

На правах рукописи

Каминский Денис Игоревич

**РАЗРАБОТКА И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
НОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА**

1.5.6 - биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук**

Ростов-на-Дону – 2025

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Мазрухо Алексей Борисович

Официальные оппоненты:

Матвеева Ирина Николаевна - доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», лаборатория молекулярной биологии и вирусологии, заведующая

Жарникова Ирина Викторовна - доктор биологических наук, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, научно-производственная лаборатория препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ведущий научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет инженерных технологий»

Защита диссертации состоится «__»_____2026 года в _____ часов на заседании Диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__»_____2026 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Пименова Алёна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Седьмая пандемия холеры началась в 1961 г., когда осложнения касались только Азии, но постепенно превратились в мировую проблему. Всемирная Ассамблея Здравоохранения в мае 2011 года обозначила факт глобализации эпидемических проявлений холеры и призвала к «интегральному» подходу в борьбе с ней (Москвитина Э.А. и др., 2012; Wkly Epidem. Rec., 2014). Эпидемиологическая ситуация по холере в мире остается неблагоприятной с тенденцией роста заболеваемости по полиномиальной линии тренда с 2014 по 2024 гг. В настоящий момент случаи холеры регистрируются в 33 странах (Носков А.К. и др., 2023). Для Российской Федерации эти обстоятельства являются серьезным внешним эпидемиологическим риском. Угроза завоза данной инфекционной болезни является актуальной для любого субъекта Российской Федерации, а произошедший завоз следует рассматривать как чрезвычайную ситуацию в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения. Положительные результаты комплексных мероприятий по усилению эпидемиологического надзора в нашей стране проявились в виде предотвращения завоза холерной инфекции с Украины на территорию Российской Федерации в 2011-2012 гг. (Мазрухо А.Б. и др., 2012).

Санитарно-эпидемиологическое благополучие населения Российской Федерации по холере, эффективность проводимого в стране эпидемиологического надзора за данной опасной инфекционной болезнью во многом зависят от организации лабораторных исследований, проводимых на различных уровнях. Риск распространения любой инфекционной болезни, по мнению авторов (Онищенко Г.Г. и др., 2015), определяется рядом показателей, одним из которых является уровень готовности медицинской и лабораторной службы. Это комплексный показатель и его значимое слагаемое - наличие необходимых материальных ресурсов. Важной составляющей санитарно-эпидемиологического надзора за инфекционными болезнями, в том числе холерой, является система методов и средств их лабораторной диагностики (Шепелин А.П., 2015). В современных условиях в связи с актуальностью проблемы холеры в целом, вопросы совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции, всестороннего изучения экологии, физиологии, биохимии, генетики холерного вибриона приобретают особую научно-прикладную значимость и требуют дальнейшего улучшения качества существующих и разработки новых высокоэффективных питательных сред для культивирования, выделения и идентификации данного микроорганизма.

В связи с вышеизложенным, актуальной представляется проблема поиска новых направлений разработки недорогих, легко стандартизуемых, удобных в применении и отечественных питательных сред для культивирования и выделения холерного вибриона. Они должны быть на основе доступного, экономически выгодного сырья, позволяющего осуществлять их широкомасштабный выпуск, а так же превосходить используемые в практике аналоги по чувствительности, эффективности и скорости роста.

Степень разработанности темы исследования

Проблема разработки недорогих, удобных в использовании и легко стандартизуемых, а также выгодных в плане крупномасштабного выпуска питательных сред для культивирования и выделения холерного вибриона, по нашему мнению, может быть

решена путём создания последних на основе препаратов, получаемых из пекарских дрожжей.

Сотрудниками ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (Мазрухо А.Б. и др., 2009-2011, 2012) был разработан панкреатический перевар пекарских дрожжей и проведено изучение роста различных штаммов холерного вибриона на содержащих его средах. Продемонстрированы преимущества разработанного препарата перед используемыми в микробиологической практике отечественными и импортными белковыми гидролизатами на основе сырья животного происхождения (Мазрухо А.Б. и др., 2010). Полученные авторами результаты создают предпосылки возможности конструирования на данной основе питательных сред для культивирования и выделения *V. cholerae*, не только не уступающих существующим аналогам, но и превосходящих их по ряду биологических показателей.

Недостатком всех применяемых в лабораторной диагностике холеры полиуглеводных сред является отсутствие возможности отобрать с их помощью подозрительные колонии по какому-либо специфическому критерию, присущему исключительно роду *Vibrio*. В этом аспекте дифференциация холерного вибриона от представителей глюкозо- и сахарозопозитивных микроорганизмов (*Aeromonas*, *Plesiomonas*) становится невозможной (Bonev S.I. et al., 1974; Pazzaglia G. et al., 1991; Abbott S.L. et al., 2003; Авдеева Е.В. и др., 2005; Janda J.M. et al., 2010; Куклина Н.Г. и др., 2013).

В связи с вышеизложенным становится актуальной проблема разработки такой дифференциально-диагностической питательной среды, которая позволяла бы идентифицировать *V. cholerae* сразу по двум признакам - ферментации сахарозы и аргинина, являющихся ключевыми биохимическими критериями идентификации данного микроорганизма. До настоящего времени научных исследований по разработке подобных сред в мировой практике не было.

Цель исследования

Сконструировать и провести изучение биологических показателей и эффективности применения в мониторинговых исследованиях новых питательных сред для выделения, культивирования и идентификации холерного вибриона.

Задачи исследования

1. Разработать питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей: агаризованную, жидкую накопительную и бульон.
2. Сконструировать питательную среду для первичной идентификации холерного вибриона по признакам ферментации сахарозы, отсутствия дигидролазы аргинина и образования сероводорода.
3. Провести сравнительное изучение сконструированных питательных сред и используемых в практике сред аналогичного назначения по биологическим показателям в отношении музейных штаммов холерного вибриона.
4. Оценить возможность разработанного ХДС-бульона для культивирования штаммов *V. cholerae* и изучение их энтеротоксинпродуцирующей активности *in vitro*.
5. Изучить эффективность разработанных питательных сред в модельных опытах и при мониторинге объектов окружающей среды.

Научная новизна

На основе панкреатического перевара пекарских дрожжей (патент на изобретение Российской Федерации 2375441) сконструированы новые питательные среды для лабораторной диагностики холеры и культивирования штаммов холерного вибриона: ХДС-агар, ХДС-Н (патент на изобретение Российской Федерации № 2392310) и ХДС-бульон.

Проведено изучение биологических показателей сконструированных сред ХДС-агар, ХДС-Н и ХДС-бульон в отношении различных штаммов *V. cholerae*, показавшее их превосходство перед используемыми в практической деятельности микробиологических лабораторий плотными и жидкими средами аналогичного назначения по чувствительности и вегетирующим свойствам.

Продемонстрирована возможность изучения токсинопродукции штаммов *V. cholerae* с помощью сконструированного ХДС-бульона.

Разработана питательная среда АЖС-агар. Она предназначена для первичной идентификации холерного вибриона; не имеет аналогов в мировой практике. Предложен способ дифференциации с её помощью бактерий *V. cholerae* от бактерий - представителей рода *Aeromonas* (патент на изобретение Российской Федерации № 2734940).

Продемонстрированы преимущества разработанной питательной среды АЖС-агар перед используемыми в практике полиуглеводными питательными средами.

Доказана высокая эффективность сконструированных питательных сред ХДС-агар, ХДС-Н, АЖС-агар как в модельных опытах, так и при тестировании в ходе исследования реальных водных объектов на контаминацию холерными вибрионами.

Теоретическая и практическая значимость

Научно обоснована возможность использования в микробиологической практике разработанных питательных сред ХДС-агар, ХДС-Н, ХДС-бульон, АЖС-агар и доказана их более высокая эффективность на различных этапах лабораторной диагностики холеры по сравнению с существующими аналогами.

Успешно проведена процедура государственной регистрации разработанной питательной среды ХДС-агар (регистрационное удостоверение РЗН 2017/5435 от 27.03.2017 г.). Она внедрена в практику работы Референс-центра по мониторингу за холерой (акт внедрения от 01.10. 2024 г.) и специализированной противоэпидемической бригады при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 08.08.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.10.2024 г.), ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (акт внедрения от 11.11.2024 г.).

Получено регистрационное удостоверение № РЗН 2020/10543 от 03.06.2020 г. и положительные заключения по результатам проведенных в рамках подготовки к государственной регистрации испытаний на разработанную среду для первичной идентификации холерного вибриона АЖС-агар. Она внедрена в практику работы Референс-центра по мониторингу за холерой (акт внедрения от 18.09.2024 г.) и специализированной противоэпидемической бригады при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 11.09.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (10.10.2024 г.), ФКУЗ

Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (07.11.2024 г.).

Предложена к практическому использованию при проведении лабораторных исследований на холеру сконструированная среда ХДС-Н. По результатам её комиссионных испытаний получено положительное заключение (акт комиссионной проверки от 25.12.2002 г.). Инструкция по изготовлению и контролю и инструкция по применению утверждены директором ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора 29.12.2005 г. Получены акты внедрения в практику патента на среду ХДС-Н от Референс-центра по мониторингу за холерой при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 25.09.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 11.10.2024 г.), ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (акт внедрения от 11.11.2024 г.), специализированной противоэпидемической бригады при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 08.08. 2024 г.).

Предложена к внедрению в лабораторную практику жидкая питательная среда для культивирования холерного вибриона - ХДС-бульон. Проведены её межлабораторные комиссионные испытания (акт комиссионной проверки от 25.12.2002 г.), по результатам которых получено положительное заключение. Инструкция по изготовлению и контролю и инструкция по применению на эту среду утверждены директором ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора 29.12.2005 г. ХДС-бульон внедрен в практику работы Референс-центра по мониторингу за холерой при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 25.09.2024 г.), специализированной противоэпидемической бригады при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 08.08.2024 г.).

Методология и методы исследования

Методология исследования полностью соответствовала его цели. Объектами исследования являлись: разработанные питательные среды ХДС-Н, ХДС-агар, ХДС-бульон, АЖС-агар; штаммы *V. cholerae* различных биоваров и серогрупп, *E. coli*, *P. vulgaris*, а также штаммы микроорганизмов, относящиеся к роду *Aeromonas*.

Статьи, опубликованные в научных изданиях, которые были посвящены разработке и изучению новых питательных сред для выделения, культивирования и идентификации холерного вибриона, проанализированы формально-логическими методами. В исследовании были применены современные микробиологические и физико-химические методы. Обработка полученных данных осуществлялась по общепризнанным методам статистического анализа.

Материалы исследования

При проведении настоящей работы было исследовано:

- на этапе конструирования среды ХДС-агар - 855 образцов среды с различными концентрациями питательной основы, солей, агара микробиологического;
- на этапе испытаний сконструированной среды ХДС-агар - 240 образцов 25 экспериментальных серий;
- на этапе конструирования среды ХДС-Н - 585 образцов среды с различными концентрациями питательной основы, солей, а также различными значениями pH;
- на этапе испытаний сконструированной среды ХДС-Н - 224 образца 28 экспериментальных серий;

- на этапе конструирования среды ХДС-бульон - 445 образцов среды с различными концентрациями питательной основы, солей, а также различными значениями pH;
- на этапе испытаний сконструированной среды ХДС-бульон - 120 образцов 15 экспериментальных серий;
- на этапе конструирования среды АЖС-агар - 855 образцов среды с различными концентрациями питательной основы, L-Аргинина солянокислого, сахарозы, солей, индикаторов, а также различными значениями pH;
- на этапе испытаний сконструированной среды АЖС-агар - 144 образца 18 экспериментальных серий;

Так же при проведении данной работы на наличие холерного вибриона было исследовано 816 проб поверхностных водоёмов из стационарных точек на территории г. Ростова-на-Дону и 112 проб из мест сброса сточных вод после очистных сооружений КНС-4.

В качестве контрольных и сред сравнения были использованы зарегистрированные в установленном порядке сухие щелочные агары и основные пептоны производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (впоследствии АО «Микроген»), ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск Московской области; среда Гисса-ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск Московской области; агар Клигlera-ГРМ производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск Московской области; декарбоксилазный бульон Мёллера (с аргинином) производства HiMedia Ltd., Индия; питательные среды лабораторного изготовления: бульон Мартена, среда АКI (Iwanaga M. et al., 1985), среды лактозо-сахарозная и Хью-Лейфсона, среды Гисса с различными углеводами и многоатомными спиртами и индикатором Андреде, среды Меллера с лизином, аргинином и орнитином.

В настоящей работе были использованы 70 штаммов *V. cholerae* различных биоваров и серогрупп из коллекции лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, в том числе, 4 штамма *V. cholerae* O1 classical, 53 штамма *V. cholerae* O1 El Tor, 8 штаммов *V. cholerae* O139 и 5 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Для сравнительного изучения роста бактериальных популяций *V. cholerae* и микробов-контаминантов *E. coli* и *P. vulgaris* в жидкой накопительной среде, а так же для изучения дифференцирующих свойств разработанной питательной среды АЖС-агар были использованы штаммы других микроорганизмов, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* и роду *Aeromonas*.

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Биологические показатели питательных сред (чувствительность, показатель прорастания, диаметр колоний, морфология колоний, дифференцирующие свойства) определяли в соответствии с МУ 3.3.2.2124-06 и МУК 4.2.2316-08.

Выделение культуры холерного вибриона из искусственных смесей с различными концентрациями микроорганизмов-контаминантов, исследование проб воды поверхностных водоёмов и сточных вод, а так же материала от людей на наличие холерного вибриона проводили согласно МУК 4.2.2218-07, МУК 4.2.3745-22.

Культивирование штаммов *V. cholerae* с целью исследования их энтеротоксинпродуцирующей активности (продукции холерного энтеротоксина - СТ)

осуществляли методом непрерывного шуттелирования при 33°C и частоте - 180 качаний платформы в минуту в течение 18 часов во флаконах объёмом 100 мл с 10 мл среды (опытной и контрольных) под ватно-марлевой пробкой. В качестве контрольных сред служили бульон Мартена pH 7,8±0,2 и среда AKI (Iwanaga, M. et al, 1985, 1987). Каждый флакон засекали 0,1 мл суспензии, содержащей 1х10⁹ м.к./мл суточной агаровой культуры исследуемого штамма. Супернатанты получали центрифугированием при 8 тыс. g в течение 30 минут.

Биологический метод определения холерного энтеротоксина

Продукцию СТ *in vitro* штаммами холерного вибриона при их культивировании на опытной и контрольной средах исследовали постановкой теста кожной проницаемости (Richardson S.H., 1969, 1971; Овсова Л.М. и др., 2003), а также на культуре клеток СНО-K1 (Guerrant R.L. et al., 1974).

Метод изучения стабильности питательных сред: долговременной, в процессе применения, при транспортировании

Изучение стабильности питательных сред (в настоящей работе - АЖС-агар) проводили руководствуясь требованиями, изложенными в ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики IN VITRO. Оценка стабильности для диагностики *in vitro*».

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии

Использовали масс-спектрометр Autoflex speed III Bruker Daltonix (Германия) (Coelho A. et al., 2009; Афанасьев М.В. и др., 2014; Котенева Е.А., 2017) и программное обеспечение Biotyper.

Физико-химические методы исследования

Определение физико-химических показателей питательных сред (общего и аминного азота, углеводов, содержания натрия хлорида, прочности агарового студня, pH) проводили в соответствии с МУК 4.2.2316-08, МУК 4.1/4.2.588-96.

Статистические методы

Статистическую обработку данных проводили по биометрическим методам, включающим определение ошибок средних арифметических, коэффициентов вариаций, доверительных интервалов (Каминский Л.С., 1964). Группировку первичных данных и вычисления осуществляли на персональных компьютерах с использованием пакета программ Microsoft Excel.

Личное участие автора в получении результатов

Автору принадлежит идея разработки питательных сред выделения и культивирования холерного вибриона на основе дрожжевого ферментативного белкового гидролизата. Автором лично проведено конструирование сред ХДС-Н, ХДС-агар и ХДС-бульон и изучение показателей, характеризующих качество разработанных питательных сред, выполнены модельные опыты по выделению штаммов холерного вибриона из искусственных смесей, проведены испытания сред при исследовании водных объектов, сформирована и реализована идея конструирования среды для первичной идентификации холерного вибриона - АЖС-агара, выполнена работа по внедрению разработанных питательных сред в практику. Основные положения диссертации, её актуальность, научная новизна, практическая значимость, выводы и практические рекомендации сформулированы автором лично.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанные дрожжевые питательные среды ХДС-агар и ХДС-Н, имея значительные экономические преимущества перед существующими аналогами, превосходят некоторые из них по ряду биологических показателей в отношении различных штаммов холерного вибриона и эффективности применения в мониторинговых исследованиях водных объектов.

2. Разработанная дрожжевая среда ХДС-бульон может быть эффективно использована не только для культивирования штаммов холерного вибриона, но и в качестве среды накопления холерного энтеротоксина (СТ) и скрининга штаммов *V. cholerae* по критерию энтеротоксинпродуцирующей активности *in vitro*.

3. Разработана эффективная питательная среда для первичной идентификации холерного вибриона АЖС-агар. В основу дифференцирующих свойств данной среды заложены три критерия: выявление способности исследуемых микроорганизмов ферментировать сахарозу, аргинин и образовывать сероводород. Предложенная среда позволяет дифференцировать между собой вибрионы и близкородственные сахарозопозитивные аэромонады, что существенно облегчает отбор подозрительных на *V. cholerae* колоний при проведении лабораторной диагностики холеры.

Степень достоверности и апробация результатов исследования

Диссертационная работа была выполнена в рамках реализации трёх НИР: № 017-4-02 «Разработка питательных сред для культивирования и выделения холерных вибрионов» (№ государственной регистрации 01.200.200.2 12998); № 136-4-11 «Разработка алгоритма обеспечения питательными средами специализированной противоэпидемической бригады при работе в очаге холеры» (№ государственной регистрации 01201002622); № 203-4-18 «Разработка питательной среды для идентификации холерного вибриона «Аргинин-железо-сахарозный агар» (№ государственной регистрации АААА-А18-118022).

Достоверность полученных результатов базируется на достаточных объёмах выборок изучаемых образцов разработанных питательных сред (ХДС-агар, ХДС-Н, АЖС-агар) - было исследовано 3468 образцов, проб объектов окружающей среды - 928, репрезентативной выборке использованных штаммов холерного вибриона и других микроорганизмов в количестве 77, а также воспроизводимости результатов в пятикратной повторности.

Диссертация апробирована на заседании Учёного совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 15 от 25.11.2024 г.).

Материалы и результаты исследований были доложены на заседаниях Проблемной комиссии (48.04) «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (г. Ростов-на-Дону, 05.06.2002 г., 04.06.2004 г., 04.06.2010 г., 07.06.2012 г.); научных конференциях ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт (20.03.2001 г., 04.10.2001 г., 02.03.2004 г., 10.09.2009 г., 08.04.2015 г.); на XI научно-практической конференции, посвященной 115-летию ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница», г. Краснодар (01.06.2018 г.).

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 20 печатных работ, из них 8 статей - в

рецензируемых научных изданиях, 3 статьи - в других изданиях, 6 тезисов в сборниках материалов конференций, 3 патента на изобретение. Подготовлены и утверждены 4 эксплуатационных документа на питательные среды. Получены 2 регистрационных удостоверения на питательные среды.

Объём и структура диссертации

Диссертация изложена на 162 страницах, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), 3 глав собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, списка научных публикаций. Она иллюстрирована 27 таблицами и 7 рисунками. Библиография представлена 214 работами, в том числе 140 - отечественными, 74 - иностранными.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Конструирование и исследование основных характеристик и показателей микробиологических сред для *V. cholerae* - ХДС-агара, ХДС-Н и ХДС-бульона на репрезентативной выборке музейных и свежевыделенных штаммов данного микроорганизма

В ходе выполненных исследований были сконструированы на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей три питательных среды: агаризованная ХДС-агар, жидкая накопительная ХДС-Н и бульон для культивирования холерного вибриона ХДС-бульон. После проведенной оптимизации составы разработанных сред были следующими (Таблица 1).

Таблица 1 - Составы разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред для холерного вибриона

Ингредиенты, единицы измерения	Оптимальные концентрации в составе сред (на 1,0 л готовой среды)		
	ХДС-агар	ХДС-Н (концентрированная)	ХДС-бульон
Панкреатический перевар пекарских дрожжей, % по аминному азоту	0,05±0,01	0,22±0,02	0,07±0,01
Натрий хлористый, г	4,0	50,0	5,0
Натрий фосфорнокислый двузамещённый, г	6,0	5,0	6,0
Калий азотнокислый, г	нет	1,0	нет
Агар-агар бактериологический, г	13,0	нет	нет
Вода дистиллированная	до 1,0 л	до 1,0 л	до 1,0 л
рН	7,8±0,2	8,2±0,2	7,8±0,2

Было установлено, что разработанная питательная среда ХДС-агар по своим биологическим показателям не уступала щелочному агару производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск (Таблица 2) и превосходила щелочной агар производства ФГУП НПО «Микроген» по диаметру колоний, показателю прорастания из посевной дозы 100 м.к., эффективности и чувствительности в отношении одного штамма *V. cholerae* O1 *classical* и восьми штаммов *V. cholerae* O139.

Таблица 2 - Результаты сравнительного изучения ХДС-агара и контрольной среды - щелочного агара производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск в ходе предрегистрационных испытаний

Штаммы <i>V. cholerae</i>	ХДС-агар		Щелочной агар	
	Показатель прорастания из 100 м.к. (M±m)	Чувствительность, м.к.	Показатель прорастания из 100 м.к. (M±m)	Чувствительность, м.к.
<i>V. cholerae</i> O1 classical 3 штамма	42,44±2,16	10	36,89±2,04	10
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 6 штаммов	38,39±1,62	10	36,11±1,21	10
<i>V. cholerae</i> O139 2 штамма	42,84±2,95	10	34,50±1,02	10
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 4 штамма	45,17±2,17	10	39,58±4,30	10

Примечание: М - среднее значение определяемого показателя; m - ошибка среднего значения определяемого показателя; штаммы *V. cholerae* O1 classical: P-1 (145), 1391, 569В; штаммы *V. cholerae* O1 El Tor: М-878, 18367, 18368, 18588, 18890, 19433; штаммы *V. cholerae* O139: 16064, 17676; штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139: P-9741, P-5447, P-5448, P-5449

Основываясь на полученных в ходе сравнительного изучения опытной и контрольных сред данных, можно сделать заключение о том, что разработанная накопительная среда ХДС-Н по изученным биологическим показателям не уступала контрольной среде - 1% пептонной воде, приготовленной из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск (Таблица 3).

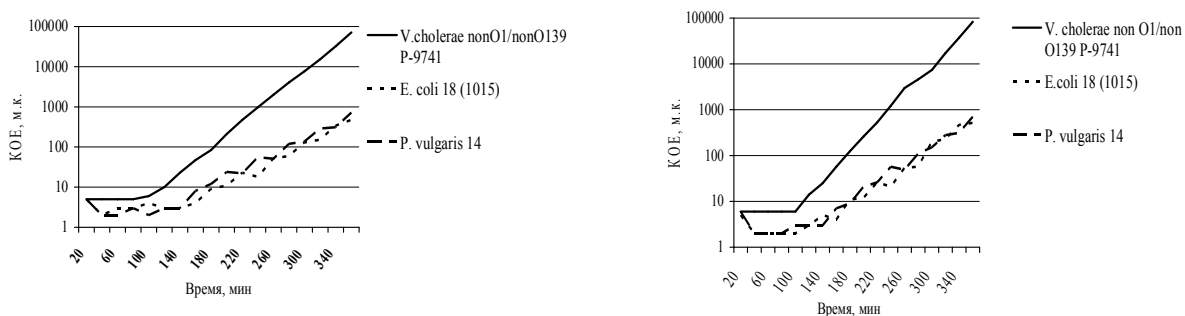
Таблица 3 - Результаты сравнительного изучения разработанной среды ХДС-Н и 1% пептонной воды, приготовленной из основного пептона производства ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск в ходе предрегистрационных испытаний

Штаммы <i>V. cholerae</i>	ХДС-Н (разведённая в 10 раз дистиллированной водой)			1% пептонная вода		
	Показатель числа выросших колоний при высеве шестичасовых культур на агаровые пластинки		Чувствительность, м.к.	Показатель числа выросших колоний при высеве шестичасовых культур на агаровые пластинки		Чувствительность, м.к.
	Исходная посевная доза 10 м.к. (M±m)	Исходная посевная доза 100 м.к. (M±m)		Исходная посевная доза 10 м.к. (M±m)	Исходная посевная доза 100 м.к. (M±m)	
<i>V. cholerae</i> O1 classical 3 штамма	13,96±0,76	149,07±6,13	10	13,37±0,96	147,41±2,46	10
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 6 штаммов	12,52±0,77	123,96±4,23	10	11,83±0,83	125,45±1,95	10
<i>V. cholerae</i> O139 2 штамма	14,06±0,79	97,06±1,92	10	13,28±0,99	94,33±1,68	10
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 9 4 штамма	17,12±0,87	97,25±2,03	10	16,17±1,03	93,97±1,27	10

Примечание: М - среднее значение определяемого показателя; m - ошибка среднего значения определяемого показателя; штаммы *V. cholerae* O1 classical: P-1 (145), 1391, 569В; штаммы *V. cholerae* O1 El Tor: М-878, 18367, 18368, 18588, 18890, 19433; штаммы *V. cholerae* O139: 16064, 17676; штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139: P-9741, P-5447, P-5448, P-5449

Данная питательная среда превосходила аналогичную среду производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ в отношении одного штамма *V. cholerae* O1 *classical*, одного штамма *V. cholerae* O1 El Tor и всех взятых в исследование штаммов холерного вибриона O139 серогруппы.

Было проведено сравнительное изучение роста бактериальных популяций холерного вибриона, кишечной палочки и протей в опытной (ХДС-Н) и контрольной (1% пептонная вода) жидких накопительных средах в первые шесть часов культивирования. Были построены кривые роста популяций данных штаммов (Рисунок 1).



А

Б

Рисунок 1 - Кривые роста *V. cholerae* nonO1/nonO139 P-9741, *E. coli* 18, *P. vulgaris* 14 на разработанной накопительной питательной среде ХДС-Н (А) и 1% пептонной воде (Б) в течение первых 6 часов от начала культивирования

При равных низких посевных дозах, как в среде ХДС-Н, так и в 1% пептонной воде размножение данного штамма холерного вибриона происходило быстрее, чем использованных в настоящей части работы культур кишечной палочки и протей. Это обусловлено, вероятно, более короткой латентной фазой и меньшим значением времени генерации у *V. cholerae* nonO1/nonO139 P-9741 по сравнению с *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14.

Установлено, что 32 штамма холерного вибриона, выделенных во время вспышки холеры от людей в г. Казань летом 2001 г., продуцировали СТ, наличие которого регистрировали при их культивировании как в ХДС-бульоне, так и в контрольных средах: бульоне Мартена pH 7,8 и среде АК1. Полученные данные свидетельствуют в пользу пригодности разработанного ХДС-бульона в качестве среды для скрининга штаммов холерного вибриона по критерию энтеротоксинопродукции *in vitro*.

Изучение эффективности применения новых дрожжевых питательных сред для выделения и культивирования холерного вибриона - ХДС-агара и ХДС-Н в модельных опытах и при мониторинговых исследованиях водных объектов на предмет контаминации их холерными вибрионами

При проведении модельных опытов было установлено, что на опытном комплексе сред (ХДС-Н - ХДС-агар) штамм *V. cholerae* в конечной концентрации 10 м.к./мл удавалось изолировать из смесей, содержащих до 1×10^8 м.к./мл использованных штаммов кишечной палочки и протей. На средах сравнения достигнуть выделения холерного вибриона в данной концентрации было возможным только из смесей с взятыми в исследование штаммами микроорганизмов сопутствующей микрофлоры, концентрация которых была на порядок ниже, чем в случае использования опытных

сред.

Различия между разработанными и контрольными средами для культивирования и выделения холерного вибриона можно объяснить разницей содержания питательной основы (по аминному азоту) в средах накопления. Среда ХДС-Н используется (в данном случае) в десятикратно разведённом виде и имеет концентрацию питательной основы 0,02% по аминному азоту. Это в 2,5-3,5 раз меньше, чем в 1% пептонной воде, которая может быть получена из основного раствора пептона аналогичным путём. Такого количества питательной основы вполне достаточно для того, чтобы, холерный вибрион, благодаря своим физиологическим особенностям размножался гораздо быстрее, чем другие микроорганизмы, которые присутствуют во взятых на анализ пробах как контаминанты. Изложенные обстоятельства создают предпосылки эффективного применения разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред с целью исследования клинического материала на наличие *V. cholerae*.

Были проведены испытания сконструированных питательных сред ХДС-Н (в концентрированном и десятикратно разведенном вариантах) и ХДС-агар в условиях их комплексного использования при мониторинговых исследованиях водных объектов г. Ростов-на-Дону, направленных на выявление *V. cholerae*. Пробы воды отбирали из стационарных точек, расположенных вдоль русла рек Дон и Темерник, а также в местах сброса сточных вод после очистных сооружений КНС-4. Результаты этой части исследования приведены в таблице 4.

Таблица 4 - Итоги испытаний разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред ХДС-Н и ХДС-агар за шесть лет мониторинговых исследований воды поверхностных водоёмов и стоков на территории г. Ростов-на-Дону

Показатели	Из поверхностных водоёмов	Из сточных вод	Всего
Исследовано проб воды	816	122	938
Выделено культур <i>V. cholerae</i> O1	16	2	18
Выделено культур <i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	407	31	438

О высокой результативности использования сконструированных сред при исследовании водных объектов свидетельствует тот факт, что за шесть лет мониторинга с помощью комплекса ХДС-Н - ХДС-агар холерные вибрионы выделяли из каждой второй исследованной пробы, в частности, было изолировано 18 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, а также - не менее 65 штаммов холерного вибриона nonO1/nonO139 серогрупп ежегодно.

Проведённые испытания разработанных сред ХДС-Н и ХДС-агар в тактико-специальном учении специализированной противоэпидемической бригады наглядно продемонстрировали их выраженные преимущества перед контрольными. Так, в учебных пробах, имитирующих материал от больных и вибрионосителей за счёт их искусственной контаминации штаммом холерного вибриона, с помощью комплекса сред ХДС-Н - ХДС-агар данный микроорганизм был выявлен в случаях его конечной

концентрации 10^3 , 10^5 , 10^7 м.к./мл. На контрольных средах это удалось сделать только в пробах, в которых концентрация возбудителя превышала 10^5 м.к./мл.

Результаты исследований 10 реальных проб из воды рек Дон и Темерник в ходе тактико-специального учения подтвердили преимущества комплекса сконструированных сред, на котором был выделен нетоксигенный штамм холерного вибриона O1 серогруппы. Из этих же проб при параллельных посевах на контрольные среды штаммы *V. cholerae* O1 не были изолированы.

Успешные испытания разработанных сред ХДС-Н и ХДС-агар в процессе учения специализированной противоэпидемической бригады открывают перспективы их включения в табель оснащения бригады (в качестве сред резерва) для работы по локализации и ликвидации эпидемических проявлений холеры.

Одним из важных аспектов разработки питательных сред является их экономическая составляющая. В результате проведённых расчётов установлено, что по показателю стоимости материалов на изготовление 1,0 л сред питательные среды ХДС-Н и ХДС-агар в 8,95 и 1,98 раз соответственно дешевле используемых в практике аналогов.

Проведённые комиссионные испытания среды ХДС-Н продемонстрировали её полное соответствие требованиям национальных стандартов (акт комиссионной проверки от 25.12.2002 г.) и заявленным в Инструкции по изготовлению и контролю (утверждена директором ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора 29.12.2005 г.) показателям качества.

Сконструированная и прошедшая всесторонние испытания питательная среда ХДС-агар зарегистрирована в установленном порядке как изделие медицинского назначения (Регистрационное удостоверение от 27.03.2017 г. № РЗН 2017/5435).

Разработка, изучение биологических показателей и оценка эффективности применения новой питательной среды для идентификации холерного вибриона АЖС-агар

Одним из важнейших направлений проведенных исследований явилось создание среды для первичной идентификации холерного вибриона по его биохимической активности в отношении сахарозы, аргинина и продукции сероводорода - АЖС-агара. Данная среда уникальна и аналогичной среды в мировой практике до настоящего времени не было разработано.

При конструировании этой питательной среды провели выбор и оптимизацию содержания (по аминному азоту) питательных основ (панкреатического перевара пекарских дрожжей или пептона ферментативного), сахарозы, L-Аргинина солянокислого, солевых компонентов (натрия хлористого, натрия серноватистокислого, соли Мора, калия фосфорнокислого двузамещённого 3-водного), агара микробиологического. Так же определили значение оптимума pH АЖС-агара и подобрали входящую в его состав индикаторную систему, состоящую из бромтимолового синего и крезолового красного в их оптимальных концентрациях (в виде спиртовых растворов).

Проведённая качественная и количественная оптимизация состава разрабатываемой питательной среды АЖС-агар позволила сформировать её следующий финишный вариант (из расчёта на 1,0 л):

- панкреатический перевар пекарских дрожжей - из расчёта - 0,006% по аминному

азоту или пептон сухой ферментативный для бактериологических целей (по ГОСТ 13805-76) - 1,0 г;

- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) - 5,0 г;
- L-Аргинин солянокислый ЧДА или ХЧ (по ТУ 6-09-2100-78) - 13,0 г;
- сахара ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 5833-75, Изм. № 3) - 1,0 г;
- натрий серноватисто-кислый 5-водный ЧДА (по ГОСТ 27068-86) - 0,3 г;
- соль закиси железа и аммония двойная сернокислая 6-водная (Соль Мора) ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4208-72, Изм. 2) - 0,2 г;
- калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный ЧДА (по ГОСТ 2493-75, Изм. № 2) - 0,3 г;
- агар-агар микробиологический (по ГОСТ 17206-96) - 12,0 г;
- бромтимоловый синий водорастворимый ЧДА (по ТУ 6-09-07-1602-87) - 0,03 г (в виде 1,6% спиртового раствора - 1,88мл);
- крезоловый красный водорастворимый ЧДА (по ТУ 6-09-796-76) - 0,015 г (в виде 0,1% спиртового раствора - 5 мл);
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1) - до 1 литра;
- рН 6,7.

Дифференцирующие свойства АЖС-агара в сравнении с контрольными средами - декарбоксилазным бульоном Мёллера с аргинином (HiMedia), средой Гисса-ГРМ с сахарозой и агаром Клигlera-ГРМ изучали с использованием 19 штаммов холерного вибриона (*V. cholerae* O1 El Tor - 9 штаммов; *V. cholerae* O1 classical - 1 штамм; *V. cholerae* O139 - 8 штаммов; *V. cholerae* nonO1/nonO139 - 1 штамм), 5 штаммов - представителей рода *Aeromonas*, а так же 2 штаммов - представителей семейства *Enterobacteriaceae* (*E. coli* и *P. vulgaris*).

Культивирование в АЖС-агаре всех использованных штаммов холерного вибриона приводило к изменению цвета всей толщи среды от зеленого на жёлтый. В случае применения для этой цели контрольных сред их исходный цвет также изменялся на жёлтый. Продукция сероводорода при этом отсутствовала как на опытной, так и на контрольных средах.

Аэромонады, в отличие от штаммов *V. cholerae*, при выращивании в АЖС-агаре изменяли его исходный зелёный цвет на синий благодаря накоплению продуктов расщепления аргинина, сдвигающих рН в щелочную сторону. Эта реакция доминировала над закислением, связанным с ферментативным расщеплением сахарозы. Только у *A. caviae* Р-6051 «столбик» среды оставался жёлтым после посинения скошенной части вследствие ферментации аргинина. Это обстоятельство в перспективе может служить ключом к дифференциации штаммов внутри рода *Aeromonas* и требует специального изучения.

Культивирование всех использованных в работе штаммов аэромонад в контрольном декарбоксилазном бульоне Мёллера с аргинином продемонстрировало наличие у них фермента аргининдигидролазы, о чем свидетельствует изменение цвета среды от пурпурного до фиолетового. На других контрольных средах - Гисса-ГРМ и агаре Клигlera-ГРМ (в составе которых аргинин отсутствует) штаммы рода *Aeromonas* ферментировали сахарозу с накоплением кислых продуктов. Указанная реакция регистрировалась по наличию пожелтения данных сред.

В связи с отсутствием у кишечной палочки способности ферментировать как сахарозу, так и аргинин, штамм *E. coli* 18 при культивировании на АЖС-агаре не вызывал изменения исходного зелёного цвета среды.

При росте на контрольных средах - декарбоксилазном бульоне Мёллера с аргинином (HiMedia) и агаре Клиглера-ГРМ *E. coli* 18 вызывал пожелтение обеих сред. Наличие газообразования на агаре Клиглера-ГРМ (пузырьки газа в толще среды, отрыв содержимого пробирок от их стенок) свидетельствовало о том, что штамм кишечной палочки ферментирует глюкозу, входящую в состав данной среды. На среде Гисса-ГРМ с сахарозой штамм *E. coli* 18 не вызывал никаких изменений (исходный зелёный цвет среды), что также свидетельствовало об отсутствии ферментации сахарозы.

Так же в ходе сравнительного изучения установили, что *P. vulgaris* НХ 19 № 222 при культивировании его в условиях 37°C на АЖС-агаре окрашивал скошенную часть и «столбик» среды в жёлто-оранжевый цвет вследствие ферментации сахарозы с более выраженным, чем у штаммов холерного вибриона, кислотообразованием. При культивировании данного штамма на опытной среде регистрировали также чёрный преципитат сульфида железа в «столбике», что указывало на продукцию H_2S . При росте на контрольных средах он вызывал их закисление (жёлтый цвет обеих сред), что говорило об отсутствии у него образования щелочных продуктов вследствие ферментации аргинина, присутствии утилизации сахарозы с образованием кислоты. На контрольной среде - агаре Клиглера-ГРМ *P. vulgaris* НХ 19 № 222 вызывал закисление «столбика» среды (жёлтый цвет) с образованием «колец» или «зон» чёрного цвета, которые указывали на продукцию сероводорода.

Подводя итоги по настоящей части работы, можно сделать заключение о том, что АЖС-агар позволяет проводить эффективную идентификацию *V. cholerae* одновременно по трём признакам и дифференциацию его штаммов от аэромонад, кишечной палочки и протей (Рисунок 2).



Рисунок 2 - Цвет АЖС-агара при посеве в него тест-штаммов микроорганизмов - целевых аналитов

Приоритет полученных данных подтверждён патентом на изобретение от 26.10.2020 г. № 2734940 «Способ дифференциации бактерий *Vibrio cholerae* от бактерий представителей рода *Aeromonas*».

При межлабораторных испытаниях питательной среды АЖС-агар получено положительное заключение.

В процессе оформления нормативной документации проведено изучение специфичности, воспроизводимости и стабильности физико-химических и биологических показателей питательной среды АЖС-агара. Выявлена и подтверждена её специфичность в отношении выбранных штаммов - целевых аналитов, что позволяет дифференцировать их друг от друга, а также воспроизводимость полученных результатов определения физико-химических и биологических показателей. Определена стабильность разработанной среды «в реальном времени», включающая долговременную стабильность, покрывающую срок годности и стабильность при применении.

Результатами исследования стабильности АЖС-агара подтверждены: срок годности (1 год) и срок использования настоящего препарата после вскрытия первичной упаковки (10 дней) при соблюдении необходимых температурных режимов.

Оформлены, одобрены Учёным Советом и утверждены директором института 30.03.2020 г. нормативная и эксплуатационная документация на разработанный препарат.

Результаты посевов материала 375 подозрительных колоний при испытаниях АЖС-агара в ходе исследования проб из водных объектов убедительно свидетельствуют, что на нем можно было четко дифференцировать холерные вибрионы (преимущественно nonO1/nonO139 серогрупп) от аэромонад по изменению цвета «столбика» и скошенной части среды от исходного зелёного к жёлтому или жёлто-зелёному у *V. cholerae* и к синему - у материала из колоний аэромонад. Контрольная среда Клиглера-ГРМ не давала возможности проводить подобную дифференциацию, так как колонии обоих микроорганизмов имели на ней идентичный вид. Эти результаты подтверждают преимущество по дифференцирующим свойствам разработанной среды АЖС-агар перед описанной в литературных источниках и широко применяемой средой Клиглера (Kusama H. et al., 1970; Милютин В.Н. и др., 1975; Татаринова С.Д., 1980; Петровский Б.В. и др., 1982; Адамов А.К. и др., 1984; Рожков Е.В. и др., 1988).

По результатам сравнительных исследований эффективности использования двух методов идентификации подозрительных на холерный вибрион колоний со щелочного агара: посева материала данных колоний на АЖС-агар и исследования методом MALDI-TOF масс-спектрометрии было установлено совпадение на 98,8% результатов, полученных при использовании каждого из методов в отношении 81 исследованной колонии.

Сконструированная среда АЖС-агар зарегистрирована в установленном порядке (№ РЗН 2020/10543 от 03.06.2020 г.).

Полученные при выполнении диссертации результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего продолжения выбранного направления исследований. Создан эффективный, экономически выгодный и конкурентоспособный инструмент для решения ряда научных и практических задач эпидемиологического надзора за холерой. Государственная регистрация разработанных питательных сред, постановка их на производство и внедрение в практику лабораторной диагностики холеры позволит решить, в том числе, и задачи по импортозамещению в данной области.

Предлагаемый набор питательных сред (ХДС-агар, ХДС-Н, ХДС-бульон, АЖС-агар) в полной мере может обеспечить потребности лабораторий территориального уровня,

выполняющих основной объём мониторинговых исследований на холеру, и, частично, лабораторий регионального и федерального уровней.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и предложены к внедрению в микробиологическую практику питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона ХДС-агар и ХДС-Н на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей, характеризующиеся экономическими преимуществами перед применяемыми в практике аналогами (стоимость материалов на изготовление 1 л разработанных сред в 1,98 и 8,95 раз соответственно меньше), и при этом превосходящие по чувствительности традиционные щелочной агар и основной пептон в 100 раз в отношении одного штамма *V. cholerae* O1 *classical* и трёх штаммов *V. cholerae* O139 и в 10 раз - в отношении четырёх штаммов *V. cholerae* O139.

2. Экспериментально обоснована возможность эффективного использования созданного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей ХДС-бульона для культивирования и накопления биомассы штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп и скрининга их по критерию продукции энтеротоксина *in vitro*, что подтверждено идентичными с контрольной средой - бульоном Мартена титрами СТ в культуре клеток СНО-К1 в отношении 93,9% исследованных штаммов, а также десятикратным преимуществом по этому показателю перед указанной контрольной средой в отношении одного штамма *V. cholerae* O1 El Tor.

3. Продемонстрирована эффективность сконструированных сред ХДС-агар и ХДС-Н при исследованиях водных объектов на предмет их контаминации холерными вибрионами, подтвержденная выделением с их помощью 18 штаммов *V. cholerae* O1, что в шесть раз превосходит аналогичный показатель на контрольных средах. Выявленное преимущество разработанного комплекса сред способствовало реальному обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия населения Ростовской области по холере.

4. Экспериментально показана возможность эффективной дифференциации с помощью разработанной среды АЖС-агара штаммов *V. cholerae* от наиболее часто встречающихся микроорганизмов - представителей сопутствующей микрофлоры: аэромонад, кишечной палочки и протей, результаты которой на 98,8% совпадают с данными MALDI-TOF масс-спектрометрии.

5. Сконструированные питательные среды могут быть предложены в качестве резервных при укомплектовании специализированных противоэпидемических бригад для работы в очагах холеры.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Сконструированные в ходе выполнения диссертационной работы питательные среды ХДС-Н и ХДС-агар могут быть рекомендованы к применению микробиологическими лабораториями всех уровней для исследования на холеру клинического материала и проб из объектов окружающей среды в качестве эффективной альтернативы основному пептону и щелочному агару.

2. Созданный на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей ХДС-бульон может быть рекомендован лабораториям регионального и федерального уровней для

проведения исследований энтеротоксинопродуцирующей активности штаммов холерного вибриона.

3. Питательная среда АЖС-агар может быть рекомендована к использованию лабораториями территориального и регионального уровней при проведении отбора выросших на щелочном агаре колоний для дальнейшей расширенной идентификации сформировавших эти колонии культур на принадлежность к виду *V. cholerae*.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным направлением исследований в аспекте дальнейшей разработки темы представляется создание сухих вариантов сконструированных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей готовых к использованию сред для выделения, культивирования и первичной идентификации холерного вибриона.

Так же планируется создание, всестороннее изучение и внедрение в практику селективно-дифференциальных высокочувствительных питательных сред нового поколения для холерного вибриона. В их основе лежит возможность дифференциации данного возбудителя от представителей сопутствующей микрофлоры не только по признаку ферментации сахарозы (как в средах TCBS и СЭДХ), но одновременно и по другим биохимическим свойствам, а также использование современных эффективных селективных добавок.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Каминский, Д.И. Изучение возможности использования ХДС-агара для культивирования и выделения холерных вибрионов / Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков, Л.М. Овсова, И.С. Шестиалтынова, Ю.Г. Киреев, А.Б. Долгова, К.Б. Криваченко, В.Д. Кругликов, Е.П. Авдеева, О.Г. Булахова // В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2001. - Вып. 14. - С. 90 - 92.

2. Сальникова, О.И. Оценка токсинопродуцирующей активности штаммов холерного вибриона, выделенных при вспышке холеры в Казани в 2001 году, на модели культуры клеток СНО-К 1 и ИФА-2 АТ / О.И. Сальникова, О.В. Маркина, А.Б. Мазрухо, Л.М. Овсова, Л.П. Алексеева, Б.Л. Мазрухо, И.С. Шестиалтынова, Д.И. Каминский // В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2002. - Вып. 15. - С. 41 - 42.

3. Мазрухо, А.Б. Новый комплекс питательных сред для культивирования и выделения холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, К.К. Рожков, К.Б. Криваченко, Л.М. Овсова, В.Д. Кругликов, Б.Л. Мазрухо, И.С. Шестиалтынова, Е.П. Авдеева, О.Г. Булахова, О.И. Сальникова, О.В. Маркина, Л.П. Алексеева, А.В. Летуновский, Ю.Г. Киреев, А.Б. Долгова, К.В. Ерошенко, С.С. Хвацева, Н.Г. Золотилина, А.А. Рыжкова, Л.В. Солдатова // В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2002. - Вып. 15. - С. 80 - 82.

4. Каминский, Д.И. Результаты использования нового комплекса сред для диагностики холеры при исследовании проб воды на территории г. Ростова-на-Дону в 2000-2001 годах / Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков, Л.М. Овсова, В.Д. Кругликов, К.Б. Криваченко, Б.Л. Мазрухо, Е.П. Авдеева, О.Г. Булахова, Ю.Г. Киреев, А.Б. Долгова, К.В. Ерошенко, С.С. Хвацева, Н.Г. Золотилина, А.А. Рыжкова, Л.В. Солдатова // В сборнике: Окружающая среда и здоровье: Материалы научно-практической конференции с международным участием, посвящённой 90-летию основания кафедры общей гигиены и экологии СГМУ. - Саратов: СГМУ, 2002. - С. 95 - 96.

5. Каминский, Д.И. Оценка жидкой накопительной питательной среды ХДС-Н для культивирования и выделения холерного вибриона / Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, Ю.М. Ломов, К.К. Рожков, К.Б. Криваченко, Л.М. Овсова, Е.В. Монахова, В.Д. Кругликов, Б.Л. Мазрухо, Е.П. Авдеева, О.Г. Булахова, Ю.Г. Киреев, А.Б. Долгова, К.В. Ерошенко, С.С. Хвацева, Н.Г. Золотилина, А.А. Рыжкова, Л.В. Солдатова // Биотехнология. - 2003. - № 4. - С. 70 - 74.

6. Мазрухо, А.Б. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированных противэпидемических бригад Роспотребнадзора при работе в очаге холеры / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков, И.М. Алутич, В.Д. Кругликов, Ю.М. Пухов, В.И. Прометной, А.В. Тришина // Здоровье населения и среда обитания. - 2009. - № 11. - С. 8 - 16.

7. Мазрухо, А.Б. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Н.Р. Телесманич // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. - 2010. - № 3. - С. 75 - 80.

8. Мазрухо, А.Б. Новая питательная среда для диагностики холеры ХДС-агар как перспективный элемент мобилизационного резерва специализированных противэпидемических бригад / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков, Л.М. Овсова, О.Г. Булахова, В.Д. Кругликов, Ю.М. Пухов, В.И. Прометной, Н.Л. Пичурина // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. - 2011. - № 3. - С. 101 - 105.

9. Мазрухо, А.Б. Сравнительная оценка белковых гидролизатов при создании на их основе универсальной питательной среды для диагностики чумы и холеры / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков, В.Д. Кругликов // Клиническая лабораторная диагностика. - 2011. - № 6. - С. 46 - 48.

10. Мазрухо, А.Б. Результаты использования нового комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения специализированной противэпидемической бригады / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков, В.Д. Кругликов, Е.В. Гончаренко, А.В. Тришина, Ю.М. Пухов, В.И. Прометной, Н.Л. Пичурина // Проблемы особо опасных инфекций. - 2011. - Вып. 3 (109). - С. 54 - 57.

11. Каминский, Д.И. Совершенствование питательных сред для выращивания некоторых возбудителей опасных инфекционных болезней / Д.И. Каминский, В.В. Лобанов, К.К. Рожков, А.Б. Мазрухо // Журнал микробиологии, эпидемиологии и

иммунобиологии. - 2017. - № 2. - С. 104 - 110.

12. Мазрухо, А.Б. Экономические преимущества питательных сред на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей для выделения и культивирования холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, К.К. Рожков, В.Д. Кругликов, М.И. Ежова, И.В. Архангельская, Н.Л. Пичурина // В сборнике: Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области: Материалы региональной научно-практической конференции, посвящённой 95-летию санитарно-эпидемиологической службы Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 24 октября 2017 г.). - Ростов-на-Дону, 2017. - С. 206 - 212.

13. **Каминский, Д.И.** Внедрение в практику здравоохранения питательных сред на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей - новый вектор совершенствования лабораторной диагностики холеры / **Д.И. Каминский**, А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков // В сборнике: Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России: Материалы XI научно-практической конференции, посвящённой 115-летию ГБУЗ «Специализированная клиническая инфекционная больница» Министерства здравоохранения Краснодарского края (Краснодар, 31 мая - 1 июня 2018 г.). - Краснодар, 2018. - С. 100 - 102.

14. Мазрухо, А.Б. Изучение эффективности питательной среды для идентификации холерного вибриона «Аргинин-железо-сахарозный агар» при проведении клинических испытаний / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, Д.В. Соков, Л.М. Овсова, О.Г. Сокиркина, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.А. Левченко, М.И. Ежова // Астраханский медицинский журнал. - 2021. - Т. 16, № 1. - С. 73 - 82.

15. Мазрухо, А.Б. Дифференциация штаммов холерного вибриона от микроорганизмов-представителей рода *Aeromonas* с помощью питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, В.В. Лобанов, Д.В. Соков, И.В. Архангельская, М.И. Ежова, Д.А. Левченко, М.М. Сагакянц // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский Регион. Естественные науки. - 2021. - № 2. - С. 119 - 125.

16. Мазрухо, А.Б. Изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» в ходе мониторинговых исследований воды поверхностных водоёмов и сточных вод на наличие холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, Л.М. Овсова, В.В. Лобанов, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, Д.В. Соков, Е.А. Меньшикова, Д.А. Левченко, М.И. Ежова, Е.Ю. Люкшина, Ю.Г. Киреев, В.В. Балахнова // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. - 2021. - Т. 17, № 2. - С. 69 - 74.

17. **Каминский, Д.И.** Разработка технологии изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей как основы питательных сред для холерного вибриона / **Д.И. Каминский**, А.Б. Мазрухо, Д.В. Соков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. - 2024. - Т. 20, № 4. - С. 6 - 14.

ПАТЕНТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

18. Патент 2375441 Российская Федерация, МПК C12N 1/16 (2006.01) A23J (2006.01). Способ получения белкового гидролизата / Мазрухо А.Б., Каминский

Д.И., Рожков К.К., Алути И.М. заявитель и патентообладатель: ФГУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (RU). - № 2008100689/13; заявл. 09.01.2008; опубл. 10.12.2009, Бюл. № 34. - 7 с.

19. Патент 2392310 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01). Среда обогащения для выделения холерного вибриона / Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алути И.М. заявитель и патентообладатель: ФГУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (RU). - № 2008137070/13; заявл. 15.09.2008; опубл. 20.06.2010, Бюл. № 17. - 7 с.

20. Патент 2734940 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01) C12R 1/63 (2006.01). Способ дифференциации бактерий *Vibrio cholerae* от бактерий представителей рода *Aeromonas* / Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К. заявитель и патентообладатель: ФГУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора (RU). - № 2019117111; заявл. 03.06.2019; опубл. 26.10.2020, Бюл. № 30. - 10 с.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЖС-агар - Аргинин-железо-сахарозный агар; дифференциально-диагностическая питательная среда, предназначенная для идентификации холерного вибриона и его дифференциации от микроорганизмов сопутствующей ему в пробах микрофлоры: *Aeromonas spp.*, *E. coli*, *P. vulgaris*

ГРМ - гидролизат рыбной муки

КНС-4 - канализационно-насосная станция № 4 г. Ростов-на-Дону

м.к. - микробные клетки

МУ, МУК - методические указания

НИР - научно-исследовательская работа

СЭДХ - среда селективно-дифференциальная для выделения холерного вибриона

ХДС-агар - холерная дрожжевая среда агаризованная (агаризованная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей)

ХДС-бульон - холерная дрожжевая среда - бульон (жидкая питательная среда для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей)

ХДС-Н - холерная дрожжевая среда накопительная (жидкая накопительная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей)

АКІ - питательная среда для выявления энтеротоксинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона в условиях *in vitro*

СНО-К1 - овариальные клетки золотистого хомячка

СТ - холерный энтеротоксин

ТСBS - селективно-дифференциальная среда для выделения холерного вибриона