижение концентрации раствора дезинфектанта отмечали при 4-х и 18-ти часовой экспозициях при температуре воздуха плюс 30<sup>0</sup>С (2,7 % от начальной 3,0 %), что позволяет использовать моющее средство «Сульфонол НП 1» в качестве ПАВ, но только при температурном диапазоне от плюс 18<sup>0</sup>С до плюс 24<sup>0</sup>С и в течение не более 4-х часов при проведении перепроверки концентрации рабочего раствора, используемого для работы с ПБА.

При использовании препарата «Детергент 7Х» было показано, что концентрации рабочих растворов перекиси водорода практически не изменялись в течение 18-ти часов (2,9 - 3,0 % от начальной 3,0 %). Незначительные отклонения от исходной концентрации наблюдали в отдельных сериях экспериментов, которые были в рамках статистической погрешности.

### **Выводы:**

Препарат «Пемос» снижает концентрации рабочих растворов перекиси водорода, которые усиливаются при повышении температуры. Данный препарат и аналогичные ему моющие средства не рекомендуется применять в качестве ПАВ для приготовления рабочих растворов перекисных соединений в микробиологических лабораториях.

Препарат «Сульфонол НП 1» умеренно снижает концентрации рабочих растворов перекиси водорода. Применение таких препаратов возможно при комнатных температурах (плюс 18<sup>0</sup>С - 24<sup>0</sup>С) в течение не более 4 часов.

Препарат «Детергент 7Х» не оказывает отрицательного влияния на динамику снижения концентрации рабочих растворов перекиси водорода и может быть рекомендован для использования в качестве ПАВ.

Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила СП 1.3.3118-13. - М.: 2014. - 195 с.
2. Санитарно-эпидемиологические требования к организациям, осуществляющим медицинскую деятельность: СанПиН 2.1.3.2630-10. - М., 2010. - 255 с.
3. Методические указания по дезинфекции, предстерилизационной очистке и стерилизации изделий медицинского назначения: МУ-287-113. - М., 1998. - 67 с.
4. Эпидемиологические и дезинфектологические обоснования рационального выбора методов, средств и режимов дезинфекции и стерилизации в лечебно-профилактических учреждениях: Рекомендации для медицинских работников. - М.: ООО «Типография Момент», 2006. - 39 с.
5. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности: ГОСТ 12.1.007-76. - М., 1976. - 6 с.
6. Панкратова Г.П. Токсичность и безопасность применения дезинфицирующих средств // Глав. мед. сестра. - 2007. - № 3. - С. 83-87.
7. Панкратова Г.П., Мальцева М.М., Новикова Э.А. К вопросу о безопасности применения дезинфицирующих средств в лечебно-профилактических учреждениях // Санитарно-эпидемиологическая безопасность России: актуальность проблемы, методы и средства для ее решения: Тез. докл. науч.- практ. конф. – Казань, 2006. - С. 50-54.
8. Приготовление растворов перекиси водорода с моющими средствами: МУ 42-51-7-93. - М., 1993.
9. Соколова Л.Ф., Арефьева Л.И., Пархач М.Е., Стабилизация водных растворов пероксида водорода // Фармация. - 1987. - № 4. – С. 74-76.
10. Перекись водорода: ГОСТ 177-88. - М., 1966. - 4 с.
11. Применение индикаторных полосок Дезиконт Перекись водорода для экспресс контроля концентраций рабочих растворов дезинфицирующего средства Перекись Водорода». ТУ 9398-038-1176404-2003. НПФ «ВИНАР», рег. уд-е. ФСР 20008/0295.

\*\*\*

**ОРГАНИЗАЦИЯ КОНСУЛЬТАТИВНЫХ СЕМИНАРОВ  
ПО ВОПРОСАМ БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ  
В ПЕРИОД ПОДГОТОВКИ К ПРОВЕДЕНИЮ МАССОВОГО  
МЕЖДУНАРОДНОГО МЕРОПРИЯТИЯ, НА ПРИМЕРЕ  
ЧЕМПИОНАТА МИРА ПО ФУТБОЛУ 2018  
В ГОРОДЕ РОСТОВЕ-НА-ДОНУ**

Пичурина Н.Л., Бурлакова О.С., Водяницкая С.Ю., Сизова Ю.В.,  
Сокольская О.А., Чемисова О.С., Титова С.В.

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

Южная столица России – город Ростов-на-Дону – один из 11 субъектов Российской Федерации задействованных в организации и проведении игр Чемпионата мира по футболу. Это не только высокая честь, но и огромная ответственность, связанная с перемещением значительных контингентов участников и гостей, сопряженная с рисками заноса инфекционных болезней, в том числе особо опасных. Во время проведения массовых спортивных мероприятий также необходимо учитывать угрозы активизации природных очагов инфекций из числа нозологических форм краевой патологии.

Целенаправленный и эффективный комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и биологической безопасности во время подготовки и проведения массовых мероприятий требует высокого уровня профессиональной компетенции специалистов различных ведомств. Эта задача была определена и поставлена Руководителями Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека [1], Управления Роспотребнадзора по Ростовской области и оперативно решена во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. [2]

Ведущими специалистами института, в рамках законодательных, актуальных нормативно-правовых документов, с учётом внешних и внутренних рисков региона, в соответствии с профилем слушателей целевых аудиторий, были разработаны Программы консультативных семинаров, которые согласованы с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области, Министерством здравоохранения Ростовской области, обсуждены на Ученом Совете и утверждены директором института.

С учётом профессиональной компетенции и функциональных обязанностей специалистов проведены следующие семинары:

- для сотрудников учреждений Роспотребнадзора по Ростовской области: «Вопросы биологической безопасности при работе с возбудителями

1-2 групп патогенности. Эпидемиология и профилактика туляремии, сибирской язвы и другой актуальной природно-очаговой краевой патологии»;

- для специалистов лечебно-профилактических организаций (эпидемиологи, инфекционисты, терапевты и врачи других специальностей, а также медицинские сестры с высшим образованием): «Организация и обеспечение противоэпидемической готовности к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения особо опасных инфекций при проведении массовых мероприятий»;

- для медицинского персонала сети лечебных учреждений РЖД-Медицина: «Организация и обеспечение противоэпидемической готовности к проведению мероприятий в случае выявления больного, подозрительного на заболевание инфекционными болезнями, вызывающими чрезвычайные ситуации в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения среди пассажиров на железнодорожном транспорте»;

- для врачей и биологов лабораторной сети медицинских организаций: «Организация лабораторной диагностики инфекционных болезней, лабораторного контроля объектов окружающей среды при проведении массовых мероприятий»;

- для медицинского персонала модульного инфекционного блока МБУЗ «Городская больница № 1 им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону: «Биологическая безопасность работ при выявлении больного / подозрительного на заболевание инфекционными болезнями, вызванными ПБА неустановленного систематического положения»;

- для энтомологов, паразитологов и зоологов учреждений Роспотребнадзора по Ростовской области: «Кровососущие членистоногие – переносчики возбудителей опасных инфекций»;

- для специалистов учреждений Роспотребнадзора по Ростовской области: «Основы работы с геоинформационным порталом (ГИС-порталом) ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора».

Всего за период подготовки к Чемпионату проведено 16 семинаров (в том числе выездных и в формате видеоконференции), с общим числом слушателей 516. Из них специалистов Роспотребнадзора и Министерства здравоохранения Ростовской области 76 и 440, соответственно.

Каждый семинар состоял из теоретического и практического модулей. Теоретическая часть включала вопросы биологической безопасности, изучение актуальных нормативных документов в соответствии с профилем специальности и задачами, выполняемыми специалистами в период подготовки и проведения Чемпионата мира по футболу. Вопросы эпидемиологии и клиники актуальных инфекционных болезней рассматривали с позиций оценки внешних и внутренних рисков, с учетом синдромного подхода и элементов эпидемиологической диагностики. [3]

В модуле практической части особое внимание специалистов было направлено на средства индивидуальной защиты (СИЗ) и использование костюмов различных типов («Tuchem», «Кварц» и их аналогов), надевание / снятие СИЗ, отбор, упаковку и транспортировку биологического материала для исследования, обеззараживание медицинских отходов класса В и их утилизацию.

В результате освоения программ консультативных семинаров слушатели ознакомились с актуальной нормативно-правовой и нормативно-методической документацией; получили знания по обеспечению готовности к экстренному реагированию на случай возникновения чрезвычайной ситуации в период проведения массового мероприятия; приобрели практические навыки использования современных СИЗ при проведении разного вида работ с патогенными биологическими агентами неустановленного систематического положения.

Таким образом, проведение консультативных семинаров для целевых аудиторий, с учетом функциональных обязанностей обучаемых – важное направление в структуре мероприятий по подготовке к Чемпионату мира по футболу, позволяющее повысить профессиональный уровень кадров для своевременного и рационального принятия решений в своей сфере деятельности.

По нашему мнению, обучение специалистов в формате, разработанном во ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт, является необходимым элементом подготовки к массовым мероприятиям с международным участием.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Письмо Руководителя Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 08.06.2016 № 01/7235-16-27 «О координации деятельности в период подготовки и проведения Чемпионата мира по футболу».
2. Протокол от 26.06.2017 №3 рабочего совещания оперативного штаба Управления Роспотребнадзора по Ростовской области по обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия и защиты прав потребителей в период подготовки и проведения Чемпионата мира по футболу, FIFA 2018 в г. Ростове-на-Дону.
3. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Топорков В.П. и др. Современные угрозы и вызовы в области биологической безопасности и стратегия противодействия / Проблемы особо опасных инфекций. - 2015. - Вып. 3. - С. 5-9.

\*\*\*

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ГАЗОВОЙ ХРОМАТО-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ ЖИРНЫХ КИСЛОТ ДЛЯ АНАЛИЗА БИОПЛЁНКИ *VIBRIO CHOLERAЕ* НА ПОВЕРХНОСТИ ХИТИНА

Захаров М.В., Водопьянов С.О., Меньшикова Е.А., Курбатова Е.М.,  
Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Симакова Д.И.

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

Установлено, что *Vibrio cholerae* в объектах окружающей среды могут находиться в двух основных формах: планктонной и в составе биоплёнки. Известно, что в природе холерный вибрион образует биопленку главным образом на поверхности хитинового покрова некоторых морских обитателей или целлюлозного покрова водорослей [1]. Нахождение возбудителя в составе биоплёнки не только обеспечивает его сохранение, но и может вести к переносу в новые районы морскими течениями [2]. Поэтому не удивителен интерес исследователей к изучению биологии биоплёночной формы холерного вибриона [2, 3, 4].

Вместе с белками и углеводами липиды составляют основную массу органического вещества бактериальной клетки. И если особенности строения и функционирования белковых и углеводных молекул в ходе формирования биоплёнки изучены довольно хорошо, то изменения спектра жирных кислот, как основной составляющей липидов вибрионов, изучены крайне недостаточно.

В последнее время количественное газохроматографическое определение индивидуальных жирных кислот в биологических объектах является одним из наиболее востребованных методов аналитической и клинической биохимии: оно широко используется при оценке пищевой ценности продуктов питания, для таксономического и судебно-медицинского установления природы биологических образцов, в качестве источника информативных биомедицинских критериев в диагностике заболеваний разной этиологии, в научно-исследовательских, бактериологических, ветеринарных и санитарно-бактериологических лабораториях [5, 6, 7]. Одной из перспектив применения газовой хроматографии в биомедицинских исследованиях является концепция метаболических профилей-систем интегральной оценки метаболизма, как для макро- (метаболические профили биосред: мочи, крови, слюны, выдыхаемого воздуха) так и микроорганизмов. Метаболические профили так же индивидуальны, как и отпечатки пальцев.

**Цель** настоящей работы заключалась в изучении качественного состава жирных кислот и спиртов холерных вибрионов, входящих в составе биоплёнки, образованной *V. cholerae* на поверхности хитина панциря рака *Astacus astacus*.



**Материалы и методы.** В работе использовали штамм *V. cholerae* O1 20000 stxAB<sup>-</sup> tcpA<sup>-</sup>, изолированный из реки Темерник г. Ростова-на-Дону в 2016 г. Работу проводили в соответствии с требованиями биологической безопасности (СП 1.3.3118-13). Биоплёнку холерного вибриона формировали на хитиновом панцире речного рака *Astacus astacus* размером 0,5x0,5 см. В качестве питательной среды использовали физиологический раствор, культивирование проводили в течение 7 суток при 28 °С. По окончании инкубации пластины хитина обезвоживали метанолом, высушивали и подвергали солянокислому метанолизу в запаянных ампулах при 85 °С в течении 45 минут. После инкубации метиловые эфиры жирных кислот (ЖК) и спиртов экстрагировали гексаном. Полученный материал подвергали силилированию Бис-(Триметилсилил)-N,O трифторацетамидом в течение 7 минут при 85 °С. Полученные силильные производные ЖК анализировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии на приборе «Маэстро-2» (Интерлаб, Россия).

Наличие биоплёнки холерных вибрионов контролировали с помощью ПЦР как описано ранее [3].

**Результаты и обсуждение.** При анализе исходных стерильных хитиновых пластин было обнаружено до восьми пиков различных ЖК, находящихся в пределах 16,9 - 26,4 минут. На наш взгляд, их наличие могло быть обусловлено либо наличием липидов в составе хитинового панциря речного рака, либо это остатки биоплёнки прежних микроорганизмов, которые не были удалены в процессе приготовления хитина для исследования.

При анализе фрагментов хитина, содержащих биоплёнку холерного вибриона, наряду с ранее обнаруженными пиками были выявлены несколько дополнительных уникальных пиков с меньшим временем выхода - от 10,3 до 14,0. Из них наше внимание привлек пик 10,3, идентифицированный как тетрадеканол. На хроматограмме он четко дискриминировался (Рис. 1) в опытных образцах хитина, содержащих биоплёнку, и коррелировал с концентрацией вибрионов на хитине, в то время как в контрольном образце тетрадеканол не выявлялся. На наш взгляд, тетрадеканол (пик 10,3) может являться индикатором наличия холерных вибрионов.

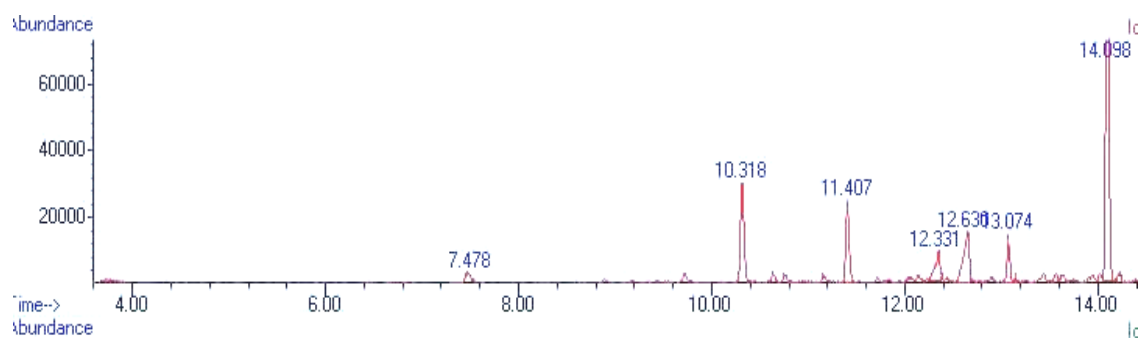


Рисунок 1. Фрагмент газовой хромато-масс-спектрограммы фрагментов хитинового панциря речного рака *Astacus astacus*, содержащего биоплёнку холерного вибриона. По оси абсцисс -интенсивность пика, по оси ординат - время выхода пика.

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что клетки холерного вибриона в составе биоплёнки на хитиновом панцире речного рака *Astacus astacus* обуславливают появление ряда специфических ЖК и спиртов с коротким временем выхода, при этом пик 10,3, идентифицированный как тетрадеканол, может служить удобным индикатором наличия возбудителя. Это открывает возможность проведения работ по изучению влияния различных условий культивирования на формирование биоплёнки и возможную роль липидных компонентов в этом процессе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Faruque S.M., Biswas K., Udden S.M., Ahmad Q.S., Sack D.A. et al. Transmissibility of cholera: in vivo-formed biofilms and their relationship to infectivity and persistence in the environment // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. -2006. – Vol. 103, № 16. - P. 6350-6355.
2. Zettler E.R., Mincer T.J., Amaral-Zettler L.A. Life in the "plastisphere": microbial communities on plastic marine debris // Environ. Sci. Technol. - 2013. - Vol. 47, № 13. - P. 7137-46.
3. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С. и др. Изучение межвидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биоплёнках // Здоровье населения и среда обитания. -2017. -№ 3 (288). - С. 51-54.
4. Кузьменко Т.Е., Головня Р.В., Воронова Е.А. Исследование состава высших жирных кислот свободных липидов *V.cholerae* // Биоорганическая химия. – 1980. - Т.6, №1. - С. 90-98.
5. Ариповский А.В., Колесник П.О., Кулагина Т. П., Титов В. Н. Подготовка проб для газохроматографического определения жирных кислот: преимущества безэкстракционного метода с прямой переэтерификацией липидов высушенных биологических проб // Клин. лаб. диагност. – 2018. – Т. 63, № 3. - С. 141-147.
6. Андрюков Б.Г., Сомова Л.М., Тимченко Н.Ф. Жирные кислоты

как объект исследования температурных адаптационных стратегий микроорганизмов-психрофилов // Здоровье. Медицинская экология. Наука. - 2015. - Т. 61, № 3. - С. 43-49.

7. Верховцева Н.В., Осипов Г.А. Метод газовой хроматографии-масс-спектрометрии в изучении микробных сообществ почв агроценоза // Проблемы агрохимии и экологии. - 2008. - № 1. - С. 51-54.

\*\*\*

## МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ И ГЕНЕТИКА

### ТРАНСКРИПТОМНЫЙ АНАЛИЗ ОСТРОВА RND У ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННОГО В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Бородина Т.Н.,  
Олейников И.П., Титова С.В.

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

В геноме атоксигенного апилированного штамма *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор 278, выделенного в августе 2017 года из реки Темерник, обнаружен генетический остров, обозначенный нами как остров RND. Эта генетическая структура по предварительным расчётам имела размер 43 596 пар оснований и содержала 51 открытую рамку считывания. Учитывая важные функции, которые выполняют гены в составе различных генетических островов холерного вибриона, представляется целесообразным провести изучение продуктов генов, входящих в состав выявленного острова RND.

Анализ транскриптома с помощью приёма полногеномного секвенирования является наиболее точным и чувствительным методом оценки тонких регуляторных механизмов бактериальной клетки, особенно на модели патогенов [1, 2]. Данный метод позволяет точно интерпретировать ответ изучаемых микроорганизмов на воздействие условий окружающей среды и макроорганизма.

**Цель исследования** заключалась в анализе экспрессии генов *V. cholerae*, входящих в состав острова RND, с помощью приёма полногеномного секвенирования транскриптома.

#### **Материалы и методы.**

Культуру штамма *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор 278 засекали в 10 мл жидкой питательной среды (синказная, синтетическая, триптоновая, LB, АК1) в концентрации  $10^4$ . Культивирование проводили с принудительной аэрацией при 33 °С в течении 16 часов. Выделение РНК проводили по оригинальной авторской методике, основанной на дифференциальном осаждении в кислых условиях биополимеров бактерий в присутствии ионов лития. Синтез кДНК проводили с помощью набора «Реверта» (ИЛС, Москва). Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторе MiSeq (Illumina).

Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы FastQC, алгоритмов Trimmomatic и Lighter. Анализ транскриптома проводили с помощью программ TopHat и Bowtie. Количественный анализ экспрессии генов проводили по показателю FPKM

(fragments per kilobase per million mapped reads), рассчитываемому по алгоритму Cufflinks. Открытые рамки считывания идентифицировали с помощью программы Glimmer, идентификацию открытых рамок считывания осуществляли, используя BLAST (NCBI).

### **Результаты и обсуждение.**

В суммарном пуле секвенированной РНК штамма *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор 278 с помощью авторской программной обработки была идентифицирована РНК, кодируемая примерно 3500 известными генами холерного вибриона. При этом тип использованной питательной среды практически не влиял на профиль транскрипции. Из 51 гена, входящего в состав острова RND, специфические транскрипты обнаружены для 43 генов. Для восьми генов (шесть из которых кодировали гипотетические протеины, один протеин семейства P2 GrU и tail protein) специфических транскриптов выявить не удалось. Это позволяет рассматривать указанные протеины как «молчачие».

Среди 43 транскрибируемых белков острова RND 18 кодировали гипотетические протеины с неясной функцией. Среди идентифицированных белков 11 имели отношение к продукции или сборке фагов - phage portal protein, phage major capsid protein, phage baseplate assembly protein V, phage baseplate protein (2 гена), phage tail assembly protein, phage tail protein I, phage tail protein (4 гена). Возможно, что остров RND в своей основе имеет фаговую природу происхождения, как и другие острова патогенности *Vibrio cholerae*, тем более, что факт участия различных фагов в эволюции холерного вибриона путем приобретения и передачи генов патогенности хорошо документирован [3].

Остальные идентифицированные гены в составе острова RND детерминировали: интегразу, идентичную обнаруженной нами ранее в составе островка патогенности VcB (4); лизоцим; терминазу; регулятор транскрипции; фактор инициации трансляции IF-3; регулятор транскрипции типа helix-turn-helix; РНК-зависимую ДНК-полимеразу; белки семейства TIGR 02646 и beta; ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase; glycine cleavage system aminomethyltransferase T; DUF4102 domain-containing protein; chromosome segregation protein SMC и threonine-tRNA ligase. Столь широкий спектр активности транскрибируемых белков входящих в состав острова RND, включая протеины с неустановленной функцией, может свидетельствовать в пользу многих функций реализуемых этой генетической структурой. Учитывая, что данный атоксигенный апилированный штамм выделен из внешней среды, более информативные результаты о функции острова RND будут получены при культивировании клеток вибрионов в различных условиях, включая экстремальные (температура, голодание, нахождение в биоплёнке). На наш взгляд необходимы дополнительные исследования для изучения роли острова RND в биологии *Vibrio cholerae*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Скворцов Т.А., Игнатов Д.В., Майоров К.Б. и др. Транскриптом *Mycobacterium tuberculosis* при заражении мышей с разной генетической чувствительностью к инфекции // *Acta naturae*. – 2013. - Т. 5, № 2 (17). - С.64-71.
2. Соломенцев В.И., Кадникова Л.А., Кисличкина А.А. и др. Сравнительное секвенирование транскриптомов культур *Yersinia pestis* subsp. *microti* bv. *ulegeica*, отличающихся по вирулентности для морских свинок // *Бактериология*. – 2017. - Т. 2, №2. - С. 30–35. DOI: 10.20953/2500-1027-2017-2-30-35
3. Vodop'ianov A.S., Vodop'ianov S.O., Mishan'kin B.N. et al. Correlation between the Presence of the VcB Variable Tandem Repeat Region and the VPI-1 Pathogenicity Island in *Vibrio cholera* // *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. – 2017. - Vol. 32, № 2. – P. 75–79.
4. Faruque S. M., Mekalanos J. J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae* // *Virulence*. – 2012. – Vol. 3, №. 7. – P. 556-565.

\*\*\*

## КОМПЬЮТЕРНЫЙ АНАЛИЗ СИКВЕНСОВ ДНК-ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* НА НАЛИЧИЕ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ ЛЕКАРСТВЕННОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ

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

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

Возбудитель холеры продолжает представлять существенную угрозу для общественного здравоохранения. Это диктует необходимость всестороннего изучения постоянно изменяющихся свойств возбудителя и внесения соответствующих корректив в схемы индикации и типирования с целью проведения мониторинга. Одним из наиболее изменчивых признаков, имеющих значение для практического здравоохранения, является резистентность возбудителя к различным лекарственным препаратам. Часто гены резистентности локализованы на мобильных генетических элементах (ICE), способных к горизонтальному внутривидовому и межвидовому переносу [1].

Многообещающим направлением анализа резистентности у микроорганизмов являются методы молекулярной биологии, позволяющие детектировать наличие генов, определяющих устойчивость к различным

антибиотикам и химиопрепаратам. Одним из подобных перспективных приемов является предложенный способ определения у штаммов *Vibrio cholerae* серогруппы O1 генов лекарственной устойчивости к тетрациклинам, фторхинолонам, триметоприму и хлорамфениколу с помощью мультиплексовой ПЦР в режиме реального времени [2].

За последние годы секвенированы геномы свыше 800 штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в различных регионах мира, информация о которых находится в открытом доступе в GenBank, разработаны и успешно апробированы способы компьютерного анализа баз данных генетических последовательностей холерного вибриона с целью анализа различных детерминант [3,4].

**Цель настоящей работы** заключалась в изучении *in silico* встречаемости генов резистентности к тетрациклинам, фторхинолонам, триметоприму и хлорамфениколу, входящих в состав мультиплексовой ПЦР системы среди штаммов *Vibrio cholerae*, представленных в GenBank.

Базу данных *Vibrio cholerae*, выделенных в различных регионах мира, формировали с учетом ранее предложенных критериев [3,4]. Виртуальную ПЦР с праймерами к генам лекарственной устойчивости к тетрациклинам (*tetR*<sup>+</sup>), фторхинолонам (*qnrVC1*), триметоприму (*dfrA1*) и хлорамфениколу (*floR*) [2] проводили с помощью авторской программы Virtual PCR [2,3] с использованием локальной базы данных, включавшей геномы штаммов *Vibrio cholerae*, находившихся в GenBank.

### **Результаты и обсуждение**

На момент проведения исследования в составе GenBank находится информация о 834 геномах *Vibrio cholerae*, с учетом ранее использованных нами критериев отбора [3,4] сформированная нами локальная база насчитывала 694 последовательности. Штаммов серогруппы O1 (*wbe*<sup>+</sup>) - 530, из них 396 содержали ICE элемент, 378 наряду с ICE элементом содержали ген холерного токсина (*ctx*<sup>+</sup>). К не O1/не O139 относилось 144 штамма, из них 29 содержали ICE элемент.

При анализе встречаемости генов резистентности к тетрациклинам, фторхинолонам, триметоприму и хлорамфениколу получены данные о чрезвычайном разнообразии наличия указанных генов у холерного вибриона O1 и у не O1/не O139 (Таблица 1). Так, гены устойчивости к тетрациклинам (*tetR*<sup>+</sup>) и триметоприму (*dfrA1*) наиболее часто встречались у O1 *ctx*<sup>+</sup>ICE<sup>+</sup> штаммов, в то время как ген устойчивости к хлорамфениколу (*floR*) с одинаковой частотой встречался у O1 и у не O1/не O139 штаммов, а ген устойчивости к фторхинолонам (*qnrVC1*) чаще встречался у не O1/не O139 штаммов. Полученные данные позволяют исключить связь между геном устойчивости к фторхинолонам (*qnrVC1*) и наличием ICE элемента.

Таблица 1. Встречаемость генов лекарственной устойчивости к тетрациклинам (tetR+), фторхинолонам (qnrVC1), триметаприму (dfrA1) и хлорамфениколу (floR) по данным «виртуальной ПЦР» локальной базы геномов *Vibrio cholerae*

№	Детерминанта	Штаммы, всего	из них штаммов с генотипом	
			ctx+	ICE+
	tetR+	45	37	38
	tetR+ wbe+	38	36	34
	tetR+ wbe-	7	1	2
	qnr VC1+	38	2	21
	qnr VC1+ wbe+	7	2	1
	qnr VC1+ wbe-	31	0	20
	dfr A1+	56	39	54
	dfr A1+wbe+	54	37	52
	dfr A1+wbe-	2	1	2
	floR+	102	55	91
	floR+wbe+	54	39	54
	floR+wbe-	48	16	37

При анализе частоты сцепленности генов лекарственной устойчивости установлено, что наиболее часто у штаммов холерного вибриона встречалось сочетание двух маркеров dfrA1+ floR+ (292 штамма), интересно, что 34 штамма несли три маркера (tetR+ dfrA1+ floR+). Не было обнаружено ни одного штамма содержащего четыре изученных генетических детерминанты (Таблица 2).

Таблица 2. Частота сцепленности генов лекарственной устойчивости к тетрациклинам (tetR+), фторхинолонам (qnrVC1), триметаприму (dfrA1) и хлорамфениколу (floR) по данным «виртуальной ПЦР» локальной базы геномов *Vibrio cholerae*

№	генотип	Число штаммов
1	dfrA1+ floR+	292
2	tetR+ floR+	42
3	tetR+ dfrA1+ floR+	34
4	qnrVC1+ floR+	28
5	tetR+ qnrVC1+ floR+	5



При анализе штаммов, выделенных во время вспышки холеры на о. Гаити (101 штамм), выявлено, что 69 штаммов относились к серогруппе O1 (содержали ген *wbe*) из них 67 штаммов содержали ген *ctx* и ICE элемент, при этом 66 штаммов несли детерминанты *dfrA1+* *floR+*. Полученный результат подтверждает мнение о клоновой природе вспышки холеры. В период эпидемии было выделено и просеквенировано 32 штамма вибрионов неO1/неO139. Для этих культур характерна высокая встречаемость генов устойчивости к фторхинолонам (*qnrVC1*) и хлорамфениколу (*floR*) – по 23 штамма. Полученный результат согласуется с предположением, что популяция вибрионов не O1/не O139 может служить резервуаром сохранения различных генов [5].

На территории Российской Федерации выделено, просеквенировано и представлено с достаточным качеством 23 штамма серогруппы O1 (12 *ctx+* и 11 *ctx-*). При этом 10 штаммов обладали «мажорным гаитянским» генотипом генов лекарственной устойчивости (*dfrA1+* *floR+*), а два штамма содержали ген *tetR*. У 11 *ctx-* штаммов серогруппы O1 обнаружено присутствие генов устойчивости к фторхинолонам (3 штамма), триметоприму и хлорамфениколу (по 1 штамму).

Таким образом, выявление генов лекарственной устойчивости к тетрациклинам (*tetR+*), фторхинолонам (*qnrVC1*), триметоприму (*dfrA1*) и хлорамфениколу (*floR*) у O1 и неO1/неO139 штаммов *Vibrio cholerae* в перспективе позволит не только быстро определить правильную тактику антибактериальной терапии, но и служить удобным генетически маркером для проведения молекулярного типирования штаммов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 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 // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. - № 21(6). – С. 347-351.
2. 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.
3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквенсов ДНК-штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 г. // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - № 3 (240). - С. 28-30.
4. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Корреляция области варибельного tandemного повтора VcB (VNTR VcB) и гена токсин-корегулируемых пилей (TCРА) у возбудителя холеры: компьютерный анализ // Здоровье населения и среда обитания. - 2014. - № 4

(253). - С. 14-16.

5. Титова С.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В. и др. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – №5. – С. 45-47.

\*\*\*

## **ОПЫТ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПОРТАТИВНОГО СЕКВЕНАТОРА ЧЕТВЁРТОГО ПОКОЛЕНИЯ MINION**

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

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

Метод полногеномного секвенирования и последующего анализа результатов по международным базам данных нуклеотидных последовательностей позволяет на основании выявления уникальных генетических детерминант идентифицировать практически любой патоген. Поэтому этот метод нашел широкое распространение в практике работы лабораторий научно-исследовательских институтов Роспотребнадзора.

Существенным недостатком широко распространенного оборудования для полногеномного секвенирования является его высокая стоимость (несколько миллионов рублей), сложность и требовательность к окружающим условиям. Так, полногеномный секвенатор MiSeq является стационарным оборудованием, его настройка и юстировка после окончательного размещения осуществляется только инженером, сертифицированным фирмой-производителем. Настройка прибора требует использования особых калибровочных импортных наборов. Эти обязательные требования полностью исключают его использование в условиях лабораторий мобильного комплекса специализированной противозидемической бригады Роспотребнадзора.

В последнее время появились полногеномные портативные секвенаторы четвертого поколения- MinION, основанные на феномене нанопоровых микрочипов. Достоинством прибора MinION является невысокая цена (в пределах полутора сотен тысяч рублей), портативность и энергоэффективность, поскольку вес и размеры портативного секвенатора MinION соответствуют размеру обычного мобильного телефона, а питание в процессе работы и обмен информацией производится через стандартный USB-порт [1]. Важно, что обработка результатов полученных с помощью портативного секвенатора нового поколения MinION проводится автономно с использованием открытого программного обеспечения и не привязана к

определенному производителю.

Эти обстоятельства открывают возможность использования портативного полногеномного секвенатора четвертого поколения MinION в практике работы противочумной службы с перспективой использования в лабораториях мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора

Цель данного исследования: апробация работы портативного полногеномного секвенатора четвертого поколения MinION на модели штамма холерного вибриона.

Материалы и методы. В работе использовали культуру нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000, выделенного в августе 2017 года из реки Темерник. ДНК из клеток вибрионов выделяли с помощью коммерческого набора «Проба НК», получение геномной библиотеки и последующее секвенирование осуществляли с использованием набора и по протоколу производителя портативного полногеномного секвенатора четвертого поколения MinION.

Результаты и их обсуждение. Время, затрачиваемое на выделение ДНК и получение геномной библиотеки для одного штамма, составляло около одного часа. Этап секвенирования в наших условиях занял 12 часов, в этот период секвенатор MinION был подключён к управляющему компьютеру посредством USB-порта. Присутствия оператора в этот период не требовалось, работа проводилась в автономном режиме.

Интересной особенностью секвенатора MinION является возможность повторного использования ячейки, содержащей нанопоровые микрочипы. В этом случае ячейку промывают специальным буфером и сразу используют для повторного анализа или консервируют с помощью буфера хранения. Все буферные растворы входят в комплект расходных реактивов, поставляемых вместе с секвенатором MinION.

Полученный результат в виде ридов суммарным объемом 5 ГБ был обработан с помощью открытого бесплатного программного обеспечения SPADES (Санкт-Петербург, Россия). Для большей достоверности при обчёте конечного результата данные, полученные на портативном полногеномном секвенаторе четвертого поколения MinION, были объединены с нашими предварительными результатами анализа этого же штамма на полногеномном анализаторе MiSeq.

В результате обчёта полученных данных программой SPADES получен полностью собранный геном штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000. Геном был представлен двумя хромосомами размером 2,9 и 1,1 млн пар оснований. Суммарное содержание [G+C] составило 47,5 %. В составе полного генома обнаружено 3619 открытых рамок считывания.

Далее был проведен анализ собранного генома штамма 20000 с помощью программы SeqAnalyzer [2]. Были идентифицированы локусы

вариабельных тандемных повторов VcA (VCA0171) - 11 повторов, VcC (VC0147) - 9 повторов, VcD (VC0436-VC0437) - 4 повторов, VcG (VC1650) - 5 повторов, использованные ранее для оценки качества секвенирования [3,4]. Локус VcB (VCA0283) - не найден. Полученный результат полностью совпал с ранее полученными результатами VNTR-типирования *in vitro*. Также были точно идентифицированы INDEL-маркеры CoA - 98 п.о., OmpU - 166 п.о., hutG - 171 п.о., 2456 - 87 п.о., 122 - 65 п.о., 704 - 71 п.о., 3186 - 74 п.о., CheA - 193 п.о. и p1070 - 80 п.о. Полученные результаты показали высокое качество сборки полного генома штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000.

Таким образом, с помощью портативного полногеномного секвенатора четвертого поколения MinION проведен полногеномный сиквенс нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 El Tor 20000. Получен полный геном с высоким качеством сборки. В настоящее время результаты готовятся для депонирования в GenBank.

На наш взгляд, использование портативного секвенатора четвертого поколения MinION позволит проводить полногеномное секвенирование в лабораториях мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады Роспотребнадзора и оперативно выявлять известные и, в перспективе, неизвестные патогены.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lindberg M.R., Schmedes S. E., Hewitt F. C. et al. Comparison and integration of MiSeq and MinION platforms for sequencing single source and mixed mitochondrial genomes// PLOS ONE | DOI:10.1371/journal.pone.0167600 December 9, 2016/
2. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Олейников И.П., Иванов С.А. SeqAnalyzer- программа для анализа результатов полногеномного секвенирования *Vibrio cholerae*, определения кратности вариабельных тандемных повторов (VNTR) и выявления INDEL-маркеров. Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2017613695, РФ; 2016, 24 марта 2017.
3. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных сиквенсов ДНК-штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 г. // Здоровье населения и среда обитания. - 2013. - № 3 (240). - С. 28-30.
4. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П. Корреляция области вариабельного тандемного повтора VcB (VNTR VcB) и гена токсин-корегулируемых пилей (TCPA) у возбудителя холеры: компьютерный анализ // Здоровье населения и среда обитания. - 2014. - № 4 (253). - С. 14-16.

\*\*\*

## ФОРМИРОВАНИЕ КОЛЛЕКЦИИ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ С ОХАРАКТЕРИЗОВАННЫМИ ГЕНЕТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ

Архангельская И.В., Монахова Е.В., Ежова М.И., Левченко Д.А.,  
Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Титова С.В.

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

Молекулярно-генетические исследования в настоящее время являются неотъемлемой частью анализа при изучении биологических свойств, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов [2, 3]. При проведении сравнительных исследований геномов штаммов *Vibrio cholerae*, выделяемых от больных и из объектов окружающей среды на территориях Российской Федерации (РФ), необходимо иметь набор культур с уже охарактеризованными свойствами в качестве эталонных.

**Целью** настоящей работы был отбор культур холерных вибрионов, изолированных в РФ и бывших республиках СССР, имеющих генетические особенности. Штаммы (за исключением одного) были охарактеризованы с помощью полногеномного секвенирования и предлагаются для использования в сравнительных гено- и фенотипических исследованиях при изучении роли различных факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов.

В коллекцию вошли два токсигенных штамма *Vibrio cholerae* O1 и 18 нетоксигенных штаммов: 7 – O1 El Tor, один – O139, 10 – nonO1/nonO139, которые содержали в геномах различные сочетания детерминант факторов патогенности и персистенции (табл.1). Один из токсигенных штаммов был типичным представителем классического биовара, второй – гибридный вариант Эль Тор, имеющий четыре маркера высокого эпидемического потенциала (*ctxB7*, *tcpA*<sup>CIRS101</sup>, *rtxA4a*,  $\Delta$ VSPII) [5].

Ранее была показана генетическая неоднородность популяции холерных вибрионов, циркулирующих в одних и тех же регионах, по наборам содержащихся в их геномах детерминант факторов патогенности, которая может свидетельствовать о взаимозаменяемости при реализации патогенетического потенциала [1,3,4,6]. Результаты дальнейшего анализа полногеномных последовательностей показали наличие большого числа разных аллелей одних и тех же генов, продукты которых могут различаться по биологической активности.

Нетоксигенные культуры имели различия по наличию и/или структуре профагов *preCTX*, островов патогенности VPI, VPI-II, острова пандемичности VSP-II, кластеров T3SS, MSHA, VPS и RBM, присутствию разных аллелей генов *cef*, *chxA*, *rtxA*. Поэтому, они могут использоваться для

изучения экспрессии этих генов и выявления роли их продуктов в реализации вирулентных свойств и способности к персистенции.

Таблица. Характеристика штаммов *V.cholerae*, вошедших в коллекцию

№	штамм	характеристика	Источник, место и год выделения	Генетическая особенность
1	2	3	4	5
1	P-17917	O1 classicalOgawa	р. Дон, Ростов-на-Дону, 1999	<i>ctxB1</i> , <i>rstR<sup>class</sup></i> , <i>tcpA<sup>class</sup></i> ; <i>cef<sup>class</sup></i> ; усеченные <i>rtxA</i> , <i>rtxB</i> , <i>hlyA</i> , отсутствие <i>rtxC</i> , профагаRS1, острова пандемичностиVSP-II. Ген <i>hapR</i> усечен.
2	19667	O1 El Tor Ogawa	больной, Москва, 2014	<i>ctxB7</i> , <i>tcpA<sup>CRST01</sup></i> , <i>rtxA4a</i> , протяженная делеция в VSPII
3	19787	O1 El Tor Inaba	р. Агура, г. Сочи, 2015	аллель <i>cefE3</i> , ген <i>chxA1</i> , измененный ген <i>rtxA</i> , продукт которого содержит дополнительный домен Hia, отличные от прототипа кластеры <i>msh</i> и <i>vspI-rbm-vspII</i>
4	19758	O1 El Tor Inaba	р. Великая, Псковская обл., 2014	аллель гена <i>cefE5</i> , кластер T3SS,существенно отличные от прототипов кластеры <i>msh</i> и <i>vspI-rbm-vspII</i> ,наличие острова пандемичности VSPII при отсутствии профагаCTX и острова патогенности VPI
5	14157	O1 El Tor Ogawa	больной, Азербайжан, 1989	наличие острова пандемичностиVSPII при отсутствии CTX и VPI
6	14863	O1 El Tor Ogawa	больной, Украина, 1987	аллель гена <i>cefE4</i> , кластер T3SS, существенно отличный от прототипа кластер <i>vspI-rbm-vspII</i>
7	P-13169	O1 El Tor Ogawa	р. Дон, Ростов-на-Дону, 1987	профагpre-CTXс <i>rstR<sup>class</sup></i> , остров патогенности VPI, кластер T3SS, аллель гена <i>rtxA8</i>
8	P-18904	O1 El Tor Inaba	р. Темерник, Ростов-на-Дону, 2006	аллель гена <i>cefE2</i> , кластер T3SS
9	P-19430	O1 El TorOgawa	р. Темерник, Ростов-на-Дону, 2013	аллель гена <i>cefE4</i> , кластер T3SS
10	P-17918	O139	р. Темерник, Ростов-на-Дону, 1999	ген cholix-токсина II типа <i>chxAII</i> , существенно отличные от прототипов гены <i>rtxA</i> , <i>cef</i> , кластеры <i>msh</i> и <i>vspI-rbm-vspII</i> , остров пандемичностиVSPII
11	P-912	nonO1/nonO139	больной, Ростовская обл., 1968	усеченные гены cholix-токсина III типа <i>chxAIII</i> , <i>rtxC</i> ,существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i> .
12	P-9771	nonO1/nonO139	больной, Ростов-на-Дону, 1975	кластерT3SS, отличные от прототипа ген нейраминидазы <i>nanH</i> , остров патогенности VPI-2 и кластер <i>msh</i>

1	2	3	4	5
13	P-9798	nonO1/nonO139	больной, Ростовская область, 1969	ген <i>chxAII</i> , измененный <i>rtxA</i> , продукт которого лишен доменов ACD и abH, но содержит 2 домена RID; существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i>
14	P-12935	nonO1/nonO139	больной, Ростов-на-Дону, 1975	Ген <i>chxAI</i> , измененный <i>rtxA</i> , продукт которого лишен доменов ACD и abH, но содержит 2 домена RID; существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i>
15	P-17751	nonO1/nonO139	больной, Ростов-на-Дону, 1978	профаг pre-CTX с <i>rstR<sup>class</sup></i> , острова VPI, VPI-II, усеченный <i>rtxA</i> с образованием второй ORF, продукт которой сохранил все активные домены; существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i>
16	17449	nonO1/nonO139	больной, Узбекистан, 1987	профаг pre-CTX с <i>rstR<sup>env</sup></i> , остров VPI, кластер T3SS, отличный от прототипа кластер <i>msh</i>
17	P-19093	nonO1/nonO139	больной, Рост. область, 2009	измененный ген нейраминидазы <i>nanH</i> , усеченный ген <i>rtxA</i>
18	P-19260	nonO1/nonO139	больной, г. Таганрог, 2011	ген <i>chxAI</i> , усеченный <i>rtxA</i> с образованием второй ORF, продукт которой лишен доменов ACD и abH, но содержит 2 домена RID и новый домен Hia; существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i>
19	P-19261	nonO1/nonO139	больной, Таганрог, 2011	кластер T3SS, гены <i>chxAI</i> , <i>nanH</i> , измененный <i>rtxA</i> , продукт которого лишен доменов ACD и abH, но содержит 2 домена RID и новый домен VIP2; существенно отличный от прототипа кластер <i>msh</i> .
20	2016	nonO1/nonO139	больной, Симферополь, 2016	наличие гена термостабильного токсина <i>st</i> ( <i>stn/sto</i> )

У одного штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 выявлен ген термостабильного токсина *st* (*stn/sto*), что позволяет использовать его в качестве положительного контроля при проведении ПЦР. В этом же качестве могут быть использованы 3 штамма неO1/неO139 серогрупп, содержащие гены *chxAI*, III типов, хотя последний и утратил функциональность за счет однонуклеотидной вставки, приведшей к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Однако это никак не повлияло на результаты ПЦР-детекции этого гена. Наконец, в качестве контрольного для ПЦР-детекции может служить единственный из исследованных нами штамм неO1/неO139, имеющий аллель гена *rstR<sup>env</sup>* в составе профага preCTX.

Коллекция подлежит дальнейшему пополнению по мере получения новых сиквенсов и идентификации в них перечисленных и других генетических детерминант.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенных в Ростовской области // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С. 25-27.
2. Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю. и др. Молекулярное типирование *Vibrio cholerae* в системе эпидемиологического надзора за холерой и изучении филогении возбудителя: результаты исследования, проблемы, направления совершенствования // Молекулярная диагностика 2017: сб. трудов IX Всерос. научно-практ. конф. с международ. участ. – М., 2017. – Т.1. – С. 323-324.
3. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В. Особенности структуры генома возбудителей холеры, циркулирующих на территориях России и сопредельных стран // Молекулярная диагностика 2017: сборник трудов IX Всерос. научно-практ. конф. с международным участием. – М., 2017. – Т. 1. – С. 325-327.
4. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор) // Пробл. особо опасных инф. – 2012. – №4. – С. 60-68.
5. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В. и др. Структура гена *rtxA* – четвертый критерий оценки эпидемического потенциала *Vibrio cholerae* // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сб. статей Пробл. комиссии КНС по сан.-эпид. охране территории РФ. - Ростов н/Д, 2017. – Вып. 30. – С. 131-138.
6. Титова С.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В. и др. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 5. – С. 45-47.

\*\*\*

### **СТРУКТУРА И ИЗМЕНЧИВОСТЬ НЕЙРАМИНИДАЗЫ (NanH) ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/НЕ O139 СЕРОГРУПП**

Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б.,  
Дуванова О.В.

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

Основная роль нейраминидазы (NanH) токсигенных штаммов холерных вибрионов состоит в повышении чувствительности клеток кишечника к действию холерного токсина [7, 8], однако некоторые авторы не исключают,



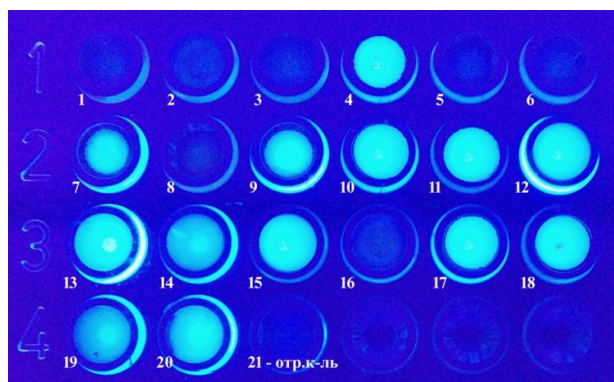
что она может играть определенную роль в развитии легкой формы инфекции или кратковременного носительства [2, 6]. NanH (наряду с продуктами других генов *nan-nag* области острова патогенности VPI-II) также может участвовать в утилизации ганглиозидов высшего порядка в качестве источника питания, повышая тем самым персистентный потенциал вибрионов в разных экологических нишах [5,8]. Как было показано ранее нами и зарубежными авторами, далеко не у всех нетоксигенных штаммов, особенно у представителей холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп в ПЦР выявляется кодирующий ее ген *nanH* [1, 3, 5]. Тем не менее, содержащие этот ген штаммы, как клинические, так и выделенные из открытых водоёмов, способны к его экспрессии [5,6], что указывает на участие NanH в механизмах вирулентности и/или персистенции, которые до настоящего времени практически не изучены.

Целью настоящего исследования явилось выявление генов *nanH* у клинических штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных в России, изучение их экспрессии и биоинформационный анализ продуктов трансляции.

В работе было использовано 20 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, для которых были получены полногеномные сиквенсы (19 вызвавших заболевания людей в Ростовской области и 1 – в республике Калмыкия). Ген *nanH* выявляли в ПЦР как описано ранее [3], а также в полных геномах с использованием программы BLASTN 2.2.29, трансляцию генов и AlignX-анализ осуществляли с помощью пакета программ Vector NTI 11 (Invitrogen). Нейраминидазную активность суточных бульонных культур определяли по отношению к специфическому субстрату (4-метилумбеллиферил-N-ацетилнейраминовой кислоте) [4].

Данные ПЦР показали наличие гена *nanH* у 10 из 20 изученных штаммов, однако только для семи негативных его отсутствие было подтверждено результатами поиска в полногеномных сиквенсах, тогда как в геномах трёх штаммов (9760, 19063, 19093) он был найден, несмотря на отрицательные результаты ПЦР-детекции. Как показала проверка в программе Vector NTI, это было связано с отличиями от прототипа сайтов отжига одного или обоих использованных праймеров.

Результаты определения нейраминидазной активности культур совпали с наличием/отсутствием гена, выявленного одним либо обоими способами (рис. 1), кроме штамма 17751, возможно, содержащего изменённый ген, который не попал в полногеномный сиквенс.



№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
штамм	6	16	930	950	912	9798	9507	12935	9767	9699	9705	9786	9771	17751	19063	19260	19261	18470	9760	19093
ПЦР	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Seq	-	-	-	+	-	-	nd	-	+	+	+	+	+	nd	+	-	+	+	+	+
ФТ	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Рисунок 1. Результаты определения наличия гена *nanH* и фенотипического проявления нейраминидазной активности у 20 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

Нумерация соответствует порядку штаммов в таблице. nd – ген не попал в полногеномный сиквенс, ФТ – фенотип.

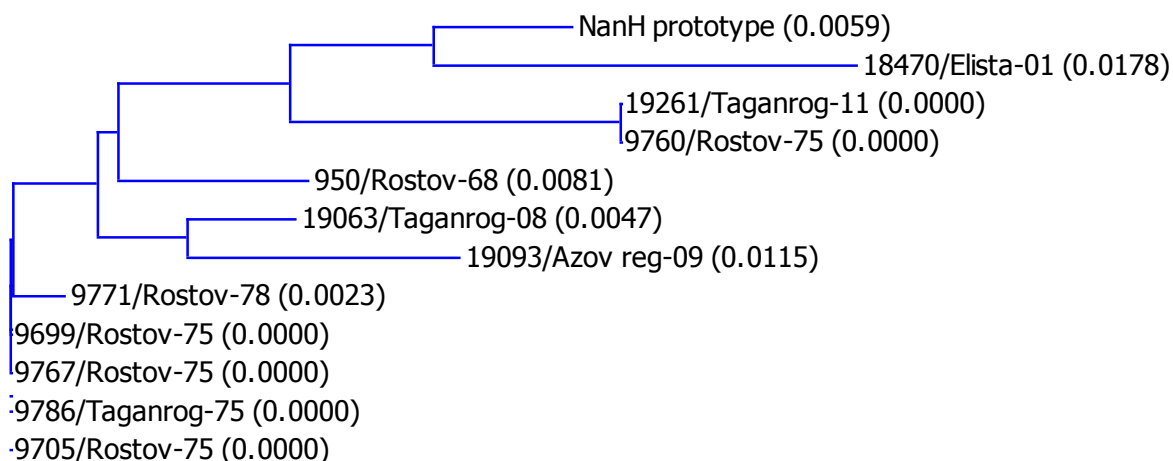


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа белков NanH 11 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

На дендрограмме, построенной по результатам AlignX-анализа NanH (рис. 2), идентичными оказались белки 4 и 2 штаммов, остальные пять отличались от них и друг от друга, и все существенно отличались от прототипа, что не помешало проявлению специфической активности.

Таким образом, примерно половина штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 сохранила не только ген *nanH*, но и способность к его экспрессии, что указывает на вероятное использование ими нейраминидазы для реализации

патогенетического либо персистентного потенциала, тогда как другие штаммы утратили этот ген, вероятно, в целях энергосбережения и используют в указанных целях другие взаимозаменяемые факторы.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Монахова Е.В. и др. Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в Ростовской области //Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – №3. – С.25-27.
2. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Голубинский Е.П. и др. Некоторые «дополнительные» гены вирулентности штаммов холерного вибриона различного происхождения // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2004. – Вып.17. – С.62-65.
3. Монахова Е.В. Факторы патогенности нехолерогенных штаммов *V.cholerae*: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2012. – 46 с.
4. Рябухина О.Ю., Шиманюк Н.Я., Мишанькин Б.Н. Определение нейраминидазы у вибрионов O1 и неO1 групп // Лаб. дело. – 1990. – № 8. – С.63-65.
5. Eneva R., Engibarov S., Strateva T. et al. Biochemical studies on the production of neuraminidase by environmental isolates of *Vibrio cholerae* non-O1 from Bulgaria // Can. J. Microbiol. – 2011. – Vol. 57, No.7. – P.606–610.
6. Figueiredo S.C., Neves-Borges A.C., Coelho A. The neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 2005. – Vol.100, No.6. – P.563-569.
7. Galen J.E., Ketley J.M., Fasano A. et al. Role of *Vibrio cholerae* neuraminidase in the function of cholera toxin // Infect. Immun. – 1992. – Vol.60, No.2. – P. 406-415.
8. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates // Microbiology. – 2002. – Vol. 148. – P. 3681-3693.

\*\*\*

# БИОИНФОРМАЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ГЕНОВ *RTX*А КАК ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ *VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/NON O139*

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

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

Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп – возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) – редко содержат гены холерного токсина и большей частью реализуют патогенетический потенциал за счет целого ряда других факторов, наборы и уровни экспрессии которых неодинаковы у разных штаммов [1, 2]. Одним из таких факторов является MARTX – высокомолекулярный мультифункциональный самопроцессирующийся цитотоксин, кодируемый геном *rtxA* в составе RTX-кластера [3]. Молекула MARTX содержит ряд активных доменов, среди которых наиболее важное значение придают необходимым для проявления биологической активности ACD (актин-связывающему), RID (инактивирующему ГТФазу), Abh (альфа-бета-гидролаз) и CPD (цистеиновой протеазы) [3, 5].

Ранее Dolores J., Sachell K.J.F. [3] было показано, что ген *rtxA* имеет несколько аллелей даже у токсигенных штаммов O1 серогруппы, а у *V. cholerae* не O1/не O139 отличается крайней гетерогенностью, заключающейся в огромном количестве нуклеотидных полиморфизмов (SNP). При этом среди продуктов этих измененных генов были выявлены 2 утративших ACD, но в результате генных перестроек у первого сформировался домен аденилат-циклазы, у второго – потенциальный домен АДФ-рибозилазы, что могло привести к преобразованию активатора MARTX в токсины с иным механизмом действия.

Поскольку холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп на протяжении полувека периодически вызывают заболевания людей на территории Ростовской области, а в текущем столетии – и в граничащей с ней республике Калмыкия, мы заинтересованы в выявлении их потенциальных факторов патогенности. Поэтому целью настоящего исследования явился сравнительный анализ продуктов трансляции генов *rtxA* ряда клинических штаммов-возбудителей ОКИ на указанных и некоторых других территориях (происхождение штаммов указано ниже на рис.1). Гены идентифицировали в полных геномах, секвенированных нами на платформе MiSeq (Illumina), с помощью программы BLASTN 2.2.29 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), трансляцию генов осуществляли в программе Vector NTI 11 начиная с кодона ATG (а не с начального GTG), поскольку экспериментально доказано, что именно он является истинно стартовым в *rtxA* [3]. Для анализа белков использовали программы AlignX (Vector NTI) и Blastp (NCBI).

У изученных штаммов ген *rtxA* был представлен множеством аллелей, существенно отличающихся от прототипа, и их продукты также различались по аминокислотному (aa) составу. На рисунке 1 показана дендрограмма, отражающая это разнообразие. Тем не менее, белки 13 из 20 штаммов *V. cholerae* были более или менее близки прототипу, и 8 из них (*V. cholerae* 950, 9507, 9767, 9699, 9705, 9786, 18362, 18363) имели «нормальную» длину 4545 aa, у одного (19063) содержали 1 и у трех (9771, 12250, 18470) – 2 «лишних» aa, а у 19093 белок был укорочен до 4030 aa вследствие образования в гене «преждевременного» стоп-кодона. У штамма 17751 в результате делеции 16 п.н. (2015-2030) образовались 2 ORF – первая (1980 п.н.) представляла собой усеченный из-за «преждевременного» стоп-кодона *rtxA*; вторая (11640 п.н.), локализованная на 2 п.н. ниже первой, начиналась с GTG и была на 98% идентична дистальной части прототипа.

RtxA остальных 7 штаммов образовали значительно удаленную ветвь, на которой 5 (6, 16, 930, 9798, 12935) состояли из 4525 aa, 2 были укорочены (19260 – 4343 aa, 19261 – 4407 aa) за счет нескольких протяженных делеций и вставок внутри кодирующих генов. При этом у штамма 19260 наблюдалась картина, аналогичная таковой 17751: первая ORF была усечена до 453 п.н., вторая (13032 п.н.), ниже первой на 183 п.н., начиналась с GTG.

Поскольку резко укороченные продукты первых ORF штаммов 17751 и 19260 не могли сохранить какую-либо активность, при анализе мы использовали продукты вторых (дистальных) ORF.

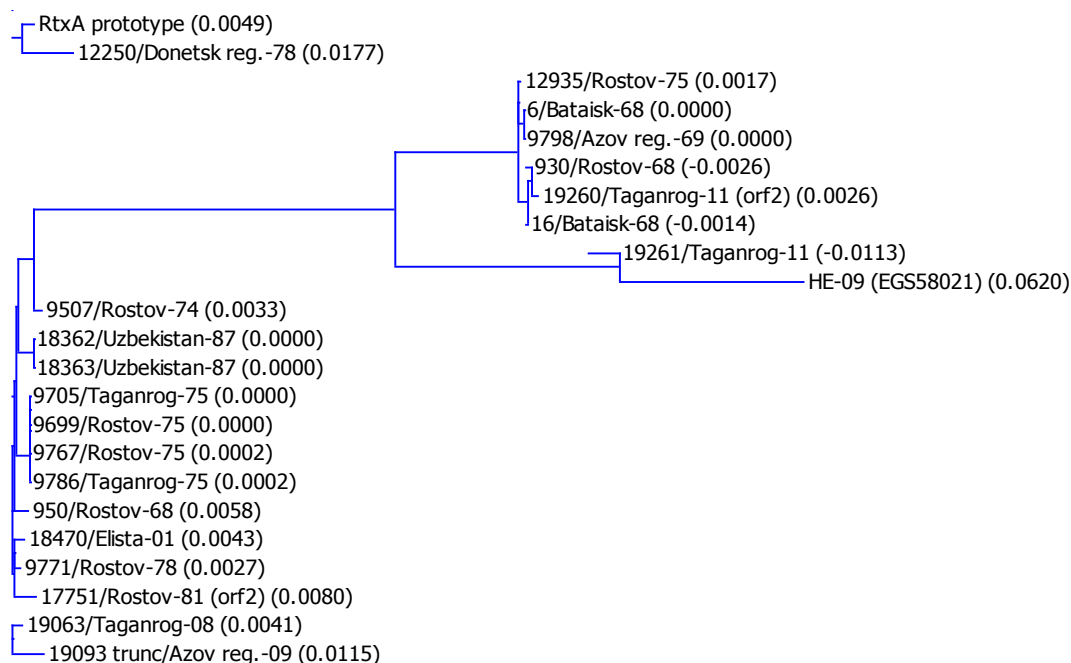


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная по результатам AlignX-анализа продуктов гена *rtxA* 20 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

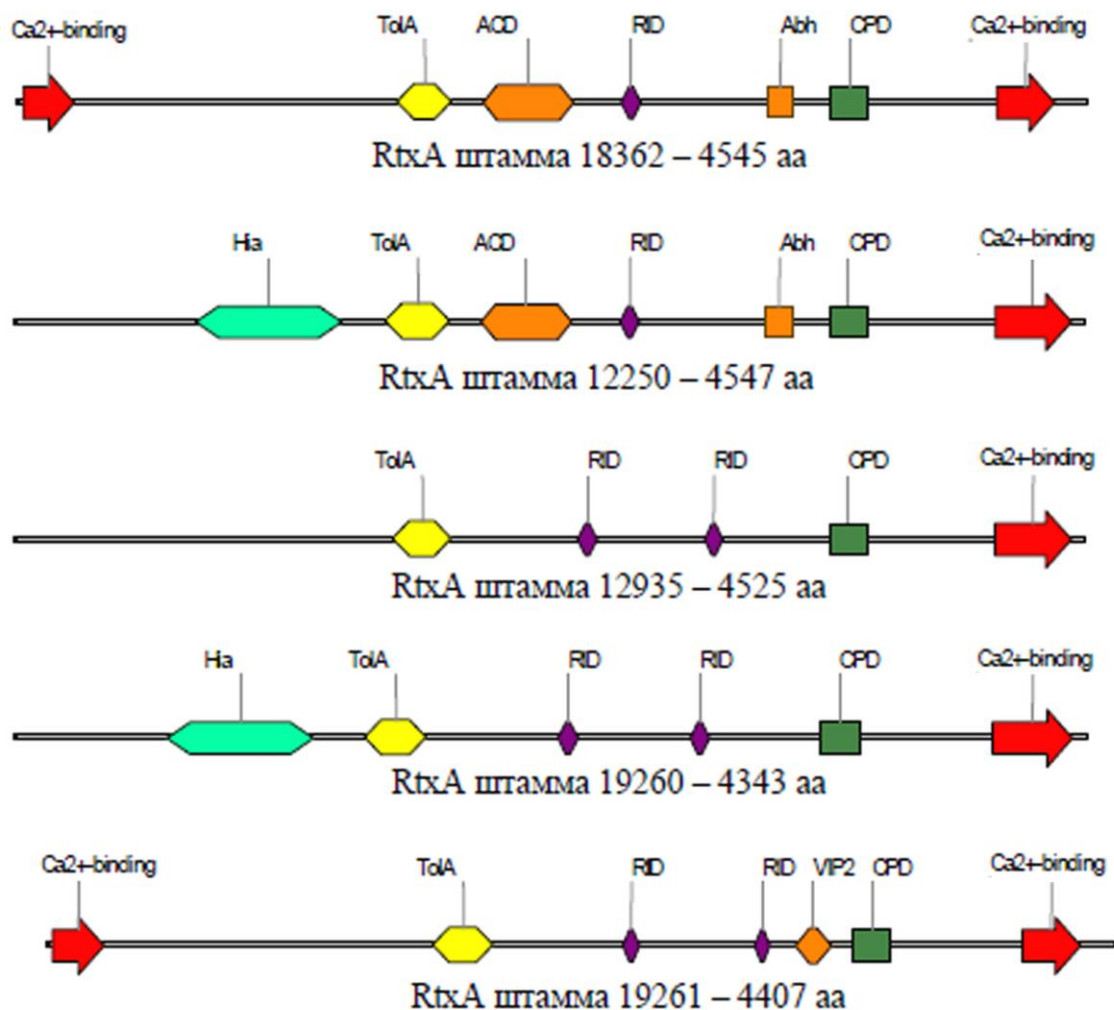


Рисунок 2. Домены в RtxA разных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139.

Домены ACD, RID, CPD, Abh, VIP2 и Hia описаны в тексте; Ca<sup>2+</sup>-binding и TolA, функции которых в MARTX не установлены, показаны для дополнения общей картины локализации доменов.

Результаты Blastp-анализа показали, что белки всех 13 штаммов первой группы сохранили все характерные для MARTX домены, хотя и не полностью идентичные прототипу. Это свидетельствует в пользу возможности проявления ими актино модулирующей активности, кроме MARTX штамма 19093, потерявшего 516 С-концевых аа. Это заключение следует из того факта, что MARTX некоторых геновариантов *V. cholerae* O1 (продукт аллеля в *rtxA4*), укороченный всего на 12 аа, несмотря на сохранение интактных доменов полностью утрачивает биологическую активность по отношению к эукариотическим клеткам [3]. У штамма 12250 также сформировался новый домен Hia, ранее не выявленный у холерных вибрионов (рис. 2). Такой домен характерен для поверхностных белков, в частности, для адгезинов иерсиний и моракселл (факторов патогенности) и сходных с ними белков множества других бактерий, выделяемых как из клинического материала, так и из объектов окружающей среды, что послужило основанием для предположения об их значимости как факторов

адаптации к разным экологическим нишам [4].

В молекулах RtxA всех 7 штаммов второй группы отсутствовал ACD и появился второй RID. Утрата ACD свидетельствует в пользу соответствующей потери типичной для MARTX активности; смысл формирования второго RID неясен, хотя в прототипном белке он сдвигает равновесие между F- и G-актином (соответственно полимерной и мономерной формы) в пользу последнего, который затем ковалентно связывается, что делает процесс деполимеризации необратимым [5]. С другой стороны, не исключено, что и в отсутствие ACD этот сдвиг может привести хотя бы к временному обездвиживанию клеток-мишеней, способствуя развитию патологического процесса. Кроме того, у одного из штаммов этой группы (19260) идентифицирован вышеупомянутый домен Hia, у другого (19261) – домен VIP2 (рис.2) – один из выявленных Dolores J., Sachell K.J.F. [3] в RtxA штамма HE-09, выделенного из внешней среды на Гаити (2010 г.). Авторы полагают, что мишенью этого токсина являются липиды мембран. Он также имеет высокий уровень гомологии с токсином VIP2 (АДФ-рибозилтрансферазой) *Bacillus cereus* – модификатором G-актина. Мы провели дополнительный Blastp-анализ RtxA HE-09 (EGS58021) и обнаружили, что он содержит такие же домены, как идентифицированные у штамма 19161, с очень сходной локализацией, даже несмотря на то, что существенно усечен с N-конца аналогично RtxA штамма 19260, но на дендрограмме сгруппировался с RtxA 19161, хотя и был значительно короче.

Таким образом, белки RtxA нетоксигенных *V. cholerae* не O1/не O139 крайне вариабельны, хотя часть из них, вероятно, сохраняет активомодулирующую активность. Другая же часть, возможно, приобретает иные свойства, характерные для факторов патогенности либо персистенции. Полученные нами данные позволяют лишь сделать предположения на этот счет и требуют экспериментальной проверки. Однако присутствие сходных по своей структуре детерминант в геномах штаммов, выделенных в разное время на разных территориях, указывает на неслучайный характер их формирования и сохранения. Мы также не исключаем, что отдельные штаммы «специально» укорачивают эти гены с сохранением функций их продуктов или без сохранения (как это имеет место у геновариантов, содержащих аллель *rtxA4* [3]) либо полностью выключают синтез высокомолекулярного токсина в целях энергосбережения и используют для реализации патогенетического потенциала другие факторы, продукция которых требует меньших энергетических затрат.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Монахова Е.В. и др. Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп как возбудители кишечных инфекций в Ростовской области и республике Калмыкия // Актуал. вопросы инф. патологии: Матер. международ. форума специалистов с заседанием



профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» МЗ РФ. – Краснодар, 2016. – С. 25-27.

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

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

4. Hoiczky E., Roggenkamp A., Reichenbecher M. et al. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins // EMBO J. – 2000. – Vol.19, No.22. – P.5989-5999.

5. Kudryashov D.S., Durer Z.A.O., Ytterberg A.J. et al. Connecting actin monomers by iso-peptide bond is a toxicity mechanism of the *Vibrio cholerae* MARTX toxin // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2008. – Vol.105, No.47. – P. 18537-18542.

\*\*\*

## **INDEL-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ В 2014-2017 ГОДАХ**

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

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

Возбудитель холеры продолжает оставаться актуальной проблемой общественного здравоохранения практически для всех стран мира. Несмотря на все усилия специалистов, в нашей стране ежегодно регистрируются выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды. Вместе с тем, эпидемиологическое расследование на современном уровне случаев выделения культур невозможно без методов, позволяющих проводить внутривидовое типирование возбудителей и выявлять индивидуальные особенности отдельных штаммов.

В связи с этим, цель настоящего исследования состояла в изучении штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России в 2014-2017 годах по распределению INDEL-маркеров.

### **Материалы и методы**

В работе использовано 173 штамма *Vibrio cholerae* O1, выделенных в



период 2014-2017 годов и поступивших в Референс-центр по холере. INDEL-типирование с использованием девяти локусов проводили по методике, описанной ранее (Водопьянов А.С., 2017).

Вариабельность оценивали с помощью индекса разнообразия Симпсона (diversity index, DI), рассчитываемого по формуле (Simpson E.H., 1949):

$$DI = 1 - \sum (\text{частота аллели}^2),$$

Кластерный анализ и построение дендрограммы проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Для построения дендрограммы использовали программу MEGA 5 (Tamura K., 2011).

### **Результаты и обсуждение**

На основе проведенного INDEL-типирования все штаммы холерного вибриона распределились между 34 генотипами. По результатам кластерного анализа все генотипы сгруппированы в 8 кластеров, обозначенных буквами с «А» по «Н» (рисунок 1).

При анализе дендрограммы установлено, что кластер G представлен исключительно штаммами холерного вибриона, содержащими ген токсинорегулируемых пилей, хотя изученные INDEL-маркеры не сцеплены с генами кластера *tcp*. Это подтверждает высказанное ранее предположение, что *tcpA*<sup>+</sup> штаммы составляют отдельный кластер, четко дискриминирующийся от *ctx*- *tcpA*<sup>-</sup> штаммов (Водопьянов А.С., 2015). Одним из объяснений этому может быть независимое происхождение популяции апилированных атоксигенных штаммов.

Интересные особенности выявлены при анализе вариабельности *ctxAB*<sup>-</sup>, *tcpA*<sup>-</sup> штаммов, выделенных на разных территориях (рисунок 2). Так для ряда регионов (Ростовская область, Республика Калмыкия, Приморский край) характерно высокое генетическое разнообразие выделяемых культур, что проявляется циркуляцией штаммов, принадлежащих к различным INDEL-кластерам. В противовес этому, в ряде регионов циркулируют штаммы, принадлежащие преимущественно к одному INDEL-кластеру. Например, все штаммы изолированные в Забайкальском крае принадлежали к кластеру А (два близкородственных генотипа А5 и А6), в Республике Крым – кластеру Е.

Важное значение имеют повторные выделения штаммов одного и того же INDEL-генотипа. Так, например, в Забайкальском крае в 2017 году были выделены штаммы с генотипом А5, которые уже выделялись и в предыдущие годы. Аналогичная ситуация наблюдается и в Ростовской и Иркутской областях, что может объясняться сохранением данных штаммов в природе в течение нескольких лет. И, наоборот, в ряде случаев выделяются штаммы, существенно отличающиеся по INDEL-маркерам от штаммов, циркулировавших ранее. Сюда можно отнести штамм генотипа Е2, выделенный в Иркутской области в 2017 году и штамм с генотипом Е1 в

Ростовской области. На наш взгляд, выделение таких штаммов можно расценивать как случаи завоза из других регионов.

Таким образом, в ходе проведенной работы проведено INDEL-генотипирование штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории России в период 2014-2017 годов. Сделано предположение, что INDEL-типирование способно выявлять завозные случаи выделения штаммов холерных вибрионов из окружающей среды, однако это требует дальнейшего изучения.

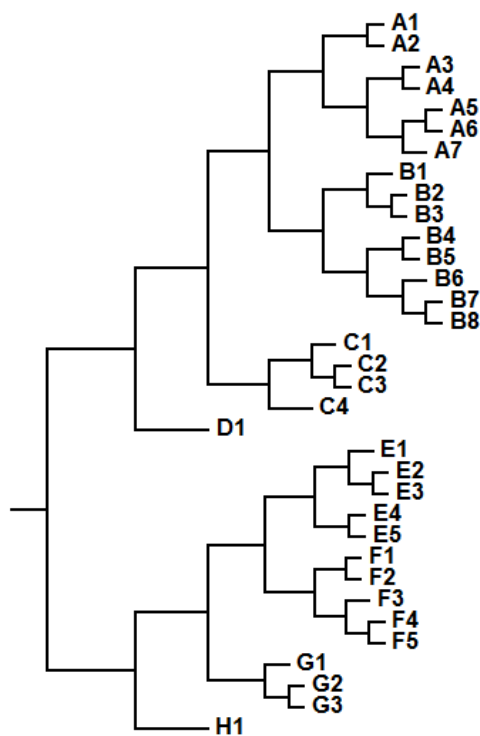


Рисунок 1. Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа распределения аллелей 9 INDEL-локусов.

Регион	Вариаб.	Год	Генотипы
Забайкальский край	0.04	2014	A6
		2015	A5
		2016	A5
		2017	A5
Иркутская область	0.62	2014	A6
		2015	A5
		2017	A4 A5 E2
Калининградская область	0	2014	A6
Краснодарский край	0	2015	E2
Приморский край	0.69	2014	A6 C4
		2016	A4
		2017	A4 B2
Псковская область	0	2014	A6
Республика Бурятия	0.5	2016	A5
		2017	B1
Республика Калмыкия	0.87	2014	B5 B7 B8 C2 C3 D1 E5 F2 F3 F4 F5 H1
		2015	A4 A5 B8 G2
		2016	A2 A4 B4 C1 C2 F1 F4
		2017	A1 A3 A4 A5 B4 B8 C1 F4 G2
Республика Коми	0	2016	G1
Республика Крым	0.37	2014	E3
		2016	E4
Ростовская область	0.75	2014	F4 F5
		2015	B3 G3
		2016	A4 F4 G3
		2017	E1
Рязанская область	0	2014	A7
Свердловская область	0.48	2016	A4 B6
		2017	A4
Татарстан	0	2016	A5
Хабаровский край	0	2016	G1
Челябинская область	0.5	2015	E2
		2016	F4

Рисунок 2. Распределение генотипов штаммов холерного вибриона по регионам Российской Федерации.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Simpson E.H. Measurement of diversity // Nature (London). – 1949. - Vol. 163, № 4148. – P. 668.
2. Tamura K., Peterson D., Peterson N. et al. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods // Molecular Biology and Evolution. – 2011. – Vol. 28. – P. 2731-2739.
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 (266). - 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.

\*\*\*

## **РАЗРАБОТКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ДЛЯ ПОИСКА МАЛЫХ РНК И ИХ МИШЕНЕЙ У *VIBRIO CHOLERAЕ***

Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Сорокин Р.А.,  
Захаров М.В., Симакова Д.И., Олейников И.П., Сорокин В.М.

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

Одними из важнейших функциональных элементов прокариотической клетки являются молекулы РНК. В частности, экспрессия генов зависит от наличия или отсутствия ряда малых РНК, которые служат своеобразным регулятором синтеза тех или иных белков. Согласно данным литературы некоторые из Hfq ассоциированных малых РНК прямо или косвенно участвуют в регуляции вирулентности холерного вибриона (Bejerano-Sagie M., 2007; Dalia A.V., 2014).

В ходе работы нами были получены транскриптомы трех штаммов *V. cholerae* O1 (569В tcp+/ctx+, 5879 tcp+/ctx+, 20000 tcp-/ctx-) на пяти питательных средах (синказная, триптоновая, синтетическая, Аki, LB).

Цель настоящего исследования состояла в поиске потенциальных мишеней выявленных малых РНК и, соответственно, выявление РНК, способных оказать влияние на экспрессию холерного токсина.

### **Материалы и методы**

Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы FastQC (Andrews S., 2010). Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы Trimmomatic (Bolger A.M., 2014) и Lighter (Song, L., 2014). Анализ транскриптома проводили с помощью программ TopHat (Trapnell C., 2009) и Bowtie (Langmead B, 2009). Количественный анализ экспрессии генов проводили по показателю FPKM (fragments per kilobase per million mapped reads) рассчитываемому по алгоритму Cufflinks (Trapnell C, 2010). Авторское программное обеспечение для обработки данных разрабатывали на языках программирования Java и Python.

### **Результаты и обсуждение**

В ходе изучения транскриптомов штаммов путем их сравнения нами были обнаружены 46 нетранслируемых последовательностей потенциальных

малых РНК, не описанные ранее. Указанные последовательности были характерны только для токсигенных штаммов *V.cholerae* классического и E1Tor биотипов (569В и 5879, соответственно) и отсутствовали у атоксигенного штамма *V.cholerae* O1 №20000. Из этих 46 нетранслируемых последовательностей выявлены 8 потенциальных малых РНК, характерных только для биотипа E1Tor.

Традиционно для сравнения последовательностей используют два вида выравнивания – глобальное и локальное. **Глобальное** выравнивание используют при сравнении последовательностей примерно одинакового размера, при этом алгоритм программы производит выравнивание последовательности по всей длине. Данный метод оптимален при сравнении последовательностей малых РНК одинаковой длины или фрагментированных на одинаковые по размеру участки.

В противовес этому, **локальное** выравнивание применяют если одна из последовательностей заведомо меньше – это позволяет найти оптимальное место гибридизации или паринга.

Для поиска мишеней малых РНК мы предлагаем использовать не всю последовательность гена, а его фрагмент, состоящий из 50 нуклеотидов от старт-кодона в обе стороны. На наш взгляд, РНК-блокирование синтеза белка происходит на его ранней стадии (этап инициации). Однако при таком подходе ни глобальное, ни локальное выравнивание не подходят, так как в ряде случаев малая РНК может иметь размер превышающий размер самого фрагмента гена как потенциальной мишени.

Большинство зарубежных авторских программ при поиске места гибридизации малой РНК на последовательности гена-мишени фрагментируют исходные последовательности (и ген, и малая РНК) на короткие участки и проводят выравнивание относительно друг друга. При этом получаемый результат сильно зависит от размера таких последовательностей: чем они меньше – тем больше обнаруживается потенциальных мишеней для малой РНК. При этом, в данном контексте проводимых исследований вопрос об оптимальном размере фрагментов остается открытым. Однако мы считаем такой подход сомнительным, ибо размер совпадающего участка может быть от 5-7 до 20-30 нуклеотидов. И выбирая какой-то фиксированный размер, мы заведомо увеличиваем погрешность, что приводит к фатальному накоплению ошибок.

На наш взгляд, одним из путей решения этой проблемы может являться использование полу-глобального выравнивания (Daily J., 2016). Для этой цели нами была разработана программа «RNA Target 1.0» для поиска мишеней малой РНК с использованием указанного алгоритма.

Следующим этапом работы был поиск мишеней для обнаруженных нами ранее потенциальных малых РНК. В качестве мишени были выбраны гены холерогена. В ходе биоинформационного анализа с применением выбранного алгоритма нам удалось выявить две малых РНК, потенциально

способных влиять на продукцию холерогена. Так РНК, обозначенная как 348\_class\_ElTor, по нашим данным, способна гибридизоваться с геном stxB в непосредственной близости от старт-кодона, что может влиять на посадку рибосомы и, соответственно ингибировать экспрессию (рисунок 1). Сходная ситуация наблюдается при взаимодействии РНК 215\_cls\_ElTor с геном большой субъединицы холерного токсина (рисунок 2)

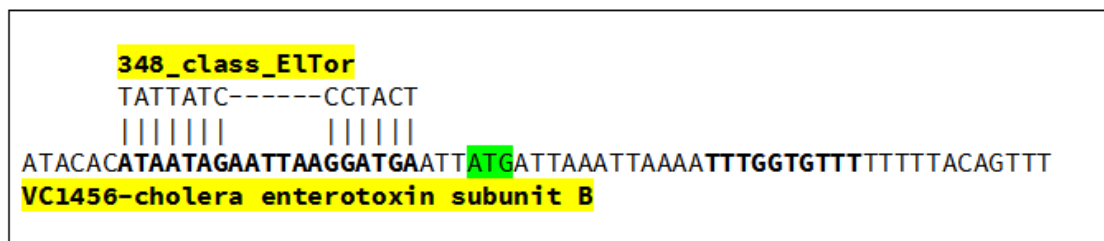


Рисунок 1 – место гибридизации малой РНК на мРНК гена stxB, найденное с помощью программы «RNA Target 1.0».

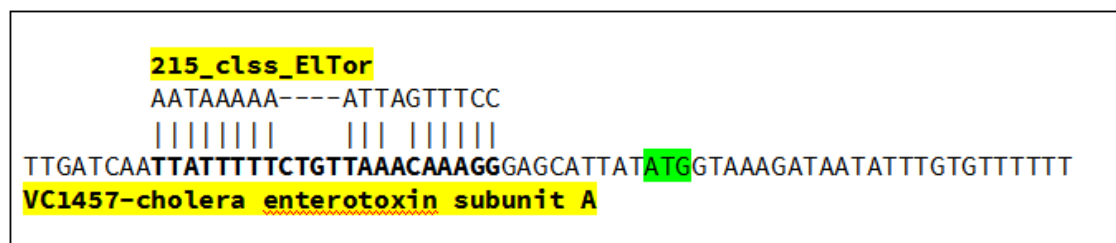


Рисунок 2 - место гибридизации РНК 215\_cls\_ElTor на мРНК гена stxB, найденное с помощью программы «RNA Target 1.0».

Таким образом, в ходе проведенной работы нами разработано программное обеспечение, позволяющее выявлять мишени малых РНК, используя алгоритм полу-глобального выравнивания. Это позволило выявить две потенциальные малые РНК, способные изменять экспрессию генов холерного токсина.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Писанов Р. В., Водопьянов А. С., Симакова Д. И. Роль малых РНК в контроле экспрессии генов, вовлеченных в реализацию патогенности *Vibrio cholerae* //Проблемы ООИ. - 2017. - №. 2. - С. 36-39.
2. Bejerano-Sagie M., Xavier K. B. The role of small RNAs in quorum sensing //Current opinion in microbiology. - 2007. - Vol. 10, №. 2. - P. 189-198.
3. Dalia A. B., Lazinski D. W., Camilli A. Identification of a membrane-bound transcriptional regulator that links chitin and natural competence in *Vibrio cholerae* //MBio. – 2014. – Vol. 5., №. 1. – P. 01028-13.
4. Trapnell, C., Pachter, L. & Salzberg, S.L. TopHat: discovering splice

junctions with RNA-seq. *Bioinformatics* 25. – 2009. – Vol. 25. – P. 105–1111.

5. Langmead B., Trapnell C., Pop M., Salzberg S.L.. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome // *Genome Biology*. – 2009. – Vol. 10. – P. 25.

6. Andrews S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

7. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data // *Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 30, № 15. – P. 2114–2120.

8. Song, L., Florea, L. and Langmead, B., Lighter: Fast and Memory-efficient Sequencing Error Correction without Counting // *Genome Biol.* – 2014. – Vol.15, № 11. – P. 509.

9. Trapnell C., Williams B., Pertea G. et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation // *Nature Biotechnology*. - 2010, doi:10.1038/nbt.1621.

10. Daily J. Parasail: SIMD C library for global, semi-global, and local pairwise sequence alignments // *BMC Bioinformatics*. – 2016. Feb 10;17:81. doi: 10.1186/s12859-016-0930-z.

\*\*\*

## **ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМА ТОКСИГЕННОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬ ТОР 31, ВЫДЕЛЕННОГО В Г. МАРИУПОЛЕ В 2011 Г.**

Васильева О.В., Савельев В.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А.,  
Писаренко С.В., Тихонов С.Н., Куличенко А.Н.

*ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ставрополь*

За период с мая по август 2011 года в г. Мариуполе зарегистрировано 33 случая заболеваний холерой и 25 вибрионосителей. С фекалиями больных (носителей) возбудитель попал в городскую централизованную канализационную систему г. Мариуполя, выгребные ямы, ливневую канализацию, затем в реки Кальчик, Кальмиус и Азовское море. Развитию вспышки способствовали интенсивные дождевые осадки, подтопления частных канализационных колодцев, несанкционированные сбросы сточных вод. Заражение людей происходило при отлове, разделке и употреблении в пищу рыбы, а также при купании в море и питье необеззараженной воды из рек [1]. Предположительно эпидемически опасные штаммы завезли туристы,

вернувшиеся в 2011 г. на Украину из Гаити, Доминиканской республики и Африки, где в это время наблюдались эпидемии холеры [2].

**Цель работы** – полногеномное секвенирование ДНК штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор 31 и биоинформационный анализ полученных нуклеотидных последовательностей мобильных генетических элементов (СТХφ, VSP-1, VSP-2, SXT).

**Материалы и методы.** Исследование возбудителя проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07 М. 2007 «Лабораторная диагностика холеры», полногеномное секвенирование выполняли на генетическом анализаторе модели Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием соответствующих фрагментных библиотек (shot-gun). Выделение ДНК штаммов для получения геномных библиотек проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК бактерий ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit («Invitrogen», США) по стандартному протоколу в соответствии с МУ 1.3.2569-09. Оценку качества первичных данных проводили с помощью программы FastQC. С целью фильтрации данных, содержащих нуклеотиды с низким качеством прочтения, риды были обработаны в программе Trimmomatic. Из дальнейшего анализа были удалены низкокачественные риды со средним значением баллов качества  $Q < 15$ . Сборку *de novo* проводили с использованием программного обеспечения SPAdes v 3.1.0. Функциональную аннотацию геномных последовательностей осуществляли с использованием ресурсов «Rapid Annotations using Subsystems Technology (RAST)» и «NCBI GenBank Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP)». Полученные последовательности изучаемых генов сравнивали с последовательностями, представленными в GenBank для референс-штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор N16961 и *V. cholerae* O395 классического биовара. Полногеномная последовательность штамма *V. cholerae* биовар Эль Тор депонирована в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank: LJFF00000000.

При изучении фенотипических свойств штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор 31 установлено, что он относится к O1 серологической группе, серовару Огава. При определении гемолитической активности по Грейгу штамм не лизировал эритроциты барана. Биоварспецифические тесты показали, что штамм лизировался в диагностическом рабочем титре холерным фагом Эль Тор, был резистентен к классическому фагу, образовывал ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра, устойчив к 50ЕД полимиксина, а также агглютинировал эритроциты морской свинки. На основании этих данных штамм отнесен к биовару Эль Тор. Определение чувствительности к антимикробным препаратам показало, что изучаемый штамм чувствителен к испытуемым антибиотикам тетрациклину, левомицетину, доксициклину, ципрофлоксацину, гентамицину.

В течение седьмой пандемии, самой продолжительной из известных, возбудитель холеры с высокой частотой претерпевает генетические изменения, наиболее значимые из которых затронули ключевые гены



патогенности, а именно изменение в структуре генома профага СТХф несущего структурные гены *ctxA* и *ctxB*, кодирующие биосинтез холерного токсина. В 1991 году появились генетически измененные варианты *V. cholerae* Эль Тор несущие в геноме профага СТХф ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*) [7]. Современный период развития 7-й пандемии холеры характеризуется дальнейшим изменением генома *V. cholerae* биовара Эль Тор, что выражается в появлении дополнительной мутации в гене *ctxB*. При исследовании нуклеотидной последовательности гена *ctxB* штамма *V. cholerae* биовара 31 установлено, что в позициях 115 и 203 присутствует цитозин, что характерно для классических холерных вибрионов [7], кроме того была обнаружена дополнительная мутация - замена цитозина на аденин в положении 58. Такие геноварианты были обнаружены впервые 2007 г. в Индии в Ориссе. Новый аллель гена *ctxB* был обозначен как *ctxB7* –Orissa variant. Присутствие дополнительной мутации в гене *ctxB* указывает на генетическое сходство изучаемого штамма с высокопатогенными вариантами возбудителя холеры, обнаруженными в Индии и на Гаити [9].

Помимо разной нуклеотидной последовательности гена *ctxB*, измененные варианты могут содержать различные аллели фагового гена *rstR*: *rstR<sup>class</sup>* и *rstR<sup>EI</sup>*. В СТХф штамма 31 имеется Эль Тор аллель гена *rstR*. Это означает содержание в его геноме гибридного профага СТХф<sup>hybr</sup> (*rstR<sup>eltor</sup>* / *ctxB7*) [8].

Принимая во внимание тот факт, что геноварианты могут отличаться по структуре генома острова патогенности VPI-1 и острова пандемичности VSP-II, мы изучили структуру этих мобильных элементов. В первую очередь была определена нуклеотидная последовательность гена *tcpA*, входящего в состав острова патогенности VPI-1. Было показано, что ген *tcpA* содержит однонуклеотидную замену в положении 266 (аденин на гуанин). Эти данные указывают на присутствие в VPI-1 аллеля *tcpA*, который был ранее обнаружен в штамме *V. cholerae* CIRS101, выделенного в Бангладеш в 2002 г., и был обозначен как аллель *tcpET<sup>CIRS</sup>* [6]. Было выявлено, что штаммы измененных вариантов, содержащие *tcpET<sup>CIRS</sup>*, выделены в последние годы в Африке (2008-2010) и Южной Азии (2005-2010). Данный аллель присутствует также в штаммах, изолированных во время эпидемии на территории Гаити в 2010-2011 гг.

Затем мы изучили вариабельность острова пандемичности VSP-II. К настоящему времени установлено, что VSP-II представляет собой участок ДНК размером 26,9 т.п.н. содержит 30 генов *vc0489-vc0571*, кодирующих различные белки, определяющих уровень адаптации к различным стрессовым факторам. При изучении структуры острова пандемичности, показано наличие протяженной делеции в центральной части острова патогенности VCO495-VCO512. Наличие протяженной делеции в VSP-II в настоящее время принято считать показателем высокого эпидемического потенциала холерных вибрионов. Наличие протяженной делеции в геноме

VSP-II является характерным генетическим признаком измененных вариантов, выделенных в 2004-2012 гг. [4].

В геноме штамма присутствовал мобильный генетический элемент SXT. Этот элемент несет гены резистентности к триметоприму (*dfrA1*), стрептомицину (*strB*), сульфаметоксазолу (*sulII*) [5].

Таким образом, фенотипический и молекулярно-генетический анализ штамма 31 завезенного на территорию Мариуполя в 2011 году, показал, что он относится генетически измененному варианту *V. cholerae* биовара Эль Тор, содержит в геноме гибридный профаг СТХφ с аллелем гена *ctxB7* и геном *rstR* Эль Тор типа, измененный остров патогенности с аллелем *tcpET*<sup>CIRS</sup>, а также измененный остров пандемичности с протяженной делецией.

Эти данные свидетельствуют о том, что генетическая организация штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор 31, выделенным на острове Гаити в 2010-2011 г., соответствует штаммам, циркулирующих в Индии.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Хайтович, О.Б. Біологічні властивості холерних вібріонів, виділені на території України у 2011 році. / О.Б. Хайтович, Ю.О. Ильичев, Н.Н. Пидченко и др. // Інформаційно-аналітичне повідомлення // Державний заклад «Українська протичумна станція» Міністерства охорони здоров'я Україна.– Сімферополь, 2012. – 18 с.
2. Хайтович, О.Б. Салах холери у місті Маріуполь у 2011 році / О.Б. Хайтович, М.К. Шварсалон, О.Л. Павленко и др. // Інфекційні хвороби. – 2011. – № 1.– С. 10–14.
3. Челдышова, Н.Б. Молекулярно-генетические свойства штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, циркулирующих на африканском континенте / Н.Б. Челдышова, Н.И. Смирнова, С.П. Заднова и др. // Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. – 2017. – № 1. – С. 12–19.
4. Grim, C.J. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seven pandemic VSP-I island and a new variant / C.J. Grim, J. Choi, J. Chun et al. // OMICS. – 2010. –Vol. 14. - P. 1-7.
5. Hochhut, B. Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139 / B. Hochhut, J. Marrero, M. K. Waldor // J. Bacteriol. – 2000. – Vol. 182, N 7. – P. 2043-2047.
6. Nair, G.B. Cholerae due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh / G.B. Nair, F. Qadri, J. Holmgren, S. Nusrin, D. Murphy, C. Nicol et al. // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 4211–4213.
7. Nair, G.B. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhes in Bangladesh. / G.B. Nair // J. Clin. Microbiol. – 2002. - Vol. 4. - P. 3296-3299.

8. Safa, A. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes / A. Safa, N.A. Bhuiyan, S. Nursin et al. // J. Med. Microbiol. – 2006. – Vol. 55. – P. 1563–1569.

9. Son, M.S. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes / M.S. Son, C.J. Megli, G. Kovacicova et al. // J. Clin. Microbiol. – 2011. - Vol. 49. - P. 3739-3749.

\*\*\*

## **РАЗРАБОТКА МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ ИНТЕГРАЗ БАКТЕРИОФАГОВ ПРИ ПОМОЩИ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ**

Погожова М. П., Водопьянов А. С., Гаевская Н. Е., Водопьянов С. О.,  
Писанов Р. В., Романова Л. В., Тюрина А. В., Кочеткова А. О.

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

Вирулентность бактериофагов играет большую роль в их селекции для использования в составе лечебных и профилактических препаратов или средств деконтаминации, поскольку воздействие умеренных бактериофагов на культуру фагочувствительных бактериальных клеток приводит к ее частичной лизогенизации, результатом которой является образование фагорезистентных вариантов. По этой причине в состав биопрепаратов важно подбирать наиболее вирулентные бактериофаги [1].

К настоящему времени подтверждение вирулентности или умеренности бактериофага осуществляют в ходе выявления генов, кодирующих интегразы. Интегразы представляют собой ферменты, которые осуществляют однонаправленную сайт-специфическую рекомбинацию между двумя последовательностями распознавания ДНК, сайтом присоединения фагов – *attP* и сайтом бактериального присоединения – *attB* [2]. Интегразы бактериофагов классифицируются на два семейства: тирозиновые рекомбиназы и репликазы серина [2]. Поскольку интеграция ДНК является необходимым процессом для лизогена, по мнению некоторых авторов, гены интеграз должны быть сходными для умеренных фагов [2]. Исходя из опытов других ученых, консервативные последовательности у умеренных фагов отсутствуют, что затрудняет разработку молекулярных методов их обнаружения [3]. Более того, существуют умеренные фаги, которые вообще не кодируют гена интегразы. Таким является нитевидный фаг СТХф, который интегрируется в геном *Vibrio cholerae*. Интеграция СТХф зависит от рекомбиназ, кодируемых хозяином XerC и XerD [4, 5]. Профаг также может передаваться вертикально в виде внехромосмных репликонов

без интеграции в геном хозяина [6, 7, 8, 9]. Таким примером является P1-подобный фаг энтеробактерий [3].

Фаги идентифицируют как вирулентные только если у них нет гена интегразы. На данный момент для проверки этого используется полногеномное секвенирование. Однако известен более простой подход – выявление генов интегразы при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный метод уже использовался в Ливерпульском университете (Великобритания) на умеренных бактериофагах энтеробактерий [3].

Цель нашего исследования состоит в получении и анализе генов интеграз холерных бактериофагов и разработке метода их выявления с помощью ПЦР.

На первом этапе работы нужно было получить данные о нуклеотидных последовательностях генов интеграз, встречающихся у фагов. В базе данных GenBank было найдено 214 последовательностей.

Второй этап работы заключался в выявлении среди них уникальных последовательностей, то есть создании базы данных различных интеграз. Для этого все интегразы были сравнены друг с другом используя алгоритм локального выравнивания Смита-Ватермана. При этом последовательность считали уникальной если она отличалась от уже имеющихся в базе данных более чем на 15%. По итогам этого этапа работы была создана база интеграз, содержащая 106 последовательностей.

На третьем этапе работы проведен кластерный анализ этих интеграз. Последовательности нужно было сгруппировать друг с другом по схожести и на каждую группу сконструировать праймеры для ПЦР. Однако данная идея провалилась, потому что все интегразы довольно разные и сгруппировать их сложно. Делать праймеры для их выявления не имеет смысла. Таким образом, у нас появилась общая база интеграз.

Далее нами был выбран более простой путь: для работы использованы не все фаговые интегразы, а интегразы, которые есть только у *Vibrio phage*. Таковых обнаружили 55 штук. После сравнения их друг с другом в базе было оставлено только 14 уникальных интеграз. Кластерный анализ (рисунок 1) показал, что их тоже тяжело группировать друг с другом. Таким образом, для выявления 55 интеграз сделаны 14 пар праймеров. Это целесообразно для создания маркеров, определяющих вирулентность бактериофага.

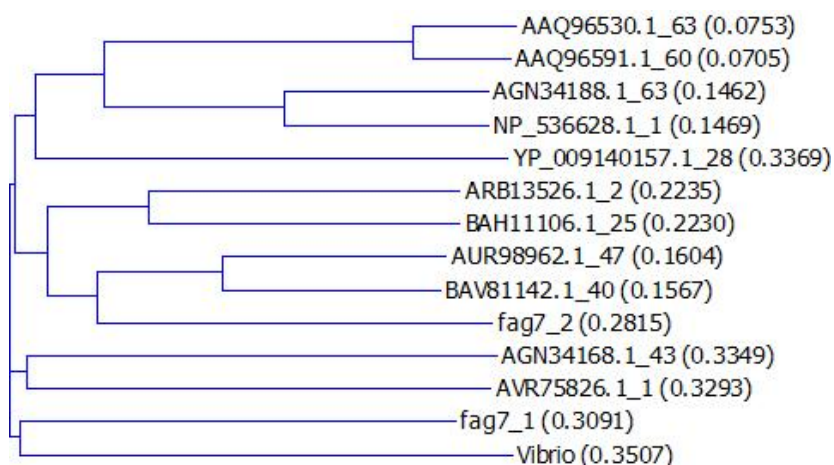


Рисунок 1 – дендрограмма, построенная на основе кластерного анализа интеграз *Vibrio phage*.

Таким образом, были созданы праймеры для полимеразной цепной реакции, с помощью которых удастся обнаружить гены интеграз у *Vibrio phage*. В настоящее время праймеры проходят апробацию на коллекции бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Викторов Д.А., Васильев Д.А., Золотухин С.Н. и др. Разработка методики дифференцирования умеренных и вирулентных бактериофагов // Бактериофаги: теоретические и практические аспекты применения в медицине, ветеринарии и пищевой промышленности: Материалы междунаро. науч.-практ. конф. – Ульяновск, 2013. – Т. 1. – С.32-37.
2. Amy C. Groth, Michele P. Calos. Phage Integrases: Biology and Applications // J. of Mol. Biology. – 2004. – Vol. 335 (3). – P. 667-678.
3. Balding C., Bromley S. A., Pickup R. W., Saunders J. R. Diversity of phage integrases in *Enterobacteriaceae*: development of markers for environmental analysis of temperate phages // Environmental Microbiology. – 2005. – Vol. 7, № 10. – P. 1558–1567.
4. Huber, K.E., Waldor, M.K. Filamentous phage integration requires the host recombinases XerC and XerD // Nature. – 2002. – Vol. 417. - P. 656–659.
5. McLeod, S.M., Waldor, M.K. Characterization of XerC- and XerD-dependent CTX phage integration in *Vibrio cholerae* // MolMicrobiol. – 2004. – Vol. 54. - P. 935–947.
6. Ikeda, H., Tomizawa, J.I. Prophage P1, an extrachromosomal replication unit // Cold Spring Harbor Symp Quant Biol. – 1968. – Vol. 33. - P. 791–798.

7. Ravin, V.K., Shulga, M.G. Evidence for extrachromosomal location of prophage N15 // *Virology*. -1970. – Vol. 40. - P. 800–805.
8. Inal, J.M., Karunakaran, K. V. phi20, a temperate bacteriophage isolated from *Bacillus anthracis* exists as a plasmidial prophage // *CurrMicrobiol.* - 1996. – Vol. 32. - P.171–175.
9. Saint Girons, I., Bourhy, P., Ottone, C. et al. The LE1 bacteriophage replicates as a plasmid within *Leptospira biflexa*: construction of an *L. biflexa*–*Escherichia coli* shuttle vector // *J. Bacteriol.* – 2000. – Vol. 182. – P. 5700–5705.

\*\*\*

## ИММУНОЛОГИЯ

### ВЛИЯНИЕ ИММУНОМОДУЛЯТОРОВ НА РАЗВИТИЕ ГЕНЕРАЛИЗОВАННОЙ ФОРМЫ ХОЛЕРЫ У ВАКЦИНИРОВАННЫХ БЕЛЫХ МЫШЕЙ

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

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

В настоящее время ведется активный поиск препаратов, способных, во-первых, усилить иммуногенное действие современных вакцин, особенно у лиц с вторичными иммунодефицитами, а во-вторых, направить развитие иммунного ответа по гуморальному или клеточному типу в зависимости от свойств патогена [11]. В практической медицине уже используется несколько вакцин, в составе которых присутствуют иммуномодуляторы. Полиоксидоний включен в поливакцину для терапии и профилактики хронической герпетической инфекции, вызванной вирусами простого герпеса 1 и 2 групп (ВПГ1 и ВПГ2), и в субъединичную гриппозную вакцину «Гриппол». Другая поливакцина против ВПГ1 и ВПГ2 под названием «Витагерпавак» содержит гиалуронат натрия [4, 5, 9].

Кроме этого показано, что включение в схему вакцинации препаратов цитокинов и различных иммуномодуляторов обеспечивает развитие полноценного иммунного ответа на различные вакцины и повышает их иммунологическую безопасность [1, 2, 6, 7, 10, 13, 14].

Целью работы явилась оценка влияния разных по происхождению иммуномодуляторов (полиоксидония и дерината) на развитие генерализованной формы холеры у белых мышей, вакцинированных таблетированной холерной бивалентной химической вакциной (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора).

#### **Материалы и методы**

Учитывая, что препараты для повышения эффективности специфической профилактики холеры должны обладать комплексным иммуномодулирующим действием как на системный, так и на местный иммунитет, мы остановили свой выбор на полиоксидонии и деринате. Полиоксидоний (азоксимера бромид) (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) — (сополимер N-окси-1,4-этиленпиперазина и N-карбокси-1,4-этиленпиперазин бромида) стимулирует продукцию антител, фагоцитоз, восстанавливает иммунные реакции при вторичных иммунодефицитных

состояниях, увеличивает резистентность организма в отношении локальных и генерализованных инфекций, обладает противовоспалительным действием и т.д. Деринат (дезоксирибонуклеинат натрия) (ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия) - натриевая соль дезоксирибонуклеиновой кислоты, повышает сопротивляемость к вирусным, грибковым, бактериальным инфекциям, а также стимулирует репаративные процессы на слизистых оболочках.

Перед пероральной иммунизацией беспородных белых мышей (весом 18-20 г) однократно поили 5% раствором пищевой соды (по 0,1 мл) для снижения повреждающего действия желудочного сока на противохолерную вакцину. Прививочную дозу таблетированной холерной бивалентной химической вакцины и иммунопрепаратов рассчитывали согласно весу мышей, исходя из человекодоз, рекомендованных производителями. Иммуномодуляторы вводили животным однократно сразу после вакцинации.

Через месяц после вакцинации животных заражали внутрибрюшинно агаризованной культурой вирулентного штамма *Vibrio cholerae cholerae* 569B. Модель генерализованной формы холеры у мышей используется длительное время для определения иммуногенности вакцин и для оценки эффективности антибиотиков при холере [8]. О развитии генерализованной инфекции у белых мышей судили по количеству павших животных на третьи сутки после заражения при 100% гибели контрольных (интактных) мышей в течение суток.

Статистический анализ материалов осуществляли с помощью таблиц для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала [3, 12]. Определяли значения доверительных интервалов (L) среднеарифметического (M) для уровня достоверности (P) 95%.

### **Результаты и обсуждение**

Результаты экспериментов по оценке влияния иммуномодуляторов на способность вакцины предотвращать генерализованную форму холеры показали, что из группы вакцинированных животных, получавших полиоксидоний, выжили  $90 \pm 6,7\%$  мышей. У животных из группы с деринатом генерализованная холера не развилась у  $80 \pm 4,1\%$  мышей, что статистически не отличалось от количества выживших в группе вакцинированных животных без иммуномодуляторов ( $70 \pm 5,5\%$ ). Интактные мыши контрольной группы полностью погибли (табл.).

Таким образом, способность полиоксидония достоверно увеличивать процент выживших вакцинированных белых мышей, заражённых агаризованной культурой холерных вибрионов, свидетельствует об эффективности сочетанного применения этого иммуномодулятора и таблетированной холерной бивалентной химической вакцины.



Таблица. Оценка влияния иммуномодуляторов на развитие генерализованной формы холеры у вакцинированных белых мышей

Группы животных:	Количество зараженных животных	Количество выживших животных после заражения <i>V. cholerae cholerae 569B</i>	Протективность %
контрольные	30	0	-
вакцинированные	30	21±1,65	70±5,5
вакцинированные +полиоксидоний	30	27±2,0	90±6,7
вакцинированные + деринат	30	24±1,23	80±4,1

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова Н.Н., Симбирцев А.С., Долгушин И.И. Влияние бестима и беталейкина на иммунный статус больных с вторичными иммунодефицитными состояниями при вакцинации против вирусного гепатита В // Цитокины и воспаление. - 2004. – Т.3, №4. – С. 29-35.
2. Авдеева Ж.И., Акользина С.Е., Алпатова Н.А. и др. Влияние цитокинов на иммуногенные свойства вакцины против клещевого энцефалита // Цитокины и воспаление. -2009. – Т.8, №2. – С. 25-29.
3. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М., Медгиз, 1962. - 180 с.
4. Баринский И.Ф., Алибарова Л.М, Лазаренко А.А., Давыдова А.А. Иммуномодуляторы и специфические инактивированные вакцины в экстренной профилактике экспериментальных арбовирусных инфекций // Вопросы вирусологии. – 2013. – Т.58, №4. - С 35.
5. Баринский И.Ф., Алимбарова Л.М., Лазаренко А.А. и др. Вакцины как средство специфической иммунокоррекции при герпетических инфекциях // Вопросы вирусологии. – 2014. –Т. 59, № 1. - С 5 - 11.
6. Демьянова О.Б., Жукова С.Б., Авророва И.В. Иммуностимулирующая активность синтетического дипептида бестима при мелиоидозной инфекции //Матер. X съезда ВНПОЭМП. - Москва, 2012. - Т. 2, № 1, 2. - С. 99-100.
7. Коготкова О.И., Аксёнова Л.Ю., Буравцева Н.П., Ерёменко Е.И. Сочетанное применение в эксперименте сибирязвенной вакцины СТИ-ПР с ликопидом // Мед. микробиол. – XXI век: Матер. Всерос. науч.-практич. конф., Саратов, 2004. – С. 119-120.
8. Вакцинопрофилактика. Основные требования к вакцинным штаммам холерного вибриона: МУ 3.3.1.2075-06.3.3.1. – М., 2006.

9. Пинегин Б.В., Латышева Т.В. Иммунодефицитные состояния: возможности применения иммуномодуляторов // Лечащий врач. – 2001. - № 3. – С. 101 –106.

10. Пономарева Т.С., Дерябин П.Н., Каральник Б.В. Влияние беталейкина на показатели антигенспецифического иммунного ответа в модельных опытах иммунизации животных живой противочумной вакциной // Цитокины и воспаление. - 2014. - Т. 13, № 1. - С.57-62.

11. Симбирцев А.С., Петров А.В., Пигарева Н.В., Николаев А.Т. Новые возможности применения рекомбинантных цитокинов в качестве адъювантов при вакцинации // Биопрепараты. – 2011. – Т. 41, №1. – С. 16- 20.

12. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. – Обнинск, 1980.

13. Чеботарева Т.А., Каряева С.К., Малиновская В.В. и др. Современные возможности повышения эффективности вакцинации против гриппа у детей высокого риска заболеваемости // Иммунология. – 2011. - №3. – С. 146 - 50.

14. Duckett N.S., Olmos S., Durrant D.M., Metzger D.W. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain // Infect. Immun. - 2005. – Vol. 73, № 4 – P. 2306-2311.

\*\*\*

## **СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ВЛИЯНИЯ ПОЛИОКСИДОНИЯ И ДЕРИНАТА НА ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ТАБЛЕТИРОВАННОЙ ХОЛЕРНОЙ БИВАЛЕНТНОЙ ХИМИЧЕСКОЙ ВАКЦИНЫ**

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

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

Одним из подходов к совершенствованию стратегии борьбы с инфекционными болезнями любой этиологии является разработка схем комплексного применения вакцин и различных групп иммунобиологических препаратов - иммуномодуляторов, цитокинов и т.д., способных стимулировать формирование поствакцинального иммунитета [2]. Получены положительные результаты использования иммуномодуляторов для совершенствования специфической профилактики особо опасных инфекций [3-5, 7].

**Целью работы** явилось экспериментальное изучение влияния двух разных по происхождению иммуномодуляторов на протективную активность таблетированной холерной бивалентной химической вакцины (производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора) с целью оценки целесообразности их применения при специфической профилактике холеры.

### **Материалы и методы**

Были выбраны препараты «Полиоксидоний» (азоксимера бромид) (ООО «НПО Петровакс Фарм», Россия) и «Деринат» (дезоксирибонуклеинат натрия) (ЗАО «ФП «Техномедсервис», Россия), так как они обладают комплексным иммуномодулирующим действием на системный и местный иммунитет.

Перед пероральной иммунизацией взрослых кроликов однократно поили 5% раствором пищевой соды по 2 мл для снижения повреждающего действия желудочного сока на противохолерную вакцину. Прививочную дозу вакцины и иммунопрепаратов рассчитывали, исходя из человекодоз, рекомендованных производителями, согласно весу взятых в эксперимент кроликов (1,8-2,0 кг). Иммуномодуляторы вводили однократно сразу после вакцинации.

Способность иммуномодуляторов повышать протективную активность холерной вакцины оценивали, заражая животных в изолированную петлю тонкого кишечника вирулентным штаммом *Vibrio cholerae 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:  $K = \text{объем жидкости} / \text{длину петли}$  ( $K > 1$  свидетельствует о развитии холерогенного эффекта), а также наличию/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 [1, 6]. 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 (контрольных) зараженных кроликов выявлено, что их опытные петли были сильно растянуты и заполнены мутным содержимым, регистрировались кровоизлияния и отек слизистых, что свидетельствовало о развитии холерогенного ( $K = 1,14 \pm 0,06$ ) и энтеропатогенного эффектов (табл. 1).

Результаты заражения вакцинированных животных через месяц после вакцинации продемонстрировали наличие достаточно напряженного поствакцинального иммунитета у 75 % кроликов, у которых отсутствовали

как холерогенный ( $K=0,15\pm0,09$ ), так и энтеропатогенный эффекты. Только у 25% кроликов наблюдались признаки развития заболевания.

У групп вакцинированных животных, получавших иммуномодуляторы, при заражении через месяц не выявлено патоморфологических изменений в опытных петлях тонкого кишечника, то есть энтеропатогенный и холерогенный эффекты отсутствовали в 100% случаев, что свидетельствовало о положительном влиянии иммунопрепаратов на протективные свойства холерной вакцины (см. табл. 1).

Таблица 1. Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов через месяц после вакцинации

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная	100	$1,14\pm0,06$	100	сильная
вакцина	25	$1,1\pm0,08$	0	отсутствует
вакцина полиоксидоний	0	$0,15\pm0,09$	0	отсутствует
вакцина деринат	0	$0,14\pm0,07$	0	отсутствует

Через семь месяцев поствакцинального периода напряженность противохолерного иммунитета у группы вакцинированных кроликов уменьшилась (табл. 2). Протективный эффект вакцины регистрировался только у 25 % животных ( $K=0,19\pm0,04$ ). У 75% кроликов наблюдался как холерогенный, так и слабовыраженный энтеропатогенный эффекты.

Таблица 2. Влияние иммуномодуляторов на наличие/выраженность холерогенного и энтеропатогенного эффектов у взрослых кроликов через семь месяцев после вакцинации

Группы животных:	Наличие/выраженность			
	холерогенного эффекта		энтеропатогенного эффекта	
	% животных	коэффициент растяжения петли (K)	% животных	степень проявления
контрольная	100	$1,18\pm0,06$	100	сильная
вакцина	75	$1,12\pm0,08$	75	слабая
вакцина полиоксидоний	50	$1,04\pm0,02$	0	отсутствует
вакцина деринат	50	$1,06\pm0,04$	50	слабая

Патоморфологическая картина, характерная для холеры, наблюдалась у 50% животных из групп с полиоксидонием ( $K=1,04\pm0,02$ ) и деринатом ( $K=1,06\pm0,04$ ), причем у вакцинированных кроликов, получавших деринат, присутствовал и слабовыраженный энтеропатогенный эффект.

Результаты экспериментов по изучению возможности снижения в два раза рекомендуемой дозы противохолерной вакцины при её сочетанном применении с иммуномодуляторами показали, что деринат и полиоксидоний препятствовали развитию холеры у 50 % вакцинированных сниженной дозой вакцины кроликов ( $K=0,41\pm 0,08$  и  $K=0,22\pm 0,04$ , соответственно). У остальных животных этих групп регистрировались холерогенный и слабовыраженный энтеропатогенный эффекты (табл 3). Следует отметить, что у вакцинированных половинной дозой вакцины животных наблюдалась патогенетическая картина, характерная для холеры: опытные перевязанные петли тонкого кишечника были растянуты и заполнены красноватым средней степени мутности содержимым ( $K=1,12\pm 0,02$ ), наличие отека и кровоизлияний свидетельствовали о развитии энтеропатогенного эффекта.

Таблица 3. Влияние иммуномодуляторов 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	$1,25\pm 0,08$	100	сильная
вакцина	100	$1,12\pm 0,02$	100	средняя
вакцина полиоксидоний	50	$1,08\pm 0,02$	50	слабая
вакцина деринат	50	$1,06\pm 0,04$	50	слабая

Полученные результаты свидетельствуют о том, что иммуномодуляторы достоверно повышают протективные свойства антигенов, входящих в состав химической таблетированной холерной бивалентной вакцины. Учитывая вышеизложенное, можно сделать вывод о том, что повышение эффективности холерной вакцины за счет сочетанного применения ее с иммуномодуляторами, особенно с полиоксидонием, может являться одним из подходов к совершенствованию специфической профилактики холеры.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. М., Медгиз, 1962. - 180 с.
2. Воробьев А.А. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Москва: МИА, 2004. - 690 с.
3. Демьянова О.Б., Жукова С.Б., Авророва И.В. Иммуностимулирующая активность синтетического дипептида бестима при мелиоидозной инфекции //Матер. X съезда ВНПОЭМП. – М., 2012. - Т. 2, № 1, 2. - С. 99-100.

4. Каральник Б.В., Пономарева Т.С. Дерябин П.Н. Влияние иммуномодуляции на иммуногенную и протективную активность живой чумной вакцины // Журн. микробиол. - 2014. - № 6. - С. 108-112.

5. Коготкова О.И., Аксёнова Л.Ю., Буравцева Н.П., Ерёменко Е.И. Сочетанное применение в эксперименте сибиреязвенной вакцины СТИ-ПР с липопидом // Мед. микробиол. – XXI век: Матер. Всерос. науч.-практ. конф. - Саратов, 2004. – С. 119-120.

6. Стрелков Р.Б. Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала. – Обнинск, 1980.

7. Duckett N.S., Olmos S., Durrant D.M., Metzger D.W. Intranasal interleukin-12 treatment for protection against respiratory infection with the *Francisella tularensis* live vaccine strain // Infect. Immun. - 2005. – Vol. 73, № 4. – P. 2306-2311.

\*\*\*

## ДИАГНОСТИКА

### **ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ И ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ (ПГВС)**

Чемисова О.С., Мазрухо А.Б., Харабаджахян Г.Д., Савельева И.К.,  
Каминский Д.И., Сагакянц М.М., Рожков К.К., Ульрих Е.П.

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

Основополагающим фактором в современной диагностике любого инфекционного заболевания бактериальной природы является наличие в арсенале микробиологов специализированных питательных сред для выделения конкретного возбудителя в клиническом материале. Особое значение такие среды приобретают при расшифровке случаев острых кишечных инфекций со сложной верификацией.

Этиологическим фактором ряда острых кишечных инфекций, причину которых зачастую не удается установить, являются паразитические вибрионы (ПГВ) [1]. Вызываемые ими заболевания наиболее распространены на приморских территориях Южного и Дальневосточного федерального округов [2, 3].

Действующими Методическими указаниями при диагностике таких заболеваний предусмотрено использование либо питательных сред для выделения холерного вибриона, либо сред для выделения ПГВ лабораторного изготовления. В Реестре медицинских изделий до настоящего времени отсутствуют зарегистрированные в установленном порядке отечественные питательные среды для селективного выделения ПГВ из клинического материала.

В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора разработана новая питательная среда для выделения и первичной идентификации паразитических вибрионов (ПГВС). Среда предназначена для выделения ПГВ из клинического материала и может быть использована при обследовании объектов окружающей среды, пищевых продуктов. Область её применения – клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. На разработанную среду оформлена нормативная и эксплуатационная документация. Отличительной особенностью среды, кроме селективного выделения ПГВ, является возможность проведения первичной идентификации галофильных вибрионов. Среда прошла успешные межлабораторные комиссионные испытания как на тест-штаммах, так и на широком наборе патогенных

вибрионов из коллекции института. В настоящее время начата процедура государственной регистрации среды ПГВС как изделия медицинского назначения.

Внедрение среды ПГВС в практику здравоохранения будет способствовать повышению эффективности лабораторной диагностики пищевых токсикоинфекций.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Либинзон, А.Е. Этиологическая структура пищевых токсикоинфекций, вызванных морскими галофильными вибрионами / А.Е. Либинзон, З.И. Ус, А.Ф. Нагорная и др. // Журн. микробиол. – 1994. - № 6. – С. 20-21.

2. Маслов, Д. В. Вспышка галофилеза среди населения города Владивостока Приморского края / Д.В. Маслов // Здоровье населения и среда обитания. - 1997. - № 12 (57). - С. 17-21.

3. Рыковская, О.А., *Vibrio parahaemolyticus* серогруппы O3:K6 – возбудитель вспышек пищевой токсикоинфекции в Приморском крае Российской Федерации / О.А. Рыковская, А.Б. Мазрухо, Л.М. Смоликова и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2013. – № 4. – С. 57 – 61.

\*\*\*

## РАЗРАБОТКА ПРЕПАРАТОВ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, O139 СЕРОГРУПП ИММУНОФЕРМЕНТНЫМИ МЕТОДАМИ И ОЦЕНКА ИХ ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ

Евдокимова В.В., Алексеева Л.П.

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

В лабораторной практике давно нашли применение диагностические иммуноферментные тест-системы для детекции возбудителей различных заболеваний. Однако в России в настоящее время не выпускают прошедшие государственную регистрацию иммуноферментные тест-системы для выявления возбудителя холеры. Значительно повысить диагностические показатели иммунобиологических препаратов, в том числе иммуноферментных тест-систем, позволяет использование для их конструирования моноклональных антител (МКА). Особенно привлекательным является вариант dot-ИФА, который относится к числу экспрессных, так как его постановку осуществляют в течение 1,5-2 часов и результаты реакции можно учитывать визуально. Нами проведена работа по



созданию моноклональных пероксидазных конъюгатов (ПХ-МКА) для обнаружения специфических O1- и O139-антигенов холерного вибриона методом ТИФА и дот-иммуноанализа (dot-ИФА).

Для разработки препаратов в первую очередь были получены препаративные количества иммуноглобулинов. Источником МКА служили гибридомы-продуценты, выведенные ранее в нашей лаборатории и постоянно хранящиеся в жидком азоте: 1) РККК (П) 386Д - продуцирует иммуноглобулины класса G, узнающие видоспецифические эпитопы O-антигена *V.cholerae* O1 (МКА-O1); 2) РККК (П) 674Д - продуцирует иммуноглобулины класса M, направленные к детерминантам ЛПС *V. cholerae* O139 (МКА-O139). Было получено несколько серий асцитических (АЖ) и культуральных (КЖ) жидкостей. Для выделения и очистки специфических иммуноглобулинов использовали известный метод осаждения антител - высаливание белков насыщенным раствором сульфата аммония с последующим диализом. При сравнении данных количественного выхода специфических иммуноглобулинов до и после очистки был сделан вывод, что используемый метод позволяет выделять антитела с наименьшими потерями (по белку). Титры очищенных МКА в непрямом ИФА составляли 1:16000-1:32000 (КЖ) и 1:100000-1:200000 (АЖ).

После накопления в препаративных количествах и очистки антител, их конъюгировали с пероксидазой хрена по методу Nakane P.K., Kawaoi A.J. (1974) с модификациями. Были подобраны оптимальные условия конъюгации, а именно молекулярные соотношения Ig и ПХ, а также pH реакционной смеси. Было установлено, что наиболее оптимальным является соотношение ПХ и Ig 1:2, т.к. в этом случае получены конъюгаты ПХ-O1 и ПХ-O139 с рабочим титром, равным 1:128-1:256. По отработанной схеме приготовили экспериментальные образцы (3 серии) моноклональных пероксидазных конъюгатов для выявления *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139 в иммуноферментных методах. Титры ПХ-МКА O1 в зависимости от серии составляют 1:64-1:128, ПХ-МКА O139 - 1:128-1:256. Чувствительность метода прямого ТИФА с использованием пероксидазных конъюгатов находится на уровне  $10^6$  м.к./лунку. Конъюгированные антитела стабилизировали методом лиофильного высушивания, предварительно добавив бычий сывороточный альбумин в концентрации 0,1 %.

Экспериментальные серии лиофильно-высушенных пероксидазных конъюгатов были сформированы в Набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» («Иг - *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА»). На медицинское изделие разработаны нормативные документы (ТУ и Инструкция по применению), утверждённые Учёным советом института (протокол № 10 от 5.12.2016 г.).

Для оценки диагностической значимости моноклональных конъюгатов были проведены лабораторные испытания: специфическую активность

экспериментальных серий препаратов проверяли на музейных штаммах холерных вибрионов O1 (94) и O139 (34) серогрупп, близкородственных (25) и гетерологичных (15) микроорганизмов. Результаты ИФА показали, что из всех исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 с нагрузкой антигена  $10^8$  м.к./лунку при взаимодействии с ПХ-МКА O1 положительная реакция зарегистрирована у 100% штаммов. При нагрузке антигена  $10^6$  м.к./лунку препарат ПХ-МКА O1 выявлял 80 % штаммов *V. cholerae* O1. Препарат ПХ-МКА O139 при взаимодействии с культурами *V. cholerae* O139 с нагрузкой антигена  $10^8$  м.к./лунку выявлял 100% штаммов, и 88 % культур *V. cholerae* O139 - при нагрузке антигена  $10^6$  м.к./лунку. Специфическая активность препаратов подтверждена отрицательной реакцией с RO-штаммами, *V. cholerae* не O1/не O139 и *V. cholerae* O22. На основе результатов лабораторных испытаний составлен и утверждён директором института Акт внедрения Набора реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ИФА и дот-ИФА» № 1041/1-16-10 от 02.09.2016 г.

Несмотря на то, что в настоящее время различные варианты иммуноферментного метода не включены в схему лабораторной диагностики холеры, применение моноклональных пероксидазных конъюгатов в ИФА и дот-ИФА информативно в ходе мониторинга воды поверхностных водоёмов для обнаружения представителей *V. cholerae* O1, O139, поскольку из объектов окружающей среды наряду с типичными выделяют штаммы холерных вибрионов атипичные по серологическим свойствам, в том числе со сниженной агглютинабельностью холерными O-сыворотками.

В работе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора как Референс-центра по мониторингу холеры, используют диагностические препараты на основе МКА: для слайд-агглютинации, прямой иммунофлуоресценции, иммуноферментного анализа, что позволяет повысить специфичность серологических методов и исключить перекрёстную активность с представителями близкородственных, в том числе *V. cholerae* не O1/не O139, и гетерологичных микроорганизмов.

\*\*\*

## **ИСПОЛЬЗОВАНИЕ НАБОРОВ РЕАГЕНТОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ В МОНИТОРИНГЕ ХОЛЕРЫ**

Кретенчук О.Ф., Алексеева Л.П., Ежова М.И., Кругликов В.Д.,  
Чемисова О.С., Яговкин М.Э.

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

С каждым годом моноклональные антитела (МКА) становятся все более популярными в диагностике [4, 7] и терапии различных заболеваний [3, 5]. МКА в силу своей уникальной направленности к индивидуальным антигенным детерминантам позволяют получать высокоспецифичные препараты, отвечающие современным требованиям. Так, в Ростовском-на-Дону противочумном институте была создана коллекция гибридом-производителей МКА, что явилось отправной точкой для разработки диагностических тест-систем для выявления холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в реакции иммунофлуоресценции, слайд-агглютинации, иммуноферментном анализе. В настоящее время российский рынок предъявляет строгие требования к медицинским изделиям, что требует от производителя высокого качества уже на этапе разработки и документального оформления результатов с определением профиля безопасности. В порядке, установленном Правительством Российской Федерации, уполномоченным им федеральным органом исполнительной власти, были зарегистрированы в качестве медицинских изделий два набора реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические флуоресцирующие сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РИФ «Иг - *V. cholerae* O1/O139 – РИФ» и «Иммуноглобулины моноклональные диагностические сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (in vitro) методом РА «ИГ –*V. cholerae* O1/O139 — РА» [6]. Учитывая вышеизложенное, перспективным направлением является использование моноклональных препаратов в процессе мониторинга холеры.

В связи с существующей изменчивостью холерных вибрионов по признаку агглютинабельности [1, 2], при исследовании воды поверхностных водоёмов на наличие возбудителя холеры важным звеном лабораторной диагностики остается дифференциация штаммов *V. cholerae* O1 от *V. cholerae* не O1/не O139. В ходе мониторинга 2017-2018 гг. при исследовании 306 проб воды из стационарных точек ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора была выделена 171 культура *V. cholerae* не O1/не O139 и 1 культура *V. cholerae* O1. В процессе идентификации 75 штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 давали ложноположительный результат в реакции слайд-агглютинации с поликлональной сывороткой, при этом не взаимодействуя с моноклональными препаратами. Положительная реакция с наборами МКА зарегистрирована только в одной пробе (июнь 2018 г.), из которой впоследствии были выделены холерные вибрионы O1 серогруппы. Следует отметить, что наряду с увеличением количества выделенных из водных объектов представителей *V. cholerae* не O1/не O139 с 72 (2017 г.) до 99 (2018 г.), наблюдается и увеличение числа штаммов, взаимодействующих с диагностической лошадиной сывороткой O1 в реакции слайд-агглютинации. Этот факт не исключает возможности диагностических ошибок при проведении исследований на наличие возбудителя холеры лабораториями территориального уровня, что подтверждает необходимость введения либо дополнительного теста дифференциации, например реакции

иммунофлуоресценции, либо высокоспецифичных препаратов. Использование реагентов на основе МКА в реакции иммунофлуоресценции и слайд-агглютинации позволяет исключить ложноположительные результаты, повышая тем самым качество проводимых исследований.

Таким образом, зарегистрированные наборы реагентов «ИГ – *V.cholerae* O1/O139 — РА» и «ИГ - *V. cholerae* O1/O139 – РИФ» перспективны для включения в схему лабораторной диагностики наравне с поликлональными препаратами.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.П. Особенности циркуляции различных по происхождению холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп / Е.П. Авдеева, Б.Л. Мазрухо, Л.Г.Воронежская и др. // Эпидемиология инфекционных болезней. – 2006. - №2. – С. 19-22.

2. Григоренко, Л.В. Особенности агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139, выделенных из воды открытых водоемов / Л.В. Григоренко, В.Д. Кругликов, Э.А. Москвитина и др. // Пробл. комиссия «Холера и патоген. для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону, 2011. – Вып. 24. - С.114 – 117.

3. Деев, С.М. Моноклональные антитела для диагностики и терапии / С.М. Деев // Биотехнология. – 2008. - №2. – С. 3 – 13.

4. Евдокимова, В.В. Изучение диагностических возможностей моноклональных антител, специфичных к мембранному белку возбудителя холеры, в иммуноферментном анализе / В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева, В.П. Зюзина и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. - №3. – С. 45 – 48.

5. Карабельский, А.В. Разработка инновационных препаратов моноклональных антител / А.В. Карабельский, Т.А. Неманкин, А.Б. Утилин и др. // Биотехнология. – 2017. - №1. – С.10 – 29.

6. Кретенчук, О.Ф. Разработка новых препаратов на основе моноклональных антител для диагностики холерных вибрионов O1, O139 серогрупп ускоренными методами: автореф. дис...канд. биол. наук : 03.01.06 / Кретенчук Оксана Федоровна. - Ростов-на-Дону, 2014. – 20 с.

7. Лунева, Н.М. Разработка латексного диагностикума на основе моноклональных антител для идентификации энтерогеморрагической *E.coli* O157 серогруппы / Н.М. Лунева, Р.З. Шайхутдинова, Е.В. Белова, И.Г. Шемякин // Биотехнология. – 2011. - №5. – С. 85 – 92.

\*\*\*

## ИЗУЧЕНИЕ НЕКОТОРЫХ АСПЕКТОВ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ХОЛЕРНОГО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОГО ФАГОВОГО ПРЕПАРАТА *IN VITRO* И *IN VIVO*

Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Кочеткова А.О.

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

Активное распространение холеры в ходе седьмой пандемии требует повышенного внимания специалистов, занимающихся проблемами диагностики, терапии и профилактики этого заболевания [1].

Для элиминации возбудителя из организма больного после проведенного лечения, а также для профилактики вибрионительства холеры ВОЗ рекомендует использовать антибактериальные средства. Однако проведение антибактериальной терапии может вызвать побочные реакции на антибактериальные препараты [2], и привести к неуклонному росту антибиотикорезистентности холерных вибрионов [3].

В связи с этим, актуальны исследования бактериофагов, преимущество которых является способность поражать как чувствительные, так и полиантибиотикорезистентные штаммы возбудителей инфекций [4].

Важной особенностью бактериофагов является возможность использовать фаговые композиции, содержащие несколько фагов разной специфичности для расширения большей зоны литической активности [5].

Для обоснования предлагаемого применения композиции холерных бактериофагов в клинических исследованиях часто используют результаты исследований *in vivo*.

Целью нашей работы было отобрать холерные фаги, перспективные для использования в экспериментально-профилактическом препарате, и изучить некоторые аспекты фармакокинетики данного препарата *in vivo* на модели взрослых кроликов *per os*.

В работу были отобраны три холерных фага из коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, лизирующие вибрионы O1и O139 серогруппы биоваров *Classical* и *El Tor*, из которых создана новая фаговая композиция, в соотношении 1:1:1. Изучение свойств бактериофагов проводили общепринятыми методами (Адамс, 1961). Питательные среды для эксперимента включали бульон Мартена, 0,7 % и 1,5 % агар Мартена (рН 7,7).

При отборе холерных бактериофагов учитывали следующие

показатели: специфичность литического действия в отношении вибрионов, максимально высокая репродуктивная активность, степень лизиса гомологичных бактерий, продолжительность культивирования, скорость размножения, посевные дозы бактерий и фагов.

Перспективными для проведения исследования оказались вирулентные холерные фаги, обладающие высокой литической активностью. Спектр литической активности одного из фагов имеет широкий диапазон, включающий холерные вибрионы биоваров *Classical* (64,6 %) и *El Tor* (56 %). Диапазон литической активности второго фага распространяется только на холерные вибрионы биовара *El Tor*, но в высоком проценте (70 %). Третий бактериофаг обладает высокой литической активностью в отношении *V. cholerae* O139 серогруппы (50 %).

По данным электронно-микроскопического исследования № 1 и № 2 холерные бактериофаги относились к III морфогруппе, холерный фаг № 3 к V морфогруппе (Тихоненко А.С., 1968). Тип 1 и 2 фага относятся к семейству *Podoviridae*, фаг № 3 к семейству *Myoviridae* (Ackerman Н.В., 1987).

В начале нашей работы *in vivo* было отобрано восемь кроликов (2 - 2,5 кг), которые были разделены на четыре группы.

Фаговую смесь вводили перорально в объеме 1 мл один раз в сутки в концентрации  $n \times 10^{-8}$  -  $n \times 10^{-9}$  БОЕ/мл, всем четырём группам:

- первая группа: однократно.
- вторая группа: в течение трёх дней.
- третья группа: в течение пяти дней.
- четвёртая группа: в течение семи дней.

После окончания введения холерного экспериментально-профилактического препарата, производили исследования биоматериала кроликов (кровь, кал, мочу) на наличие в них фаговых частиц препарата.

Схема исследования биоматериала: кровь – два раза в сутки (утро, вечер) в один день после введения, затем один раз в сутки. Испражнения и мочу кроликов отбирали один раз в сутки.

Эксперимент показал, что в первой группе фаговый препарат выделяли из крови в высоком титре фаговых частиц только на вторые сутки после введения, затем титр снижался до нуля. В испражнениях кроликов шло нарастание титра на вторые сутки, в моче диагностировали интенсивное нарастание титра до трёх дней, затем шло постепенное снижение титра в течение пяти суток до нуля.

У второй группы фаговый препарат выделяли из крови только в первые сутки в малом титре, в испражнениях кроликов до двух суток шло нарастание титра (также как в первой группе), в моче нарастание титра происходило на вторые сутки, на третий день фаговый препарат не выделяли.

Фаговые частицы у третьей группы выделяли только в моче в высоком титре до трёх суток, после чего шло резкое снижение титра фагового препарата. У четвёртой группы животных фаговый препарат выделяли в испражнениях в высоком титре только в первые сутки, в моче шло нарастание титра до двух суток, затем произошло резкое снижение титра до нуля.

На основании результатов опытов, проведенных на кроликах следует, что данный препарат, введенный *per os*, поступает в общий ток крови, но в крови не задерживается. Выведение из организма происходит через кишечник и почки. Мы можем предположить, что при наличии в организме холерного вибриона длительность пребывания фагового препарата в организме увеличивается, и может иметь место даже повышение титра бактериофага.

В исследовании показана перспективность разработки холерного экспериментально-профилактического фагового препарата *in vitro* и *in vivo*, которая может оказаться полезной при профилактике заболевания холерой.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов и др. // Вестник РАМН. – 2015. № 70 (2). – С. 249–256.
2. Granowitz, E.V. Antibiotic adverse reactions and drug interactions / E.V. Granowitz, R.V. Brown // Crit Care Clin. – 2008. – Vol. 24. – P. 421–422.
3. Селянская, Н.А. Динамика антибиотикорезистентности холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории РФ в 2012-2016 гг. / Н.А. Селянская, Л.А. Егиазарян, Л.М. Веркина // Актуал. вопр. эпидемиол. микробиол. и диагност. инф. и паразитар. забол. в Рост.обл.: Матер. регион. научн.-практ. конф. – Ростов-на-Дону, 2017. –С. 151-154.
4. Асланов, Б.И. Бактериофаги – эффективные антибактериальные средства в условиях глобальной устойчивости к антибиотикам / Б.И. Асланов // Медицинский совет. – 2015. - № 13. – С. 106-109.
5. Плетенева, Е.А. Новый подход к составлению смесей бактериофагов антибактериальной терапии / Е.А. Плетенева, О.В. Шабурова, М.В. Буркальцева // Журн. микробиол. - 2016. - № 5. – С. 3-11.

\*\*\*

## ОБЗОРНАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ

### АНАЛИТИЧЕСКИЙ ОБЗОР НАУЧНО - ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В 2018 ГОДУ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ»

Щипелева И.А., Марковская Е.И., Титова С.В., Алексеева Л.П.,  
Чемисова О.С., Кретенчук О.Ф.

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

По проблеме 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы» в 2018 г. было выполнено 18 научно-исследовательских работ (НИР). В разработке НИР, посвящённых холере, в 2018 г. приняли участие сотрудники Ростовского-на-Дону, Иркутского, Ставропольского, Волгоградского научно-исследовательских противочумных институтов и Российского НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора; ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Управления Роспотребнадзора и ФБУЗ ЦГиЭ по Ростовской области; ФБУН «Ростовский-на-Дону институт микробиологии, эпидемиологии и паразитологии» Роспотребнадзора.

Научные сотрудники указанных учреждений осуществляют исследования по таким важным направлениям, как: совершенствование эпидемиологического надзора 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; разработка системы внешнего контроля качества при проведении мониторинга холеры; изучение экологии возбудителя холеры и других, патогенных для человека, 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; полногеномное секвенирование бактериофагов патогенных вибрионов; совершенствование лабораторной диагностики холеры на основе новых диагностических технологий, разработка и внедрение новых современных импортозамещающих диагностических препаратов и питательных сред; создание новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов; создание новых эффективных



фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов и профилактики холеры; анализ механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиск способов преодоления резистентности; поиск новых путей оптимизации специфической профилактики холеры; научное обоснование внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на территории РФ.

Несмотря на актуальность изучения фундаментальных основ патогенеза и иммуногенеза холеры и других болезней, вызываемых патогенными вибрионами, разработки данного направления в настоящее время не осуществляются.

По направлению 48.04.01 «Экология вибрионов, эпидемиология холеры и эпиднадзор» осуществляется разработка 7 научных тем, из которых выполнение 6 НИР будет продолжено в 2019 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 учётом чрезвычайных ситуаций различного происхождения» (срок выполнения темы: 2018-2021 гг., руководители НИР: Э.А. Москвитина, С.В. Титова) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Сведения о заболеваемости холерой с систематизацией данных о холере в мире по континентам, регионам, странам и административным территориям, полученные в результате обработки информации с сайтов ProMed, Европейского, Азиатского и других региональных сайтов ВОЗ, сводок ВОЗ (WER), Юнисеф и других, использованы для формирования баз данных «Холера Эль-Тор. Мир», «Холера Эль-Тор. Мир. Административные территории», «Холера Бенгал», «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия». Данными о биологических свойствах холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, полученными в результате идентификации культур, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территории России, пополнена база данных «Холера 1989 - 2014». Посредством внесения паспортных данных на штаммы холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, продолжено формирование базы данных «Холерные вибрионы. Россия». Проведён анализ данных по выделению холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды в субъектах РФ, федеральных округах, по климатогеографическим областям и стационарным точкам выделения. Продолжено формирование ГИС «Эпидемиологический надзор за холерой» с визуализацией данных по выделению холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды в субъектах РФ.

В рамках 200-4-18 «Научное обоснование оптимизации порядка организации, объёма 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 2018 г. получены следующие результаты:

Осуществлён анализ порядка проведения мониторинговых исследований на холеру на территории РФ. Систематизированы данные по оказанию консультативно-методической и практической помощи органам и учреждениям Роспотребнадзора, а также ЛПО в субъектах РФ, связанным с изменениями структуры учреждений Роспотребнадзора, в отношении номенклатуры и объёма исследований, порядка контроля питательных сред и реактивов для лабораторной диагностики холеры, схемы исследования на холеру и идентификации изолированных типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов O1, O139; схем оповещения о выделении штаммов *V. cholerae* O1, O139 различной эпидзначимости, и их передачи для подтверждения. Разработаны предложения по оптимизации организации и проведения мониторинга холеры на территории России в лабораториях различных территориальных уровней в соответствии с Приказом Роспотребнадзора № 1116 от 01.12.2017г. «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации». В 4 квартале будет направлено в Роспотребнадзор информационно-аналитическое письмо «Информационно-аналитическая оценка состояния вопросов организации и проведения лабораторной диагностики холеры, в лабораториях различного уровня в субъектах РФ и предложения по адаптационной переработке МУК 4.2.2870-11 «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровня».

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 2018 г. получены следующие результаты:

Установлена роль температуры среды культивирования в межродовой конкуренции холерных вибрионов и доминирующих видов бактериопланктона поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону в ходе мониторинга и в эксперименте.

Изучено влияние температуры на образование биоплёнки холерными вибрионами на хитиновом панцире речного рака в эксперименте. Проведена трансмиссионная электронная микроскопия биоплёнок *V. cholerae* на хитиновом панцире речного рака. Получена приоритетная справка на изобретение «Способ моделирования биоплёнок, формируемых *V. cholerae* O1 серогруппы на поверхности хитина».

В рамках НИР 013-4-18 «Экологические, эволюционные и

молекулярно-генетические аспекты адаптации и персистенции микроорганизмов рода *Vibrio* в поверхностных водоёмах Сибири и Дальнего Востока» (срок выполнения темы: 2018-2020 гг., руководители НИР: С.В. Балахонов, Л.В. Миронова) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Проведено секвенирование на приборе Illumina 10 штаммов *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, выделенных в разные годы из водоёмов Сибири и Дальнего Востока.

Проведено секвенирование фрагментов двух генов (*cat*, *dnaE*) у 16 штаммов *V. cholerae* R-варианта. Показана высокая степень сходства исследуемых штаммов по последовательностям обоих генов.

Выполнен скрининг наличия кластера SXT у 7 штаммов *V. cholerae*, выделенных во время эпидосложнений от людей и из объектов окружающей среды. Выявлено 3 типа SXT-элементов.

Проанализировано наличие в геноме штаммов O1 серогруппы и R-варианта 35 ключевых генов, обеспечивающих механизмы биоплёнкообразования и “quorum sensing”. У штамма O1 серогруппы присутствуют все гены в сравнении с контрольным штаммом N16961, обнаружены SNP в генах *hapA* и *luxO*, у штаммы R-варианта обнаружено значительное количество SNP в генах биоплёнкообразования и “quorum sensing”, а также делеция генов *vpsC-G*, *vpsI*.

По результатам PFGE-типирования изолированных культур холерного вибриона установлена идентичность *NotI*- генерируемого паттерна рестрикции штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных из р. Ушаковки в 2017 г.

Проведены опыты по энзимоблоттингу ферментов СКЖ штаммов *V. cholerae* O1 569B, *V. cholerae* El Tor O1 129-05-B, И-638, И-680, И-1263 на нитроцеллюлозную мембрану, обработанную хромогенным субстратом N-acetyl benzoyl DL-nitroanilide, указанные штаммы проявили активность в отношении данного хромогенного субстрата. Поставлены эксперименты по оптимизации условий проведения субстратного электрофореза при изучении хитиназ и протеаз холерных вибрионов, статистически достоверно выявлена возможность применения разных детергентов и дистиллированной воды на этапе «отмывки» гелей непосредственно перед инкубацией полиакриламидных гелей, что свидетельствует о наличии у холерных вибрионов детергент-устойчивых протеаз.

В рамках 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) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Создан аннотированный библиографический указатель «Холера и

патогенные для человека вибрионы» за 2017 г., включающий 413 рефератов отечественных и зарубежных источников информации. Продолжается работа по формированию информационно-библиографической базы данных «Холера и патогенные для человека вибрионы».

В рамках 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) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Проведён сбор и анализ данных о международном водном транспорте, прибывающем в территориальные воды РФ в 20 портах 8 субъектов РФ (2015-2017 гг.). Создана ГИС «Мониторинг судовых балластных вод».

Выполнение НИР 180-4-15 «Изучение вибриопейзажа и санитарно-гигиенических характеристик поверхностных водоёмов города Ростова-на-Дону» (срок выполнения темы: 2015-2018 гг., руководители НИР: С.В. Титова, С.О. Водопьянов, Е.В. Ковалев, Г.В. Карпущенко) завершается в 2018 г. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Создана нативная экспериментальная модель мультивидовой биоплёнки, включающая холерные вибрионы, энтеробактерии, и продемонстрирована способность токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, O139 к выживанию в подобных условиях за счет их конкурентных возможностей. Разработаны способы качественной и количественной оценки холерных вибрионов в составе мультивидовых или мультиродовых биоплёнок по числу КОЕ их отпечатков на пластинах агара и с помощью ПЦР.

Патентом на изобретение подтверждён «Способ дифференциации токсигенных и нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы по ингибирующей активности», позволяющий эффективно определять роль вибриофлоры поверхностных водоёмов в сохранении токсигенных холерных вибрионов в объектах окружающей среды.

У токсигенных вибрионов выявлена устойчивость к конкурентной активности гетерологичных организмов и способность формировать биоплёнки на поверхности пластика, т.е. у них есть возможность занять новую экологическую нишу в пластисфере. Что, вполне вероятно, может привести к глобальному распространению вибрионов на частицах пластисферы морскими течениями.

Разработан и апробирован новый способ отбора воды из поверхностных водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов и переносное устройство для его осуществления, подтверждённый патентом на изобретение «Способ отбора воды из поверхностных водоёмов для определения присутствия холерных вибрионов и переносное устройство для

его осуществления». В отличие от рутинного метода забора больших объёмов воды, рекомендованного МУК 4.2.2870-11, лабораторному анализу подвергаются мультивидовые плёнки, образованные на поверхности пробоотборника, в состав которых могут входить и холерные вибрионы. Практическое использование устройства повышает эффективность мониторинга холеры, о чем свидетельствует выделение большего числа культур новым способом по сравнению с традиционным.

Разработана и представлена к регистрации постоянно пополняемая геоинформационная система «Водоёмы г. Ростова-на-Дону», позволяющая проводить сравнительный многофакторный анализ результативности мониторинговых исследований холеры и оценивать эпидемиологическую ситуацию. Широкое изучение свойств штаммов холерных вибрионов позволяет совершенствовать микробиологическую составляющую эпидемиологического надзора за этой инфекцией, как в текущем временном периоде, так и на перспективу.

Впервые разработан «Эпидемиолого-географический атлас Российской-Украинская граница», часть 1 – Реки, предназначенный для обеспечения справочной информацией, необходимой для работы специалистов Роспотребнадзора и здравоохранения. Атлас направлен в территориальные управления для использования в работе.

По направлению 48.04.02 «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов» осуществляется разработка 4 научных тем, выполнение которых будет завершено в 2018 г.

В разработке комплексной НИР 182-4-16 «Молекулярные основы персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов различного происхождения» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководители НИР: Е.В. Монахова, С.В. Балахонов, В.Н. Савельев, Д.А. Ковалев, И.Б. Захарова) приняли участие все противочумные институты. В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Проведён подробный биоинформационный анализ сиквенсов геномов не только свежевыделенных холерогенных штаммов *V. cholerae*, но и ряда нехолерогенных представителей разных серогрупп, вызвавших заболевания людей, а также циркулирующих в объектах окружающей среды в России и бывших республиках СССР. Выявлены родственные связи возбудителей холеры и холероподобных диарей из других регионов мира, в том числе генетически изменённых токсигенных ( $ctxAB^+tcpA^+$ ) клонов *V. cholerae*; нетоксигенных, но содержащих токсинкорегулируемые пили ( $ctxAB^-tcpA^+$ ) штаммов;  $ctxAB^-tcpA^-$  штаммов различных серогрупп, способных вызывать холероподобные заболевания. Впервые определены аллели ряда наиболее значимых генов факторов патогенности / персистенции, присутствующие в популяциях возбудителя, циркулирующих в РФ и на пограничных

территориях, и охарактеризован «отечественный резервуар» этих аллелей, которые могут служить генетическим материалом для формирования новых клонов с повышенным патогенетическим потенциалом. Установлены на молекулярно-генетическом уровне критерии оценки: 1) эпидемического потенциала занесённых на территорию России холерогенных штаммов возбудителей, основанные на структуре генов *ctxB*, *tcpA*, *rtxA* и острова персистенции VSPII; 2) патогенетического потенциала и степени опасности нехолерогенных штаммов разных серогрупп, выделяемых от больных и из объектов окружающей среды, на основе наличия и структуры детерминант дополнительных факторов патогенности – островов VPI и VPI-2, профагов *pre-CTX*, кластеров RTX, контакт-зависимых систем секреции T3SS и T6SS, генов цитотонического фактора Cef, cholix-токсина (*chxA*), сериновой протеазы (VC1649), гемолизинов; 3) вероятности сохранения штаммов обеих групп в объектах окружающей среды и их распространения на территории РФ с учётом присутствия интактных генов факторов жизнеобеспечения и конкурентоспособности, таких как входящие в состав *nan-nag*-области острова VPI-2, кластеров генов, определяющих синтез маннозочувствительных пилей (*msh*), экзополисахарида (*vps*), генов протеазы PrtV, белков наружной мембраны (*omp*).

На основании SNP-профилирования впервые установлено происхождение и пути заноса штаммов при эпидосложнениях на территорию Сибири и Дальнего Востока. Изучена структура и локализация кластера CTX и RS1 области у токсигенных штаммов *V. cholerae*, показана вариабельность организации указанных мобильных генетических элементов, согласующаяся с принадлежностью патогена к волнам глобального распространения пандемии. Выявлены закономерности трансформации генотипа холерного вибриона при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды. Определены особенности организации комплекса генов домашнего хозяйства *ctxAB<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup> V. cholerae*. Определены спектры антибиотикоустойчивости у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, изучена структура кластера SXT-элемента у 4 эпидемически опасных штаммов, выделенных при эпидосложнениях в 90-е гг. XX века от людей; обнаружены генетические детерминанты антибиотикорезистентности у галофильных вибрионов. Получены данные о наличии гидролазной, хитозаназной, липолитической, лецитиназной, муциназной, РНК-азной и протеазной активности культуральных фильтратов токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*.

Впервые проведён анализ распространенности ICE в штаммах *V. cholerae* O1, O139 и не O1/O139, выделенных в различных регионах РФ за более чем 40 лет. Впервые исследовано разнообразие генов резистентности к антибактериальным препаратам, локализованных в вариабельных последовательностях горячих точек HS3, HS5 и вариабельного региона VRIII ICE штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ. Впервые проведён скрининг на наличие интегративных конъюгативных

элементов штаммов *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области.

Разработана новая программа GeneGraph для биоинформационного анализа. Пополнена база данных "Астролябия", доступная на сайте <http://astrolab.antiplague.ru/>. Сформирована коллекция эталонных штаммов, несущих определенные аллели генов, делеции островов патогенности и персистенции, для сравнительных научных исследований, проведена их паспортизация. Разработан алгоритм анализа для полногеномного SNP-типирования и сформирована база данных однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) штаммов *V. cholerae*.

Выявление ICE и определение набора генов резистентности к антибактериальным препаратам в вариабельной ДНК элемента в горячих точках HS3, HS5 и вариабельном регионе VRIII может быть дополнением к схеме молекулярного типирования штаммов холерных вибрионов для определения клонального характера вспышки заболевания при проведении эпидемиологического расследования.

Во ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в 2018 г. завершается работа над НИР 47-4-14 «Молекулярно-генетический анализ механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор в современный период 7-ой пандемии холеры» (срок выполнения темы: 2014-2018 гг., руководитель НИР: Н.И. Смирнова). В рамках данной НИР авторами представлены следующие результаты:

Проведена оценка вариабельности участков генома, связанных с патогенностью и адаптацией к меняющимся условиям окружающей среды, у различных природных типичных и генетически изменённых (атипичных) штаммов *V. cholerae* O1. Проведено полногеномное секвенирование 48 штаммов, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на территории РФ и Украины (1970-2014 гг.). При анализе полных геномов типичных и генетически изменённых штаммов *V. cholerae* показано генетическое разнообразие геновариантов, обусловленное вариабельностью профага СТХ, острова патогенности VPI-1, острова пандемичности VSP-II и кластера *msh* генов. Представлена динамика изменения структуры генома геновариантов в результате горизонтального переноса генов и возникновения различных типов мутаций. Анализ 55 секвенированных и представленных в GenBank нетоксигенных штаммов позволил разделить их на три группы, отличающиеся от токсигенных и между собой по составу мобильных элементов с генами патогенности и эпидемичности. По мнению авторов, нетоксигенные штаммы, выявленные на территории РФ, независимо от генотипа являются эпидемически безопасными. В модельных экспериментах доказана возможность возникновения геновариантов из типичных штаммов в результате конъюгационного переноса классического профага СТХφ в последние. Разработан алгоритм определения экспрессии генов вирулентности и жизнеобеспечения на уровне транскрипции в штаммах *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флюоресцентным учётом

результатов в режиме реального времени. Изучена экспрессия регуляторных генов *aphA*, *rpoS*, *hapR* в типичных штаммах и штаммах геновариантов. Установлено, что у геновариантов экспрессия гена *rpoS* в 1,8-9,15 раз выше. Создан штамм кишечной палочки - продуцент токсин-корегулируемых пилей адгезии возбудителя холеры. Сконструирован авирулентный штамм *V. cholerae* - продуцент иммуногенной В-субъединицы холерного токсина. Разработан новый способ дифференциации нетоксигенных штаммов с разной эпидемической значимостью.

В рамках завершаемой НИР 171-4-14 «Изучение транс-кодируемых малых РНК, ассоциированных с белком Hfq, *Vibrio cholerae* O1 серогрупп» (срок выполнения темы: 2014-2018 гг., руководитель НИР: Р.В. Писанов) авторами представлены следующие результаты:

Изучена возможность профилирования и сравнительного анализа штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы по малым РНК и информационным РНК. Подобраны 11 штаммов-продуцентов холерного токсина *V. cholerae* O1, проведено их полногеномное секвенирование. Получена специфическая поликлональная кроличья сыворотка к холерогену. Создан полимерный латексный диагностикум для оценки токсинопродукции *in vitro* штаммов *V. cholerae*. Создана плаزمида pHfq2.21 в составе которой клонирован ген *hfq* *V. cholerae* O1 и подобраны условия его экспрессии в *E. coli*. Разработан метод выделения основного пула малых и информационных РНК из клеток *V. cholerae*, исключающий присутствие ДНК без применения ферментативного разрушения. Отработаны методы выделения малых и информационных РНК из *V. cholerae* O1 серогруппы. Подобраны условия для осуществления обратнотранскриптазной цепной реакции полимеразы (ОТ-ПЦР) для генерации кДНКовых библиотек малых РНК из *V. cholerae* O1 серогруппы. Разработаны праймеры для детекции малых РНК *V. cholerae*. Секвенирован основной пул малых и информационных РНК штаммов *V. cholerae* O1. Обнаружены неизвестные ранее малые РНК характерные для токсигенных штаммов *V. cholerae* O1. Создана база данных малых РНК. Осуществлено транскриптомное профилирование штаммов *V. cholerae* O1. Разработан методический подход к профилированию штаммов *V. cholerae* по транскриптому.

В рамках завершаемой НИР 183-4-16 «Экспериментальное обоснование возможных путей преодоления антибиотикоустойчивости у холерных вибрионов» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководитель НИР: Н.А. Селянская) авторами представлены следующие результаты:

Проведён анализ встречаемости маркеров антибиотикорезистентности и их сочетаний на основе антибиотикограмм (значения МПК 13 препаратов) 515 штаммов вибрионов Эль Тор и не O1 / не O139, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территории РФ в 2007-2017 гг.

Разработанные и зарегистрированные база данных «Фенотипы антибиотикорезистентности холерных вибрионов различных серогрупп,



выделенных на территории Ростовской области» и ГИС «Антибиотикорезистентность холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации (2005-2016 гг.)» содержат сведения о чувствительности / устойчивости к антибактериальным препаратам штаммов *V. cholerae El Tor*, O139, non O1 / O139 различной эпидзначимости, выделенных от людей и из водных объектов, и предназначены для хранения и анализа антибиотикорезистентности холерных вибрионов, выделенных на данной территории, как в конкретный период времени, так и в динамике.

Проведён анализ данных полногеномного секвенирования около 500 штаммов *V. cholerae* на наличие генов антибиотикорезистентности. В NCBI GenBank депонированы нуклеотидные последовательности штамма *V. cholerae El Tor* 18963, содержащего «молчащий» ген, ответственный за продукцию  $\beta$ -лактамазы.

Определены наиболее эффективные в отношении множественноустойчивых штаммов возбудителя холеры комбинации антибактериальных препаратов и неантибактериальных средств с антибиотиками и предложен способ повышения чувствительности холерных вибрионов к антибактериальным препаратам. Показана эффективность пектина в отношении холерных вибрионов различных серогрупп и образованных ими биоплёнок. Подобраны фаги, эффективные при профилактическом применении и лечении холерной инфекции у белых мышей.

По направлению 48.04.04 «Разработка современных медико-иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами» осуществляется разработка 6 научных тем, из которых – выполнение 5 НИР будет продолжено в 2019 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 2018 г. получены следующие результаты:

Подготовлен аналитический обзор по состоянию внутрилабораторного и внешнего контроля качества микробиологической диагностики холеры в современных условиях, анализ возможных источников ошибок при проведении лабораторной диагностики холеры.

Подобраны тест-штаммы *V. cholerae*, охарактеризованные по комплексу генетических детерминант, для контроля лабораторной диагностики.

Собрана и систематизирована информация обо всех питательных средах различного назначения отечественного и импортного производства (как зарегистрированных в установленном порядке, так и не имеющих в

данный момент регистрационного удостоверения), а также лабораторного изготовления, используемых на этапах лабораторной диагностики холеры. Проведён анализ доступных эксплуатационных документов на применяемые в РФ питательные среды для выделения, культивирования и идентификации холерного вибриона с целью определения соответствия критериев контроля качества требованиям действующих нормативных документов МУ 3.3.22124-06 и МУК 4.2.2316-08. Проведены сравнительные испытания образцов зарегистрированных в установленном порядке и применяемых в РФ агаризованных (щелочных агаров) и жидких накопительных (основных пептонов) питательных сред для выделения и культивирования *V. cholerae* с оценкой их биологических показателей. Проведено сравнительное изучение эффективности применения сред различных производителей в модельных опытах. Разработан и экспериментально проверен дополнительный показатель, характеризующий качество жидких накопительных питательных сред: число колоний, выросших при посеве 6 часовых бульонных культур на агаровые пластинки при различных исходных посевных дозах.

В рамках 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) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

В иммунохимических методах оценена специфическая активность моно- и поликлональных антител к холерному токсину. Холерный токсин получен в препаративных количествах. Проведена его очистка, изучена биологическая и иммунохимическая активность. Отработаны отдельные этапы технологической схемы конъюгации пероксидазы хрена с поликлональными антителами.

В рамках 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) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Изготовлены экспериментальные серии усовершенствованного холерного бактериофага Эль Тор. Серии проходят испытания на музейных и штаммах холерных вибрионов, полученных в процессе мониторинга холеры. Полный геном фага Ростов-1 зарегистрирован в международной базе Genbank (NCBI).

В рамках 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) авторами в 2018 г. получены следующие результаты:

Завершена оптимизация состава и разработка технологии изготовления комплексной питательной среды для выделения и первичной идентификации

парагемолитических вибрионов (ПГВС). Отработаны элементы фасовки и упаковки препарата. Разработаны методы контроля среды по физико-химическим и биологическим показателям. Изготовлены три экспериментальные серии среды ПГВС. Проведены их квалификационные испытания, испытания стабильности, валидация среды сравнения, валидация стерилизации. Оформлены технические условия и инструкция по применению комплексной питательной среды для выделения и первичной идентификации парагемолитических вибрионов. Проведены межлабораторные комиссионные испытания разработанной питательной среды ПГВС на соответствие требованиям нормативной документации с использованием штаммов парагемолитических вибрионов из коллекции музея живых культур института, включая тест-штаммы. По результатам данных испытаний получено положительное заключение.

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 2018 г. получены следующие результаты:

Проведена оптимизация состава разрабатываемой питательной среды. Найдены оптимальные концентрации питательной основы, сахарозы, аргинина. Подобрана оптимальная индикаторная система – бромтимоловый синий-крезоловый красный. Подобран буферный компонент, препятствующий интенсивному закислению среды вследствие ферментации сахарозы. Определены основные физико-химические и биологические показатели, характеризующие среду, тест-штаммы. Изготовлены три экспериментальные серии питательной среды для проведения авторских лабораторных испытаний. Проведены авторские лабораторные испытания, показавшие, что разработанная среда позволяет наглядно дифференцировать штаммы холерного вибриона от всех взятых в исследование сахарозопозитивных штаммов – представителей рода *Aeromonas*.

Выполнение НИР 185-4-16 «Повышение иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бивалентной химической вакцины с помощью разных по происхождению иммуномодуляторов у экспериментальных животных» (срок выполнения темы: 2016-2018 гг., руководитель НИР: И.А. Иванова) завершается в 2018 г. В рамках данной НИР авторами получены следующие результаты:

Оценена эффективность и целесообразность применения иммуномодуляторов для совершенствования специфической профилактики холеры. Впервые изучено влияние разных по происхождению иммуномодуляторов на иммуногенные и протективные свойства холерной вакцины, а также на функциональную активность эффекторов системного и местного клеточного и гуморального иммунного ответа у вакцинированных различными дозами вакцины животных. Получены новые данные, свидетельствующие о стимулирующем действии иммуномодуляторов на различные звенья противохолерного иммунитета. Впервые показано, что

иммуномодуляторы повышают иммуногенные свойства антигенов, входящих в состав химической таблетированной холерной бивалентной вакцины, как в начальные, так и отдаленные сроки поствакцинального периода. Оценена эффективность и целесообразность применения полиоксидония, дерината, ликопида для совершенствования специфической профилактики холеры. Предложена наиболее эффективная схема, позволяющая усилить протективную активность вакцины с помощью иммуномодулятора ликопида на всех этапах формирования поствакцинального иммунитета. Методические рекомендации по способу повышения иммуногенности таблетированной бивалентной противохолерной вакцины направлены производителю вакцины (РосНИПЧИ «Микроб»).

По направлению 48.04.05 «Биологическая безопасность при холере и других заболеваниях, вызываемых патогенными вибрионами. Противодействие биотерроризму» осуществляется разработка 1 НИР.

В рамках НИР 198-4-17 «Внедрение дистанционно-обучающих электронных технологий на очно-заочных курсах повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций Ростовской области по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой» (срок выполнения темы: 2017-2019 гг., руководители НИР: О.С. Бурлакова, А.С. Водопьянов) в 2018 г. авторами получены следующие результаты:

Разработаны нормативные акты по использованию электронного обучения: положение об использовании электронного обучения, инструкция по работе. Создан электронный образовательный ресурс для обеспечения дистанционного образования. Разработано Учебное пособие «Лабораторная диагностика и эпидемиологический надзор за холерой» для дистанционной части курсов повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций. Создан Сборник квалификационных тестов и система тестирования для контроля уровня знаний.

Из 18 НИР, выполняемых по проблеме 48.04 «Холера и патогенные для человека вибрионы», в текущем году завершаются 6 научных тем; работа по выполнению 12 НИР, будет продолжена в 2019 г.; кроме того, к планированию на 2019 г. представлено ещё 5 новых разработок.

\*\*\*

## **ВНЕДРЕНИЕ В ПРАКТИКУ РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ УЧРЕЖДЕНИЙ РОСПОТРЕБНАДЗОРА ПО ТЕМАТИКЕ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» В 2018 ГОДУ**

Марковская Е.И., Щипелева И.А., Титова С.В., Чемисова О.С.,  
Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф.

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

Концепция функционирования системы противочумных учреждений Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия населения до 2020 года разработана в 2016 году и утверждена Руководителем службы А.Ю. Поповой. Реализация Концепции является основой для разработки и исполнения планов работ противочумных учреждений Роспотребнадзора. В разделе «Повышение эффективности научных исследований в области санитарно-эпидемиологического благополучия по особо опасным инфекционным болезням» указаны задачи, касающиеся вопросов внедрения:

- повысить конкурентоспособность отечественной научной продукции на мировом рынке;
- повысить эффективности фундаментальных научных исследований за счёт внедрения результатов в практику;
- обеспечить внедрение современных диагностических, молекулярно-генетических, информационных технологий на всех этапах эпидемиологического надзора за особо опасными инфекциями;
- обеспечить разработку и создание новых методов и средств специфической индикации ПБА, диагностических и лечебных препаратов, технологий производств с целью эффективного внедрения в практику отечественной продукции и импортозамещения.

Эти задачи решает научное сообщество сотрудников всех противочумных институтов Роспотребнадзора, с реализацией научных разработок в рамках запланированной научной тематики, которая была одобрена на заседании проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2017 г.

В ходе выполнения научной тематики в 2018 году получены следующие результаты.

**ФКУЗ Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора**

Раздел «Экология, эпидемиология и эпиднадзор»

Федеральный уровень внедрения

- Информационное письмо «Об эпидемиологической ситуации по холере в 2017 г. и прогноз заболеваемости на 2018 год в мире, странах СНГ и России» направлено в Федеральную службу Роспотребнадзора в I квартале 2018 г.

- Информационные бюллетени «Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и РФ» еженедельно представляются в Роспотребнадзор и параллельно публикуются на сайте Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института.

- Аналитические справки об эпидемиологической обстановке в мире и в России по холере, в которых представлена информация о распространении холеры по континентам и странам мира с анализом эпидемиологической ситуации по холере в России, странах СНГ и мире, а также информация о выделении культур холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в течение года направляются в Роспотребнадзор.

- В стадии подготовки к направлению в Федеральную службу Роспотребнадзора: информационное письмо «Результаты мониторинговых исследований воды поверхностных водоемов РФ в 2018 г.» и информационно-аналитическая справка по анализу состояния организационных вопросов проведения лабораторной диагностики холеры, номенклатуры и объемов исследований в лабораториях различного уровня в субъектах Российской Федерации, на территории которых выделялись холерные вибрионы в период 2012 - 2017 гг.

- Оформлены: заявка на государственную регистрацию ГИС «Водоёмы г. Ростова-на-Дону»; база данных «ГИС мониторинг судовых балластных вод в Российской Федерации»; патент «Способ получения образцов биоплёнок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии»; аннотированный библиографический указатель «Холера и патогенные для человека вибрионы» – справочник (за 2017 год).

Раздел «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов»

Международный уровень внедрения

- Депонированы в NCBI GenBank нуклеотидные последовательности полного генома штамма *V. cholerae* non O1/non O139 под номером PRJNA454192, а также участки геномов, отдельные гены и кластеры холерных вибрионов разных серогрупп для проведения филогенетического анализа, определения резервуара аллелей отдельных генов штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории России и пограничных государств, предсказания возможности экспрессии детерминант факторов патогенности и персистенции.

- Депонирование в NCBI GenBank последовательностей ДНК штамма *V. cholerae* El Tor 75 (18963), содержащего «молчащий» ген, ответственный за продукцию  $\beta$ -лактамазы, может быть полезным в научной работе при изучении генов антибиотикорезистентности.

#### Федеральный уровень внедрения

- Внесены в реестр баз данных с государственной регистрацией ГИС «Антибиотикорезистентность холерных вибрионов Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации (2005-2016 гг.)» и ГИС «Фенотипы антибиотикорезистентности холерных вибрионов различных серогрупп, выделенных на территории Ростовской области».

- Созданы и представлены к государственной регистрации база данных «База потенциально малых РНК *V. cholerae* O1» и база данных «Генетически измененные штаммы холерных вибрионов, циркулирующие на территории РФ».

- Осуществляется внедрение зарегистрированных баз данных «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области» и «Холерные вибрионы не O1/не O139 серогрупп республики Калмыкия» в работу противочумных институтов.

- Приняты к депонированию в ГКПБ «Микроб» 13 штаммов *V. cholerae* разных серогрупп с определенными наборами генетических маркеров.

- Направлены заявки на получение патентов: «Антительный латексный диагностикум для выявления и определения титра холерогена у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1»; «Способ повышения чувствительности холерных вибрионов к антибактериальным препаратам»; «Способ повышения эффективности противохолерной вакцинации в эксперименте».

#### Учрежденческий уровень внедрения

- Подготовлен проект нормативной документации, включающий в себя технические условия и инструкцию по применению на медицинское изделие «Тест-система для диагностики *in vitro* для выявления холерного токсина и оценки уровня токсинопродукции *V. cholerae* серогруппы O1 (Диагностикум ХолПитокс O1)». Тест-система «Диагностикум ХолПитокс O1» предназначена для выявления холерного токсина (качественный анализ) и определения уровня токсинопродукции (полуколичественный анализ) *V. cholerae* O1 с помощью реакции латекс-агглютинации.

- Методические рекомендации по определению титра холерогена у токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 обсуждены на заседании Учёного Совета института и утверждены директором.

Раздел «Разработка современных медико-иммунобиологических препаратов и методов для диагностики, лечения и профилактики холеры и других заболеваний, вызываемых патогенными вибрионами».

Федеральный уровень внедрения

Оформлены и поданы заявки на патенты:

- «Оригинальная рецептура питательной среды для выделения, культивирования и первичной идентификации параземолитических вибрионов»;

- «Способ количественной оптимизации состава разрабатываемой питательной среды и изучения ее свойств».

Раздел «Биологическая безопасность при холере и других заболеваниях, вызываемых патогенными вибрионами. Противодействие биотерроризму».

Учрежденческий уровень внедрения

- Проводится активная работа по внедрению дистанционно-обучающих электронных технологий на очно-заочных курсах повышения квалификации специалистов Роспотребнадзора и лечебно-профилактических организаций Ростовской области по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой.

- До конца года будут разработаны: Положение об использовании дистанционно-обучающих электронных технологий; Инструкция по работе с дистанционно-обучающими электронными технологиями; Учебное пособие, которое представляет собой курс лекций и демонстрационный материал, необходимый для проведения цикла; Сборник квалификационных тестов, для тестирования контроля уровня знаний, как самостоятельно освоенных, так и полученных в процессе обучения.

**ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора**

Раздел «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов».

Международный уровень внедрения

- В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности полных геномов 2-х токсигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Top 20a/11 и 186. Депонировано 5 нетоксигенных ctx-tcpA+ штаммов (M1425, 2613, 2687, 2688, 124) и 4 нетоксигенных ctx-tcpA- штаммов (M1332, 8, 2843, 3178), выделенных на территории РФ от больных или из внешней среды в 1995 г. и 2000-2017 гг.



#### Учрежденческий уровень внедрения

- Подготовлены методические рекомендации «Конструирование штаммов кишечной палочки – продуцентов протективного антигена токсин-корегулируемых пилей адгезии возбудителя холеры».

### **ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора**

#### Раздел «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов»

#### Международный уровень внедрения

- Депонированы полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов *V. cholerae* El Tor И-1501 и 102-16, выделенных из поверхностных водоемов на курируемой территории для проведения углубленного исследования структурной организации отдельных локусов генома, проведения филогенетического и филогеографического анализа.

- Депонированы в GenBank 10 нуклеотидных последовательностей «house-keeping» генов (*recA*, *pgm*, *cat*, *chi*) штаммов холерного вибриона для проведения филогенетического анализа, межлабораторного сопоставления MLST-профилей штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, биоваров и серогрупп, анализа глобального распространения отдельных клонов *Vibrio cholerae*.

#### Учрежденческий уровень внедрения

- Подготовлен проект методических рекомендаций по определению хитинолитической активности методом зимографии.

### **ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора**

#### Раздел «Микробиологические, молекулярно-биологические и генетические аспекты характеристики холерных вибрионов».

#### Международный уровень внедрения.

- Депонирование в GenBank «ICE from *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. Ogawa RND6878».

- Депонирование в GenBank «ICE from *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor str. Inaba RND18826 ICE element, complete sequence».

#### Федеральный уровень внедрения

- Депонирование в ГКПБ «Микроб» штаммов:
- Штамм *V. cholerae* El Tor Ogawa №19243 может быть использован как референтный для определения вариантов ICE типа SXTET.

- Штамм *V. cholerae* non O1/ non O139 № 19190 может быть использован как референтный для определения вариантов ICE типа SXTET.

Актуальность проблемы «Холера и патогенные для человека вибрионы» даёт основания для дальнейших активных научных исследований в данном направлении; получения новых знаний с целью научно-методического сопровождения и практической реализации на территории Российской Федерации комплекса мер по обеспечению биологической безопасности в широком понимании и недопущению возникновения ЧС за счёт обеспечения готовности к проведению индикации и изучения возбудителя холеры, благодаря новым современным методическим подходам, эпидемиологическим расследованиям и совершенствованию информационно-аналитической системы мониторинга.

\*\*\*

# РАЗРАБОТКА СОВРЕМЕННЫХ ДИАГНОСТИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

## НАБОР РЕАГЕНТОВ

### «ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ IN VITRO ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ УРОВНЯ ТОКСИНОПРОДУКЦИИ *VIBRIO CHOLERAЕ* СЕРОГРУППЫ O1 С ПОМОЩЬЮ ЛАТЕКС-АГГЛЮТИНАЦИИ (ДИАГНОСТИКУМ ХОЛПИТОКС O1)»

Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.

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

Тест-система «Диагностикум ХолПитокс O1» предназначена для определения токсинопродукции *Vibrio cholerae* O1 в бульонных культурах при выделении холерных вибрионов O1 серогруппы из объектов внешней среды и от человека в реакции латекс-агглютинации.

Область применения - лабораторная диагностика ООИ, эпидемиология. Тест-система может быть использована в стационарных и мобильных бактериологических лабораториях Центров гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, специализированных учреждений других министерств и ведомств, имеющих право на проведение диагностических исследований на холеру в регламентированном объеме.

Функциональным назначением исследования, выполняемого с помощью тест-системы «Диагностикум ХолПитокс O1», является поддержка диагностики холеры, вызываемой *Vibrio cholerae* серогруппы O1, выявление токсигенных штаммов возбудителя холеры, оценка уровня токсинопродукции при выделении из объектов внешней среды и от человека, мониторинг при выделении и очистке препарата холерного токсина.

Аналитические характеристики, чувствительность и специфичность определены в лабораторных исследованиях на наборе токсигенных и нетоксигенных штаммов холерного вибриона.

Нормативная документация (ТУ и Инструкция по применению) на «Тест-систему для диагностики in vitro для выявления уровня токсинопродукции *Vibrio cholerae* серогруппы O1 с помощью латекс-агглютинации (Диагностикум ХолПитокс O1)» одобрена Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 4 от 26.06.2018 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**НАБОР РЕАГЕНТОВ**  
**«ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВИДА**  
***VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ**  
**ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (REAL-**  
**TIME PCR)»**

Чемисова О.С., Полеева М.В., Трухачев А.Л., Рыковская О.А.

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

Набор предназначен для выявления ДНК патогенных бактерий вида *V. parahaemolyticus* в бактериологическом посеве с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR). Специфичность обусловлена видоспецифическими комплементарными нуклеотидными последовательностями праймеров и зонда.

Набор относится к изделиям медицинского назначения, предназначенным для идентификации *V. parahaemolyticus* in vitro.

Область применения - клиническая микробиологическая диагностика, ветеринария, пищевая микробиология, научные исследования.

Диагностическая ценность набора подтверждена лабораторными испытаниями.

Нормативная документация (ТУ и Инструкция по применению) на набор реагентов «Тест-система для идентификации штаммов вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR)» одобрена Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 12 от 14.12.2017 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**НАБОР РЕАГЕНТОВ**  
**«ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ**  
**ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНОВ ИЗ МАТЕРИАЛА ОТ**  
**ЛЮДЕЙ И ИХ ПЕРВИЧНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ (ПГВС)»**

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

Питательная среда предназначена для выделения параземолитических вибрионов из образцов клинического материала, и может быть использована при обследовании объектов внешней среды и продуктов питания при

проведении микробиологической диагностики пищевых токсикоинфекций *in vitro* с целью поддержки диагностики инфекционных заболеваний, а также выявления источников инфекции, мониторинга объектов окружающей среды.

Возможности среды обусловлены присутствием в ее составе факторов селективности, подавляющих рост сапрофитов, а также наличием варианта среды, не содержащего натрия хлорид, что позволяет идентифицировать вибрионы в тесте галофильности.

Среда ПГВС относится к изделиям медицинского назначения, предназначенным для выделения *V. parahaemolyticus in vitro*.

Область применения – клиническая микробиологическая диагностика, пищевая микробиология, эпидемиология, научные исследования.

Диагностическая ценность питательной среды подтверждена лабораторными испытаниями.

Нормативная документация (ТУ и Инструкция по применению) на Питательную среду для выделения параземолитических вибрионов из материала от людей и их первичной идентификации (ПГВС) одобрена Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.06.2018 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

## АННОТАЦИИ ДИССЕРТАЦИЙ, ЗАЩИЩЕННЫХ ПО ПРОБЛЕМЕ «ХОЛЕРА»

### НАУЧНОЕ ОБОСНОВАНИЕ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ПОДХОДОВ К ИДЕНТИФИКАЦИИ И МОЛЕКУЛЯРНОМУ ТИПИРОВАНИЮ *VIBRIO CHOLERAE* В СИСТЕМЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА

(диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 03.02.03 – микробиология)

Миронова Л.В.

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

Проведена оценка эффективности внедрения молекулярных технологий в систему лабораторной диагностики холеры. Показана информативность применения ПЦР-скрининга детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах объектов окружающей среды. Установлена высокая аналитическая и диагностическая ценность MALDI-ToF масс-спектрометрического определения таксономической принадлежности микроорганизмов рода *Vibrio*.

Установлен завоз на территорию Сибири и Дальнего Востока атипичных генетически измененных клонов возбудителя холеры Эль Тор, несущих классическую аллель гена субъединицы В холерного токсина. С применением разработанной схемы генотипирования установлена дифференциация атипичных вариантов на генотипы, коррелирующие с направлением завоза возбудителя. По результатам полногеномного SNP-типирования показана принадлежность указанных вариантов *V. cholerae* El Tor к кладам второй и третьей волн глобального распространения холеры.

Определена возможность кратковременного закрепления (2-3 года) или длительной персистенции штаммов *V. cholerae* определенных MLVA-профилей в водных экосистемах на отдельных территориях Сибири и Дальнего Востока с трансформацией генотипа и формированием близкородственных однолокусных вариантов холерного вибриона.

Установлена эволюционная дистанцированность *V. cholerae* El Tor разной эпидемической значимости. На основании оценки особенностей организации генов жизнеобеспечения показано, что *ctxAB*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>+</sup> варианты *V. cholerae* из окружающей среды являются самостоятельной клональной линией, демонстрирующей большой уровень гомологии указанных участков генома с эпидемически опасными штаммами холерного вибриона.

Выявлены закономерности адаптационной изменчивости и

трансформации генома *V. cholerae* при воздействии неблагоприятных факторов окружающей среды в эксперименте: показана возможность изменения MLVA- и PFGE-профилей холерного вибриона при сохранении стабильности структуры генов «домашнего хозяйства». Установлено, что большей способностью к генетической изменчивости характеризуются геноварианты вибриона Эль Тор с классической аллелью гена субъединицы В холерного токсина.

Охарактеризованы молекулярно-эпидемиологические механизмы возникновения и развития эпидемических осложнений на неэндемичных территориях Сибири и Дальнего Востока.

Теоретически обоснован комплексный дифференцированный подход к применению молекулярных методов в анализе структуры популяции *V. cholerae*, выяснении закономерностей развития эпидемических осложнений и изучении филогенетической истории возбудителя.

Сформирована и интегрирована в программу MALDI Biotyper 3,0 панель референсных масс-спектров *V. cholerae*, обеспечивающая возможность ускоренной идентификации микроорганизма на основе MALDI-ToF масс-спектрометрии. Разработана схема генотипирования атипичных вариантов *V. cholerae* O1 El Tor по комплексу ассоциированных с патогенностью возбудителя детерминант (*ctxB*, *rstC*, *rstR*, *tbr*, TLC). Усовершенствован алгоритм применения молекулярных методов в системе микробиологического мониторинга холеры.

Разработанные и усовершенствованные подходы к идентификации и молекулярному типированию *V. cholerae* включены в нормативно-методические документы федерального уровня, методические рекомендации учрежденческого уровня. Результаты исследования вошли в три информационных письма, три учебно-методических пособия и три базы данных.

В Государственную коллекцию патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» депонировано пять штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. В международную базу данных GenBank депонировано 184 нуклеотидных последовательности генов и драфт-геномы четырех штаммов *V. cholerae* El Tor.

Научные и практически значимые материалы диссертации включены в лекционные курсы дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Диссертация защищена 20.09.2017 г. на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

\*\*\*

**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО  
МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ  
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ С 1989 Г. ПО 2016 Г.**

(диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.02.03. – микробиология)

Левченко Д.А.

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

В диссертационной работе разработан способ идентификации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor методом ПЦР-генотипирования на основе детекции минимального количества генов-мишеней, который подтвержден положительным решением на выдачу патента «Способ идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант». По результатам ПЦР-анализа, проведенного по набору минимального количества генетических детерминант (14), показана гетерогенность нетоксигенных штаммов *V. cholerae*. С помощью предложенного способа удалось установить у 408 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов 81 генотип, составивший десять кластеров, которые обнаруживаются в водных объектах окружающей среды на территории федеральных округов и субъектов Российской Федерации на протяжении от одного года до нескольких лет.

Создана пополняемая база данных ГИС «Холера 1989 - 2014», которая в 2015 г. интегрирована в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Охарактеризованы штаммы *V. cholerae* O1, O139, поступившие в референс-центр по мониторингу холеры на территории Российской Федерации. Проведен сравнительный анализ фено- и генотипических свойств штаммов *V. cholerae* O1, O139 с учетом количественной динамики и повторяемости выделения (по годам) культур на территории России за 27-летний период во временном и пространственном форматах.

Разработаны методические рекомендации «ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов». Методические рекомендации были внедрены в работу сотрудников лаборатории диагностики ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 02.05.2017 г.) и лабораторию холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 27.04.2017 г.).

Диссертация защищена 18.04.2018 г. в диссертационном совете Д



208.078.02 на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

\*\*\*

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА  
ТОКСИНОПРОДУКЦИЮ И ДРУГИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ  
ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ**

*(диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук  
по специальности 03.02.03. – микробиология)*

Сизова Ю.В.

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

В диссертационной работе показано влияние стрессового воздействия на патогенные, культуральные и персистентные свойства холерных вибрионов O1 серогруппы различной эпидемической значимости. Оценена роль отдельных стрессоров в патогенезе и персистенции возбудителя холеры.

Доказано, что стрессовые факторы, имитирующие воздействие на холерные вибрионы в организме человека, вызывают повышение продукции холерного токсина, что свидетельствует об активации экспрессии генов *ctxAB*, кодирующих основной фактор патогенности, а низкая температура как стрессор, имитирующий условия окружающей среды в речной воде в холодное время года, в течение 1-2 месяцев вызывает снижение продукции холерного токсина вплоть до полной его утраты. При этом изменения активности изучаемых свойств, связанные со стрессовым воздействием, не связаны с утратой генов, кодирующих продукцию холерогена, экзополисахарида, что подтверждено специальными исследованиями в ПЦР на наличие генов *ctxAB*, *tcpA*, *vps*.

В работе показано, что у токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов при персистенции в условиях окружающей среды, сопровождающихся длительной гипоксией, происходит снижение или утрата агглютинабельности холерными сыворотками, что может вызывать затруднения при идентификации выделенных культур.

Изучено влияние стрессового воздействия на свойства, обуславливающие персистентный потенциал холерных вибрионов в опытах, моделирующих условия существования в различных экологических нишах: биопленкообразование, продукцию полиамина кадаверина, антилизоцимную активность. Отработан метод определения полиамина кадаверина холерных вибрионов и получен патент на изобретение RU № 2566558 от 29.09.2015 г.

Утверждены директором методические рекомендации «Методики

создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры».

Диссертация защищена 18.04.2018 г. в диссертационном совете Д 208.078.02 на базе ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора.

\*\*\*

## **АННОТАЦИИ МЕТОДИЧЕСКИХ РЕКОМЕНДАЦИЙ И ИНСТРУКЦИЙ**

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ»**

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Егиазарян Л.А.

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

В методических рекомендациях предлагается способ количественной оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам, который основан на расчёте индексов активности антибактериальных препаратов по специальной, предложенной авторами формуле, позволяющий выбрать наиболее эффективный препарат в отношении конкретного штамма холерного вибриона.

Методические рекомендации предназначены для специалистов лабораторий, имеющих разрешение на работу с возбудителями опасных инфекционных болезней, противочумных станций, противочумных институтов и СПЭБ, изучающих антибиотикочувствительность биоплёнок холерных вибрионов.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 6 от 15.08.2017) и утверждены директором института.

\*\*\*

### **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ВЫДЕЛЕНИЕ ОСНОВНОГО ПУЛА МАЛЫХ РНК И МАТРИЧНЫХ РНК БЕЗ ПРИМЕСИ ДНК ИЗ *VIBRIO CHOLERAE*»**

Иванов С.А., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Сорокин В.М.

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

В настоящих методических рекомендациях описан комплекс

методических приемов, позволяющих получать основной пул матричных РНК и малых РНК без примесей ДНК из *Vibrio cholerae*. В основе метода лежит дифференциальное осаждение биологических полимеров бактериальной клетки за исключением основного пула мРНК и малых РНК. Применение Cellite S35 кремниевой матрицы, имеющей мелкоячеистую структуру, в качестве сорбента позволяет в кислой среде связывать молекулы ДНК и осаждать их из водного раствора. В качестве специфического элюэнта впервые использован 10-12 М раствор LiCl. Данный метод при его практическом использовании позволяет выявлять жизнеспособные формы холерного вибриона и в перспективе изучать экспрессию генов возбудителя.

Методические рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений, изучающих и работающих с малыми и матричными РНК *Vibrio cholerae*.

Методические рекомендации одобрены Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 9 от 19.10.2017 г.) и утверждены директором института.

\*\*\*

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
«ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИОННОГО СРЕДСТВА  
НА ОСНОВЕ ПОЛИГУАНИДИНОВ («БИОПАГ – Д») В ОТНОШЕНИИ  
ИНДИКАТОРНЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ, РЕКОМЕНДОВАННЫХ  
МЕЖДУНАРОДНЫМ СТАНДАРТОМ КАЧЕСТВА СУДОВЫХ  
БАЛЛАСТНЫХ ВОД»**

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

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

На основании полученных экспериментальных данных по бактерицидной активности дезинфекционного средства на основе полигуанидинов («Биопаг–Д») в отношении индикаторных микроорганизмов настоящие рекомендации дают обоснование для его применения при деконтаминации судового балласта. В рекомендациях приводится характеристика действующего химического вещества дезинфекционного средства «Биопаг – Д» и теоретическое обоснование его возможного применения на различных типах судов.

Методические рекомендации предназначены для специалистов  
180

дезинфекционного профиля и специалистов противочумных учреждений.

Одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Протокол № 9 от 19.10.2017 г.) и утверждены директором института.

\*\*\*

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ «ПОЛУЧЕНИЕ МОНОДИСПЕРСНЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МИКРОСФЕР С АЛЬДЕГИДНЫМИ ГРУППАМИ»**

Наркевич А.Н., Шубин Г.Г., Ларионова Л.В., Симакова Д.И., Захаров М.В.,  
Сорокин Р.А.

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

Методические рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений, занимающихся исследованиями в области получения различных иммобилизованных биологических веществ.

В методических рекомендациях описан разработанный в нашем институте способ получения полимерных микросфер с альдегидными группами на основе полиакролеина в условиях одномоментно протекающей анионной и радикальной полимеризации, методы их физико-химической характеристики. В результате химического синтеза получают бесцветные или окрашенные различными красителями полимерные микросферы.

Для проведения синтеза полимерного микросферического носителя в реактор загружают дистиллированную воду, в которую при перемешивании на магнитной мешалке добавляют персульфат калия, поливинилпирролидон и перегнанный акролеин. Далее при перемешивании в реакционную смесь добавляют раствор тетраметилэтилендиамина. Полимеризация начинается в конце добавления инициатора. Окрашенные микросферы получают по описанной рецептуре для бесцветных микросфер, но перед добавлением в реакцию тетраметилэтилендиамина в реакционную смесь добавляют водный раствор красителя. Выход микросфер 65 %, средний диаметр  $2,0 \pm 0,1$  мкм.

Диаметр полимерных микросфер определяют методом электронной трансмиссионной микроскопии. Качественную реакцию на наличие альдегидных групп проводят с использованием реагента Шиффа, взвесь приобретает синюю окраску, интенсивность которой возрастает в течение 2-х часов.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 4 от 26.06.2018 г.) и утверждены директором института.

\*\*\*

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
«ВЫЯВЛЕНИЕ ХОЛЕРНОГО ТОКСИНА И ОЦЕНКА  
ТОКСИНОПРОДУКЦИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В РЕАКЦИИ  
АГЛОМЕРАЦИИ ОБЪЕМНОЙ (РАО) С ПОМОЩЬЮ ХОЛЕРНОГО  
ПОЛИМЕРНОГО ИММУНОГЛОБУЛИНОВОГО  
АНТИТОКСИЧЕСКОГО ДИАГНОСТИКУМА ХОЛПИТОКС О1»**

Писанов Р.В., Наркевич А.Н., Ларионова Л.В., Симакова Д.И.

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

Предлагаемые методические рекомендации описывают метод выявления холерного токсина и оценки уровня токсинопродукции холерных вибрионов в реакции агломерации объемной (РАО). Методические рекомендации предназначены для специалистов научно-исследовательских учреждений: бактериологических лабораторий, центров индикации и диагностики опасных инфекционных заболеваний I-II групп патогенности и учреждений, имеющих право на проведение диагностических исследований на холеру в регламентированном объеме.

Латексный «Диагностикум ХолПитокс О1» представляет собой полиакролеиновые микросферы размером  $1,1 \pm 0,1$  мкм, окрашенные голубым красителем тианином. Микросферы содержат на своей поверхности альдегидные группы, обеспечивающие прочное связывание антител к токсину *V.cholerae* серогруппы О1 (АТ) с поверхностью полимерного микросферического латекса. В присутствии холерного токсина (АГ) в исследуемой бульонной культуре при взаимодействии «Диагностикума ХолПитокс О1» происходит склеивание (агглютинация) микросфер за счет образования комплекса АГ-АТ. Учет результатов проводят через 2-2,5 часа. Положительная реакция характеризуется макроскопической агглютинацией в виде образования окрашенных агломератов микросфер, равномерно оседающих в виде «зонтика»; отрицательная реакция - осаждением микросфер в виде пуговки или маленького кольца. Чувствительность диагностикума, проверенная на препарате холерного токсина с известным содержанием белка, составляет 100 нг/мл. Диагностическая ценность набора

подтверждена лабораторными испытаниями. При исследовании токсинопродукции токсигенных штаммов холерного вибриона в РАО с «Диагностикумом ХолПитокс О1» были получены титры от 1:32 до 1:512. С нетоксигенными штаммами и штаммами гетерологичных культур диагностикум реакции не давал.

Методические рекомендации одобрены Учёным советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 4 от 26.06.2018 г.) и утверждены директором института.

\*\*\*

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ  
«ПОЛУЧЕНИЕ И ОЧИСТКА ПРЕПАРАТА ПРЯМОГО  
ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО ГЕМОЛИЗИНА (TDH) *VIBRIO  
PARAHAEMOLYTICUS*»**

Полеева М. В., Чемисова О.С., Писанов Р. В., Рыковская О.А.

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

Методические рекомендации определяют методы получения и очистки прямого термостабильного гемолизина (TDH) парагемолитических вибрионов и его характеристику методом MALDI-TOF масс-спектрометрии и предназначены для специалистов лабораторий, занимающихся медицинской биотехнологией и микробиологией, изучением структурных и функциональных особенностей токсинов и разработкой диагностических препаратов. Получение препарата термостабильного прямого TDH-гемолизина – основного фактора патогенности *V. parahaemolyticus* – необходимо для решения вопросов научно-исследовательского характера, изучения функциональных особенностей токсина, разработки диагностических препаратов.

Методические рекомендации одобрены Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 12 от 14.12.2017 г.) и утверждены директором института.

\*\*\*

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**«ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ МЕРОПРИЯТИЙ ПО**  
**УТИЛИЗАЦИИ МЕДИЦИНСКИХ ОТХОДОВ КЛАССА В»**

Меньшикова Е.А., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л.

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

Настоящая инструкция помогает проводить утилизацию отходов класса В, соблюдая все требования по работе с отходами, обозначенными в различных документах. Инструкция предназначена для сотрудников медицинских организаций, в которых возникает необходимость утилизировать отходы этого класса.

Инструкция «Требования к проведению мероприятий по утилизации медицинских отходов класса В» одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 10 от 14.11.2017 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**ИНСТРУКЦИЯ**  
**ПО НАДЕВАНИЮ/СНЯТИЮ ЗАЩИТНЫХ КОСТЮМОВ**  
**РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ ДЛЯ СПЕЦИАЛИСТОВ МЕДИЦИНСКИХ**  
**ОРГАНИЗАЦИЙ И КЛИНИКО-ДИАГНОСТИЧЕСКИХ**  
**ЛАБОРАТОРИЙ**

Трухачев А.Л., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л.

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

Разработанные правила надевания и снятия костюмов различных типов позволяют облегчить задачу правильного использования СИЗ сотрудникам медицинских организаций, не имеющих большого опыта работы с ними. Инструкция по надеванию/снятию защитных костюмов предназначена для специалистов медицинских организаций и клинико-диагностических лабораторий, не занимающихся постоянной работой с ПБА I-II групп патогенности.

Инструкция одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 10 от 14.11.2017 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*



## РАЗРАБОТАННЫЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНЫЕ ПРОГРАММЫ

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ «БИОЛОГИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ РАБОТ ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ БОЛЬНОГО/ПОДОЗРИТЕЛЬНОГО НА ЗАБОЛЕВАНИЕ ИНФЕКЦИОННЫМИ БОЛЕЗНЯМИ, ВЫЗВАННЫМИ ПБА НЕУСТАНОВЛЕННОГО СИСТЕМАТИЧЕСКОГО ПОЛОЖЕНИЯ»**

Бурлакова О.С.<sup>1</sup>, Пичурина Н.Л.<sup>1</sup>, Сизова Ю.В.<sup>1</sup>, Водяницкая С.Ю.<sup>1</sup>,  
Павлович Н.В.<sup>1</sup>, Водопьянов А.С.<sup>1</sup>, Титова С.В.<sup>1</sup>, Чемисова О.С.<sup>1</sup>,  
Баташев В.В.<sup>1</sup>, Чигаева Е.В.<sup>2</sup>, Усаткин А.В.<sup>2</sup>, Валенцева А.А.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ростов-на-Дону;

<sup>2</sup>МБУЗ «ГБ № 1 им. Н.А. Семашко г. Ростова-на-Дону», г. Ростов-на-Дону

Целью программы повышения квалификации специалистов является совершенствование профессиональных знаний и компетенций в области обеспечения биологической безопасности, организации и проведении работ при выявлении больного/подозрительного на заболевание инфекционными болезнями, вызванными ПБА неустановленного систематического положения. Программа предназначена для специалистов с высшим медицинским и биологическим образованием лечебно-профилактических организаций: врачей-инфекционистов и врачей других специальностей (хирурги, реаниматологи и др.), клинических эпидемиологов, специалистов клиничко-диагностических лабораторий и медицинских сестер с высшим и средним образованием.

Дополнительная профессиональная образовательная программа повышения квалификации специалистов одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 2 от 27.04.2018 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ПРОФЕССИОНАЛЬНАЯ ОБРАЗОВАТЕЛЬНАЯ  
ПРОГРАММА ПОВЫШЕНИЯ КВАЛИФИКАЦИИ СПЕЦИАЛИСТОВ  
«ВЫЯВЛЕНИЕ И ТИПИРОВАНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ  
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)»**

Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В., Бурлакова О.С.,  
Сизова Ю.В., Захаров М.В., Сорокин Р.А.

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

Целью программы повышения квалификации специалистов является совершенствование теоретических знаний по молекулярно-генетическим методам, используемым в лабораторной диагностике инфекционных болезней для детекции, идентификации и типирования бактериальных и вирусных патогенов, приобретение практических навыков осуществления анализа проб биологического материала и объектов окружающей среды, подозрительных на заражённость патогенными биологическими агентами бактериальной и вирусной природы методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Программа предназначена для специалистов с высшим медицинским, биологическим или ветеринарным образованием (специалисты Роспотребнадзора), врачей-бактериологов (биологи), специалистов ветеринарных лабораторий, сотрудников клинических лабораторий и медицинских учреждений.

Дополнительная профессиональная образовательная программа повышения квалификации специалистов одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 2 от 27.04.2018 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА  
«КАРТОГРАФИРОВАНИЕ И ОСНОВЫ РАБОТЫ С  
ГЕОИНФОРМАЦИОННЫМ ПОРТАЛОМ (ГИС-ПОРТАЛОМ)  
ФКУЗ РОСТОВСКОГО-НА-ДОНУ ПРОТИВОЧУМНОГО  
ИНСТИТУТА РОСПОТРЕБНАДЗОРА»**

Водопьянов А.С., Пичурина Н.Л., Водопьянов С.О., Водяницкая С.Ю.,  
Титова С.В., Чемисова О.С., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В.

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

Целью программы консультативного семинара является формирование и совершенствование профессиональных знаний и компетенций в области картографирования различных эпидемиологических данных и работе с онлайн-ГИС, в том числе расположенных на ГИС-портале ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора. Программа предназначена для специалистов Роспотребнадзора с высшим и средним образованием.

Программа консультативного семинара одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 1 от 12.02.2018 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА  
«ОРГАНИЗАЦИЯ И ОБЕСПЕЧЕНИЕ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ  
ГОТОВНОСТИ К ПРОВЕДЕНИЮ МЕРОПРИЯТИЙ В СЛУЧАЕ  
ЗАНОСА ИЛИ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ  
ПРИ МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЯХ»**

Титова С.В., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л., Водяницкая С.Ю., Баташев В.В.,  
Бурлакова О.С., Сизова Ю.В., Павлович Н.В.

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

Целью программы консультативного семинара является совершенствование профессиональных знаний и компетенций в области обеспечения вопросов биологической безопасности при работе с возбудителями 1-2 групп патогенности, организации противоэпидемической готовности к проведению мероприятий в случае завоза или возникновения

особо опасных инфекций при проведении массовых мероприятий. Программа предназначена для специалистов медицинских организаций, а также сотрудников учреждений других ведомств с высшим медицинским или биологическим образованием.

Программа консультативного семинара одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 11 от 12.12.2017 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

**ПРОГРАММА КОНСУЛЬТАТИВНОГО СЕМИНАРА  
«ОРГАНИЗАЦИЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ  
ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ, ЛАБОРАТОРНОГО КОНТРОЛЯ  
ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ  
МАССОВЫХ МЕРОПРИЯТИЙ»**

Титова С.В., Чемисова О.С., Пичурина Н.Л., Водяницкая С.Ю.,  
Павлович Н.В., Бурлакова О.С., Сизова Ю.В.

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

Целью программы консультативного семинара является совершенствование профессиональных знаний и компетенций в области обеспечения вопросов биологической безопасности при работе с возбудителями 1-2 групп патогенности, организации лабораторной диагностики инфекционных болезней при проведении массовых мероприятий. Программа предназначена для специалистов медицинских организаций, а также сотрудников учреждений других ведомств с высшим медицинским или биологическим образованием.

Программа консультативного семинара одобрена Учёным Советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 8 от 12.12.2017 г.) и утверждена директором института.

\*\*\*

# ЗАЩИТА РАЗРАБОТОК ПАТЕНТАМИ И СВИДЕТЕЛЬСТВАМИ ОБ ОФИЦИАЛЬНОЙ РЕГИСТРАЦИИ БАЗ ДАННЫХ

## ПАТЕНТ «СПОСОБ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО ВНУТРИВИДОВОГО ТИПИРОВАНИЯ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ O1 EL TOR*»

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П.

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

Изобретение может быть использовано при молекулярно-генетическом внутривидовом типировании токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Одним из маркёров токсигенных клонов вибрионов являются интегративные конъюгативные элементы Integrative conjugative elements (ICEs), сообщающие хозяину резистентность к различным антибактериальным препаратам. Показано существование нескольких типов ICE, которые являются удобными генетическими маркёрами происхождения токсигенных штаммов. Цель предполагаемого изобретения заключается в разработке способа выявления ICE элементов Индийского или Мозамбикского типа у токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Поставленная задача достигается путем постановки мультиплексной ПЦР с авторскими праймерами к ICE «индийского» и «mozамбикского» типов, и учёте полученных результатов путем определения точки плавления полученных ампликонов. Предполагаемое изобретение может быть использовано в практической деятельности лабораторий Ростпотребнадзора, использующих при лабораторной диагностике холеры молекулярно-генетические методы.

Патент на изобретение № 2627192 от 03.08.2017 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ**  
**«СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРЕПАРАТА БЕЛКА OMP<sub>T</sub> ДЛЯ**  
**МОДЕЛИРОВАНИЯ ПРОТИВОХОЛЕРНОГО ИММУНИТЕТА У**  
**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ»**

Иванова И.А., Мишанькин Б.Н., Омельченко Н.Д., Шипко Е.С.,  
Филиппенко А.В., Беспалова И.А.

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

Предложен способ получения препарата белка наружной мембраны холерного вибриона (*Omp<sub>T</sub>*) для моделирования противохолерного иммунитета к разным биоварам и сероварам O1 серогруппы возбудителя холеры у экспериментальных животных.

Иммунизация белых мышей и взрослых кроликов белком *Omp<sub>T</sub>*, выделенным из штамма *Vibrio cholerae* El Tor 18950, предотвращает развитие экспериментальной холеры, вызванной штаммами возбудителя холеры O1 серогруппы, относящимися к разным биоварам и сероварам, что свидетельствует о наличии перекрестного иммунитета. Эти результаты, могут быть полезны при разработке новых иммунобиологических вакцинных препаратов для специфической профилактики холеры.

Патент на изобретение № 2663102 от 01.08.2018 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ**  
**«СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ**  
**ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ С ПОМОЩЬЮ ПЦР**  
**ДЛЯ ВЫДЕЛЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ»**

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

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

Способ предназначен для изучения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения на молекулярно-биологическом уровне с целью установления их роли в этиологии спорадических случаев и вспышек диарейных заболеваний.

Использование данного способа позволяет с высокой достоверностью и

в короткие сроки осуществлять идентификацию нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы за счет систематизации изолятов в прикладном аспекте и определять путем ПЦР оптимально минимального количества и сочетания генетических детерминант факторов патогенности, применение которых даёт возможность с наименьшей затратой времени и средств оценить родственные связи нетоксигенных культур *V. cholerae* O1.

Изобретение даёт ответ с высокой дискриминирующей силой о сходстве/различии, происхождении нетоксигенных штаммов, выделенных на территориях Российской Федерации.

Патент на изобретение № 2665542 от 30.08.2018 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ**  
**«ШТАММ *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*, ИСПОЛЬЗУЕМЫЙ В**  
**КАЧЕСТВЕ ПРОДУЦЕНТА ПРЯМОГО ТЕРМОСТАБИЛЬНОГО**  
**ГЕМОЛИЗИНА (TDH)»**

Чемисова О. С., Полеева М. В., Рыковская О. А., Сагакянц М. М.  
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,*  
*г. Ростов-на-Дону*

Изобретение относится к биотехнологии и микробиологии и может быть использовано для получения и изучения функциональных особенностей термостабильного прямого TDH-гемолизина *Vibrio parahaemolyticus*, который необходим в лабораторной диагностике для получения сывороток и препаратов.

Штамм *Vibrio parahaemolyticus* KM 2027 содержит ген прямого термостабильного гемолизина (tdh), лишен гена TDH-подобного гемолизина (trh) и обладает высокой гемолитической и цитотоксической активностями.

Использование изобретения позволяет с помощью нового штамма *V. parahaemolyticus* KM 2027 получать высокоактивный препарат прямого термостабильного гемолизина – TDH, который дает возможность наиболее полно осуществлять изучение функциональных особенностей препарата гемолизина *V. parahaemolyticus*, с применением в лабораторной практике для получения диагностических препаратов, направленных на выявление острых кишечных инфекций, вызванных *V. parahaemolyticus*.

Решение о выдаче патента от 03.04.2018 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ  
«СПОСОБ ОЦЕНКИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ К  
АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ  
ВИБРИОНОВ»**

Селянская Н.А., Веркина Л.М., Титова С.В.

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

Разработан способ оценки чувствительности биоплёнок холерных вибрионов к антибактериальным препаратам, основанный на расчёте индексов активности антибактериальных препаратов по специальной формуле. Использование предлагаемого изобретения позволяет оценить чувствительность биоплёнок одновременно нескольких штаммов холерных вибрионов к широкому спектру антибактериальных препаратов и выбрать наиболее эффективный препарат в отношении конкретного штамма холерного вибриона.

Изобретение может быть использовано специалистами лабораторий, имеющих разрешение на работу с возбудителями опасных инфекционных болезней, противочумных станций, противочумных институтов и СПЭБ, изучающих антибиотикочувствительность биоплёнок холерных вибрионов.

Патент на изобретение № 2628098 от 14.08.2017 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ  
«СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ШТАММОВ ВИДА  
*VIBRIO PARAHAEEMOLYTICUS* МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ  
ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ (REAL-  
TIME PCR)»**

Чемисова О. С., Полеева М. В., Трухачев А. Л., Рыковская О. А.

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

Изобретение относится к области биотехнологии и генетической инженерии и может быть использовано при экспресс-диагностике представителей вида *V. parahaemolyticus*.

Использование изобретения позволяет за счёт набора реагентов, который включает два сконструированных праймера и специфичный зонд,



проводить идентификацию представителей вида *V. parahaemolyticus* методом полимеразной-цепной реакции в режиме реального времени (Real-Time PCR). Это позволяет точно, быстро и эффективно проводить детекцию и дифференцировать от близкородственных видов штаммы *V. parahaemolyticus*. Простое в исполнении тестирование, невысокая себестоимость, высокая чувствительность и специфичность данных праймеров и зонда даёт возможность применять их в практике бактериологических лабораторий центров гигиены и эпидемиологии, лечебно-профилактических, противочумных и других учреждений.

Патент № 2644232 от 08.02.2018 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ**  
**«ШТАММ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ГИБРИДНЫХ КЛЕТОК**  
**ЖИВОТНОГО *MUS MUSCULUS* - ПРОДУЦЕНТ**  
**МОНОКЛОНАЛЬНОГО АНТИТЕЛА К МЕМБРАННОМУ БЕЛКУ,**  
**ОБЩЕМУ ДЛЯ *TCP*+ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1 И**  
**O139 СЕРОГРУПП»**

Алексеева Л.П., Евдокимова В.В.

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

Изобретение относится к биотехнологии, в частности гибридной биотехнологии, и представляет собой клон ГХ-Н2F6/Omp гибридных культивируемых клеток животных *Mus musculus L.*, продуцирующий в культуральных средах моноклональные антитела (МКА) к антигену возбудителя холеры (мембранному белку).

МКА гибридных клеток могут использоваться при создании иммуноферментных диагностических тест-систем для идентификации *tcp*<sup>+</sup> штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп в целях лабораторной диагностики в здравоохранении и для проведения научных исследований.

Патент на изобретение № 2663003 от 31.07.2018 г.

\*\*\*

**ПАТЕНТ**  
**«СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ОБРАЗЦОВ БИОПЛЁНОК ХОЛЕРНЫХ**  
**ВИБРИОНОВ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕТОДОМ**  
**ТРАНСМИССИОННОЙ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ»**

Симонова И.Р., Головин С.Н, Титова С.В.

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

Изобретение относится к экспериментальной биологии и медицине.

Предложен способ получения образцов биоплёнок холерных вибрионов для исследования методом трансмиссионной электронной микроскопии, включающий культивирование биоплёнок в суспензии исследуемого штамма на поверхности плёнок-подложек субстрата в течение не менее 5 суток при температуре 22°C. Формваровые плёнки-подложки размещают на медных опорных сеточках для трансмиссионного электронного микроскопа, которые прикреплены на предметном стекле. Биоплёнки фиксируют, контрастируют. Субстрат с образцами биоплёнок высушивают на воздухе, отделяют сетки от предметного стекла и просматривают полученные образцы в электронном микроскопе.

Способ обеспечивает получение качественных и информативных образцов биоплёнок холерных вибрионов, позволяющих визуализировать как наружные, так и внутренние структуры самой биоплёнки и входящих в её состав клеток, максимально сохранивших нативную структуру.

Патент на изобретение № 2662938 от 31.07.2018 г.

\*\*\*

**БАЗА ДАННЫХ**  
**«КОЛЛЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД,**  
**ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА**  
**ВИБРИОНОВ»**

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

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

На сегодняшний день база данных включает 22 плазмиды, экспрессирующие гены *V. cholerae*, и 3 – *V. parahaemolyticus*. В ней отражены

такие характеристики, как: наименование клонированного гена, музейный номер микроорганизма донора ДНК; дата, источник и место выделения; наименование продукта экспрессии и его особенности; генетически кодируемая антибиотикорезистентность; тип индуктора; рекомендации по культивированию рекомбинантных штаммов *E. coli*. Предполагается дальнейшее пополнение базы по мере конструирования новых плазмид.

В случае необходимости по запросу заинтересованных сотрудников учреждений Роспотребнадзора плазмиды, созданные в Ростовском противочумном институте и защищенные патентами либо публикациями, могут быть предоставлены им для работы на безвозмездной основе.

Свидетельство № 2018620825 от 07.06.2018 г.

\*\*\*

**БАЗА ДАННЫХ  
«ФЕНОТИПЫ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ХОЛЕРНЫХ  
ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ НА  
ТЕРРИТОРИИ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ»**

Селянская Н.А., Березняк Е.А., Егиазарян Л.А., Тришина А.В.,  
Архангельская И.В., Веркина Л.М., Симонова И.Р.

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

База данных содержит сведения о чувствительности/ устойчивости к 22 антибактериальным препаратам штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, O139, по O1 / O139 различной эпидзначимости, выделенных от людей и из водных объектов на территории Ростовской области. Предназначена для хранения и анализа антибиотикорезистентности холерных вибрионов, выделенных на данной территории, как в конкретный период времени, так и в динамике. Информация, представленная в базе данных, может быть полезна при прогнозировании эффективности этиотропной терапии, а также в эпиднадзоре за холерой в регионе. Кроме того, имеется возможность её пополнения за счет включения новых охарактеризованных штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Ростовской области.

Свидетельство № 2018620078 от 12.01.2018 г.

\*\*\*

**БАЗА ДАННЫХ  
«ГИС МОНИТОРИНГ СУДОВЫХ БАЛЛАСТНЫХ ВОД В  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ»**

Водяницкая С.Ю., Лях О.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О.,  
Иванова Н.Г., Рыжова А.А., Сергиенко О.В., Баташев В.В., Чемисова О.С.,  
Сагакянц М.М., Ежова М.И., Архангельская И.В.

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

База данных содержит сведения о международных сообщениях водного транспорта Российской Федерации и результаты микробиологического мониторинга балластных вод международных морских судов. База данных состоит из модулей «Название судна», «Дата отбора проб», «Порт убытия», «Порт прибытия», «Тип судна», «Водоизмещение судна», «Температура балласта при отборе пробы», «рН балласта», «Солёность балласта», а также в ней имеются сведения о координатах мест смены балласта; данные о портах стран, с которыми Российская Федерация имеет экономические связи. На примере Ростовской области представлены результаты микробиологических исследований балластных вод судов с 2010 по 2016 гг. на *E. coli*, *V. cholerae*, кишечные энтерококки, в соответствии со стандартом D-2 Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками (2004), вступившей в силу в Российской Федерации 8 сентября 2017 года. База данных предназначена для создания научно-технического задела в области эпидемиологии холеры, с её помощью будет дано научное обоснование степени риска заноса и распространения холерных вибрионов из неблагополучных по холере стран в акватории портов РФ с целью совершенствования мероприятий при проведении эпидемиологического надзора за холерой на территории РФ.

Свидетельство № 2018621059 от 12.07.2018 г.

\*\*\*

**ГЕОИНФОРМАЦИОННАЯ БАЗА ДАННЫХ  
«АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ  
ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ (2005-2016 ГГ.)»**

Селянская Н.А., Водопьянов А.С., Егиазарян Л.А., Веркина Л.М.  
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
г. Ростов-на-Дону*

База данных содержит информацию о чувствительности/ устойчивости к 22 антибактериальным препаратам около 300 штаммов *Vibrio cholerae* El Tor различной эпидзначимости, выделенных от людей и из водных объектов на территории РФ в 2005-2016 гг. с привязкой к конкретным местам выделения и позволяет сформировать представление о распространении резистентных штаммов *Vibrio cholerae* El Tor в конкретный период времени на данной территории, отслеживать динамику антибиотикоустойчивости. Предназначена для сбора и анализа информации об антибиотикорезистентности *Vibrio cholerae* El Tor с целью оптимизации мониторинговых исследований в рамках эпиднадзора за холерой.

База данных размещена на ГИС-портале ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Свидетельство о регистрации в Реестре баз данных № 2017621246 от 27.10.2017 г.

\*\*\*

**ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ  
«ГИС: КРЫМСКАЯ ГЕМОРРАГИЧЕСКАЯ ЛИХОРАДКА.  
ЭПИЗООТИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ.  
РОСТОВСКАЯ ОБЛАСТЬ»**

Анисимова Г.Б., Москвитина Э.А., Кривошеев А.П., Дворцова И.В.,  
Пичурина Н.Л.

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

Разработана программа для визуализации на картах Ростовской области пространственно-временных запросов из двух баз данных «Крымская геморрагическая лихорадка. Эпизоотическое состояние природного очага. Ростовская область» и «Крымская геморрагическая лихорадка. Эпидемиологические типы заболеваемости. Ростовская область»

в СУБД Access с использованием ArcGIS-10.

Предусмотрено определение активности природного очага КГЛ с учётом обнаружения маркёров вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки в пробах от клещей, млекопитающих, птиц, а также проведение эпидемиологического анализа и диагностики при Крымской геморрагической лихорадке.

Тип ЭВМ: ЮМ-РС совместимый компьютер

Язык программирования: Python 2.7

используемый внешний модуль arcsru из комплекта поставки ArcGIS for Desktop.

ОС: Windows 7, Windows XP, Windows Wista

Объём программы: 0,2 Мб

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018612037 от 09.02.2018 г.

\*\*\*

**ПРОГРАММА ДЛЯ ЭВМ  
«CONTIGSEARCHER - ПРОГРАММА ДЛЯ АНАЛИЗА РЕЗУЛЬТАТОВ  
ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ, ОПРЕДЕЛЕНИЯ  
НАЛИЧИЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ РАЗЛИЧНЫХ ГЕНОВ В  
КОНТИГАХ, ПОЛУЧЕННЫХ ПРИ СЕКВЕНИРОВАНИИ,  
ВЫЯВЛЕНИЯ INDEL-МУТАЦИЙ»**

Водопьянов А.С., Трухачев А.Л., Подладчикова О.Н., Писанов Р.В.

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

Разработанная программа позволяет проводить анализ данных полногеномного секвенирования штаммов микроорганизмов. В основе метода лежит поиск последовательностей известных генов среди набора нуклеотидных последовательностей контигов, что позволяет определять наличие этих последовательностей в геноме микроорганизма, а также наличия в INDEL мутаций. Принципиальной особенностью программы является возможность сборки полной последовательности гена, даже если его фрагменты распределены между разными контигами.

Программа ContigSearcher написана на языке программирования Java,

что позволяет работать с ней в операционных системах Windows, Linux, MacOS. Программа распространяется бесплатно с условием указания ссылки на авторство.

Свидетельство о государственной регистрации программы для ЭВМ № 2018611348 от 01.08.2018 г.

\*\*\*

## ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ И КОЛЛЕКЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД

### ИНФОРМАЦИЯ О ДЕПОНИРОВАНИИ

в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в 2017 – 2018 гг. депонированы штаммы:

-*Vibrio cholerae* КМ 2044 - *Vibrio cholerae* 19706. Штамм может быть использован в научно-исследовательской работе в качестве тест-штамма для размножения экспериментального диагностического фага *Vibrio cholerae* №1 (E1 1).

Авторы: Гаевская Н.Е., Тюрина А.В.

Дата депонирования: 16.06.2017 г.

-*Vibrio cholerae* КМ 2045 - *Vibrio cholerae* 18546. Штамм может быть использован в научно-исследовательской работе в качестве тест-штамма для размножения экспериментального диагностического фага *Vibrio cholerae* №7 (E1 2).

Авторы: Гаевская Н.Е., Тюрина А.В.

Дата депонирования: 16.06.2017 г.

-*Escherichia coli* КМ 2047 - *Escherichia coli* JM 103 pNanH - суперпродуцент нейраминидазы *Vibrio cholerae*. Предназначен для получения препаративных количеств двух форм нейраминидазы (исходной и зрелой) для изучения ее значимости как фактора патогенности.

Авторы: Монахова Е.В., Дуванова О.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Мишанькин Б.Н.

Дата депонирования: 22.12.2017 г.

-Приняты к депонированию **13 штаммов *V. cholerae*** разных серогрупп с определенными наборами генетических маркеров.

**В МЕЖДУНАРОДНОЙ БАЗЕ ДАННЫХ GenBank депонированы нуклеотидные последовательности:**

- полного генома штамма *Vibrio cholerae* 75 (P-18963) O1 серогруппы биовара Эль Тор, изолированного в г. Ростове-на-Дону в 2007 г. (код доступа QENR01000001- QENR01000066) под номером PRJNA454191.

Авторы: Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Иванов С.А., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Селянская Н.А.

Дата депонирования: 07.05.2018 г.



- полного генома *Vibrio cholerae strain* 5879 (PQBQ01000001-PQBQ01000114) под номером PRJNA224116.

Авторы: Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Иванов С.А.

Дата депонирования: 02.02.2018 г.

- полного генома *Vibrio cholerae strain* 2044 (PXZC01000001-PXZC01000124) под номером PRJNA224116.

Авторы: Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Иванов С.А.

Дата депонирования: 28.03.2018 г.

- полного генома штамма *Vibrio cholerae nonO1/nonO139 P-9507* (QENS01000001-QENS01000105) под номером PRJNA454192.

Авторы: Архангельская И.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Иванов С.А.

Дата депонирования: 07.05.2018 г.

- полного генома *Vibrio phage Rostov-1* (MG957431).

Авторы: Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Погожова М.П., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Иванов С.А.

Дата депонирования: 28.02.2018 г.

- ICE-элемента штамма *Vibrio cholerae O1 El Tor 81* (MG950412).

Авторы: Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Иванов С.А., Олейников И.П.

Дата депонирования: 14.07.2018 г.

- генов коровой области профагов СТХ 4 штаммов *V. cholerae O1* (KX533976, KX584734- KX584736), полных последовательностей профага pre-СТХ *V. cholerae El Tor* (KY569282) и профага СТХ классического штамма (MF155889).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Ежова М.И., Титова С.В.

Даты депонирования: 03.02.2017 г., 25.05.2017 г., 31.05.2017 г.

- полной последовательности профага pre-СТХ *V. cholerae O8* (MH782192).

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

Дата депонирования: 23.08.2018 г.

- генов высокомолекулярного цитотоксина *rtxA* 15 штаммов *V. cholerae O1* (KY406908-KY406911, KY406913-KY406917, KY569275-KY569280).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А., Титова С.В.

Даты депонирования: 26.10.2017 г., 28.01.2018 г.

- генов *rtxA* 2 штаммов *V. cholerae* O1 (MH422972, MH422973), 2 штаммов O139 (MH422970, MH422971) и 1 штамма nonO1/nonO139 (KY406912).

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

Даты депонирования: 26.10.2017 г., 01.06.2018 г.

- генов *rtxA* 21 штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 (KY741961-KY741981, MF417378, MF417379).

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

Дата депонирования: 14.02.2018 г.

- RTX-кластера классического штамма *V. cholerae* (KY569281).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Ежова М.И.

Дата депонирования: 28.01.2018 г.

- RTX-кластера 10 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 (MF375482-MF375490, MF399211).

Авторы: Омельчук Е.П., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В.

Даты депонирования: 14.02.2018 г., 04.03.2018 г.

- *cholix*-токсина (*chxA*) 2 штаммов *V. cholerae* O1 (KY595954, KY595955).

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

Дата депонирования: 26.01.2018 г.

- *chxA* 4 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 (KY595956- KY595959).

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

Дата депонирования: 31.01.2018 г.

- *cef* (CNO cell elongating factor) 11 штаммов *V. cholerae* O1 (KX640094-KX640105).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванов С.А., Титова С.В.

Дата депонирования: 31.07.2017 г.

- *cef* штамма *V. cholerae* O1 (KY996717).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Ежова М.И.

Дата депонирования: 24.04.2017 г.

- *cef* 3 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 (KY996718- KY996720).

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

Дата депонирования: 28.04.2017 г.

- полной последовательности кластера генов системы секреции III типа (Т3SS) 2 штаммов *V. cholerae* O1 (MF374351, MF374352).

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

Дата депонирования: 23.06.2017 г.

- кластера Т3SS штамма *V. cholerae* O1 (МН494081).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Ежова М.И., Водопьянов А.С.

Дата депонирования: 19.06.2018 г.

- кластера Т3SS штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 (MF374350).

Авторы: Монахова Е.В., Омельчук Е.П., Писанов Р.В.,  
Архангельская И.В.

Дата депонирования: 23.06.2017 г.

- кластера Т3SS штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 (МН494080).

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

Дата депонирования: 19.06.2018 г.

- генов *Vibrio cholerae* O1: *rtxC* 13 штаммов (MF100056-MF100068), гемагглютинин/протеазы (*hapA*) 14 штаммов (MF099968-MF099981), регулятора (*hapR*) 10 штаммов (MF099982-MF099991), гемолизина (*hlyA*) 9 штаммов (MF099992-MF100000), маннозочувствительных пилей (*mshA*), 13 штаммов (MF100001-MF100013), нейраминидазы (*nanH*) 13 штаммов (MF100014- MF100026), белков наружной мембраны *ompU* 9 штаммов (MF100027- MF100035) и *ompW* 11 штаммов (MF100036-MF100046), металлопротеазы *prtV* 10 штаммов (MF100047-MF100055, MF099967), сериновой протеазы *VC1649* 12 штаммов (MF100078-MF100089), коллагеназы *VC1650* 6 штаммов (MF100090-MF100095), глобального регулятора *toxR* 9 штаммов (MF100069-MF100077).

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

Дата депонирования: 11.03.2018 г.

- генов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139: *rtxC* 22 штаммов (MF358505-MF358525), *hapA* 22 штаммов (MF358482-MF358503), *hapR* 24 штаммов (MF100096- MF100118, MF100121), *ompW* 22 штаммов (MF033150-MF033153, MF099902- MF099919), *prtV* 24 штаммов (MF099941-MF099964), *toxR* 19 штаммов (MF099920- MF099938).

Авторы: Омельчук Е.П., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В.

Даты депонирования: 28.02.2018 г., 11.03.2018 г.

- генов *Vibrio cholerae* 2 штаммов *V. cholerae* O139: *rtxC* (MF358527, MF358528), *hapA* 23 штамма (MF358482-MF358504), *hapR* (MF100119, MF100120), *ompW* (MF033150-MF033153, MF099902-MF099919), *prtV* (MF099965, MF099966), *toxR* (MF099939, MF099940).

Авторы: Омельчук Е.П., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В.

Дата депонирования: 11.03.2018 г.

- генов нейраминидазы *nanH* 11 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и 2 штаммов O139 серогруппы (MH513989-MH513998).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Архангельская И.В., Омельчук Е.П.

Дата депонирования: 22.06.2018 г.

- кластеров *vps1-rbm-vps2* 16 штаммов O1 (MF498890, MF498891, MF498893, MG521386-MG521397) и 6 штаммов O139 серогруппы (MF498892, MG521398-G521402).

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

Даты депонирования: 20.11.2017 г., 20.05.2018 г.

- кластеров *msh* 16 штаммов O1 (MG551931-MF551946) и 5 штаммов O139 серогруппы (MG551949-MG551953).

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

Дата депонирования: 20.05.2018 г.

- генов *vpsT* (MF498898, MF498899), *hapR* (MF498894, MF498895) и *cytR* (MF498896, MF498897) 2 штаммов *V. cholerae* O1.

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

Дата депонирования: 20.11.2017 г.

- островка патогенности VPI *V. cholerae* O1 (MH782190).

Авторы: Монахова Е.В., Писанов Р.В., Ежова М.И.

Дата депонирования: 23.08.2018 г.

- генов *tcpABQ* штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139 (MH782191).

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

Дата депонирования: 23.08.2018 г.

\*\*\*

**КОЛЛЕКЦИЯ  
РЕКОМБИНАНТНЫХ ПЛАЗМИД, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ГЕНЫ  
ПАТОГЕННЫХ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНОВ**

Монахова Е.В., Писанов Р.В., Демидова Г.В., Непомнящая Н.Б.,  
Мишанькин Б.Н., Дуванова О.В.  
*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, г.  
Ростов-на-Дону*

Коллекция создана в рамках выполнения темы № 178-4-15 «Формирование коллекции рекомбинантных плазмид, экспрессирующих гены патогенных для человека вибрионов». Предназначена для ускоренного получения препаратов рекомбинантных белков – факторов патогенности/персистенции холерных и других патогенных вибрионов, а также для изучения экспрессии клонированных генов под контролем собственных промоторов.

Коллекция утверждена директором ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (26.12.2017 г.).

\*\*\*

# **ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ**

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

**Выпуск № 31**

---

Подписано в печать 03.10.2018 г. Заказ № 10/03108.  
Обложка: мелованная 250 г. Внутри бумага офсетная 80 г.  
Формат бумаги 60x90/16. Тираж 100 экз.

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами  
в ООО «Амирит», 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.  
Тел.: 8-800-700-86-33 | (845-2) 24-86-33

---