

**Федеральное казённое учреждение здравоохранения
«Ростовский-на-Дону Ордена Трудового Красного Знамени научно-
исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по
надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека**

На правах рукописи

Каминский Денис Игоревич

Разработка и экспериментальное обоснование применения новых питательных
сред для холерного вибриона

1.5.6 – биотехнология

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

А.Б. Мазрухо

Ростов-на-Дону – 2025

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	8
Актуальность темы исследования	8
Степень разработанности темы исследования	11
Цель исследования	12
Задачи исследования	13
Научная новизна исследования	13
Теоретическая и практическая значимость работы	14
Методология и методы исследования	15
Материалы исследования	16
Методы исследования	21
Микробиологические методы исследования	21
Биологический метод определения холерного энтеротоксина	26
Метод изучения стабильности питательных сред: долговременной, в процессе применения, при транспортировании	26
Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии.....	26
Метод оптимизации состава питательных сред.....	27
Физико-химические методы исследования	27
Статистические методы	27
Личное участие автора в получении результатов	28
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	28
Степень достоверности и апробация результатов исследования	29
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	30
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	30
1.1 Проблемы периодического культивирования микроорганизмов и обеспечения их питательных потребностей	30
1.2 Физиологические особенности и питательные потребности холерного вибриона	36
1.3 Питательные среды для выделения и культивирования холерного	

вибриона	40
1.3.1 Общие положения	40
1.3.2 Питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона из сырья животного происхождения	41
1.3.3 Питательные среды для культивирования и выделения холерного вибриона из сырья растительного происхождения	43
1.3.4 Питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона из биомассы микроорганизмов	43
1.3.4.1 Ферментоллизаты биомассы микроорганизмов как источники азота в составе микробиологических питательных сред.....	43
1.3.4.2 Применение экстрактов и ферментоллизатов хлебопекарных дрожжей в питательных средах для холерного вибриона.....	45
1.4 Заключительные положения	46
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	48
ГЛАВА 2. Конструирование и исследование основных характеристик и показателей микробиологических сред для <i>V. cholerae</i> – ХДС-агара, ХДС-Н и ХДС-бульона на репрезентативной выборке музейных и свежевыделенных штаммов данного микроорганизма.....	48
2.1 Оптимизация состава питательной среды ХДС-агар.....	48
2.1.1 Нахождение частного оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды ХДС-агар.....	48
2.1.2 Нахождение частного оптимума количественного содержания солей и агар-агара бактериологического в конструируемой среде ХДС-агар.....	50
2.1.2.1 Нахождение частного оптимума количественного содержания натрия хлористого в составе конструируемой среды ХДС-агар.....	50
2.1.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды ХДС-агар.....	51
2.1.2.3 Оптимизация концентрации агара микробиологического в составе питательной среды ХДС-агар.....	53

2.1.3 Оптимизация рН питательной среды ХДС-агар.....	54
2.2 Характеристика питательной среды ХДС-агар по составу и основным физико-химическим показателям.....	54
2.3 Изучение среды ХДС-агар по основным биологическим показателям с использованием музейных штаммов <i>V. cholerae</i>	55
2.4. Оптимизация состава жидкой накопительной питательной среды для выделения и культивирования холерного вибриона ХДС-Н.....	60
2.4.1 Поиск наиболее эффективной концентрации ферментативного белкового гидролизата ПППД при конструировании среды ХДС-Н.....	60
2.4.2 Нахождение частного оптимума количественного содержания солей в конструируемой среде ХДС-Н.....	61
2.4.2.1 Нахождение частного оптимума количественного содержания натрия хлорида в конструируемой среде ХДС-Н.....	61
2.4.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды ХДС-Н...	63
2.4.3 Оптимизация значения рН в питательной среде ХДС-Н.....	64
2.5 Характеристика сконструированной питательной среды ХДС-Н, её состав и физико-химические показатели.....	69
2.6 Конструирование бульона для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей - ХДС-бульона...	70
2.6.1 Нахождение частного оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды ХДС-бульон.....	70
2.6.2 Оптимизация концентраций солевых компонентов в составе питательной среды ХДС-бульон.....	71
2.6.2.1 Оптимизация концентрации хлористого натрия в составе питательной среды ХДС-бульон.....	71
2.6.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды ХДС-бульон.....	73
2.6.2.3. Оптимизация значения рН в питательной среде ХДС-бульон.....	74

2.7 Характеристика питательной среды ХДС-бульон, её состав и физико-химические показатели.....	74
2.8 Изучение биологических показателей в отношении различных штаммов холерного вибриона сконструированных сред ХДС-Н, ХДС-бульон в сравнении с традиционной 1% пептонной водой.....	75
2.9 Сравнительное изучение роста бактериальных популяций холерного вибриона, кишечной палочки и протей в среде ХДС-Н и контрольной жидкой среде обогащения в первые шесть часов культивирования.....	80
2.10 Изучение возможности использования питательной среды ХДС-бульон в качестве среды накопления холерного энтеротоксина (СТ) из штаммов - продуцентов, а также для скрининга штаммов <i>V. cholerae</i> по критерию энтеротоксинпродуцирующей способности <i>in vitro</i>	82
ГЛАВА 3. Изучение эффективности применения новых дрожжевых питательных сред для выделения и культивирования холерного вибриона-ХДС-агара и ХДС-Н в модельных опытах при мониторинговых исследованиях водных объектов на предмет контаминации их холерными вибрионами.....	86
3.1 Изучение эффективности комплекса сконструированных сред ХДС-агар - ХДС-Н при исследованиях модельных смесей холерного вибриона и микробов - контаминантов.....	86
3.2 Изучение возможности и эффективности применения комплекса сконструированных питательных сред ХДС-агар и ХДС-Н при мониторинговых исследованиях водных объектов на предмет контаминации их штаммами <i>V.cholerae</i>	90
3.3 Исследование эффективности разработанных на основе ПППД сред для холерного вибриона в работе СПЭБ.....	91
3.4 Экономическая эффективность использования комплекса сред ХДС-агар - ХДС-Н.....	92
ГЛАВА 4. Разработка, изучение биологических показателей и оценка эффективности применения новой питательной среды для идентификации	

холерного вибриона АЖС-агар.....	96
4.1 Выбор и оптимизация содержания питательной основы в конструируемой среде АЖС-агар.....	96
4.2 Оптимизация содержания сахарозы в конструируемой среде АЖС-агар.....	97
4.3 Оптимизация содержания L-Аргинина солянокислого в в конструируемой среде АЖС-агар.....	98
4.4 Оптимизация содержания солевых компонентов и агара микробиологического в конструируемой среде АЖС-агар.....	99
4.4.1 Оптимизация содержания хлорида натрия в конструируемой среде АЖС-агар.....	99
4.4.2 Оптимизация содержания натрия серноватистокислого 5-водного в конструируемой среде АЖС-агар.....	100
4.4.3 Поиск оптимальной концентрации соли Мора в составе разрабатываемой питательной среды АЖС-агар.....	100
4.4.4 Оптимизация содержания калия фосфорнокислого двузамещённого 3-водного в составе конструируемой среды АЖС-агар.....	101
4.4.5 Оптимизация содержания агара микробиологического в составе конструируемой среды АЖС-агар.....	101
4.5 Оптимизация значения рН конструируемой среды АЖС-агар.....	102
4.6 Подбор индикаторной системы в состав конструируемой среды АЖС-агар.....	102
4.7 Характеристика питательной среды АЖС-агар по основным физико- химическим и биологическим показателям.....	103
4.8 Результаты авторских испытаний АЖС-агара с использованием музейных штаммов холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и вульгарного протей.....	106
4.9 Изучение стабильности питательной среды АЖС-агар и воспроизводимости полученных при её использовании результатов.....	108
4.10 Результаты испытаний АЖС-агара при исследованиях проб из водных	

объектов.....	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	113
ВЫВОДЫ	127
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	129
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	130
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132
СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ.....	157

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Седьмая пандемия холеры началась в 1961 году, когда осложнения касались только Азии, но постепенно превратились в мировую проблему.

Всемирная Ассамблея Здравоохранения в мае 2011года обозначила факт глобализации эпидемических проявлений холеры и призвала к «интегральному» подходу в борьбе с ней [96, 216]. 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. [77].

В современных условиях в связи с актуальностью проблемы холеры в целом, вопросы совершенствования лабораторной диагностики этой инфекции (включая разработку новых питательных сред), всестороннего изучения экологии, физиологии, биохимии, генетики холерного вибриона приобретают особую научно-прикладную значимость.

Основными научными направлениями в области конструирования холерных питательных сред являются:

1. Использование питательных основ из сырья животного происхождения;
2. Разработка и изучение сред на основе гидролизатов и экстрактов растительного сырья;
3. Разработка и изучение сред на основе биомассы, гидролизатов и экстрактов кормовых углеводородных дрожжей;
4. Разработка и изучение сред из веществ известного химического состава (синтетических питательных сред).

Первое из вышеперечисленных направлений, берущее свои истоки со второй половины XIX столетия, связано с разработкой питательных сред, ставших классическими и используемых до настоящего времени (например, жидкие и плотные среды на основе мясной воды и пептона Мартена, триптического гидролизата мяса по Хоттингеру, различных ферментативных пептонов) [5, 20, 38]. Эти среды успешно применялись и применяются как в традиционных

рецептурах, так и в модификациях [6, 38]. Однако мясное сырьё является дорогостоящим, нестандартным. Его качество во многом зависит от получаемых животным кормов и биодобавок, экологических особенностей местности, перенесённых животным заболеваний и других факторов. Воспроизводимость результатов при использовании сред на таком сырьё невысокая.

Более предпочтительным в аспекте стандартизации является казеин [42, 46, 48, 112, 113, 119]. Казеиновые среды применялись для изготовления холерных вакцин [41]. В Иркутском научно-исследовательском противочумном институте Сибири и Дальнего Востока имеется большой опыт производства сухих казеиновых питательных сред для выделения возбудителя холеры [103]. Достаточно широкое применение нашли также сухие среды для *V.cholerae* из солянокислотного казеинового гидролизата [4]. Эти среды (АЦДС, цветная среда «К», бесцветная среда «К») широко апробированы и получили положительную оценку [116]. Выпускаемая в настоящее время ФГУП НПО «Микроген» и наиболее широко используемая исследователями и практиками коммерческая питательная среда «Агар щелочной сухой для культивирования и выделения холерного вибриона» в качестве основы содержит панкреатический гидролизат казеина [119]. Несмотря на очевидные преимущества, среды для *V.cholerae* из казеиновых гидролизатов имеют ряд недостатков: трудоёмкая и дорогая технология приготовления и очистки самих гидролизатов; сложность осветления жидких и агаризованных сред из них; необходимость добавления к таким средам дополнительных стимуляторов роста, прежде всего, являющихся источниками витаминов группы В (экстракты кормовых и пекарских дрожжей) [26, 27, 104].

В связи с неполноценным аминокислотным составом большинства белков растений, необходимостью использования для их гидролиза дорогостоящих растительных ферментов (например, папаина), высоким содержанием углеводов в получаемых гидролизатах, трудностями, связанными с их очисткой сырьё растительного происхождения не получило достаточного развития в средоварении. Предложенные рядом авторов питательные среды для

культивирования *V. cholerae* на основе гидролизатов сои [43], экстрактов пшеничных отрубей [5], гороха [46], кукурузного экстракта в большинстве случаев необходимо было комбинировать с другими компонентами, стимулирующими рост микробов.

В 70-ых – 80-ых годах XX века перспективным представлялось использование биомассы, гидролизатов и экстрактов кормовых углеводородных дрожжей, широкомасштабное промышленное производство которых было организовано для нужд сельского хозяйства, как питательных основ таких сред. На основе дрожжевых экстрактов и гидролизатов были сконструированы в виде сухих рецептур плотные и накопительные питательные среды для выделения и культивирования *V. cholerae* [71, 94, 95]. По результатам широкой апробации сред на основе дрожжевых аутолизатов в лабораторных и полевых условиях были получены многочисленные положительные заключения и рекомендации о необходимости внедрения этих сред в практику [7]. В связи с этим, на базе Ставропольского НПО «Аллерген» МЗ СССР был налажен их промышленный выпуск. Однако резкое сокращение производства кормовых углеводородных дрожжей с конца 80-ых годов сделало невозможным дальнейшего развитие этого направления исследований.

Четвёртое направление в области конструирования и изучения питательных сред для холерного вибриона связано с использованием в качестве их главных ингредиентов веществ известного химического состава, что делает эти среды полностью стандартизуемыми. Ещё в 1893 году Н. Ушинский впервые получил культуру холерных вибрионов на синтетической среде, содержащей аспарагиновокислый натрий, лактат аммония, хлориды натрия и кальция, сульфат магния, фосфат калия и глицерин [57]. В последующие годы было разработано достаточно много вариантов синтетических питательных сред для культивирования *V.cholerae* [104, 117, 147, 148, 158, 159, 173]. Данные среды не получили широкого распространения и применялись преимущественно для решения специфических научных задач, связанных с изучением питательных

потребностей и метаболизма холерного вибриона [201, 209, 210], а также продукции им некоторых факторов патогенности [104, 147, 148].

Для биохимической идентификации *V.cholerae* были предложены различные среды [67, 184, 198, 214]. Наблюдаемые при посеве в эти среды штаммов данного микроорганизма изменения цвета индикаторов обусловлены накоплением кислых или щелочных продуктов. Последние накапливаются при утилизации углеводов, многоатомных спиртов или аминокислот [4, 147, 187]. Полиуглеводные среды – лактозо-сахарозную, Ресселя [207], маннозо-сахарозную, а также среду Клиглера [186] применяют для отбора подозрительных колоний и идентификации культур в ходе лабораторных исследований на холеру [88].

Однако с помощью существующих полиуглеводных сред, а также селективно-дифференциальной среды TCBS невозможно дифференцировать между собой колонии холерного вибриона и других сахарозопозитивных представителей водной микрофлоры (например, *Aeromonas*, *Plesiomonas*) [1, 65, 144, 153, 170, 182, 203].

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.

Несмотря на то, что пекарские дрожжи используются в средоварении с конца XIX века [17], в литературе имеются лишь единичные работы, посвящённые питательным средам для возбудителей опасных инфекционных болезней (в том числе - *V. cholerae*), на основе препаратов из биомассы *Saccharomyces cerevisiae*. Так, Антонычева М.В. с соавт. [10, 11, 103], Кузьмиченко И.А. с соавт. [64, 110] разработали способ получения автолизата пекарских дрожжей по модернизированной технологии с применением ферментного препарата «Протеовибрин», а также питательные среды для культивирования холерного вибриона, чумного и псевдотуберкулёзного микроба на его основе.

Пекарские дрожжи склонны к хаотичному аутолизу своей биомассы за счёт наличия трёх различных протеолитических ферментов: триптазы, эриптазы и пепсиназы [103]. Это их свойство используется при получении автолизатов, применяемых в том числе и в микробиологических целях. Вследствие того, что каждый из указанных выше ферментов обладает собственной специфичностью к субстрату, оптимальными значениями pH и температуры, получают белковые гидролизаты, имеющие разнообразный и плохо поддающийся стандартизации пептидный состав. Эти обстоятельства обуславливают недостаточную воспроизводимость результатов, получаемых при использовании питательных сред на основе дрожжевых автолизатов. Преимущества разработанного в институте способа гидролиза пекарских дрожжей [73 - 77] перед их аутолизом состоят в управляемости данного процесса и получении более стандартного конечного продукта.

Предложенные ранее для проведения первичной идентификации холерного вибриона и широко используемые питательные среды [4, 119, 139, 186, 207] имеют два недостатка: идентификация холерного вибриона только по одному признаку – ферментации углеводов (но не аминокислот); отсутствие возможности дифференциации *V. cholerae* от идентичных по отношению к углеводам аэромонад.

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 использования разработанного ХДС-бульона для культивирования штаммов *V. cholerae* и изучения их энтеротоксинпродуцирующей активности *in vitro*.
5. Изучить эффективность разработанных питательных сред в модельных опытах и при мониторинге объектов окружающей среды.

Научная новизна исследования

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 работы

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.).

г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 10.10.2024 г.), ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (акт внедрения от 07.11.2024 г.).

Предложена к практическому использованию при проведении лабораторных исследований на холеру сконструированная среда ХДС-Н. По результатам её комиссионных испытаний (акт комиссионной проверки от 25.12.2002 г.) получено положительное заключение. Инструкция по изготовлению и контролю и инструкция по применению на данную среду 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, относящихся 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 были проведены исследования проб воды в количестве: 816 - из поверхностных водоёмов и 112 - из мест сброса сточных вод после очистных сооружений КНС-4.

Контрольные питательные среды и среды сравнения

В данном исследовании в качестве контрольных и сред сравнения служили зарегистрированные питательные среды, приготовленные из сухих коммерческих препаратов, а также среды лабораторного изготовления. Все контрольные среды соответствовали требованиям действующих нормативных документов [83, 85].

Контрольными средами для выделения и культивирования, приготовленными из сухих коммерческих препаратов согласно Инструкции по применению производителя явились: основной раствор пептона и 1% пептонная вода, щелочной агар, питательный агар, питательный бульон.

Для приготовления контрольного щелочного агара были использованы следующие препараты:

- «Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая (Щелочной агар)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ;

- «Набор реагентов Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая (Щелочной агар) производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (по ТУ 9385-131-14237183-2009, РУ № ФСР 2009/06185 от 07.05.2013 г.);

- «Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая «Щелочной агар» производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области (по ТУ 9385-039-78095326-2008, РУ № ФСР 2009/05473 от 17.10.2011 г.).

Основной раствор пептона готовили из следующих препаратов:

- «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ;

- «Набор реагентов Пептон основной сухой» производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (по ТУ 9385-128-14237183-2009, РУ № ФСР 2009/06184 от 18.06.2013 г.);

- «Питательная среда для накопления холерного вибриона сухая «Пептон основной сухой» производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области (по ТУ 9385-038-78095326-2008, РУ № ФСР 2009/05472 от 17.10.2011 г.). 1% пептонную воду готовили путём разведения основного раствора пептона дистиллированной водой в 10 раз.

Для приготовления питательного агара использовали следующие сухие препараты: «Набор реагентов Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (СПА) производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (по ТУ 9385-012-14237183-10, РУ № ФСР 2008/02386 от 04.04.2013 г.) или «Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательный агар для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-агар)» производства ФБУН ГНЦПМБ пос. Оболенск Московской области (по ТУ 9398-020-78095326-2006, РУ № ФСР 2007/00001 от 17.10.2011 г).

Питательный бульон готовили из таких сухих препаратов, как «Набор реагентов Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (СПБ)» производства ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России (по ТУ 9385-122-14237183-2009, РУ № ФСР 2009/05695 от 13.09.2018 г.) или «Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательный бульон для культивирования микроорганизмов сухой (ГРМ-бульон) производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области (по ТУ 9398-021-78095326-2006, РУ № ФСР 2007/00002 от 17.10.2011 г).

Средами сравнения при изучении энтеротоксинпродуцирующей активности штаммов *V. cholerae* в разработанном ХДС-бульоне являлись предложенные ранее для этой цели бульон Мартена pH 7,7±0,1 [92] и среда АК1 [180, 181].

Для идентификации холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и вульгарного протей в настоящей работе применяли дифференциально-

диагностические питательные среды из сухих коммерческих препаратов и лабораторного изготовления.

Дифференциально-диагностическими средами, приготовленными из коммерческих сухих рецептур согласно Инструкции по применению на каждую из них, явились: Гисса-ГРМ с сахарозой (Питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Среда Гисса-ГРМ с сахарозой) производства ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск Московской области, по ТУ 9398-049-78095326-2008, РУ № ФСР 2008/03494 от 13.10.2011 г.), агар Клиглера-ГРМ (Набор реагентов для бактериологических исследований «Питательная среда для идентификации энтеробактерий сухая (Агар Клиглера-ГРМ)» производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области, по ТУ 9398-030-78095326-2007, РУ № ФСР 2007/00968 от 13.10.2011 г.), декарбоксилазный бульон Мёллера (с аргинином) производства HiMedia Ltd., Индия (каталожный номер M689-100G, РУ № ФСЗ 2009/03705 от 21.12.2012.).

Дифференциально-диагностическими питательными средами лабораторного изготовления были: среда Клиглера, среды Гисса с индикатором Андреде и углеводами, многоатомными спиртами (сахарозой, арабинозой, маннозой, маннитом, глюкозой, инозитом, лактозой), лактозо-сахарозная, Мёллера с аминокислотами, Хью-Лейфсона [4, 66, 92]. Все они соответствовали требованиям МУ 3.3.2.2124-06, МУК 4.2.2316-08, МУК 4.2.3745-22 [88].

Штаммы микроорганизмов

В настоящей работе было использовано 70 штаммов холерного вибриона различных биоваров и серогрупп из коллекции патогенных микроорганизмов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: четыре штамма *V.cholerae* 01 classical (P-1 (145) – тест-штамм; 5281; 569В; 1395), 53 штамма *V.cholerae* 01 Эль Тор (М-878 – тест-штамм; 1310; 2770; 2931; 2932; 5879; 10058; 14863; 14864; 15301; 15302; 18119; 18331-18364; 18367-18369; 18544; 18983; 18984; 19813; P-19925; P-19433; 19923; P-19925; P-19764), восемь штаммов *V.cholerae* O139 (16077 (MO45) – референс-штамм O139 серогруппы; 16063-

16065; 16074; 16075; 16131; 16489 (88)) и 5 штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139 (P-9741 – тест-штамм; 16005 (O68); 16003 (O65); 12691 (O64); 11972 (O63)).

Для сравнительного изучения роста бактериальных популяций *V.cholerae* и микробов-контаминантов *E.coli* и *P.vulgaris* в жидкой накопительной среде, а также для изучения дифференцирующих свойств разработанной питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» были использованы штаммы других микроорганизмов, относящиеся к семейству *Enterobacteriaceae* и роду *Aeromonas* (Таблица 1).

Таблица 1 – Штаммы представителей семейства *Enterobacteriaceae* и рода *Aeromonas*, использованные в настоящей работе

Штаммы	Год выделения	Место выделения	Источник выделения
<i>E. coli</i> 18 (1015, 12605)	1943	неизвестно	человек
<i>P. vulgaris</i> НХ 19 N 222 (12932)	1943	неизвестно	человек
<i>P. vulgaris</i> 14	неизвестно	неизвестно	неизвестно
<i>A. hydrophila</i> P-6052	1972	Ростов н/Д	человек
<i>A. caviae</i> P-6051	1972	Ростов н/Д	человек
<i>A. veronii</i> P-6096	1971	Керчь	морская вода
<i>A. caviae</i> P-6048	1972	Сочи	молоко

Реактивы

В данной работе были применены следующие химические реактивы:

- натрия гидроокись ЧДА (ГОСТ 4238-77);
- кислота соляная ЧДА (ГОСТ 3118-77);
- кислота серная ЧДА (ГОСТ 4204-77);
- натрий хлористый чда (ГОСТ 4233-77);
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА (ГОСТ 4172-76);
- пергидроль ЧДА (ГОСТ 1029-76);
- кальций хлористый безводный Ч (ТУ 6-09-4711-81);
- кислота азотная ЧДА (ГОСТ 4461-77);
- аммоний серноокислый ЧДА (ГОСТ 3769-78);
- реактив Несслера ЧДА(ТУ6-09-2089-77);
- формалин технический (ГОСТ 1625-2016);
- антрон ЧДА;

- квасцы железоаммонийные ЧДА (ГОСТ 4205-77);
- калия перманганат ЧДА (ГОСТ 20490-75);
- глюкоза кристаллическая ЧДА (ГОСТ 6038-74);
- сахароза ЧДА (ГОСТ 5833-75, Изм. 3);
- калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный ЧДА (ГОСТ 2493-75, Изм. 2);
- L-Аргинин солянокислый ЧДА (ТУ 6-09-2100-78);
- соль закиси железа и аммония двойная сернокислая 6-водная (соль Мора) ЧДА (ГОСТ 4208-72, Изм. 2);
- натрий серноватистокислый 5-водный ЧДА (ГОСТ 27068-86);
- бромтимоловый синий водорастворимый ЧДА (ТУ 6-09-07-1602-87);
- крезоловый красный водорастворимый чда (ТУ 6-09-796-76);
- агар микробиологический (ГОСТ 17206-96);
- пептон ферментативный для бактериологических целей (ГОСТ 13805-76);
- вода дистиллированная (ГОСТ Р ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1).

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Метод определения чувствительности питательных сред

Чувствительностью питательной среды является максимальное разведение культуры микроорганизма, которое позволяет выявить визуально рост обнаруживаемого штамма в заданный промежуток времени и при определённом значении температуры культивирования на всех засеянных объектах, содержащих питательную среду. В настоящей работе данный показатель определяли у разработанных и контрольных агаризованных (ХДС-агар, щелочной агар) и жидких (ХДС-Н, ХДС-бульон, 1% пептонная вода) питательных сред.

Для определения показателя чувствительности применяли 3-5 часовые культуры штаммов (включая тест-штаммы) холерного вибриона, выращенные на агаровых пластинках питательных сред (щелочной агар, агар Мартена pH $7,7 \pm 0,1$), соответствующих требованиям [81].

Метод определения показателя прорастания агаризованных сред

Показателем прорастания агаризованных питательных сред называется количество выросших на агаровых пластинках колоний того или иного микроорганизма, выраженное в процентах от посевной дозы (числа засеянных микробных клеток). Его определение вели на разработанной (ХДС-агар) и контрольной (щелочной агар) питательных средах в соответствии с [83].

Подготовку культур штаммов холерного вибриона (включая тест-штаммы), приготовление микробных взвесей, последовательных десятикратных разведений из них проводили так же, как и в случае определения показателя чувствительности, руководствуясь требованиями, изложенными в [81].

Метод определения показателя числа выросших колоний при посеве шестичасовых бульонных культур на агаровые пластинки

Для определения данного показателя изучаемые среды подготавливали следующим образом: основной раствор пептона и жидкую накопительную питательную среду – ХДС-Н разводили в 10 раз дистиллированной водой и разливали по 100 мл в 6 флаконов, которые закрывали ватно-марлевыми пробками. Основной раствор пептона готовили из препарата «Основной пептон сухой» производства ФГУП НПО Минздрава России согласно инструкции производителя. Бульон для культивирования холерных вибрионов – ХДС-бульон, разливали так же, не разводя его. В качестве контрольной питательной среды использовали 1 % пептонную воду (полученную путём разведения дистиллированной водой основного раствора пептона). Опытные и контрольные среды стерилизовали при 110°C в течение 20 мин. Подготовку культур холерного вибриона, их посев на контрольные и опытные питательные среды проводили в соответствии с [81].

Расчёт значений упомянутого выше биологического показателя вели по среднему числу колоний на всех чашках для каждого разведения и в отдельности для каждой из жидких питательных сред.

Метод определения показателя эффективности питательных сред

Эффективностью питательной среды является выход микробных клеток того или иного микроорганизма с 1 мл питательной среды (млрд. м.к./мл) при определённых условиях культивирования (время, температура). Этот показатель определяли для агаризованных (ХДС-агар, щелочной агар) и жидких (ХДС-Н, ХДС-бульон, 1% пептонная вода) питательных сред по методике, изложенной в [83].

Метод определения показателя диаметра колоний, выросших на агаризованных питательных средах

Данный показатель определяли путём измерения диаметра колоний каждого штамма холерных вибрионов, выросших на агаровых пластинках образцов опытной и контрольной сред. Измерения проводили при помощи лупы МБС-10, в один из окуляров которой была вмонтирована окулярная линейка. Цена деления линейки – 0,1 мм.

Метод определения морфологии колоний, выросших на агаризованных питательных средах

Морфологию колоний тест-штаммов холерного вибриона определяли при просмотре под световым микроскопом «Биолам Р-14», руководствуясь требованиями [81].

Метод определения показателя стабильности свойств культур, пассированных через питательные среды

Показателем стабильности свойств культур называется отношение числа атипичных по свойствам (морфология, биохимические, серологические и другие свойства) колоний к числу выросших на агаровых пластинках колоний тест-штаммов.

Данный показатель определяли следующим образом. У культур холерных вибрионов (включая тест-штаммы), аэромонад, кишечной палочки и вульгарного протей, пассированных через разрабатываемые и контрольные питательные среды определяли показатели стабильности биохимических и серологических свойств, руководствуясь требованиями [81, 83, 86].

Стабильность биохимических свойств культур *V.cholerae* определяли по следующим тестам: по наличию или отсутствию индофенолоксидазы; по типу расщепления глюкозы; по характеру роста на полиуглеводных средах; по ферментации углеводов; выявлению декарбоксилаз и дигидролаз аминокислот. Стабильность серологических свойств холерных вибрионов, пассированных через опытные и контрольные (плотные и жидкие) питательные среды определяли по методикам, описанных в [82, 85].

Метод изучения показателя «дифференцирующие свойства»

Дифференцирующие свойства питательной среды это – свойства питательной среды, проявляющиеся за счёт её состава и позволяющие отличать одни микроорганизмы от других по совокупности признаков, характерных для того или иного систематического таксона (семейства, рода, вида). Отличительными (дифференцирующими) признаками являются форма и окраска колоний, изменение цвета вокруг них и под ними; появление ореола вокруг колоний, а также диффузное изменение цвета среды и образование преципитата в толще среды.

Данный показатель определяли путем посева штаммов микроорганизмов на скошенную часть и уколом в «столбик» опытной (АЖС-агар) и контрольных сред. Результат учитывали после инкубации при (37 ± 1) °C в течение 12-24 часов по изменению цвета скошенной части и «столбика» сред, появлению в толще сред черного преципитата.

Метод изучения роста бактериальных популяций штаммов *V.cholerae* и микробов-контаминантов *E.coli* и *P.vulgaris* в жидкой накопительной среде

Изучение роста бактериальных популяций *V. cholerae*, *E. coli* и *P. vulgaris* в течение первых 6 часов культивирования (время использования накопительных сред без ингибиторов посторонней микрофлоры в схеме лабораторной диагностики холеры) при равных низких посевных дозах (10 м.к.) проводили следующим методом. Для каждого штамма готовили два параллельных ряда из 54 пробирок (один ряд с опытной средой, другой – с контрольной). Каждую пробирку засевали суспензиями штаммов, которые содержали по 1×10^2 м.к./ мл, в

количестве по 0,1 мл. Посевы инкубировали при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. В процессе культивирования отбирали по 3 пробирки из каждого ряда с интервалом 20 мин (до 6 часов) и производили высев на агаровые пластинки всего объёма содержащейся в них культуры. Пробирки с культурой холерного вибриона для разрушения плёнки предварительно встряхивали. Начиная с четвёртого часа культивирования высевы производили после десятикратных разведений содержимого пробирок 0,9% раствором натрия хлорида с добавлением (1/150 M) калий-натриевого фосфатного буфера pH 7,2. Засеянные агаровые пластинки инкубировали при 37°C 12 часов, по истечении которых производили подсчёт КОЕ. Время генерации (g) рассчитывали по формуле (1):

$$g = t \times \lg 2 / \lg b - \lg B \quad (1),$$

где t – заданный промежуток времени (мин); B – число КОЕ к началу данного промежутка времени; b – число КОЕ к концу данного промежутка времени.

Метод выделения культуры холерного вибриона из искусственных смесей с различными концентрациями микроорганизмов-контаминантов

Для выделения культуры холерного вибриона из искусственно созданных смесей с различными концентрациями микробов-контаминантов (кишечной палочки и протей) использовали следующий метод. Готовили смеси, содержавшие в 1 мл 10 м.к. *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741, а так же от 1×10^4 м.к. до 1×10^8 м.к. *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14. Данные смеси вносили в количестве 1 мл во флаконы со 100 мл первой среды накопления (опытной и контрольной). Через 6 часов инкубации при температуре $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ из каждого флакона бактериологической петлёй № 5 производили высевы в пробирки с 7 мл второй среды накопления (опытной и контрольной) и на агаровые пластинки. После 6 часов культивирования при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ бактериологической петлёй № 2 осуществляли высевы со второй среды накопления на чашки с агаром. Посевы на агаровых пластинках с первой и второй сред накопления выращивали 12 часов при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$. В ходе просмотра чашек отбирали колонии с типичной для *V. cholerae* морфологией, производили их подсчёт и идентификацию по основным биохимическим тестам в соответствии с [81, 82, 86].

Метод исследования проб воды из поверхностных водоёмов и сточных вод на наличие холерного вибриона

Исследование проб воды из поверхностных водоёмов и сточных вод на наличие холерного вибриона проводили согласно [82, 86].

Культивирование штаммов *V.cholerae* с целью исследования их энтеротоксинпродуцирующей активности

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. Каждый флакон засеивали 0,1 мл суспензии, содержащей 1×10^9 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 на культуре клеток CHO-K1 [176].

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*» [36].

Метод MALDI-TOF масс-спектрометрии

Использовали масс-спектрометр Autoflex speed III Bruker Daltonix (Германия) [14, 60, 161] и программное обеспечение Biotyper.

Метод оптимизации состава питательных сред

Оптимизацию количественного содержания ингредиентов в составе конструируемых питательных сред проводили методом Розенброка в модификации Вотруба [215].

Физико-химические методы исследования

Метод определения общего азота

Принцип определения показателя общего азота основан на минерализации очень малых количеств азотсодержащих органических веществ серной кислотой. Общий азот определяли в соответствии с [83].

Метод определения аминного азота

Принцип определения показателя аминного азота формальным титрованием в соответствии с [83] основан на блокировании формальдегидом при pH 7,0 свободных аминогрупп и титровании щёлочью эквивалентного количества карбоксильных групп.

Метод определения содержания хлорида натрия

Содержание хлорида натрия определяли согласно [83].

Метод определения содержания углеводов

Содержание углеводов определяли по методике, изложенной в [82].

Метод определения прочности агарового студня

Данный физико-химический показатель определяли в соответствии с [83].

Метод определения pH питательных сред

Определение pH проводили потенциометрическим методом на pH-метре Mettler Toledo Seven Easy S 20K (Mettler Toledo AG, Швейцария). В жидких питательных средах (ХДС-Н, ХДС-бульон) pH определяли путём прямого погружения комбинированного электрода pH-метра в исследуемые образцы. В агаризованных питательных средах определение данного показателя производили в расплавленных и доведённых до температуры 45-50°C пробах.

Статистические методы

В работе были использованы следующие статистические методы обработки результатов: определение средних арифметических и их ошибок, коэффициентов

вариаций, доверительных интервалов [52]. Для группировки данных, вычислений, построения диаграмм использовали пакет 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 диссертации, 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.).

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Проблемы периодического культивирования микроорганизмов и обеспечения их питательных потребностей

Периодическим культивированием называют размножение микроорганизмов в замкнутом объеме питательной среды. Этот метод культивирования характеризуется однократным засевом среды в начале и одноразовым получением биомассы микроорганизма в конце процесса, обычно после полного или частичного использования субстрата. При таком способе культивирования развитие микробной популяции приводит к постепенной смене условий существования микроорганизмов: увеличивается плотность популяции, снижается концентрация питательных веществ и накапливаются продукты обмена. Развитие происходит в виде последовательных фаз, характер и продолжительность которых зависят от физиологического состояния микроорганизма, определяемого в свою очередь условиями разнообразных факторов среды [145, 149], в которой развивается популяция.

Для культивирования микроорганизмов используют питательные среды – субстанции, содержащие питательные вещества и ростовые факторы, необходимые для оптимального роста при определённых условиях [118, 147].

Трудности выращивания микробов на питательных средах в лабораторных условиях связаны с особенностями предшествующего роста и размножения в экологической нише [208]. Сохранить жизнеспособность *in vitro* позволяет гибкость их метаболизма, а управлять физиологическими процессами в новых условиях - введение в питательные среды специальных компонентов, которые служили бы источником жизнеобеспечения определённых видов.

Микробиологи зачастую подбирают качественный и количественный состав какой-либо питательной среды эмпирическим путём. При этом не даётся объяснение присутствию различных компонентов. На настоящий момент времени данная проблема в большинстве случаев решается благодаря современным сведениям о физиологических особенностях того или иного микроба. Такую

информацию применяют при разработке, изготовлении и усовершенствовании существующих рецептур питательных сред, по которым их готовят и используют для выделения, культивирования, селекции по интересующему исследователей и клиницистов признаку, идентификации, а так же для определения чувствительности микроорганизмов к антибиотикам [106, 107, 118, 165, 195, 206].

В состав питательных сред включаются те элементы, присутствие которых необходимо для роста микробных клеток [83]. В сухом веществе клеток бактерий (как и всех живых организмов) по количественному содержанию выделяют макро- и микроэлементы [107]. Макроэлементами являются: углерод, фосфор, сера, азот, водород, кислород, железо, калий, натрий и кальций. К микроэлементам относят цинк, кобальт, медь, молибден, селен, марганец и многие другие элементы периодической системы, которые необходимы в следовых количествах [138, 139].

Обмен веществ в микробных клетках (как и у клеток других живых существ) включает в себя множество биохимических реакций и подразделяется на энергетический и пластический.

Энергетический обмен микроорганизмов разделяется на три главных типа: брожение, анаэробное и аэробное дыхание.

Процессы брожения протекают без доступа кислорода, т.е. в условиях анаэробноза. При этом происходит образование энергии с запасанием её в виде молекул АТФ. В подавляющем большинстве субстратами для такого типа обмена веществ служат углеводы.

Спектр утилизируемых бактериями сложных органических соединений достаточно широк [37]. При этом образуются вещества более простые по химической структуре: углекислый газ, водород, простые кислоты, ацетон, спирты [68].

По типу дыхания бактерии разделяют на несколько физиологических групп: облигатные (строгие) аэробы; облигатные (строгие) анаэробы; факультативные аэробы или факультативные анаэробы.

Аэробное дыхание – самый распространённый путь получения энергии многими бактериями, где органический субстрат окисляется до углекислоты и воды при помощи кислорода с максимальным высвобождением энергии. К облигатным аэробам относится большинство бактерий, но среди них встречаются микроаэрофилы. Это те прокариотные микроорганизмы, которые способны давать рост при концентрации кислорода ниже атмосферной (около 2 %), например, представители рода *Brucella* [66].

Облигатными (строгими) анаэробами являются те прокариоты, метаболизм (т.е. энергетический и пластический обмен) которых происходит при помощи так называемого анаэробного дыхания. В этом случае окисление органических веществ осуществляется посредством неорганических соединений, выступающих в роли акцепторов электронов вместо кислорода. Таким примером может служить нитритное дыхание у денитрифицирующих бактерий (*Bacillus licheniformis*, *Alcaligenes faecalis* и др.), где нитрат восстанавливается до нитрита, а затем - до аммиака [37, 81].

В этой физиологической группе у бактерий существуют различия по степени устойчивости к молекулярному кислороду внешней среды. Они подразделяются на строгих и аэротолерантных анаэробов. Первые не выносят даже ничтожно малых количеств указанного выше вещества (например, представители родов *Bacteroides*, *Methanobacterium*, *Butylovibrio*, *Fusobacterium*) и быстро погибают. Вторые же могут расти в присутствии кислорода воздуха (некоторые виды *Clostridium*, молочнокислые бактерии рода *Lactobacillus*) [37].

Последняя физиологическая группа бактерий по типу дыхания – это факультативные аэробы или факультативные анаэробы. Они могут переключаться с одного метаболического пути (т.е. пути получения энергии) на другой, к примеру, с брожения на дыхание и обратно. Таковыми являются многие представители семейств *Enterobacteriaceae* и *Vibrionaceae* (*V. cholerae*) [39, 81, 140].

Пластический обмен микроорганизмов служит для синтеза основных типов биополимеров – полисахаридов, липидов, нуклеиновых кислот и белков.

Выполнение его функций требует энергетических затрат в результате сложных метаболических процессов, где участвуют углеводы и разные азотсодержащие соединения, которые в известной мере могут заменять друг друга [45].

В процессах обмена веществ по степени важности пластическая роль белков в организации структур более необходима, чем энергетическая [23]. В микроорганизмы за счёт белковых питательных основ поступает основная масса азотистых веществ. Почти все биополимеры по своей природе нестабильны и в реакции с водой распадаются на мономерные звенья (гидролизуются) [24]. Белковые питательные продукты в клетку проникают в виде гидролизатов - аминокислот и некоторых пептидов. В связи с этим, при изготовлении питательных сред, используемых в микробиологии, делается акцент на их аминокислотный и пептидный состав [99, 134, 178]. Гидролизаты белков находятся в составе сред как питательные основы, служат источниками органического азота для микроорганизмов при их выделении и культивировании в лабораторных и промышленных условиях [79]. При разработке новых образцов питательных основ следует исходить из того, что состав конечного продукта перевара белка зависит от исходного сырья [55, 127] и способа (технологического процесса) его гидролиза. Белковые гидролизаты в основном получают с помощью кислотного и ферментативного гидролиза соответствующего сырья.

Полный гидролиз белков происходит при 110°C в присутствии соляной или серной кислоты. Он может привести к превращению белковых молекул в отдельные аминокислоты. Жёсткий кислотный гидролиз экономически невыгоден, так как сопровождается потерей многих питательных веществ, а при выравнивании pH происходит выпадение солей, от которых приходится избавляться. Заканчивается он, как правило, расщеплением белка до аминокислот при низком содержании пептидов с разрушением серина, треонина, цистеина, тирозина, триптофана [31].

Ферментативные методы гидролиза оказывают более мягкое воздействие на белки, расщепляя их до пептидов различной длины и степени полимерности, а также отдельных аминокислот. Действие ферментов, в отличие от кислот, на

белоксодержащее сырьё, кроме того, сохраняет «факторы роста микроорганизмов», к которым относятся некоторые пептиды, пуриновые, пиримидиновые основания и их производные (витамины группы В) [54, 55, 91, 105, 115, 117, 121, 127, 175]. Пепсином расщепляются пептидные связи, образованные лизином и фенилаланином; трипсином, а также содержащим его панкреатином вышеуказанные связи расщепляются в тех местах, где карбонильная группа принадлежит лизину или аргинину [24]. Панкреатин при длительном гидролизе проявляет активность в отношении тирозиновых, триптофановых, фенилаланиновых и лейциновых связей [84, 88, 129].

Изучение роли пептидов и методы их получения для заданных целей представлено в нескольких работах [97, 115, 121, 178].

В ходе ферментативного воздействия на белоксодержащее сырьё образуются продукты неполного расщепления - смеси пептидов и небольшого количества аминокислот – пептоны [113, 142, 189], которые используют при изготовлении питательных сред медицинского назначения в качестве основного источника азота [34]. Анализ научных источников свидетельствует о том, что химические характеристики пептонов неопределённые [208]. При работе над усовершенствованием питательных сред принимают во внимание тот факт, что главным компонентом в них должен оставаться пептон (ферментативный белковый гидролизат), и основной задачей является его оптимизация [100, 123]. Разнообразие состава таких сред определяет множество ферментов, содержащихся в желудке, кишечнике, поджелудочной железе и используемых при изготовлении пептонов. Такие перевары готовят в качестве основ питательных сред из мяса (ОРХ), казеина (панкреатический гидролизат казеина, *repticase*-триптический перевар казеина, *tryptone*- панкреатический перевар казеина), дрожжей. В итоге, пептонные питательные среды содержат смесь продуктов распада белков разного состава. Протеозо-пептоны по сравнению с пептонами содержат менее гидролизованные продукты [164].

В микробиологической практике используют питательные основы как лабораторного, так и промышленного изготовления. К гидролизатам,

приготавливаемым в лабораторных условиях, прежде всего, следует отнести пептон Мартена, получаемый при переработке мышечного слоя свиных желудков пепсином; основной раствор Хоттингера (ОРХ), который является триптическим (панкреатическим) гидролизатом или, как это принято называть, переваром говяжьего мяса, а также многие другие, производимые из различного по происхождению сырья [56, 99].

Среди отечественных промышленных белковых гидролизатов следует выделить ферментативный пептон [34, 107, 111]; кислотные и панкреатические гидролизаты казеина и рыбной муки [118, 139].

Ассортимент белковых питательных основ, выпускаемых ведущими зарубежными фирмами-производителями в сухом виде довольно широк. Это можно объяснить не только разнообразием источников сырья (мясо, казеин, молочная сыворотка, желатин, соя, горох, грибы), но и способами его переработки (кислотный и ферментативный гидролиз) в зависимости от целей применения.

Мясные пептоны, например, Peptone, Neopeptone, Polypeptone, протеозопептоны, триптоза – это продукты панкреатического гидролиза; Thiotone – пептического, которые используются при выращивании микроорганизмов с различными питательными потребностями [166, 167, 192 - 194, 196].

Казеиновые пептоны представлены казаминовыми кислотами и панкреатическими переварами. Первые – кислотные гидролизаты, получаемые с помощью соляной кислоты при высоких значениях температуры и давления; представляют собой смеси аминокислот. Они выпускаются с разной степенью очистки и служат для проведения молекулярно-биологических исследований и других особо точных работ. Вторые – это панкреатические перевары казеина (Trypticase Peptone, Casitone, Tryptone и др.), предназначенные для культивирования большого числа микроорганизмов и изучения различных ферментативных процессов (например, утилизации различных углеводов, многоатомных спиртов, образования индола) [177] так же, как и панкреатические

гидролизаты желатина, лактальбумина (Pancreatic digest of gelatin, Gelysate Peptone, Lactalbumin hydrolysate) [165, 211 - 213].

Заслуживает определённого внимания использование продуктов переработки сои, гороха, грибов в качестве белковых питательных основ бактериальных сред (Soytone, Select Soytone, Phytone, Veggietone Soya Peptone, Vegetable Peptone, Мусо Peptone и др.). Они получают путём гидролиза соответствующего сырья ферментами животного, растительного и грибного происхождения, что обеспечивает довольно широкий спектр присутствия в них пептидов, аминокислот, витаминов и водорастворимых углеводов; применяются аналогично пептонам из мяса [166, 167, 194, 197, 212, 213].

Несмотря на то, что пептоны могут в практически полной мере обеспечивать питательные потребности большинства прокариотических микроорганизмов, даже самых прихотливых, они обладают нестандартностью. По мнению Поляк М.С. с соавт. (2008) [112] это, прежде всего, более свойственно пептонам из мяса, а также казеиновым, из молочной сыворотки, рыбы из-за разного качества исходного сырья. Такая особенность менее характерна для соответствующих продуктов растительного происхождения.

Важно также отметить, что в зависимости от задач исследования и специфических характеристик каждого конкретного микроорганизма состав сред может быть дополнен рядом специальных компонентов [15, 57, 58, 153, 154, 197, 214].

1.2 Физиологические особенности и питательные потребности холерного вибриона

Возбудитель холеры *Vibrio cholerae* принадлежит к факультативным анаэробам и гетеротрофным микроорганизмам [138, 150]. Эволюционная и сравнительная физиология, в том числе холерного вибриона, предполагает рассмотрение экологических, структурных и функциональных особенностей организмов [185]. Холерные вибрионы имеют две основные экологические ниши – организм человека и водную среду [171]. «Двойственная» жизнь холерного вибриона и почти постоянная нехватка питательных веществ адаптировали его

катаболические пути, определили различные виды гетерогенности популяции – генетической и филогенетической [116, 217]. Данные, полученные с помощью протеомного анализа [161], свидетельствуют о том, что смена фенотипа клонов *V. cholerae* может сопровождаться значительными изменениями в метаболизме. Средой их обитания может быть пресная и морская вода, кишечник и жёлчный пузырь человека, и на каждом уровне популяция имеет конкурентную структуру [80]. Процессы жизнедеятельности холерных вибрионов происходят при участии самых разнообразных ферментов [4, 188, 189], и этот широкий спектр ферментативных активностей используют в диагностике холеры [7, 51, 67, 83, 88, 90].

Холерный вибрион хорошо растет на питательных средах с концентрацией хлористого натрия в пределах от 0 до 5 % с оптимумом 0,5-2,0 % [172] в широком диапазоне pH (от 6,5 до 9,2 с оптимумом 7,6 - 7,8) и температуры (от 10 до 42°C с оптимальным значением 35-37°C).

На жидких питательных средах (1 % пептонная вода, бульон Мартена, бульон Хоттингера, мясо-пептонный бульон) с pH 7,6-7,8 представители *V. cholerae* быстро размножаются и через 6-8 ч образуют на поверхности нежную плёнку, которая через 24 ч от начала культивирования становится грубой. Толща жидких сред при этом слегка мутнеет; на дне пробирки образуется небольшое количество осадка [66, 88].

На поверхности плотных агаризованных питательных сред (мясо-пептонный агар, агар Мартена, агар Хоттингера, щелочной агар) с pH 7,6-8,0 холерные вибрионы через 12-24 ч инкубации формируют гладкие, прозрачные с ровным краем колонии, голубоватые в косо проходящем свете от 1,0 до 3,1 мм в диаметре [67, 88].

Холерным вибрионам присуща индофенолоксидазная активность. Наличие этого свойства позволяет отличать их от бактерий кишечной группы [183]. Наличие большого количества ферментов даёт возбудителю холеры утилизировать глюкозу, мальтозу, сахарозу, целлобиозу, фруктозу, трегалозу, а также крахмал и гликоген [4]. Отличительной особенностью данного

микроорганизма является отсутствие способности расщеплять с образованием кислых продуктов арабинозу, инозит, рамнозу, дульцит [66]. В среде Хью-Лейфсона *V. cholerae* ферментируют глюкозу в аэробных и анаэробных условиях с образованием кислоты без газа. Это свойство служит одним из дифференциальных тестов, позволяющих отличить их от представителей семейства *Pseudomonadaceae* [4, 59, 66, 92, 130, 133]. Из ферментов гликолитического цикла хорошо изучены альдолаза, гексокиназа, пируваткиназа.

В ходе многолетних исследований было показано, что холерные вибрионы по отношению к сахарозе, маннозе, арабинозе вне зависимости от их серогруппы могут быть отнесены к 1-й, реже ко 2-й группе Хейберга [90, 92]. Это является важной характеристикой при идентификации вибрионов, принадлежащих к другим видам [66, 67, 92, 184].

Холерный вибрион утилизирует азот путём отщепления аминокрупп от других соединений. Для синтеза белков штаммы *V. cholerae* могут использовать аминокислоты, извлекая последние из продуктов той окружающей среды, где они могут находиться в готовом виде, а также синтезируя их из некоторых соединений, например, из глюкозы и солей аммония [4, 173]. Вибрионы могут расти и размножаться на минеральной среде, где источником азота являются соли аммония, а источником углерода - глюкоза. В подобной питательной среде их культуру впервые получил Н. Ушинский в 1898 г. [57], на синтетической среде - Agarwala S. et al. (1953) [147]. Позже [69] на синтетической среде в жидкой культуре холерного вибриона была обнаружена его способность продуцировать протеолитический фермент.

Культивирование штаммов *V. cholerae* в жидких средах известного химического состава, где в качестве источника азота используются различные аминокислоты, позволило достигнуть высокого уровня продукции холерного энтеротоксина *in vitro* [158, 159, 205].

Подобные результаты являются доказательством ограниченных питательных потребностей большинства штаммов холерного вибриона, но использование синтетических сред не находит широкого применения в повседневной

лабораторной практике, хотя до относительно недавнего времени предпринимались попытки создания таковых в экспериментальных целях [104].

Вследствие наличия протеолитических ферментов холерные вибрионы гидролизуют желатину, казеин, фибрин, свёрнутый куриный белок [4, 90, 92, 184]. Было обнаружено, что *V. cholerae* декарбоксилирует лизин и орнитин, не имеет дигидролазы аргинина, что является одним из ключевых признаков при идентификации возбудителя холеры, позволяет отличить последний от представителей рода *Aeromonas*, которому свойственно наличие такого фермента [153, 182].

Используя в качестве источника азота аммиак и соли аммония, а в качестве источника углерода – глюкозу, штаммы *V.cholerae* могут осуществлять органический синтез нуклеиновых кислот [4].

Важную роль в обеспечении структурно-функциональной организации холерных вибрионов играют липиды, которые не только входят в состав клеточных мембран, но и являются компонентом липополисахарида [148]. Ферментами, обеспечивающими расщепление молекул жиров у данного микроорганизма, являются липаза, лецитиназа, а также фосфатазы в отношении фосфолипидов и комплекс ферментов окисления [121, 123, 156, 165].

Вызывающие холеру токсигенные штаммы, принадлежащие к O139 серогруппе «Бенгал» [176, 196], которые образуют полисахаридную капсулу [162, 204] имеют особенности, связанные с повышенной потребностью в аминокислотах в составе синтетической среды [104].

Проблемными остаются некоторые вопросы, касающиеся регуляции жизнеобеспечения холерных вибрионов *in vitro* [71]. О. Felsenfeld [173] пишет о выращивании холерного вибриона и его выживаемости: он растёт на средах при pH 9,6 и солёности – 5% хлорида натрия, хотя время выживания укорачивается. Наличие в среде жёлчи, её солей, низких концентраций теллурита калия не ингибирует их, что используется при создании селективных сред [200]. Для селективного культивирования используют щелочную среду и способность холерного вибриона расщеплять маннозу, сахарозу, крахмал.

К числу факторов роста, необходимых для развития «требовательных» штаммов холерного вибриона, относятся различные аминокислоты, гипоксантин, пурин. Рост таких штаммов - ауксотрофов наступает после добавления к минимальной питательной среде одного или нескольких из перечисленных веществ [4, 49, 104, 159, 173].

1.3 Питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона

1.3.1 Общие положения

Бактериологический метод исследования остаётся ведущим при лабораторной диагностике холеры. Этот «золотой стандарт» имеет множество вариантов, в зависимости от физиологических особенностей микроорганизма. При изготовлении питательных сред учитывается потребность микробов в азотистых соединениях, углеводах, солях и ростовых веществах в соответствии с целью культивирования - выделение чистой культуры или идентификация [107, 108, 152]. Среда различают по разным признакам: жидкие, полужидкие, плотные, натуральные, известного состава, основные и специальные [35]. Для обеспечения работы по выделению культуры холерного вибриона используют комплекс питательных сред, среди которых одним из ключевых компонентов является среда накопления [51, 84, 88]. Жидкие среды накопления (1%-ная пептонная вода, основной раствор пептона) используют вместе с мясо-пептонным агаром (pH 7,6-8,3), агаром Мартена (pH 7,6-7,8), щелочными агарами, содержащими гидролизат казеина [13, 66, 82, 83, 92]. Щелочная пептонная вода - общепризнанная обогатительная среда с хорошими селективными свойствами, прежде всего, за счёт высокого pH [16, 59, 92, 172, 184]. В качестве жидкой среды накопления, обладающей селективным преимуществом, могут использовать 1% пептонную среду с теллуридом калия. Для посева на плотные среды рекомендуют щелочной мясо-пептонный агар, мартеновский агар, TCBS, обладающей селективными свойствами за счёт pH 8,6 и жёлчного компонента [84, 88]. Анализ при подозрении на холеру должен быть проведён в кратчайший срок, однако посевы в средах с ингибиторами посторонней микрофлоры приходится исследовать

несколько позже, чем на простых пептонах [16, 190]. Благодаря малому времени генерации *V.cholerae*, щелочная пептонная вода обеспечивает накопление вибрионов в течение 6-8 часов, но при удлинении этого срока может произойти опережение роста другими микробными видами. При необходимости проведения инкубации в течение 16-18 часов обычно вырастает «посторонняя» флора и приходится делать пересев на второй пептон [88, 184]. На среде TCBS этот недостаток нивелируется за счёт особой окраски искомым колоний. На чашках с отечественной средой СЭДХ-М, так же как и на TCBS, кишечная флора угнетается и не мешает отбору колоний возбудителя холеры [41, 139].

1.3.2 Питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона из сырья животного происхождения

Наиболее пригодными питательными основами для большинства бактериологических целей считаются мясные пептоны. В монографии Ю.А.Козлова [57] в подразделе «Общеупотребительные питательные среды» перечислены следующие из них: мясная вода и мясо-пептонный бульон; триптический перевар; пепсин - пептоны; мясо - пептонный агар; среды из крови. Вот как характеризовал Б.М.Раскин [114] ситуацию 1980 г. на рынке питательных сред: «Не представляется возможным при решении этого вопроса ориентироваться на пример фирм «Дифко», «Мерк», «Оксид» и др., которые идут по линии удорожания микробиологических сред, используя для их производства дорогостоящее мясное сырьё». Он предлагает использование отечественных препаратов на основе эритроцитарного кислотного гидролизата крови лошади в качестве замены казаминовых кислот и протеозо-пептона фирмы «Дифко». Среда из казеина, лактальбумина и плаценты крупного рогатого скота, «эмбрионального белка», крови и лошадиной сыворотки практикуются до последнего времени [97, 130, 133]. В настоящее время достаточно широкое применение находят питательные среды на основе гидролизатов каспийской кильки [119], молока лососевых рыб [127], сороги [132] и рыбьей костной муки [137], фибрина [101].

Способность холерных вибрионов разлагать белковые вещества обнаруживается при выращивании на желатине, свёрнутой лошадиной сыворотке, молоке, мясном бульоне [125]. Эти основы и пептоны животного происхождения издавна использовали в лабораторных исследованиях на холеру [130, 172]. Интерес представляет агар Дьедонне, содержащий смесь равных объёмов дефибринированной крови барана, быка или лошади и нормального раствора КОН [57]. Основой плотных сред часто являются питательные агары типа Хоттингера и Мартена (ферментативный перевар свиных желудков). В кратком руководстве [92] есть упоминание о сердечном настое (из сердца крупного рогатого скота) и мозговом настое, которые причислены к «основным питательным растворам, используемым при бактериологических исследованиях на холеру». Для выращивания холерных вибрионов в качестве жидких питательных сред предлагается 1%-ная пептонная вода и мясо-пептонный бульон щелочной реакции [4, 92], для накопления холерного энтеротоксина – среды на основе бактопептона и казаминовых кислот [171, 180, 181]. Многоцелевое использование питательной основы для изготовления среды обогащения, элективной среды или для выделения холерного вибриона заставляет манипулировать физико-химическими показателями этих сред. У некоторых питательных сред высоких элективных свойств удаётся добиться, повышая рН. В случае дифференциально-диагностических сред нет необходимости в высоком содержании аминного азота. Помимо солянокислотных гидролизатов в качестве белковой основы для диагностических холерных сред в настоящее время используют панкреатический гидролизат казеина (НПО «Микроген»). В справочнике [119] сообщается, что питательный агар для холерного вибриона готовят путём смешивания нескольких компонентов. В связи с появлением новых требований к обеспечению препаратами, предназначенными для профилактики и диагностики холеры [116], научная работа в этом направлении ведется постоянно.

1.3.3 Питательные среды для культивирования и выделения холерного вибриона из сырья растительного происхождения

Растительные белки в течении многих лет привлекали внимание исследователей, как перспективное сырье для питательных сред. В учебнике Г. Габричевского [32] картофель как питательная среда для бактерий описана в виде кусков, мезги и отвара. В более поздний период предлагалось использование ферментолизата сои [113, 120], экстракта кукурузы [92], гидролизата подсолнечного шрота и изолятов его белков [3, 115].

В качестве возможной альтернативы традиционным мясным и казеиновым средам были предложены среды на основе различных препаратов кукурузы [92]: основной раствор кукурузного экстракта, получаемый в дистиллированной воде с подогревом при pH 8,0-8,5; среда обогащения – кукурузный бульон, заменитель пептонной воды; жидкая элективная кукурузная среда pH 8,2-8,4. Агаровая цветная дифференциальная среда АЦДС сконструирована на основе гидролизата казеина и 20%-ного раствора кукурузного экстракта [92].

Можно присоединиться к мнению, согласно которому, изготовление питательных сред с подобными основами требует особого внимания. Важно предусмотреть влияние соотношения в них белковых и углеводных компонентов, а также возможность содержания не только стимуляторов, но и ингибиторов микроорганизмов.

1.3.4 Питательные среды для выделения и культивирования холерного вибриона из биомассы микроорганизмов

1.3.4.1 Ферментолизаты биомассы микроорганизмов как источники азота в составе микробиологических питательных сред

Биомасса микроорганизмов на протяжении многих лет привлекала внимание ученых в аспекте ее использования как сырья для приготовления питательных основ и сред из них [18, 22, 27, 33, 44, 53, 70, 109, 155, 163]. В этой связи можно упомянуть представителей рода *Candida*, *Saccharomyces*, а также *Micrococcus lactis*, *Lactobacterium acidus* [28]. Биомассу непатогенных бактерий, наряду с белками грибов, микроорганизмы утилизируют как питательные вещества [19].

В производстве питательных сред для культивирования некоторых патогенных бактерий используют биомассу *Clostridium perfringens* [47]. Препараты из бактериальной массы оказались более «питательными», чем казеиновые гидролизаты, в связи с высоким содержанием белка в ряде бактерий [29]. Однако подобные показатели не следует считать характерными, поскольку колебания химического состава бактерий зависят не только от вида, штамма, но и условий хранения и выращивания культуры.

Кормовые дрожжи некоторое время представляли собой важный источник создания основ питательных сред, в том числе для холерного вибриона. Из них готовили дрожжевой экстракт, среду агаровую дрожжевую - САД, пептонно-дрожжевую среду [92 - 95].

Несмотря на улучшение свойств экстракта БВК (биовитаминного концентрата) в результате дополнительных процедур, большим недостатком являлось наличие значительного количества белковых отходов. В этой связи было принято решение проводить дополнительный гидролиз [9, 27, 28].

Гидролиз дрожжей может быть осуществлен различными методами [21, 95, 128]: собственными ферментами, внешними ферментами, а также щелочами и кислотами, в частности – ортофосфорной [30, 40, 79, 93]. В качестве основы питательных сред для возбудителей опасных инфекционных болезней был успешно использован пептон «Д», представляющий собой смесь дрожжевого экстракта очищенного и аминокислотно-пептидного концентрата [30].

Практика бактериологических исследований позволяет утверждать, что требования к питательным основам следует тонко дифференцировать. Нужно учитывать цель исследования – накопление бактериальной массы или какого-то продукта обмена, селекция или идентификация чистой культуры. В частности, это касается оптимального содержания в среде азотистых продуктов. Так, например, на дрожжевых питательных средах с низким содержанием аминного азота был достигнут высокий уровень продукции холерного токсина [2, 71, 174].

В основном препараты из дрожжей использовали в качестве витаминной добавки к средам на основе казеинового гидролизата. Позже выяснилось, что из

дрожжей можно получать препарат, содержащий аминокислоты, пептиды разного состава и молекулярной массы, витамины, количество которых зависит от процедуры получения сырьевого продукта [31, 122, 124]. Этого можно достичь с помощью экстракции или панкреатического переваривания пекарских дрожжей. Осветлённый экстракт автолизированных дрожжей [50] используется либо как стимулятор роста (0,01-0,02%), либо как белковая основа (0,5-1,0%) в составе накопительных, диагностических и селективных питательных сред, а также – в вакцинно-сывороточном производстве. При сравнении с традиционными средами, этот препарат из дрожжей ускоряет процесс накопления биомассы и увеличивает её выход.

1.3.4.2 Применение экстрактов и ферментоллизатов хлебопекарных дрожжей в питательных средах для холерного вибриона

В последние годы отмечается широкое использование дрожжей в производствах различных продуктов с применением новых технологий [131, 155, 157]. Использование клеточной массы обуславливает условия выращивания, а цель производства - выбор конечной фазы культивирования [102, 146, 160, 168, 169]. С помощью управляемого метаболического процесса высокоплотностное культивирование рекомбинантных штаммов *S. cerevisiae* позволяет достичь конечного выхода хлебопекарных дрожжей биомассой 80 г/л за 16 часов [154]. Образцы такого сырья пекарских дрожжей, которые содержат до 80% жизнеспособных клеток и, примерно, 50% белков обычно используются для получения автолизатов, экстрактов, гидролизатов. Литературные данные позволяют говорить о перспективности пекарских дрожжей в качестве сырья для изготовления основ микробиологических питательных сред [17, 61, 135, 138, 141, 143, 191]. В середине прошлого столетия были предприняты попытки найти оптимальные способы гидролиза пекарских дрожжей для получения микробиологической питательной основы, содержащей максимум аминокислот и витаминов [7 - 9]. При ферментативном гидролизе образуются пептиды разной длины и характера аминокислотных остатков. Использование пепсина даёт пептиды с фенилаланином и лейцином, папаина - цепи с аргинином, лизином и

фенилаланином, панкреатина – аргинином и лизином, правда, при длительном гидролизе он проявляет активность в отношении тирозиновых, триптофановых, фенилаланиновых и лейциновых связей [79].

Автолизаты и экстракты хлебопекарных дрожжей давно заняли значимое место в изготовлении питательных сред [10 - 12, 25, 44, 98, 112, 122] вследствие активного метаболизма данного субстрата. В процессе аутолиза наблюдают два сложных и взаимосвязанных процесса: деградацию внутриклеточного белка и выход за пределы клетки белковых продуктов [175, 202]. Несмотря на высокую эффективность технологии аутолиза хлебопекарных дрожжей получаемые белковые гидролизаты нуждаются в последующем осветлении и очистке [55].

1.4 Заключительные положения

Поскольку холера до настоящего времени представляет угрозу для общества, это обуславливает необходимость совершенствования методов эпидемиологического надзора [72]. Важное место принадлежит бактериологическому исследованию воды. За период 2009-2019 гг. из объектов окружающей среды на территории РФ было выделено 744 штамма *Vibrio cholerae* O1 серогруппы [126]. Мероприятия по пресечению путей распространения холеры включают мониторинг вибриофлоры водоёмов разного типа. Надзор за качеством воды осуществляют учреждения государственной санитарно-эпидемиологической службы в плановом порядке и по эпидемиологическим показаниям [62, 63, 86]. Обследования питьевых и рекреационных водоисточников проводят согласно соответствующим инструкциям и методическим указаниям [87, 136]. Успешное решение этих задач может обеспечить разработка и внедрение в практику деятельности лабораторий всех уровней по лабораторной диагностике холеры эффективных и недорогих питательных сред различного назначения, объединенных в единый комплекс, базирующийся на общности питательной основы.

Специализированные противоэпидемические бригады (СПЭБ) Роспотребнадзора являются формированиями повышенной готовности и оперативного реагирования на чрезвычайные ситуации в области санитарно-

эпидемиологического благополучия населения. Бригады способны осуществлять значительный объём исследований, связанных с мониторингом объектов окружающей среды и материала от людей – больных, вибрионосителей, контактных и декретированных контингентов. Такую работу неоднократно проводили во время эпидемий холеры в Вилково (1991 г.), Республике Дагестан (1994 г.), в период массовых мероприятий, в частности, во время XXII Олимпийских игр в Сочи, чемпионата мира по футболу ФИФА 2018 [136]. Это требует трудоёмкой подготовительной работы по обеспечению бригады питательными средами, техническими средствами, оборудованием для использования современных методов лабораторной диагностики [73]. С 1999 года в Ростовском-на-Дону противочумном институте ведутся работы по изучению возможности использования новой недорогой питательной основы ПППД в составе сред выделения, культивирования и идентификации холерного вибриона, которые могли бы стать частью мобилизационного резерва специализированной противоэпидемической бригады [73 - 76, 78].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

ГЛАВА 2. 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

2.1 Оптимизация состава питательной среды ХДС-агар

2.1.1 Нахождение частного оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды ХДС-агар

В процессе проведения этой части исследования готовили варианты конструируемого ХДС-агара рН ($7,8 \pm 0,2$) с различной (по аминному азоту) концентрацией ПППД в диапазоне от 0,01 % до 0,1% с шагом 0,005%. В качестве среды сравнения использовали щелочной агар производства ФГУП НПО «Микроген».

Варианты конструируемой среды оценивали по чувствительности, показателям прорастания, эффективности, диаметру и морфологии колоний. Использовали при этом тест-штамма *V.cholerae* non 01 / non O139 P- 9741.

Результаты данной части исследования приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Оптимизация ХДС-агара по содержанию питательной основы ПППД в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741

Аминный азот питательной основы (%)	Диаметр колоний, мм ($M \pm m$)	Показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к. % ($M \pm m$)	Эффективность (выход биомассы с 1 мл среды), млрд. м.к./мл ($M \pm m$)	Морфология колоний	Чувствительность (м.к.)
0,01	$1,2 \pm 0,09$	$18,1 \pm 2,1$	$1,12 \pm 0,29$	типичная	10
0,015	$1,3 \pm 0,11$	$19,5 \pm 2,0$	$1,28 \pm 0,18$	типичная	10
0,02	$1,9 \pm 0,19$	$25,2 \pm 2,2$	$2,15 \pm 0,16$	типичная	10
0,025	$1,8 \pm 0,19$	$27,1 \pm 2,8$	$2,83 \pm 0,13$	типичная	10
0,03	$1,9 \pm 0,21$	$32,2 \pm 2,9$	$3,16 \pm 0,27$	типичная	10
0,035	$1,9 \pm 0,17$	$30,1 \pm 2,9$	$3,52 \pm 0,22$	типичная	10
0,04	$2,0 \pm 0,18$	$33,1 \pm 2,4$	$3,82 \pm 0,11$	типичная	10
0,045	$2,2 \pm 0,15$	$35,1 \pm 2,5$	$4,15 \pm 0,15$	типичная	10
0,05	$2,9 \pm 0,04$	$36,8 \pm 1,3$	$4,32 \pm 0,02$	типичная	10
0,055	$2,7 \pm 0,09$	$33,4 \pm 2,6$	$4,11 \pm 0,09$	типичная	10
0,06	$2,1 \pm 0,12$	$32,1 \pm 2,8$	$4,02 \pm 0,11$	типичная	10
0,065	$2,1 \pm 0,11$	$33,2 \pm 2,9$	$3,83 \pm 0,19$	42 % колоний с уплотнённым центром	10

Продолжение таблицы 2

0,07	2,2±0,19	31,4±2,8	3,79±0,08	68 % колоний с уплотнённым центром	10
0,075	1,65±0,14	32,6±1,82	3,92±0,15	72% колоний с уплотнённым центром	10
0,08	1,52±0,12	32,1±1,73	3,51±0,21	84,5% колоний с уплотнённым центром	10
0,085	1,32±0,20	34,5±2,55	4,03±0,33	88% колоний с уплотнённым центром	10
0,09	1,21±0,18	33,3±2,38	3,83±0,35	91,3% колоний с уплотнённым центром	10
0,095	1,10±0,15	35,6±2,82	4,22±0,38	94,5% колоний с уплотнённым центром	10
0,1	1,02±0,09	35,3±2,84	4,13±0,24	97,4% колоний с уплотнённым центром	10
Среда сравнения	2,3±0,13	31,1±1,85	3,61±0,25	типичная	10

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

Было установлено, что вариант ХДС-агара с концентрацией ПППД (по аминному азоту) равной 0,05 %, характеризовался наилучшими значениями вышеперечисленных биологических показателей.

Морфология колоний тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 на вариантах ХДС-агара с разными концентрациями ПППД (по аминному азоту) от 0,01 % до 0,06 % включительно была типичной, как и на среде сравнения.

С увеличением концентрации этой питательной основы в разрабатываемой среде (от 0,065 % до 0,1 % включительно) возрастало количество колоний с уплотнённым центром.

Было установлено, что во всем изученном диапазоне концентраций ПППД чувствительность ХДС-агара в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 составила 10 м.к., как и при использовании среды сравнения.

Таким образом, исходя из полученных в этой части исследования данных, можно сделать заключение о том, что концентрация ПППД – 0,05 % (по аминному азоту) явилась оптимальной в составе ХДС-агара в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741.

2.1.2 Нахождение частного оптимума количественного содержания солей и агар-агара бактериологического в конструируемой среде ХДС-агар

2.1.2.1 Нахождение частного оптимума количественного содержания натрия хлористого в составе конструируемой среды ХДС-агар

Изучали влияние натрия хлористого в концентрациях от 0 до 30,0 г/л с шагом 1,0 г/л на основные биологические показатели конструируемой питательной среды ХДС-агар. При этом концентрация ПППД в вариантах конструируемой среды соответствовала установленному в предыдущей серии опытов оптимуму концентрации данного ингредиента (по аминному азоту) - 0,05 %.

Оценку исследуемых вариантов среды проводили по упомянутым выше биологическим показателям в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741. Полученные данные представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Оптимизация ХДС-агара по концентрации хлористого натрия в отношении *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741

Концентрация хлористого натрия (г/л)	Диаметр колоний, мм (M±m)	Показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к., % (M±m)	Эффективность (выход биомассы с 1 мл среды), млрд. м.к./мл (M±m)	Морфология колоний	Чувствительность (м.к.)
0	1,4±0,08	14,8±0,54	4,28±0,08	типичная	10
1	1,48±0,04	16,1±0,63	4,35±0,14	типичная	10
2	1,76±0,01	22,01±0,49	4,61±0,21	типичная	10
3	2,33±0,01	32,0±0,68	4,78±0,38	типичная	10
4	3,1±0,01	40,79±0,98	5,22±0,11	типичная	10
5	3,0±0,01	38,71±0,65	5,13±0,14	типичная	10
6	2,94±0,02	37,94±0,34	5,02±0,04	типичная	10
7	2,89±0,01	37,69±0,45	4,72±0,12	типичная	10
8	2,91±0,01	36,95±0,23	4,79±0,16	типичная	10
9	2,93±0,02	36,45±0,31	4,83±0,13	типичная	10
10	2,81±0,03	34,48±0,38	4,62±0,18	типичная	10
11	2,83±0,02	33,92±0,55	4,56±0,06	типичная	10
12	2,84±0,04	33,74±0,63	4,44±0,04	типичная	10
13	2,8±0,07	33,42±0,58	4,35±0,09	типичная	10

Продолжение таблицы 3

14	2,76±0,11	33,14±0,62	4,29±0,19	типичная	10
15	2,67±0,08	32,6±0,54	4,18±0,03	типичная	10
16	2,52±0,07	33,1±0,85	4,10±0,21	типичная	10
17	2,48±0,02	32,8±0,25	4,27±0,07	типичная	10
18	2,51±0,06	33,41±0,69	4,06±0,16	типичная	10
19	2,47±0,07	31,21±0,52	4,19±0,13	типичная	10
20	2,52±0,09	32,24±0,64	3,77±0,09	типичная	10
21	2,45±0,03	30,92±0,92	3,65±0,25	типичная	10
22	2,31±0,11	30,14±0,83	3,78±0,15	типичная	10
23	2,27±0,16	29,92±0,77	3,48±0,04	типичная	10
24	2,17±0,13	28,64±0,98	3,24±0,17	типичная	10
25	2,14±0,15	27,22±1,02	3,15±0,07	типичная	10
26	1,92±0,18	25,84±1,13	2,92±0,05	типичная	10
27	1,78±0,15	19,45±1,22	3,02±0,16	типичная	10
28	1,52±0,12	17,38±1,54	2,96±0,14	типичная	10
29	1,44±0,11	13,11±1,25	3,11±0,26	типичная	10
30	1,31±0,14	8,14±0,74	2,70±1,24	типичная	100
Среда сравнения	2,1±0,11	32,4±1,98	3,54±0,23	типичная	10

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

В результате проведённых экспериментов было установлено, что вариант ХДС-агара с концентрацией хлористого натрия, равной 4,0 г/л, обладал максимальными значениями упомянутых выше биологических показателей и при этом не уступал среде сравнения.

2.1.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды ХДС-агар

В процессе разработки состава ХДС-агара было отмечено, что пробные его серии были мутными или сильно опалесцирующими. Это затрудняло проведение просмотра, микроскопии и отбора колоний. В связи с указанными обстоятельствами в состав конструируемой питательной среды для её осветления был введен натрий фосфорнокислый двузамещённый двенадцативодный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$).

Для количественной оптимизации содержания $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в составе ХДС-агара pH ($7,8 \pm 0,2$) готовили его варианты с различными значениями концентрации данного ингредиента в диапазоне от 0 г/л до 15,0 г/л с шагом 1,0 г/л. Проверяли по вышеуказанным биологическим показателям в отношении

тест-штамма *V.cholerae* non 01 / non O139 P- 9741. Концентрации питательной основы – ПППД и хлористого натрия в тестируемых вариантах питательной среды соответствовали найденным в предыдущих сериях оптимумам: 0,05 % (по аминному азоту) и 4,0 г/л соответственно. Результаты этой части исследования отображены в таблице 4.

Таблица 4 - Оптимизация ХДС-агара по концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в его составе в отношении *V.cholerae* non 01 / O139 P-9741

Концентрация $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$ (г/л)	Диаметр колоний, мм ($M \pm m$)	Показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к., % ($M \pm m$)	Эффектив- ность (выход биомассы с 1 мл среды), млрд. м.к./мл ($M \pm m$)	Морфология колоний	Чувстви- тель- ность (м.к.)
0	2,07±0,18	32,6±2,8	5,15±0,14	типичная	10
1	2,11±0,16	33,3±2,9	5,09±0,06	типичная	10
2	2,14±0,14	34,46±3,0	5,26±0,03	типичная	10
3	2,13±0,11	33,57±3,4	5,35±0,08	типичная	10
4	2,15±0,12	37,93±3,41	5,54±0,14	типичная	10
5	2,65±0,13	38,21±3,63	5,72±0,22	типичная	10
6	2,98±0,01	40,07±0,23	6,11±0,07	типичная	10
7	1,84±0,10	34,5±1,91	6,06±0,13	типичная	10
8	1,71±0,07	31,5±1,62	5,85±0,25	типичная	10
9	1,39±0,08	30,86±2,71	5,43±0,29	70% с типичной; 30% с атипичной*	10
10	1,22±0,04	24,36±1,72	5,12±0,19	67% с типичной; 33% с атипичной*	10
11	1,33±0,05	19,36±1,12	4,63±0,41	60% с типичной; 40% с атипичной*	10
12	0,95±0,04	16,07±1,02	3,21±0,08	58% с типичной; 42% с атипичной*	10
13	0,98±0,03	12,79±0,95	2,72±0,21	52% с типичной; 48% с атипичной*	10
14	1,0±0,06	8,79±0,67	2,0±0,18	44% с типичной; 56% с атипичной*	100
15	1,01±0,08	7,64±0,63	1,2±0,1	39% с типичной; 61% с атипичной*	100
Среда сравнения	2,2±0,12	32,5±1,87	3,48±0,15	типичная	10

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя;

атипичная* - колонии гладкие, округлые, с изрезанным краем, плотные, тёмные и прозрачные

При исследовании выявили, что вариант опытной среды с концентрацией $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$, равной 6,0 г/л, был полностью осветлённым без образования

осадка после стерилизации и характеризовался наилучшими значениями биологических показателей в отношении тест-штамма *V.cholerae* non 01 / non O139 P- 9741, не уступая среде сравнения.

2.1.2.3 Оптимизация концентрации агара микробиологического в составе питательной среды ХДС-агар

В ходе выполнения этой части исследования выбрали тот диапазон концентраций микробиологического агара (от 0,9 до 1,6% включительно, с шагом в 0,1 %), который в настоящее время используется в плотных бактериальных питательных средах [116, 136]. В данной работе применяли микробиологический агар, соответствующий требованиям ГОСТ 17206-96. Концентрации питательной основы – ПППД, хлористого натрия, натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в тестируемых вариантах питательной среды соответствовали найденным в предыдущих сериях опытов оптимумам: 0,05 % (по аминному азоту), 4,0 г/л и 6,0 г/л соответственно. Результаты данной части работы отражены в таблице 5.

Таблица 5 - Оптимизация ХДС-агара по концентрации микробиологического агара в его составе в отношении *V.cholerae* non O1 / O139 P-9741

Концентрация микробиологического агара, %	Диаметр колоний, мм (M±m)	Показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к.,% (M±m)	Эффективность (выход биомассы с 1 мл среды), млрд. м.к./мл (M±m)	Морфология колоний	Чувствительность, м.к.
0,9	5,58±1,05	60,45±3,24	12,20±0,98	*	10
1,0	4,35±0,28	51,2±0,44	10,56±0,74	*	10
1,1	3,95±0,35	43,4±0,31	9,27±0,69	*	10
1,2	3,14±0,04	41,2±0,24	7,68±0,22	типичная	10
1,3	3,06±0,03	36,8±0,38	6,14±0,04	типичная	10
1,4	2,89±0,07	35,4±0,42	5,86±0,31	типичная	10
1,5	2,45±0,09	31,6±0,38	4,82±0,26	типичная	10
1,6	2,02±0,11	29,2±0,65	3,64±0,22	типичная	10
Среда сравнения	2,2±0,12	32,5±1,87	3,48±0,15	типичная	10

Примечания: * - гладкие, округлые, полупрозрачные, голубоватые в проходящем свете с неровными краями;
 М – среднее значение определяемого показателя;
 m – ошибка среднего значения определяемого показателя

При проведении исследования был найден оптимум концентрации микробиологического агара, равный 1,3 % (13 г/л). При этом плотность агарового

студня по Валенту составила 375 ± 25 г. Вариант ХДС-агара с найденным оптимальным значением концентрации агара микробиологического характеризовался наилучшими среди протестированных вариантов биологическими показателями в отношении тест-штамма *V.cholerae* non 01 / non O139 P- 9741 и не уступал среде сравнения.

2.1.3 Оптимизация pH питательной среды ХДС-агар

По результатам проведенных исследований было установлено, что оптимумом pH разрабатываемой среды явились значения показателя концентрации водородных ионов, находящиеся в диапазоне $7,8 \pm 0,2$. При этом рост использованного в работе тест-штамма холерного вибриона на ХДС-агаре регистрировали при значениях pH от 6,7 до 9,3, что вполне согласуется с мнением ряда авторов [4, 16, 184, 185] о том, что представители вида *V. cholerae* растут в довольно широком диапазоне pH: от 7,0 до 9,2. Кроме того, большинство из используемых в практике плотных питательных сред для выделения и культивирования данного микроорганизма имеют pH щелочной зоны, и, как правило, это 7,6-8,5. Такие условия являются одними из благоприятных для холерных вибрионов и в значительной степени тормозят рост большинства других микроорганизмов, относящихся к сопутствующей микрофлоре.

2.2 Характеристика питательной среды ХДС-агар по составу и основным физико-химическим показателям

По результатам проведённой количественной оптимизации окончательный вариант сконструированной питательной среды ХДС-агар был следующим (на 1,0 л среды):

- ПППД – из расчёта – $(0,05 \pm 0,01)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 6,0 г;
- агар микробиологический по ГОСТ 17206-96 - 13,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1) – до 1 литра.

ХДС-агар представляет собой студнеобразную массу жёлтого или светло-коричневого цвета и имеет следующие физико-химические характеристики (показатели):

- рН – $(7,8 \pm 0,2)$;
- аминный азот – $(0,05 \pm 0,01) \%$;
- общий азот – $(0,16 \pm 0,002) \%$;
- содержание хлорида натрия – $(0,86 \pm 0,04) \%$;
- углеводы – $(0,007 \pm 0,0005) \%$;
- прочность агарового студня (по Валенту) – $(375 \pm 25) \text{ г.}$

2.3 Изучение среды ХДС-агар по основным биологическим показателям с использованием музейных штаммов *V.cholerae*

Исследовали следующие биологические показатели ХДС-агара: чувствительность, диаметр колоний, показатель прорастания (из посевной дозы 100 м.к.), эффективность, чувствительность, стабильность свойств штаммов *V.cholerae*. Контролем служил агар щелочной сухой производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Полученные данные группировали в зависимости от принадлежности штаммов *V. cholerae* к определённому биовару или серогруппе, а также по признаку идентичной чувствительности среды сравнения в отношении каждого из них. Поэтому группы штаммов были распределены на три категории. К первой были отнесены те, в отношении которых чувствительность щелочного агара составила 1000 м.к. (*V. cholerae* O1 classical P-1 (145); три штамма *V. cholerae* O139). Во вторую входили те, по отношению к которым чувствительность среды сравнения была равной 100 м.к. (четыре штамма *V. cholerae* O139). Результаты приведены в таблице 6.

При сравнении двух сред выявили, что *V. cholerae*, отнесённые к первой категории, формировали колонии только на ХДС-агаре. На щелочном агаре, приготовленном из сухого препарата производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, отмечали отсутствие их роста. В отношении штаммов холерного вибриона,

Таблица 6 - Основные биологические показатели ХДС-агара и среды сравнения - щелочного агара в отношении штаммов *V.cholerae*

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Биологические показатели							
	ХДС – агар				Щелочной агар (из сухого препарата ФГУП НПО «Микроген»)			
	Диаметр колоний, мм (M±m)	Показатель прорастания из 100 м.к. (M±m)	Эффективность, млрд. м.к. / мл (M±m)	Чувствительность, м.к.	Диаметр колоний, мм (M±m)	Показатель прорастания из 100 м.к. (M±m)	Эффективность, млрд. м.к. / мл (M±m)	Чувствительность, м.к.
<i>V.cholerae</i> O1 classical P-1 (145)	2,0±0,08	42,2±3,39	7,56±0,33	10	Нет роста	Нет роста	2,31±0,17	1000 *
<i>V.cholerae</i> O1 classical 3 штамма	2,45±0,07	34,53±2,24	4,91±0,21	10	2,08±0,10	27,50±1,75	3,75±0,11	10 ***
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 11 штаммов	2,95±0,04	37,6±2,71	6,58±0,11	10	2,65±0,06	34,0±2,09	3,93±0,09	10 ***
<i>V. cholerae</i> O139 3 штамма	2,48±0,06	33,6±2,42	5,53±0,12	10	Нет роста	Нет роста	1,61±0,07	1000 *
<i>V. cholerae</i> O139 4 штамма	2,31±0,10	27,8±1,61	3,90±0,07	10	1,66±0,15	5,8±0,43	2,42±0,08	100 **
<i>V. cholerae</i> O139 16131	2,3±0,12	24,8±1,93	4,33±0,07	10	1,45±0,13	16,0±0,93	3,57±0,04	10 ***
<i>V. cholerae</i> nonO1/non O139 5 штаммов	2,53±0,24	36,08±2,26	6,80±0,06	10	2,1±0,09	34,32±2,32	5,81±0,07	10 ***

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя; m – ошибка среднего значения определяемого показателя; * - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (1000 м.к.) щелочного агара в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* classical P-1 (145), *V.cholerae* O139 №№ 16063-16065); ** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (100 м.к.) щелочного агара в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O139 №№ 16074, 16075, 16077 (MO45), 88); *** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (10 м.к.) щелочного агара в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O1 classical №№ 5281, 569B, 1391; *V.cholerae* O1 El Tor M-878, 1310, 5879, 10058, 14863, 14864, 15301, 15302, 18367-18369; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741, 16005 (O68), 16003 (O65), P-12691 (O64), P-11972 (O63))

принадлежащих ко второй категории, предлагаемая питательная среда характеризовалась более высокими средними значениями диаметра колоний, чем настоящая среда сравнения.

Также установили, что ХДС-агар обладал незначительно большими (по сравнению со средой сравнения) усреднёнными значениями названного выше показателя в отношении штаммов, отнесённых к третьей категории, кроме *V. cholerae* O139 16131. Диаметр его колоний на пластинках предлагаемой питательной среды был достоверно более высок, чем на используемом щелочном агаре.

Таким образом, по показателю «диаметр колоний» ХДС-агар не уступал щелочному агару, приготовленному из препарата производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, в то время как на предлагаемой питательной среде они образовывали колонии из указанной посевной дозы. В отношении четырёх штаммов *V. cholerae* O139, принадлежащих ко второй категории, ХДС-агар обладал более высокими средними значениями настоящего показателя, чем настоящая среда сравнения. Обнаружили, что опытная питательная среда имела немногим более высокие, чем данный щелочной агар, усреднённые значения данного показателя в отношении трёх групп штаммов, относящихся к третьей категории кроме *V. cholerae* O139 16131.

Таким образом, ХДС-агар превосходил используемый в настоящей части исследования щелочной агар по показателю прорастания (из посевной дозы 100 м.к.) в отношении *V. cholerae* O1 classical P-1 (145) и всех штаммов *V. cholerae* O139.

При проведении исследований обнаружили, что ХДС-агар обладал гораздо более высокими, чем щелочной агар, приготовленный из препарата производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ средними значениями настоящего показателя в отношении штаммов холерного вибриона, отнесённых к первой категории. Также отметили, что предлагаемая питательная среда в отношении штаммов *V. cholerae*, принадлежащих ко второй категории, превосходила его по значению эффективности.

Усреднённые значения данного показателя ХДС-агара в отношении двух групп штаммов холерного вибриона третьей категории были заметно выше, чем у используемого щелочного агара. Эта питательная среда незначительно уступала предлагаемой по тому же показателю в отношении *V. cholerae* O139 16131. Достоверных различий между опытной средой и средой сравнения по эффективности в отношении группы из пяти штаммов *V. cholerae* non O1 / non O139 не было выявлено.

По показателю «эффективность» ХДС-агар не уступал щелочному агару и значительно превосходил его в отношении *V. cholerae* O1 classical P-1 (145), 11 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и всех штаммов *V. cholerae* O139.

Сравнительное изучение ХДС-агара и щелочного агара показало, что первая питательная среда обладала чувствительностью, равной 10 м.к. в отношении всех взятых в работу штаммов *V. cholerae*. При этом вторая среда характеризовалась меньшей чувствительностью, равной 1000 м.к. в отношении *V. cholerae* O1 classical P-1 (145), трёх штаммов *V. cholerae* O139 и 100 м.к. – в отношении группы из четырёх штаммов *V. cholerae* O139. По отношению к остальным штаммам чувствительность контрольной среды соответствовала таковой у ХДС-агара и составила 10 м.к.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что ХДС-агар не только не уступал среде сравнения производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, но и превосходил её по таким биологическим показателям как «диаметр колоний», «показатель прорастания из посевной дозы 100 м.к.», «эффективность», «чувствительность».

При оформлении нормативных и эксплуатационных документов на ХДС-агар проводили его предрегистрационные испытания на базе ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Предлагаемую питательную среду оценивали по тем же биологическим показателям, что и при авторских испытаниях. При этом были использованы 15 штаммов *V. cholerae* различных биоваров и серогрупп. В качестве контрольной среды использовали щелочной агар производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области согласно

инструкции производителя. Результаты этой части работы представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Результаты сравнительного изучения ХДС-агара и контрольной среды в ходе предрегистрационных испытаний

Штаммы <i>V. cholerae</i>	ХДС-агар		Щелочной агар (из сухого препарата производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области) (контроль)	
	Показатель прорастания из 100 м.к. ($M \pm m$)	Чувствительность, м.к.	Показатель прорастания из 100 м.к. ($M \pm m$)	Чувствительность, м.к.
<i>V. cholerae</i> O1 classical 3 штамма	42,44 $\pm$ 2,16	10	36,89 $\pm$ 2,04	10
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 6 штаммов	38,39 $\pm$ 1,62	10	36,11 $\pm$ 1,21	10
<i>V. cholerae</i> O139 2 штамма	42,84 $\pm$ 2,95	10	34,50 $\pm$ 1,02	10
<i>V. cholerae</i> non O1/non O139 4 штамма	45,17 $\pm$ 2,17	10	39,58 $\pm$ 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: M-878, 18367, 18368, 18588, 18890, 19433; штаммы *V. cholerae* O139: 16064, 17676; штаммы *V. cholerae* non O1 /non O139: *V. cholerae* non O1 /non O139: P-9741, P-5447(O2), P-5448 (O3), P-5449(O4)

Как видно из полученных в ходе предрегистрационных испытаний данных, ХДС-агар не уступал контрольной среде - щелочному агару, приготовленному из сухого препарата производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области.

Стабильность серологических свойств использованных штаммов *V. cholerae* после трёх последовательных пассажей через ХДС-агар и щелочные агары, приготовленные из сухих препаратов указанных выше производителей, оценивали постановкой реакции агглютинации с соответствующими диагностическими сыворотками, а биохимических свойств – по результатам теста на наличие индофенолоксидазы, отношению к углеводам и аминокислотам. Штаммы холерных вибрионов, троекратно пассированные через все три среды, стабильно проявляли свои основные свойства.

2.4. Оптимизация состава жидкой накопительной питательной среды для выделения и культивирования холерного вибриона ХДС-Н

2.4.1 Поиск наиболее эффективной концентрации ферментативного белкового гидролизата ПППД при конструировании среды ХДС-Н

Холерные вибрионы обладают высокой скоростью генерации и могут размножаться в условиях малых количеств азотистых компонентов в отличие от представителей сопутствующей микрофлоры: кишечной палочки и протей. Учитывая эти обстоятельства, задача состояла в подборе минимальной концентрации питательной основы, достаточной для накопления *V. cholerae* в необходимых для лабораторной диагностики количествах в течение первых 6 часов культивирования и опережения роста посторонней микрофлоры.

Поскольку ПППД характеризуется содержанием аминного азота от 0,22 до 0,35 % включительно, то готовили варианты опытной среды ХДС-Н, в которых концентрация указанного гидролизата варьировала от 0,005 % до 0,35 % включительно.

Оценку биологических показателей, характеризующих качество опытных вариантов накопительной среды с различной концентрацией ПППД, проводили в отношении тест-штамма холерного вибриона не O1 / не O139 серогруппы Р-9741. Контрольной средой была выбрана 1% пептонная вода из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Результаты данной части исследования представлены в таблице 8.

В процессе проведения настоящей части исследования обнаружили, что вариант опытной среды ХДС-Н с концентрацией ПППД (по аминному азоту), составившей 0,02 %, характеризовался наилучшими значениями вышеупомянутых биологических показателей и при этом не уступал среде сравнения.

Таким образом, можно сделать заключение, что концентрация ПППД - 0,02 % (по аминному азоту) явилась оптимальной в составе среды ХДС-Н в отношении тест-штамма *V. cholerae* non O1 / non O139 Р-9741.

Таблица 8 - Оптимизация содержания аминного азота питательной основы в среде ХДС-Н (в 10-кратно разведённых вариантах) в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741

Аминный азот питательной основы (%)	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 10 посеянных м.к. (M±m)	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 100 посеянных м.к. (M±m)	Эффективность, % (M±m)	Чувствительность (м.к.)
0,005	0,88±0,07	4,01±0,03	11,52±3,22	100
0,01	1,92±0,06	8,05±0,09	17,44±1,56	10
0,015	3,32±0,03	12,08±0,92	40,25±1,39	10
0,02	5,62±0,06	41,58±1,14	73,25±3,16	10
0,025	4,42±0,11	40,35±0,72	69,54±2,45	10
0,03	3,84±0,14	38,52±1,22	63,44±3,81	10
0,035	3,72±0,04	31,25±2,24	55,26±2,16	10
1% Пептонная вода	2,98±0,09	32,42±0,96	52,94±2,36	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

2.4.2 Нахождение частного оптимума количественного содержания солей в конструируемой среде ХДС-Н

2.4.2.1 Нахождение частного оптимума количественного содержания натрия хлорида в конструируемой среде ХДС-Н

В ходе проведения данной части исследования готовили варианты конструируемой среды (в десятикратно разведённом виде) с различной концентрацией хлорида натрия в диапазоне от 0 до 30,0 г/л с шагом 1,0 г/л. При этом концентрация питательной основы - ПППД в данных вариантах соответствовала оптимальному значению 0,02 % (по аминному азоту), установленному в предыдущей серии экспериментов. Оценку вариантов разрабатываемой среды проводили по изложенным в предыдущем разделе настоящей работы биологическим показателям в отношении того же тест-штамма *V.cholerae*. В качестве среды сравнения применяли 1% пептонную воду, приготовленную по инструкции производителя из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Результаты приведены в таблице 9.

Таблица 9 - Оптимизация содержания хлористого натрия в среде ХДС-Н (в 10-кратно разведённых вариантах) в отношении тест-штамма *V.cholerae* по О1 / по О139 Р-9741

Содержание хлористого натрия, г/л	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 10 посеянных м.к. (M±m)	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 100 посеянных м.к. (M±m)	Эффективность, % (M±m)	Чувствительность (м.к.)
0	5,72±0,49	42,22±2,11	74,84±3,56	10
1	5,94±0,36	44,35±1,67	75,12±2,68	10
2	6,11±0,28	46,29±2,35	74,98±3,11	10
3	6,53±0,18	47,35±1,44	75,83±2,75	10
4	7,26±0,31	52,39±2,08	76,24±1,93	10
5	7,64±0,22	56,21±2,44	77,18±1,35	10
6	7,55±0,14	53,45±2,12	77,02±3,04	10
7	7,31±0,08	51,21±1,55	76,34±1,71	10
8	7,22±0,11	51,36±2,02	75,95±1,38	10
9	7,24±0,18	52,11±0,85	76,11±1,21	10
10	7,13±0,09	51,10±1,13	75,79±1,41	10
11	7,08±0,16	50,89±1,16	75,43±0,91	10
12	7,14±0,32	51,16±2,04	74,64±2,33	10
13	7,25±0,07	52,12±1,39	74,25±2,64	10
14	7,05±0,09	51,08±1,08	74,11±3,13	10
15	7,16±0,11	51,14±2,21	74,02±2,14	10
16	7,18±0,09	51,24±1,11	74,21±2,05	10
17	7,04±0,13	51,35±2,14	74,07±3,01	10
18	6,93±0,08	50,86±1,21	73,67±2,64	10
19	6,89±0,41	48,61±0,95	70,22±1,93	10
20	6,72±0,44	47,63±2,31	70,08±4,12	10
21	6,55±0,24	47,24±1,55	69,93±2,69	10
22	6,32±0,12	46,44±1,84	68,72±2,54	10
23	4,56±0,09	45,31±3,19	65,54±4,67	10
24	3,74±0,26	39,31±2,18	58,31±3,93	10
25	2,37±0,21	28,23±1,12	42,11±2,74	10
26	2,21±0,14	27,56±1,38	41,83±3,33	10
27	1,93±0,11	18,31±1,02	28,17±1,72	10
28	1,65±0,07	7,31±0,48	10,25±0,83	10
29	1,01±0,05	2,32±0,11	6,11±0,44	100
30	0,92±0,03	1,72±0,08	5,25±0,36	100
Среда сравнения	3,05±0,14	34,40±0,98	54,22±2,68	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

По результатам проведённого исследования был установлен частный оптимум концентрации хлорида натрия в среде ХДС-Н, равный 5,0 г/л. При данном значении концентрации ингредиента были достигнуты наилучшие биологические

показатели в отношении использованного тест-штамма холерного вибриона. ХДС-Н не уступала среде сравнения.

Таким образом, концентрация хлористого натрия в составе конструируемой среды ХДС-Н (в десятикратно разведённом виде), равная 5,0 г/л, оказалась наиболее оптимальной для роста тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741.

2.4.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого

двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды ХДС-Н

При оптимизации состава среды ХДС-Н было отмечено, что её пробные серии после стерилизации были мутными или опалесцирующими, нередко образовывался осадок. Данное обстоятельство создавало трудности при оценке роста штаммов холерного вибриона в толще среды. В этой связи с целью осветления конструируемой среды и предотвращения образования осадка в её состав вводили натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \bullet 12\text{H}_2\text{O}$). Оптимизацию концентрации указанного ингредиента в составе питательной среды ХДС-Н проводили следующим методом. Готовили варианты конструируемой среды в концентрированном виде с найденными в предыдущих сериях экспериментов оптимумами содержания питательной основы – ПППД и хлористого натрия: 0,2 % (по аминному азоту) и 50 г/л соответственно. Варианты отличались друг от друга концентрациями натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного: от 0 до 15,0 г/л с шагом 1,0 г/л. рН в них устанавливали на уровне $8,0 \pm 0,2$. После приготовления изучаемые варианты накопительной среды разводили десятикратно дистиллированной водой. Стерилизовали при 0,5 атм (110°C) 20 мин. Их оценивали по тем же биологическим показателям с применением такой же среды сравнения, что и в двух предыдущих частях исследования. Результаты представлены в таблице 10.

В ходе исследования выявили, что вариант среды ХДС-Н с концентрацией натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного, равной 5,0 г/л, характеризовался наилучшими значениями биологических показателей,

соответствующих таковым на контрольной среде, в отношении штамма холерного вибриона не O1 / не O139 P-9741.

Таблица 10 - Результаты поиска оптимума концентрации солевого компонента среды ХДС-Н - натрия фосфорнокислого двузамещённого 12-водного для *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741

Содержание натрия фосфорнокислого 12-водного, г/л	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 10 посеянных м.к. (M±m)	Выросло колоний после шести часов инкубации в накопительной среде из 100 посеянных м.к. (M±m)	Эффективность, % (M±m)	Чувствительность (м.к.)
0	7,72±0,18	58,11±1,39	79,22±1,55	10
1	7,51±0,44	59,35±2,15	79,85±2,38	10
2	6,98±0,31	62,33±1,82	80,08±3,03	10
3	7,94±0,25	67,22±2,25	83,44±3,51	10
4	8,82±0,16	68,95±3,45	86,29±2,14	10
5	9,19±0,40	71,59±1,68	88,45±1,47	10
6	8,32±0,32	70,42±2,05	79,96±2,37	10
7	8,24±0,29	68,56±2,12	75,38±3,16	10
8	7,81±0,47	67,43±3,33	73,11±3,18	10
9	7,63±0,36	66,21±1,65	69,83±3,54	10
10	6,34±0,22	60,08±1,44	66,65±2,31	10
11	5,14±0,36	52,12±2,12	50,84±2,92	10
12	4,12±0,28	48,92±2,39	38,66±2,16	10
13	1,89±0,14	13,25±1,08	15,18±1,11	10
14	0,93±0,08	6,56±0,35	6,02±0,41	100
15	0,56±0,06	2,32±0,21	3,01±0,27	100
Среда сравнения	3,05±0,14	34,40±0,98	54,22±2,68	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

Он получил наилучшую визуальную оценку потому, как был прозрачным, хорошо осветлённым и не содержал осадка после стерилизации.

2.4.3 Оптимизация значения pH в питательной среде ХДС-Н

Одним из условий для культивирования и выделения *V.cholerae* в средах накопления является создание той концентрации водородных ионов (pH), которая не только позволяет активно размножаться холерным вибрионам, но и в значительной степени тормозит рост сопутствующей микрофлоры. В связи с этим в настоящей части работы, помимо *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741, были использованы штаммы микробов-контаминантов: *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14.

Варианты конструируемой среды ХДС-Н готовили в концентрированном виде. При этом концентрацию питательной основы – ПППД в них поддерживали на уровне 0,2 % (по аминному азоту). Концентрации хлористого натрия и натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного устанавливали на уровне 50,0 и 5,0 г/л соответственно, т.к. при разведении в 10 раз получались оптимальные значения этих параметров для роста тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741. Опытные варианты различались друг от друга значениями pH: от 7,1 до 9,1 с шагом 0,1. После приготовления их разводили десятикратно дистиллированной водой, стерилизовали при 0,5 атм (110°C) 20 мин.

Контролем служила 1% пептонная вода, приготовленная из сухого препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Данные, полученные при проведении данной части исследования, представлены на рисунках 1, 2, 3.

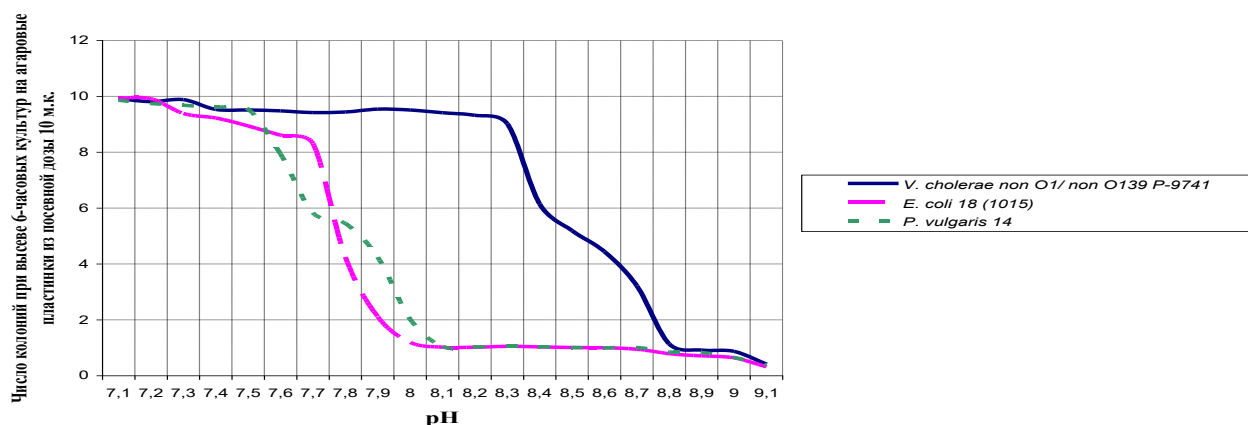


Рисунок 1 - Зависимость количества выросших колоний штаммов холерного вибриона, кишечной палочки и протей после шести часов инкубации в накопительной среде ХДС-Н от её pH (из 10 посеянных м.к.)

При проведении настоящей части исследования (Рисунок 1) выявили, что с увеличением pH среды ХДС-Н от 7,1 до 8,2 включительно настоящий показатель в отношении *V.cholerae* non O1 / O139 P-9741 изменялся от $9,92 \pm 0,81$ до $9,32 \pm 0,14$ колоний ($p < 0,05$). При дальнейшем увеличении pH от 8,3 до 9,1 включительно величина этого биологического показателя существенно снижалась от 9,02 до $0,41 \pm 0,03$ колоний ($p < 0,05$). У среды сравнения значение того же

показателя в отношении данного штамма *V.cholerae* составило $3,14 \pm 0,13$ колоний ($p < 0,05$).

Установили, что с изменением pH конструируемой среды от 7,1 до 8,1 включительно происходило существенное снижение величин приведённого выше биологического показателя в отношении *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14: от $9,94 \pm 0,61$ до $1,02 \pm 0,07$ и от $9,86 \pm 0,71$ до $1,04 \pm 0,09$ колоний ($p < 0,05$) соответственно. В ходе дальнейшего увеличения pH ХДС-Н (от 8,2 до 9,1 включительно) наблюдали отсутствие роста указанных выше микроорганизмов. Среда сравнения в их отношении обладала значениями данного показателя - $3,35 \pm 0,21$ и $4,02 \pm 0,14$ колоний ($p < 0,05$) соответственно.

Изучали также зависимость количества выросших колоний штаммов холерного вибриона, кишечной палочки и протей после шести часов инкубации в накопительной среде ХДС-Н от её pH из 100 посеянных м.к. (Рисунок 2).

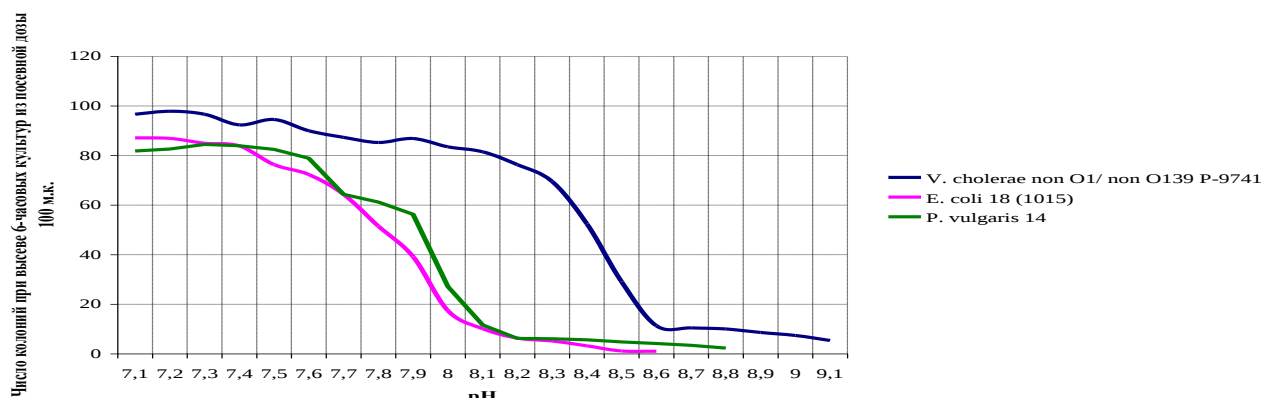


Рисунок 2 - Зависимость количества выросших колоний штаммов холерного вибриона, кишечной палочки и протей после шести часов инкубации в накопительной среде ХДС-Н от её pH (из 100 посеянных м.к.)

Дальнейшее увеличение pH от 8,7 до 9,1 включительно вызывало отсутствие роста этого штамма. Подобным образом складывалась картина в отношении *P. vulgaris* 14. В ходе последовательного увеличения pH разрабатываемой среды ХДС-Н от 7,1 до 8,8 включительно регистрировали постепенное снижение значений вышеупомянутого биологического показателя от $81,82 \pm 7,02$ до

2,32±0,24 колоний ($p<0,05$). При последующем увеличении pH от 8,9 до 9,1 включительно наблюдали отсутствие роста *P. vulgaris* 14.

В настоящей части исследования среда сравнения обладала значениями данного показателя в отношении штаммов холерного вибриона, кишечной палочки и вульгарного протей 11,22±0,98; 34,42±1,49 и 15,38±1,34 колоний ($p<0,05$) соответственно.

При проведении оптимизации pH среды ХДС-Н представляло интерес проследить за изменением следующего её биологического показателя - эффективности (Рисунок 3).

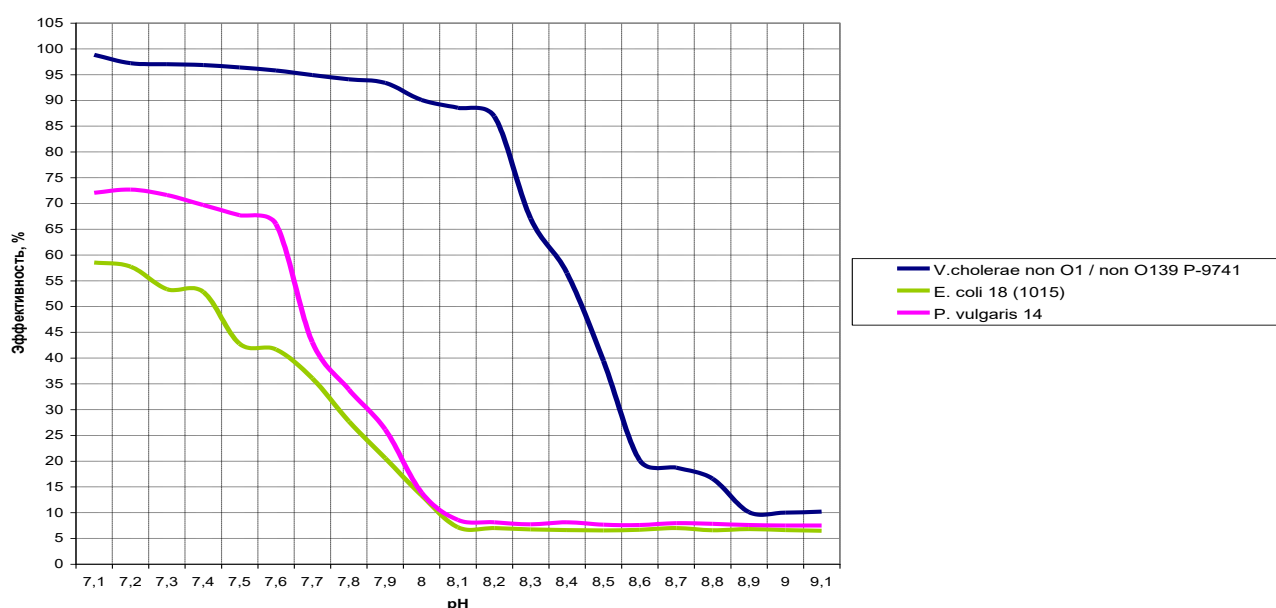


Рисунок 3 - Зависимость показателя эффективности при оптимизации pH питательной среды ХДС-Н в отношении *V. cholerae* non O1 / non O139 P-9741, *E. coli* 18 (1015), *P. vulgaris* 14

В ходе данной части настоящего исследования выявили, что с изменением pH от 7,1 до 9,1 включительно значение показателя эффективности уменьшалось от 98,85±2,25 % до 10,22±0,92 % ($p<0,05$). На участке заданного диапазона pH от 7,1 до 8,2 включительно регистрировали постепенное снижение данного показателя - от 98,85±2,25 % до 86,91±2,37 % ($p<0,05$). С дальнейшим увеличением pH тестируемых образцов питательной среды ХДС-Н от 8,3 до 8,9 включительно отмечали заметное снижение настоящего биологического показателя от 67,11±1,21 % до 10,12±0,11 % ($p<0,05$). С последующим ростом pH от 8,9 до 9,1

включительно наблюдали несущественное изменение этого показателя: от $10,12 \pm 0,11$ % до $10,22 \pm 0,92$ % ($p < 0,05$).

Также обнаружили, что с увеличением pH опытных образцов разрабатываемой среды ХДС-Н от 7,1 до 8,1 включительно происходило постепенное снижение величин их эффективности в отношении *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14: от $58,55 \pm 1,35$ % до $7,15 \pm 0,32$ % и от $72,06 \pm 2,04$ % до $8,60 \pm 0,44$ % соответственно ($p < 0,05$). Дальнейшее повышение pH от 8,2 и до 9,1 включительно вызывало незначительное изменение значений рассматриваемого показателя в отношении тех же микроорганизмов: от $7,02 \pm 0,65$ % до $6,50 \pm 0,35$ % и от $8,12 \pm 0,68$ % до $7,51 \pm 0,21$ % соответственно ($p < 0,05$).

У среды сравнения данный показатель в отношении *V. cholerae* поп O1 / O139 P-9741 составил $55,23 \pm 1,42$ % ($p < 0,05$). В отношении *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 среда сравнения 1% пептонная вода характеризовалась значениями настоящего биологического показателя – $39,35 \pm 1,55$ % и $44,48 \pm 1,98$ % соответственно ($p < 0,05$).

Опытные варианты конструируемой среды ХДС-Н с разными значениями pH исследовали также по следующему биологическому показателю – чувствительности в отношении *V. cholerae* поп O1 / O139 P-9741, *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14.

Установили, что с увеличением pH вариантов среды ХДС-Н от 7,1 до 8,8 включительно их значения настоящего показателя в отношении *V. cholerae* поп O1 / O139 P-9741 составили 10 м.к. Дальнейшее повышение pH от 8,9 до 9,1 включительно вызывало снижение упомянутого выше показателя до 100 м.к.

Также выявили, что с ростом pH вариантов конструируемой среды ХДС-Н от 7,1 до 8,1 включительно их величины упомянутого выше биологического показателя в отношении *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 составили 10 м.к. Последующее возрастание pH от 8,2 до 8,6 включительно в случае с *E. coli* 18 (1015) вызывало снижение данного показателя до 100 м.к., а увеличение pH от 8,7 до конца выбранного диапазона (9,1) способствовало уменьшению такового до 1000 м.к. Аналогичным образом складывалась картина в случае с *P. vulgaris* 14.

При установке значений pH от 8,2 до 8,8 включительно чувствительность конструируемой среды ХДС – Н снижалась до 100 м.к. Дальнейший подъём pH от 8,9 и до 9,1 с шагом 0,1 вызывал снижение настоящего биологического показателя до 1000 м.к.

Среда сравнения в отношении использованных в настоящей части работы штаммов характеризовалась значениями вышеупомянутого биологического показателя, равными 10 м.к.

При анализе полученных данных в ходе оптимизации среды ХДС-Н отметили то, что условия, создавшиеся при значениях pH от 8,0 до 8,4 включительно, явились одними из оптимальных для роста тест-штамма *V. cholerae* non O1 / O139 P-9741. В то же время они переставали быть таковыми для роста микробов-контаминантов *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14. Это было уже наиболее заметно при pH ХДС-Н, равном 8,2.

В связи с изложенным за оптимум pH в разрабатываемой питательной среде ХДС-Н был принят диапазон значений $8,2 \pm 0,2$.

2.5 Характеристика сконструированной питательной среды ХДС-Н, её состав и физико-химические показатели

По результатам проведённой количественной оптимизации окончательный вариант сконструированной питательной среды ХДС-Н был следующим (на 1,0 л среды):

- ПППД – из расчёта – $(0,22 \pm 0,02)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 50,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 5,0 г;
- калий азотнокислый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4217-77) – 1,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1) – до 1 литра.

Нитрат калия ввели в состав ХДС-Н потому, что *V.cholerae* обладает ферментом – нитратредуктазой, которая определяется по МУК 4.2.3745-22 [88]. Этот компонент содержится в том же количестве, что и в традиционных питательных средах для культивирования и выделения холерного вибриона.

ХДС-Н представляет собой жидкость коричневого или светло-коричневого цвета со следующими физико-химическими характеристиками:

- рН - $(8,2 \pm 0,2)$;
- аминный азот – $(0,22 \pm 0,02)$ %;
- общий азот – $(0,72 \pm 0,016)$ %;
- содержание хлорида натрия – $(5,46 \pm 0,14)$ %;
- углеводы – $(0,03 \pm 0,012)$ %.

2.6 Конструирование бульона для культивирования холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей - ХДС-бульона

2.6.1 Нахождение частного оптимума концентрации питательной основы в составе конструируемой среды ХДС-бульон

В отличие от накопительных сред бульоны для культивирования должны характеризоваться высокой концентрацией питательной основы (по аминному азоту), обеспечивающей длительное (18 – 48 часов) выращивание в них различных штаммов *V. cholerae* без преждевременного истощения питательного субстрата и ростовых факторов в среде. Кроме того, высокая концентрация пептидов и аминокислот питательной основы в среде создают определённую её буферность, препятствующую изменению рН среды в процессе культивирования холерного вибриона за счёт накопления кислых продуктов его метаболизма. Таким образом, при конструировании бульона для культивирования холерного вибриона представлялось целесообразным использовать ПППД в более высоких, чем в накопительной среде ХДС-Н, концентрациях.

В связи с вышеизложенным, готовили варианты ХДС-бульона с различными (по аминному азоту) значениями концентрации ПППД в диапазоне от 0,05 % до 0,12 % с шагом 0,005 %. При этом устанавливали рН среды $7,7 \pm 0,1$. Оценку показателей опытных вариантов ХДС-бульона с различной концентрацией ПППД проводили в отношении тест-штамма холерного вибриона не О1 / не О139 Р-9741. Контрольной средой была выбрана 1% пептонная вода из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства

ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Результаты данной части исследования представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Оптимизация концентрации ПППД (по аминному азоту) в разрабатываемой питательной среде ХДС-бульон в отношении *V. cholerae* по O1 / по O139 P-9741

Аминный азот питательной основы (%)	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 10 посеянных м.к. (M±m)	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 100 посеянных м.к. (M±m)	Эффективность, % (M±m)	Чувствительность (м.к.)
0,05	3,11±0,04	44,17±0,43	47,11±1,33	10
0,055	3,59±0,21	47,54±0,92	51,22±2,33	10
0,06	4,12±0,14	49,54±0,98	57,88±3,34	10
0,065	5,28±0,07	54,74±1,01	62,12±4,01	10
0,07	7,13±0,04	72,11±0,67	71,41±2,25	10
0,075	6,18±0,06	55,60±1,45	67,43±3,53	10
0,08	6,02±0,23	52,97±0,61	62,48±2,28	10
0,085	5,44±0,11	51,20±1,67	58,74±3,45	10
0,09	4,93±0,33	47,54±0,94	53,55±3,18	10
0,095	4,61±0,22	41,49±1,44	48,14±3,62	10
0,1	4,52±0,13	39,66±1,97	42,01±1,31	10
0,105	4,25±0,25	36,85±1,18	39,21±1,62	10
0,11	3,84±0,16	33,06±1,14	33,12±1,53	10
0,115	3,53±0,27	29,63±0,62	30,63±1,84	10
0,12	3,22±0,23	27,12±1,01	28,79±1,93	10
Среда сравнения	3,02±0,16	31,26±0,87	53,43±2,22	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

Вариант конструируемой среды с концентрацией питательной основы равной 0,07 %, обладал наилучшими значениями вышеперечисленных биологических показателей и при этом не уступал среде сравнения.

2.6.2 Оптимизация концентраций солевых компонентов в составе питательной среды ХДС-бульон

2.6.2.1 Оптимизация концентрации хлористого натрия в составе питательной среды ХДС-бульон

При проведении настоящей части исследования готовили варианты конструируемого бульона pH (7,7±0,1) с различными значениями концентрации хлористого натрия в диапазоне от 0 до 30,0 г/л с шагом 1,0 г/л. Варианты оценивали по тем же биологическим показателям, что и при оптимизации

питательной основы, в отношении вышеуказанного тест-штамма *V.cholerae*.

Полученные результаты приведены в таблице 12.

Таблица 12 - Оптимизация содержания хлористого натрия в среде ХДС-бульон в отношении тест-штамма *V.cholerae* по O1 / по O139 P-9741

Содержание хлористого натрия, г/л	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 10 посеянных м.к. (M±m)	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 100 посеянных м.к. (M±m)	Эффективность, % (M±m)	Чувствительность (м.к.)
0	7,09±0,02	72,21±0,58	71,68±2,28	10
1	7,12±0,05	73,34±1,24	73,56±3,25	10
2	7,29±0,08	75,11±1,31	77,89±4,29	10
3	7,41±0,21	77,15±3,15	78,25±2,62	10
4	7,49±0,32	78,64±3,64	80,02±2,12	10
5	7,56±0,06	80,05±4,18	81,62±3,52	10
6	7,35±0,05	76,56±2,26	72,23±2,14	10
7	7,38±0,28	75,59±1,13	71,79±1,19	10
8	7,22±0,11	74,95±1,05	71,24±2,24	10
9	6,92±0,24	72,36±2,63	68,43±3,31	10
10	6,31±0,07	69,22±0,32	64,67±1,37	10
11	6,28±0,12	67,11±1,11	64,33±2,53	10
12	6,12±0,07	63,22±2,35	60,92±2,62	10
13	5,95±0,12	60,32±2,92	58,36±2,06	10
14	5,38±0,06	57,24±1,44	53,68±2,28	10
15	5,44±0,02	59,02±3,74	54,11±2,21	10
16	5,22±0,04	53,14±2,65	49,91±1,41	10
17	4,89±0,09	50,23±1,43	46,81±1,24	10
18	4,75±0,05	48,63±1,03	45,23±2,93	10
19	3,79±0,08	41,21±1,63	39,63±1,52	10
20	3,55±0,05	35,14±1,04	33,04±0,34	10
21	3,41±0,04	31,41±2,67	29,92±0,63	10
22	3,32±0,02	29,03±0,43	26,55±1,15	10
23	3,01±0,01	27,31±2,12	25,71±0,28	10
24	2,92±0,04	24,29±1,45	22,28±0,73	10
25	2,53±0,08	20,12±1,58	11,52±0,24	10
26	2,12±0,04	19,44±1,67	6,85±0,06	10
27	2,05±0,05	15,23±0,31	5,11±0,11	10
28	1,44±0,04	7,21±0,44	4,30±0,25	10
29	1,21±0,01	3,45±0,06	2,78±0,14	10
30	0,92±0,06	2,15±0,04	2,55±0,17	100
Среда сравнения	4,08±0,08	32,22±1,03	54,34±2,18	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

При проведении настоящей части работы выявили, что вариант ХДС-бульона с концентрацией хлористого натрия, равной 5 г/л, характеризовался наилучшими

значениями приведённых выше биологических показателей в отношении *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 и при этом не уступал среде сравнения.

2.6.2.2 Оптимизация концентрации натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного в составе питательной среды

ХДС-бульон

С целью повышения прозрачности ХДС-бульона и недопущения образования осадка после стерилизации в состав разрабатываемой питательной среды был введен натрий фосфорнокислый двузамещённый в виде кристаллогидрата - натрий фосфорнокислый двузамещённый двенадцативодный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$).

Количественную оптимизацию данного ингредиента проводили путем тестирования вариантов ХДС-бульона с различными концентрациями $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ в диапазоне от 0 до 15,0 г/л включительно. При этом значения концентраций питательной основы – ПППД и хлористого натрия в составе тестируемых вариантов среды соответствовали частным оптимумам, установленным в предыдущих сериях экспериментов – 0,07 % (по аминному азоту) и 5,0 г/л соответственно. Результаты этой части исследования отображены в таблице 13.

Таблица 13 - Оптимизация содержания натрия фосфорнокислого двузамещённого 12-водного в среде ХДС-бульон в отношении тест-штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741

Содержание натрия фосфорнокислого двузамещённого 12-водного, г/л	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 10 посеянных м.к. ($M \pm m$)	Выросло колоний после шести часов инкубации в бульоне из 100 посеянных м.к. ($M \pm m$)	Эффективность, % ($M \pm m$)	Чувствительность (м.к.)
0	7,64 $\pm$ 0,04	79,93 $\pm$ 3,16	82,33 $\pm$ 2,18	10
1	7,89 $\pm$ 0,07	81,22 $\pm$ 2,34	84,41 $\pm$ 2,61	10
2	8,15 $\pm$ 0,24	83,41 $\pm$ 2,31	86,82 $\pm$ 2,22	10
3	8,42 $\pm$ 0,06	83,98 $\pm$ 2,48	85,93 $\pm$ 3,02	10
4	9,11 $\pm$ 0,25	84,92 $\pm$ 2,42	88,63 $\pm$ 1,93	10
5	9,43 $\pm$ 0,11	85,34 $\pm$ 2,50	90,88 $\pm$ 1,88	10
6	9,72$\pm$0,09	86,68$\pm$3,24	92,02$\pm$3,13	10
7	9,54 $\pm$ 0,03	84,31 $\pm$ 1,01	88,98 $\pm$ 2,28	10
8	8,92 $\pm$ 0,12	83,78 $\pm$ 1,48	86,44 $\pm$ 2,42	10
9	8,18 $\pm$ 0,14	76,86 $\pm$ 2,14	71,03 $\pm$ 2,63	10

Продолжение таблицы 13

10	7,46±0,16	70,06±4,12	49,33±2,54	10
11	6,41±0,04	65,91±3,94	31,70±1,27	10
12	2,16±0,14	23,21±1,94	8,72±0,22	10
13	1,37±0,09	14,75±1,25	8,23±0,53	10
14	1,02±0,07	8,28±0,68	7,76±0,44	10
15	0,89±0,09	3,06±0,19	2,25±0,08	10
Среда сравнения	5,63±0,13	39,35±2,44	54,11±1,91	10

Примечания: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

В результате исследования было выявлено, что вариант ХДС-бульона с концентрацией натрия фосфорнокислого двузамещённого двенадцативодного, равной 6,0 г/л был полностью прозрачным с отсутствием осадка после стерилизации и характеризовался наилучшими биологическими показателями в отношении тест-штамма *V. cholerae* non O1 / non O139 P-9741. При этом он не уступал среде сравнения.

2.6.2.3 Оптимизация значения pH в питательной среде ХДС-бульон

Одним из общеизвестных фактов является то, что холерный вибрион растёт в довольно широком диапазоне pH от 6,5 до 9,2 [4]. Оптимальные значения pH для его культивирования, в том числе и на традиционных бульонных питательных средах, находятся в пределах 7,6-7,8 [66, 172]. Исходя из этого, pH среды ХДС-бульона установили на уровне 7,8±0,2.

2.7 Характеристика питательной среды ХДС-бульон, её состав и физико-химические показатели

По результатам проведённой количественной оптимизации окончательный вариант сконструированной питательной среды ХДС-бульон был следующим (на 1,0 л среды):

- ПППД – из расчёта – (0,07±0,005) % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 6,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. №1) – до 1 литра.

Физико-химические показатели ХДС-бульона следующие:

- прозрачность и цветность – питательная среда прозрачная, жёлтого или светло-коричневого цвета; консистенция среды – жидкая;
- pH среды $7,8 \pm 0,2^*$;
- аминный азот (в %) – $0,07 \pm 0,005$;
- общий азот (в %) – $0,23 \pm 0,02$;
- содержание натрия хлорида (в %) – $0,96 \pm 0,04$;
- содержание углеводов (в %) – $0,01 \pm 0,0005$.

Примечание: *Одним из общеизвестных фактов является то, что холерный вибрион растёт в довольно широком диапазоне pH от 6,5 до 9,2 [4]. Оптимальные значения pH для его культивирования, в том числе и на традиционных бульонных питательных средах, находятся в пределах 7,6-7,8 [66, 172]. Исходя из этого, pH среды ХДС-бульона установили на уровне $7,8 \pm 0,2$.

2.8 Изучение биологических показателей в отношении различных штаммов холерного вибриона сконструированных сред ХДС-Н, ХДС-бульон в сравнении с традиционной 1% пептонной водой

Проводили изучение показателей сконструированных на основе ПППД накопительной среды и бульона в сравнении с контрольной накопительной средой ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ. Полученные в настоящей части исследования данные группировали, руководствуясь не только принадлежностью штаммов *V. cholerae* к определённому биовару или серогруппе, но и по признаку идентичной чувствительности 1 % пептонной воды в отношении каждого из них. Таким образом, они были распределены на три категории. Первую образовали те, в отношении которых чувствительность среды сравнения составила 1000 м.к. (*V. cholerae* O1 classical P-1 (145), четыре штамма *V. cholerae* O139). Ко второй были отнесены те, по отношению к которым чувствительность среды сравнения была раной 100 м.к. (*V. cholerae* O1 El Tor 5879, три штамма *V. cholerae* O139). Третью категорию представили те штаммы, в отношении которых идентичная чувствительность среды сравнения была 10 м.к. (три штамма холерного вибриона классического биовара, 10 штаммов холерного вибриона биовара Эль Тор, штамм холерного вибриона O139 серовара 16131, пять штаммов *V. cholerae* non O1/ non O139). Результаты данной части исследования приведены в таблицах 14 и 15. В ходе работы было установлено, что штаммы *V. cholerae* первой и второй

категорий выросли из посевной дозы 10 м.к. только на ХДС-Н и ХДС-бульоне, в то время как на среде сравнения регистрировали отсутствие их роста.

У большинства штаммов третьей категории (за исключением пяти штаммов холерного вибриона не O1/ не O139) количество выросших колоний после шести часов инкубации в опытных средах ХДС-Н и ХДС-агар превосходило данный показатель при их культивировании в среде сравнения.

Выявили, что штаммы *V. cholerae*, относящиеся к первой категории, не выросли на среде сравнения. В то же время их рост был обнаружен на предложенных питательных средах из вышеуказанной посевной дозы. ХДС-Н и ХДС-бульон значительно превосходили 1 % пептонную воду в отношении составивших вторую категорию штаммов холерного вибриона.

Следует отметить, что обе предложенные питательные среды имели достоверно более высокие средние значения данного биологического показателя, чем среда сравнения, в отношении штаммов *V. cholerae*, отнесённых к третьей категории.

Таким образом, опытные питательные среды превосходили 1 % пептонную воду по этому биологическому показателю в отношении большинства взятых в работу штаммов холерного вибриона.

Следующим этапом работы было проведение сравнительного изучения ХДС-Н, ХДС-бульона и среды сравнения по биологическому показателю «эффективность».

Обнаружили, что предложенные питательные ХДС-Н и ХДС-бульон обладали гораздо более высокими значениями данного показателя, чем среда сравнения, в отношении штаммов холерного вибриона всех категорий. Это было наиболее отчётливо видно при работе с *V. cholerae* O1 classical P-1 (145), *V. cholerae* O1 El Tor 5879 и со всеми штаммами *V. cholerae* O139 серогруппы.

ХДС-Н и ХДС-бульон по настоящему показателю не только не уступали 1 % пептонной воде, но и значительно превосходили её в отношении всех взятых в работу штаммов *V. cholerae*.

Таблица 14 - Основные биологические показатели ХДС-Н и среды сравнения в отношении штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп

Штаммы <i>V.cholerae</i>	Биологические показатели							
	ХДС – Н (разведённая в 10 раз дистиллированной водой)				1% пептонная вода (из сухого препарата пр-ва ФГУП НПО «Микроген») (среда сравнения)			
	Выросло колоний после шести часов инкубации в среде		Показатель эффективности, % (M±m)	Чувствительность, м.к.	Выросло колоний после шести часов инкубации в среде		Показатель эффективности, % (M±m)	Чувствительность, м.к.
	При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 100 м.к. (M±m)			При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 100 м.к. (M±m)		
<i>V.cholerae classical</i> P-1 (145)	9,61±0,78	72,52±5,93	84,16±1,44	10	Нет роста	Нет роста	60,23±3,62	1000*
<i>V.cholerae</i> O1 <i>classical</i> 3 штамма	8,77±0,66	72,98±3,52	87,79±2,87	10	7,30±0,64	59,63±3,32	74,85±3,03	10***
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 5879	8,45±0,72	112,60±1,40	73,67±1,34	10	Нет роста	10,8±0,92	55,92±4,34	100**
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 10 штаммов	9,11±0,64	108,27±6,45	75,71±1,96	10	6,37±0,50	66,87±3,74	65,11±2,48	10***
<i>V.cholerae</i> O139 3 штамма	6,02±0,39	69,69±5,22	63,88±2,06	10	Нет роста	4,51±0,15	33,95±1,76	100**
<i>V.cholerae</i> O139 4 штамма	8,19±0,71	87,11±6,10	63,73±1,88	10	Нет роста	Нет роста	36,12±1,88	1000*
<i>V.cholerae</i> O139 16131	5,42±0,34	46,20±3,42	60,31±1,74	10	3,26±0,28	33,38±1,28	27,17±0,86	10***
<i>V.cholerae</i> nonO1/non O139 5 штаммов	9,05±0,40	71,30±3,45	87,38±2,67	10	8,16±0,64	62,24±3,42	73,55±2,57	10***

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя; m – ошибка среднего значения определяемого показателя; * - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (1000 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae classical* P-1 (145), *V.cholerae* O139 №№ 16063, 16065, 16074, 16075); ** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (100 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O139 №№ 16064, 16077 (MO45), 88); *** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (10 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O1 *classical* №№ 5281, 569B, 1391; *V.cholerae* O1 El Tor M-878, 1310, 10058, 14863, 14864, 15301, 15302, 18367-18369; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741, 16005 (O68), 16003 (O65), P-12691 (O64), P-11972 (O63))

Таблица 15 - Основные биологические показатели ХДС-бульона и среды сравнения в отношении штаммов *V.cholerae* различных биоваров и серогрупп

Штаммы <i>V.cholerae</i>	Биологические показатели							
	ХДС-бульон				1% пептонная вода (из сухого препарата пр-ва ФГУП НПО «Микроген») (среда сравнения)			
	Выросло колоний после шести часов инкубации в среде		Показатель эффективности, % (M±m)	Чувствительность, м.к.	Выросло колоний после шести часов инкубации в среде		Показатель эффективности, % (M±m)	Чувствительность, м.к.
	При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 100 м.к. (M±m)			При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 100 м.к. (M±m)		
<i>V.cholerae classical</i> P-1 (145)	5,52±0,14	48,23±0,45	96,78±2,86	10	Нет роста	Нет роста	60,23±3,62	1000*
<i>V.cholerae</i> O1 <i>classical</i> 3 штамма	9,44±0,20	102,03±0,62	100,96±2,22	10	7,30±0,28	59,65±0,46	74,85±3,03	10***
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 5879	10,24±0,22	120,80±0,63	94,30±2,57	10	Нет роста	9,93±0,40	55,92±4,34	100**
<i>V.cholerae</i> O1 El Tor 10 штаммов	11,45±0,20	119,17±0,32	96,65±2,94	10	6,31±0,34	67,12±0,54	71,28±2,69	10***
<i>V.cholerae</i> O139 16131	5,84±0,14	69,64±0,26	74,48±1,99	10	3,29±0,22	33,44±0,19	32,41±0,76	10***
<i>V.cholerae</i> O139 3 штамма	5,61±0,16	58,24±0,20	79,21±2,41	10	Нет роста	4,55±0,31	33,95±1,76	100**
<i>V.cholerae</i> O139 4 штамма	6,82±0,16	70,93±0,23	79,03±2,42	10	Нет роста	Нет роста	36,12±1,88	1000*
<i>V.cholerae</i> nonO1/non O139 5 штаммов	9,80±0,14	87,99±0,21	91,82±2,31	10	8,09±0,19	66,69±0,25	73,55±2,57	10***

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя; m – ошибка среднего значения определяемого показателя; * - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (1000 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae classical* P-1 (145), *V.cholerae* O139 №№ 16063, 16065, 16074, 16075); ** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (100 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O139 №№ 16064, 16077 (MO45), 88); *** - группы штаммов сформированы по признаку идентичной чувствительности (10 м.к.) 1% пептонной воды в отношении каждого из штаммов (*V.cholerae* O1 *classical* №№ 5281, 569B, 1391; *V.cholerae* O1 El Tor M-878, 1310, 10058, 14863, 14864, 15301, 15302, 18367-18369; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741, 16005 (O68), 16003 (O65), P-12691(O64), P-11972(O63))

Предлагаемые питательные среды и 1 % пептонную воду сравнивали по биологическому показателю «чувствительность».

В процессе работы выявили, что ХДС-Н и ХДС-бульон обладали чувствительностью, равной 10 м.к. в отношении всех использованных в настоящей части исследования штаммов *V. cholerae*. Питательная среда сравнения имела значение данного показателя - 1000 м.к. в отношении штаммов первой категории. Среда сравнения по отношению к штаммам второй категории характеризовалась значением изучаемого показателя, равным 100 м.к. Идентичная чувствительность опытных сред и среды сравнения выявлена в отношении штаммов холерного вибриона третьей категории.

Таким образом, можно сделать заключение о том, что ХДС-Н, ХДС-бульон не только не уступали среде сравнения – 1 % пептонной воде полученной из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, но и превосходили её по всем вышеприведённым биологическим показателям.

При оформлении нормативных и эксплуатационных документов на ХДС-Н проводили её предрегистрационные испытания по методике, аналогичной авторским испытаниям, но с использованием 15 штаммов холерного вибриона и другой среды сравнения – 1% пептонной воды из сухого препарата производства ФБУН ГНЦ ПМБ, пос. Оболенск. Результаты приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты сравнительного изучения ХДС-Н и контрольной среды в ходе предрегистрационных испытаний

Штаммы <i>V.cholerae</i>	ХДС-Н (разведённая в 10 раз дистиллированной водой)		Чувстви- тельность, м.к.	1% пептонная вода (из сухого препа- рата производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области) (контроль)		Чувстви- тельность , м.к.
	Выросло колоний после шести часов инкубации в среде			Выросло колоний после шести часов инкубации в среде		
	При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 100 м.к. (M±m)		При посеве 10 м.к. (M±m)	При посеве 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

Продолжение таблицы 16

<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/non O139 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, 569B; штаммы *V.cholerae* O1 El Tor: M-878, 18367, 18368, 18588, 18890, 19433; штаммы *V.cholerae* O139: 16064, 17676; штаммы *V.cholerae* non O1 /non O139: *V.cholerae* non O1 /non O139 P-9741, *V.cholerae* non O1 /non O139 (O2) P-5447, *V.cholerae* non O1 /non O139 (O3) P-5448, *V.cholerae* non O1 /non O139 (O4) P-5449

Как видно из полученных в ходе предрегистрационных испытаний данных, ХДС-Н не уступала контрольной среде – 1% пептонной воде, приготовленной из сухого препарата производства ФБУН ГНЦ ПМБ пос. Оболенск Московской области.

Стабильность серологических свойств использованных штаммов *V.cholerae* после трёх последовательных пассажей через ХДС-Н, ХДС-бульон, среду сравнения и контрольную среду - 1 % пептонную воду оценивали постановкой реакции агглютинации с соответствующими диагностическими сыворотками, а биохимических свойств – по результатам теста на наличие индофенолоксидазы, отношению к углеводам и аминокислотам.

Штаммы холерных вибрионов, троекратно пассированные через все использованные в работе жидкие питательные среды, стабильно проявляли свои основные свойства.

2.9 Сравнительное изучение роста бактериальных популяций холерного вибриона, кишечной палочки и протей в среде ХДС-Н и контрольной жидкой среде обогащения в первые шесть часов культивирования

Была проведена оценка среды ХДС-Н в сравнении с контролем по следующим показателям: росту бактериальных популяций холерного вибриона, кишечной палочки в первые 6 ч культивирования (КОЕ в заданных временных точках, длительность латентной фазы, время генерации в течение экспоненциальной

фазы). Контрольной средой (контролем) служила 1% пептонная вода, полученная из препарата «Питательная среда для выделения холерного вибриона сухая (Основной пептон)» производства ФГУП НПО «Микроген» МЗ РФ, приготовленную согласно инструкции производителя. В ходе изучения роста штаммов холерного вибриона, кишечной палочки и протей в течение первых 6 ч культивирования на средах ХДС-Н и 1 % пептонной воде при подсчёте во всех заданных временных точках – с 20-й по 360-ую минуты были построены кривые роста популяций данных штаммов (Рисунки 4 и 5).

Анализ построенных кривых показал, что на обеих средах латентная фаза *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 (100 мин) была короче, чем *E. coli* 18 (1015) (160 мин) и *P. vulgaris* 14 (140 мин). На опытной и контрольной средах в течение этого периода количество жизнеспособных клеток в популяции *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 сохранялось приблизительно на одном уровне, а в популяциях *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 – снижалось с 20-й по 40-ю минуту от начала

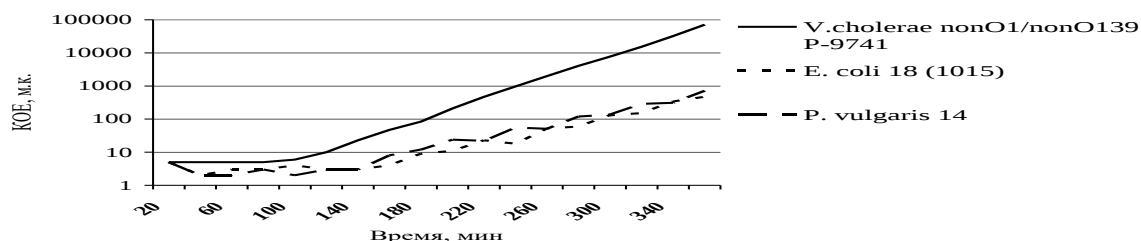


Рисунок 4 – Кривые роста *V. cholerae* nonO1/nonO139 P-9741, *E. coli* 18, *P. vulgaris* 14 на предлагаемой накопительной питательной среде ХДС-Н в течение первых 6 часов от начала культивирования

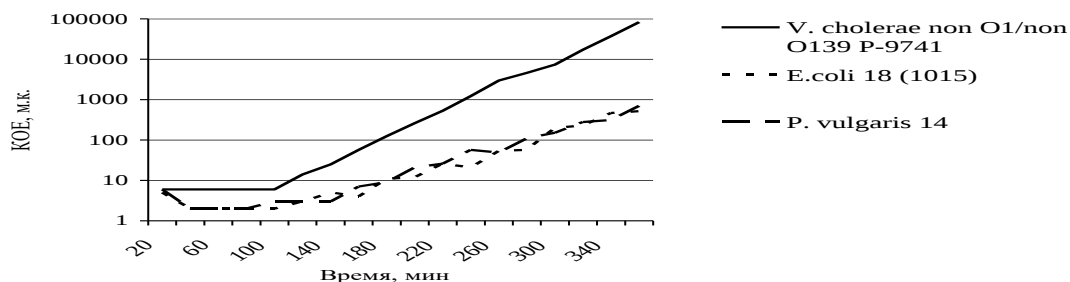


Рисунок 5 – Кривые роста *V. cholerae* nonO1 / nonO139 P-9741, *E. coli* 18, *P. vulgaris* 14 на контрольной накопительной питательной среде в течение первых 6 часов от начала культивирования

культивирования в 2,1 – 2,8 раз. Отмеченный факт может свидетельствовать о лучшей и более быстрой адаптации *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 к обеим средам.

Начало экспоненциальной фазы роста популяции *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 на ХДС-Н и 1 % пептонной воде регистрировали в одной временной точке (100 мин). У штаммов *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 эта фаза начиналась на обеих средах позднее (со 160-й и 140-й минуты, соответственно).

Для каждого из микроорганизмов было рассчитано время генерации от начала экспоненциальной фазы роста его популяции до 360-й минуты культивирования. На ХДС-Н и 1 % пептонной воде этот показатель составил: для штамма *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 – 18 мин и *E. coli* 18 (1015) – 28 мин, *P. vulgaris* 14 – 27 мин. К концу 6-го часа от начала культивирования на обеих средах число КОЕ *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 было на два порядка выше, чем *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14.

Таким образом, при равных низких посевных дозах размножение указанного штамма холерного вибриона происходило быстрее, чем использованных культур кишечной палочки и протей как на среде ХДС-Н, так и на 1 % пептонной воде. Это достигалось, вероятно, за счёт более короткой латентной фазы и меньшего времени генерации *V. cholerae* non O1 / non O139 P-9741 по сравнению с *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14. Результаты подтвердили тезис об «условной элективности» ХДС-Н по аналогии с 1% пептонной водой и основным раствором пептона.

2.10 Изучение возможности использования питательной среды ХДС-бульон в качестве среды накопления холерного энтеротоксина (СТ) из штаммов - продуцентов, а также для скрининга штаммов *V. cholerae* по критерию энтеротоксинпродуцирующей способности *in vitro*

Представляло интерес изучить продукцию СТ *in vitro* штаммами холерного вибриона по сравнению с таковой на средах лабораторного изготовления: бульоне Мартена pH 7,7±0,1, АК1 [181, 182], используемых в качестве контрольных.

Настоящее исследование проводили с использованием штаммов-продуцентов СТ *V. cholerae* O1 classical 569 B, *V. cholerae* O1 El Tor 1310, а также предложенного ранее потенциального продуцента серовара «Бенгал» - *V. cholerae* O139 MO45 (16077) [102]. Результаты приведены в таблице 17.

Таблица 17 - Энтеротоксинопродуцирующая активность штаммов *V.choleare* в ХДС-бульоне, бульоне Мартена и среде АКІ

Штаммы холерного вибриона (продуценты холерного энтеротоксина)	Максимальное разведение супернатанта, вызывающее положительный эффект в культуре клеток СНО-К1		
	ХДС-бульон	Бульон Мартена рН 7,7±0,1 (контроль)	Среда АКІ (контроль)
<i>V. cholerae</i> O1 classical 569 B	1/1280	1/1280	1/2560
<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 1310	1/640	1/640	1/2560
<i>V. cholerae</i> O139 MO45 (16077)	1/640	1/640	1/1280

Как видно из полученных данных, ХДС-бульон при культивировании в нём штаммов-продуцентов холерного вибриона по величине титров СТ в культуре клеток соответствовал бульону Мартена рН 7,7±0,1 и незначительно уступал второй среде сравнения - АКІ. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования ХДС-бульона в качестве среды накопления СТ при культивировании в ней штаммов-продуцентов.

В связи с вышеизложенным, представляло интерес изучить возможность скрининга культур холерных вибрионов по критерию энтеропродуцирующей активности *in vitro* при их выращивании в ХДС-бульоне.

В экспериментах были использованы 30 токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных из клинического материала в период вспышки в г. Казань (2001 г.) и три токсигенных штамма из объектов окружающей среды (г. Ростов-на-Дону, 2001 г.). В качестве контрольных питательных сред использовали среды лабораторного изготовления - бульон Мартена рН 7,7±0,1 и АКІ. Результаты представлены в таблице 18.

При этом выявили, что предлагаемая питательная среда совпадала с бульоном Мартена рН 7,7±0,1 по титрам СТ в отношении 31 штамма (28 из г. Казань и 3 из г. Ростова-на-Дону) *V. cholerae* и превосходила упомянутую выше контрольную

среду в десять раз в отношении одного штамма холерного вибриона – *V. cholerae* O1 El Tor 18333, выделенного в г. Казань.

Таблица 18 - Результаты скрининга энтеротоксинопродуцирующей активности клинических и водных изолятов холерного вибриона при использовании опытной и контрольных сред

Штаммы <i>V.cholerae</i> O1 El Tor	Титры в тесте на культуре клеток СНО-К1 при культивировании штаммов холерного вибриона в питательных средах		
	ХДС-бульон	Бульон Мартена (контроль)	Среда АК1 (контроль)
18330	1/400	1/400	1/800
18331	1/200	1/200	1/400
18332	1/400	1/400	1/800
18333	1/100	1/10	1/200
18334	1/3200	1/3200	1/6400
18335	нет эффекта	нет эффекта	нет эффекта
18336	1/400	1/400	1/1600
18337	1/100	1/100	1/200
18338	1/3200	1/3200	1/6400
18339	1/1600	1/1600	1/3200
18340	1/100	1/100	1/200
18341	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18342	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18343	1/800	1/800	1/1600
18344	1/400	1/400	1/800
18345	1/100	1/100	1/200
18346	1/1600	1/3200	1/6400
18347	1/10	1/10	1/100
18348	1/400	1/400	1/800
18349	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18350	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18351	1/800	1/800	1/1600
18352	1/10	1/10	1/100
18353	1/400	1/400	1/800
18354	1/100	1/100	1/200
18355	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18356	1/400	1/400	1/800
18357	ц.дестр*	ц.дестр*	ц.дестр*
18358	1/100	1/100	1/200
18364	1/10	1/100	1/200
18367	1/400	1/400	1/800
18368	1/800	1/800	1/1600
18369	1/10	1/10	1/100

Примечания: Штаммы, изолированные из воды в г. Ростове-на-Дону выделены жирным шрифтом; * ц.дестр – цитодеструкция за счёт контаминации пробы биологически активными веществами

Только один штамм - *V. cholerae* O1El Tor 18346 характеризовался более высокой продукцией СТ на бульоне Мартена pH 7,7±0,1.

Проводя данную часть работы, отметили то, что титры СТ в тесте на культуре клеток СНО-K1 при применении ХДС-бульона соответствовали таковым, полученным в ходе использования бульона Мартена $\text{pH } 7,7 \pm 0,1$. Также выявили, что обе среды по титрам СТ в вышеуказанном тесте практически одинаково незначительно уступали среде АКІ.

ГЛАВА 3. 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

3.1 Изучение эффективности комплекса сконструированных сред ХДС-агар - ХДС-Н при исследованиях модельных смесей холерного вибриона и микробов-контаминантов

Разработанные плотная и жидкая накопительная питательные среды исследованы на предмет возможности выделять с их помощью *V.cholerae* из клинического материала. В этой связи была проведена серия экспериментов по выделению данного возбудителя из искусственных модельных смесей-имитаторов с помощью опытных сред и сред контрольного комплекса аналогичного назначения производства ФГУП НПО «Микроген».

Предлагаемые и контрольные питательные среды оценивали по методике, изложенной во введении с использованием *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 в концентрации 10 м.к./мл. В качестве микробов - контаминантов применяли *E.coli* 18 (1015) и *P.vulgaris* 14, которые вносили при посеве на среды накопления в концентрациях от 1×10^4 до 1×10^8 м.к./мл включительно. При проведении высевов на агаровые пластинки из первого пептона культуру холерного вибриона не удавалось выделить как на предлагаемых, так и на контрольных средах на всём протяжении серии опытов. Наиболее чёткие результаты получили путём осуществления посевов из второго пептона. Сравнение проводили по количеству колоний тест-штамма холерного вибриона и штаммов кишечной палочки и протей, выросших при высеве со среды накопления после шести часов инкубации на плотную питательную среду. Результаты данной части исследования представлены в таблице 19.

В ходе работы выявили, что культуру холерного вибриона удавалось изолировать как на предлагаемых, так и на контрольных средах из следующих

смесей: *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *E.coli* 18 (1015) – 1×10^4 м.к /мл; *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *P.vulgaris* 14– 1×10^4 м.к /мл; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *E.coli* 18 (1015) и *P.vulgaris* 14 – по 1×10^4 м.к /мл каждого микроба-контаминанта. Среда опытного комплекса превосходила контрольные по вышеуказанному показателю в отношении тест-штамма холерного вибриона в 1,4 - 1,86 раз. Также отметили, что *E.coli* 18 (1015) и *P.vulgaris* 14 как каждый в отдельности, так и совместно выделялись на опытных средах в 1,12, 1,51 и 1,56 раз меньше в сравнении с контрольными.

В последующем отметили, что культуру *V.cholerae* было возможно выделять из искусственных смесей, с *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 в концентрации 10 м.к. /мл с микробами-контаминантами *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 в концентрациях 1×10^5 м.к. /мл каждого из них по отдельности или совместно как на разработанных, так и на контрольных средах.

При использовании разработанного комплекса питательных сред после посева со среды накопления вырастало в 1,41 - 1,98 раз больше колоний тест-штамма холерного вибриона, чем в случае применения контрольного комплекса сред (1% пептонная вода - щелочной агар).

Установили, что *E. coli* 18 (1015), *P. vulgaris* 14 выделялись на сконструированных средах как каждый в отдельности, так и совместно соответственно в 1,54, 1,65, 1,93 раз реже, чем на контрольных.

Обнаружили, что культуру холерного вибриона удавалось выделять на опытных и контрольных средах из искусственных смесей, содержащих *V.cholerae* non O1 / non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *E.coli* 18 (1015) – 1×10^6 м.к /мл; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *P.vulgaris* 14– 1×10^6 м.к /мл; *V.cholerae* nonO1/non O139 P-9741 – 10 м.к. /мл, *E.coli* 18 (1015) и *P.vulgaris* 14 – по 1×10^6 м.к /мл каждого микроба-контаминанта.

По числу КОЕ штамма холерного вибриона комплекс опытных сред превосходил контрольный в 2,24 - 3,0 раз.

Таблица 19 - Выделение *V. cholerae* nonO1 / non O139 P-9741 из искусственных смесей с микробами-контаминантами в различных концентрациях на разработанных и контрольных средах для выделения и культивирования холерного вибриона

Концентрация при посеве, м.к./мл			Число выросших КОЕ, (M±m)							
Основ- ной возбу- дитель <i>V. cholerae</i> non O1/O139 P-9741	Микробы-контаминанты		Разработанные среды ХДС-Н и ХДС-агар				Контрольные среды 1 % пептонная вода и щелочной агар			
	<i>E. coli</i> 18 (1015)	<i>P. vulgaris</i> 14	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 P- 9741	<i>E. coli</i> 18 (1015)	<i>P. vulgaris</i> 14	<i>E. coli</i> 18 (1015)+ <i>P. vulgaris</i> 14	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 P-9741	<i>E. coli</i> 18 (1015)	<i>P. vulgaris</i> 14	<i>E. coli</i> 18 (1015)+ <i>P. vulgaris</i> 14
10	10000 (10 ⁴)	нет	19,57±0,82	60,90±3,32	нет	нет	12,63±0,27	67,97±1,12	нет	нет
10	нет	10000 (10 ⁴)	18,19±0,98	нет	64,14±1,16	нет	9,79±0,27	нет	96,94±2,58	нет
10	10000 (10 ⁴)	10000 (10 ⁴)	14,09±0,81	нет	нет	70,69±0,74	10,10±0,35	нет	нет	110,27±1,53
10	100000 (10 ⁵)	нет	15,51±0,50	71,57±1,34	нет	нет	11,03±0,58	110,23±2,51	нет	нет
10	нет	100000 (10 ⁵)	13,26±0,35	нет	87,29±0,95	нет	8,30±0,39	нет	142,19±1,77	нет
10	100000 (10 ⁵)	100000 (10 ⁵)	11,21±0,57	нет	нет	88,00±1,46	5,66±0,33	нет	нет	169,49±2,35
10	1000000 (10 ⁶)	нет	7,94±0,34	112,14±2,02	нет	нет	2,64±0,25	185,04±5,52	нет	нет
10	нет	1000000 (10 ⁶)	6,54±0,32	нет	126,36±2,29	нет	2,23±0,20	нет	211,26±4,32	нет
10	1000000 (10 ⁶)	1000000 (10 ⁶)	4,51±0,28	нет	нет	129,29±2,46	2,01±0,20	нет	нет	175,00±1,76
10	10000000 (10 ⁷)	нет	4,33±0,26	127,14±2,61	нет	нет	1,03±0,09	220,94±2,88	нет	нет
10	нет	10000000 (10 ⁷)	3,59±0,27	нет	145,71±2,50	нет	1,01±0,12	нет	263,57±4,06	нет
10	10000000 (10 ⁷)	10000000 (10 ⁷)	3,21±0,20	нет	нет	159,29±2,14	1,0±0,13	нет	нет	349,70±4,83
10	100000000 (10 ⁸)	нет	3,41±0,21	150,71±2,48	нет	нет	0,54±0,11	270,11±5,92	нет	нет
10	нет	100000000 (10 ⁸)	3,06±0,19	нет	177,00±3,19	нет	0,44±0,08	нет	352,83±7,99	нет
10	100000000 (10 ⁸)	100000000 (10 ⁸)	2,77±0,22	нет	нет	279,51±3,98	0,29±0,05	нет	нет	378,60±4,72

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя; m – ошибка среднего значения определяемого показателя

При этом регистрировали то, что выделение *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 на разработанном комплексе питательный сред было в 1,12 – 1,69 раз реже, чем на контрольном.

Было установлено, что использованный в работе штамм холерного вибриона можно было выделить на обоих комплексах сред из искусственных смесей, содержащих *V.cholerae* поп О1 / поп О139 Р-9741 в концентрации 10 м.к. /мл, микробов-контаминантов *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 в концентрациях 1×10^7 м.к. /мл по отдельности каждого из них или совместно. В данном случае количество выросших колоний тест-штамма холерного вибриона при высева со среды накопления на разработанном комплексе сред было в 3,21-4,2 раза выше, чем на контрольном. Отметим, что *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 как каждый в отдельности, так и совместно выделялись на опытных питательных средах соответственно в 1,74, 1,81, 2,14 раз реже, чем на контрольных таковых.

Далее представляло интерес проверить возможность выделения культуры холерного вибриона из искусственных смесей, содержащих *V.cholerae* поп О1 / поп О139 Р-9741 в концентрации 10 м.к. /мл и микробов-контаминантов *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 в концентрациях 1×10^8 м.к. /мл, смешанных как по отдельности с данным штаммом *V.cholerae*, так и вместе. При использовании комплекса 1% пептонная вода — щелочной агар изолировать холерный вибрион не представлялось возможным. Параллельно регистрировали то, что на средах опытного комплекса *E. coli* 18 (1015), *P. vulgaris* 14 как в отдельности, так и совместно, выделялись соответственно в 1,79, 1,99 и 1,35 раз реже, чем на контрольных (традиционных) средах того же назначения.

Подводя итог по этой серии экспериментов, можно сделать вывод, что при использовании разработанного комплекса сред тест-штамм *V.cholerae* в минимальной концентрации можно было обнаружить и изолировать из модельных смесей, содержавших от 1×10^4 до 1×10^8 м.к. / мл включительно *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14. На контрольных средах было возможным изолировать названный выше штамм *V.cholerae* при концентрациях в искусственной смеси

микробов-контаминантов *E. coli* 18 (1015) и *P. Vulgaris* 14, не превышающей 1×10^7 м.к. /мл.

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, в данном случае, *V.cholerae* non O1 / non O139 Р-9741, благодаря своим физиологическим особенностям размножался гораздо быстрее, чем другие микроорганизмы, которые присутствуют во взятых на анализ пробах как контаминанты.

Указанные обстоятельства открывают широкую перспективу возможности использования сконструированных питательных сред с целью исследования клинического материала не только от больных холерой, но и от вибрионосителей.

3.2 Изучение возможности и эффективности применения комплекса сконструированных питательных сред ХДС-агар и ХДС-Н при мониторинговых исследованиях водных объектов на предмет контаминации их штаммами *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. Ростова-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 проведенных испытаний представлены в таблице 20.

Если рассматривать весь объём мониторинговых исследований на холеру в Ростовской области за шесть лет, можно сделать вывод, что только три из 21

штамма *V.cholerae* O1 серогруппы были изолированы на основном пептоне и щелочном агаре производства ФГУП НПО «Микроген», а остальные 18 - на разработанных средах. Следует также отметить, что по каждому факту обнаружения в пробах воды поверхностных водоемов и стоков штаммов холерного вибриона O1 серогруппы (в том числе - четырёх токсигенных) с помощью сконструированных питательных сред проводились эпидемиологические расследования с целью установления источников и причин контаминации водоёмов, по результатам которых органами государственной санитарно-эпидемиологической службы по Ростовской области принимались соответствующие управленческие решения и осуществлялся необходимый комплекс санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий, что, в свою очередь, способствовало поддержанию должного уровня санитарно-эпидемиологического благополучия населения города и региона в целом.

Таблица 20 - Итоги испытаний разработанного на основе ПППД комплекса сред при исследовании водных объектов

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> non O1/non O139	407	31	438

3.3 Исследование эффективности разработанных на основе ПППД сред для холерного вибриона в работе СПЭБ

После получения убедительных результатов, свидетельствующих об эффективности сконструированных сред в многолетних мониторинговых исследованиях водных объектов на наличие холерного вибриона, представляло интерес изучение возможности использования комплекса ХДС-Н - ХДС-агар в качестве препаратов резерва СПЭБ на случай работы в очаге холеры.

Для решения этой задачи предлагаемые к внедрению в практику питательные среды ХДС-Н и ХДС-агар были испытаны при проведении тактико-специального учения (ТСУ) на базе мобильного комплекса СПЭБ. Преимущество

сконструированных сред состоит в том, что они выпускаются в готовом к использованию виде и не требуют варки и стерилизации в «Блоке поддержки бактериологических исследований», что существенно экономит время, трудовые, материальные и энергетические ресурсы бригады в условиях автономного функционирования.

В ходе ТСУ исследовали 10 проб, имитирующих клинический материал, и 10 реальных проб из водных объектов. В качестве контрольных использовали среды производства ФГУП НПО «Микроген».

В случае применения комплекса сред ХДС-Н - ХДС-агар штамм холерного вибриона был выявлен в случаях его конечной концентрации 10^3 , 10^5 , 10^7 м.к./мл в пробах, имитирующих клинический материал. 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 ТСУ 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 СПЭБ открывает перспективы их включения в таблицу оснащения бригады (в качестве сред резерва) для работы по локализации и ликвидации эпидемических проявлений холеры.

3.4 Экономическая эффективность использования комплекса сред ХДС-агар - ХДС-Н

Экономические преимущества разработанных питательных сред ХДС-агар и ХДС-Н оценивали методом сравнения стоимости материалов для приготовления 1,0 л данных сред и 1,0 л готовых к использованию сред, приготовленных из сухого основного пептона и сухого щелочного агара производства ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболенск. Информацию об актуальной стоимости основных ингредиентов и расходных материалов, необходимых для приготовления опытных

сред, а также о стоимости сухих сред сравнения: основного пептона и щелочного агара ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболенск получали на основе анализа ценовых предложений различных поставщиков на отечественном рынке по состоянию на январь 2025 г. Для внесения в таблицы сравнения брали средние значения стоимости указанных компонентов из представленных в свободном доступе прайс-листов и коммерческих предложений (Таблицы 21, 22).

Таблица 21 - Сравнительная калькуляция стоимости материалов для приготовления 1,0 л питательной среды ХДС-Н и 1,0 л среды из коммерческого препарата «Питательная среда для накопления холерного вибриона сухая «Пептон основной сухой» ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск

ХДС-Н (на 1,0 л среды)				Среда, приготовленная из препарата «Питательная среда для накопления холерного вибриона сухая «Пептон основной сухой» ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск (на 1,0 л среды)			
Материалы, единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.	Материалы, единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
Дрожжи хлебопекарные прессованные, кг	0,2	167,66	33,55	Основной пептон сухой коммерческий (навеска на 1 л среды), кг	0,165	11340,00	1871,10
Панкреатин КРС сухой, кг	0,00012	3242,58	0,39	Флакон 450,0, шт	3,0	40,27	120,81
Хлороформ,	0,014	529,49	7,41	Пробка 4Ц, шт	3,0	11,42	34,26
Натрий хлористый, кг	0,05	304,76	15,24	Колпачок 12Б34 (К-3-34), шт	3,0	4,05	12,15
Натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный, кг	0,005	812,74	4,06				
Флакон 450,0, шт	3,0	40,27	120,81				
Пробка 4Ц, шт	3,0	11,42	34,26				
Колпачок 12Б34 (К-3-34), шт	3,0	4,05	12,15				
ИТОГО, руб.			227,87	ИТОГО, руб.			2038,32

На основе анализа данных, представленных в таблице 21, можно сделать заключение, что стоимость материалов на изготовление 1,0 л разработанной питательной среды ХДС-Н в 8,95 раз меньше аналогичного показателя для используемой в практике контрольной среды.

Таблица 22 - Сравнительная калькуляция стоимости материалов на приготовление 1,0 л среды ХДС-агар и 1,0 л среды из коммерческого препарата «Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая «Щелочной агар»

ХДС-агар (на 1,0 л среды)				Среда из препарата «Питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона сухая «Щелочной агар» ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск			
Материалы, единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.	Материалы, единица измерения	Кол-во	Цена, руб.	Сумма, руб.
Дрожжи хлебопекар- ные прессо- ванные, кг	0,05	167,66	8,39	Щелочной агар сухой коммерчес- кий (навеска на 1 л среды), кг	0,047	10743,26	504,93
Панкреатин КРС сухой, кг	0,00003	3242,58	0,1	Флакон 450,0, шт	3,0	40,27	120,81
Хлороформ,	0,0141	529,49	7,45	Пробка 4Ц, шт	3,0	11,42	34,26
Натрий хлористый, кг	0,004	304,76	1,22	Колпачок 12Б34 (К-3-34), шт	3,0	4,05	12,15
Натрий фосфорно- кислый дву- замещённый 12-водный, кг	0,006	812,74	4,88				
Агар-агар бактериоло- гический	0,013	11584,28	150,60				
Флакон 450,0, шт	3,0	40,27	120,81				
Пробка 4Ц, шт	3,0	11,42	34,26				
Колпачок 12Б34 (К-3-34), шт	3,0	4,05	12,15				
ИТОГО, руб.			339,86	ИТОГО, руб.			672,15

Для агаризованных питательных сред (Таблица 22) преимущество в стоимости материалов на 1,0 л ХДС-агара по сравнению с таковым для приготовления 1,0 л щелочного агара из сухого препарата производства ФБУН ГНЦ ПМБ п. Оболенск составляет 1,98 раз в пользу опытной среды.

Подводя итоги результатам исследований, представленных в настоящей главе диссертации, следует отметить, что разработанные среды ХДС-агар и ХДС-Н продемонстрировали высокую эффективность при выделении с их помощью штаммов холерного вибриона из искусственных смесей микроорганизмов, имитирующих клинический материал, были предпочтительней контрольных питательных сред при испытаниях в ходе мониторинга водных объектов на наличие *V.cholerae* и при тактико-специальном учении СПЭБ, а также имели серьезные экономические преимущества перед используемыми в практике коммерческими питательными средами.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА, ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НОВОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХОЛЕРНОГО ВИБРИОНА АЖС-АГАР

4.1 Выбор и оптимизация содержания питательной основы в конструируемой среде АЖС-агар

Принимая во внимание, что при содержании в питательной среде азотистой питательной основы в больших количествах при культивировании в ней различных микроорганизмов может происходить сдвиг рН в щелочную сторону за счет дезаминирования аминокислот ферментами бактерий и накопления щелочных продуктов [4]. Если при этом в разрабатываемую питательную среду внесён необходимый углевод (в данном случае – сахароза), то его ферментация с образованием кислых продуктов будет не видна. Так же следует учитывать, что процессы, связанные с утилизацией аминокислот (как содержащихся в питательной основе, так и вносимых отдельно) и ферментацией углеводов, происходят параллельно.

Необходимо было выбрать питательную основу с достаточно низким углеводным фоном или отсутствием углеводов вообще. Поэтому был проведён отбор питательных основ по критерию содержания углеводов, которые определяли антроновым методом согласно МУК 4.2.2316-08 [85]. В данную часть работы были взяты: ферментативный гидролизат казеина, Тип I (Триптон) производства HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия), пептон ферментативный сухой для бактериологических целей (по ГОСТ 13805-76 [34]) и ПППД. В исследование были взяты три серии каждого из этих препаратов. Содержание углеводов в каждой из серий определяли с пятикратным повтором.

Было выявлено (Таблица 23), что в качестве питательных основ для «Аргинин-железо-сахарозного агара» наиболее подходят ферментативный пептон и ПППД, т.к. содержание углеводов в них составило менее 0,06 %. Согласно данным Бендас Л.Г. [21], это обстоятельство позволяет применять данные белковые гидролизаты в составе дифференциально-диагностических питательных сред.

Таблица 23 - Содержание углеводов в питательных основах, подбираемых для разрабатываемой питательной среды

Наименование питательной основы	Содержание углеводов, % ($M \pm m$)
Ферментативный гидролизат казеина, Тип I (Триптон) HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия)	0,256 $\pm$ 0,01
Панкреатический перевар пекарских дрожжей (ПППД)	0,038 $\pm$ 0,001
Пептон ферментативный	0,045 $\pm$ 0,001

Примечание: М – среднее значение определяемого показателя;

m – ошибка среднего значения определяемого показателя

Пептон ферментативный и ПППД исследовали в диапазоне концентраций по аминному азоту от 0,005 до 0,12%. Шаг приращения концентраций составлял 0,005%.

При поиске оптимума концентрации питательных основ на каждом шаге приращения оценивали время закисления (происходящего по причине ферментации сахарозы) и защелачивания (связанного с ферментацией аргинина), столбика среды и скошенной части от момента внесения культуры, а также - время начала продукции сероводорода. Изменение pH среды фиксировали по переходу ее цвета в кислую сторону (пожелтение) или в щелочную сторону (посинение), начало продукции сероводорода - по появлению черного преципитата в виде кольца в толще среды.

Было установлено, что наиболее оптимальные концентрации (по аминному азоту) питательных основ – ПППД или пептона ферментативного находятся в интервале от 0,005 до 0,01 %. При этом штаммы микроорганизмов (*V. cholerae* non O1/ non O139 P-9741, *Aeromonas hydrophila* P-6052, *E. coli* 18 (1015), *P. vulgaris* HX 19 (12932)), взятые в работу, проявляли свои биохимические свойства согласно их таксономическому положению также, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

4.2 Оптимизация содержания сахарозы в конструируемой среде АЖС-агар

При проведении этой части работы готовили варианты конструируемой среды с концентрацией сахарозы от 0,05 до 0,3 % с шагом 0,05 %. Критериями отклика на изменения концентрации сахарозы были выбраны те же параметры, что и в предыдущей части исследования.

В процессе работы выявили, что наиболее оптимальные концентрации сахарозы находятся в интервале от 0,1 до 0,2 %. Штаммы микроорганизмов, взятые в работу, проявляли свои биохимические свойства согласно их таксономическому положению также, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

4.3 Оптимизация содержания L-Аргинина солянокислого в конструируемой среде АЖС-агар

При проведении данной части исследования оптимизацию концентрации L-Аргинина солянокислого в разрабатываемой среде осуществляли на её вариантах, содержащих питательную основу, сахарозу в количествах, соответствующих найденным в предыдущих сериях экспериментов оптимальным значениям указанных параметров. Увеличение концентрации L-Аргинина солянокислого проводили с шагом 0,1 % в диапазоне 0,1 – 3,0 %. Критериями отклика на каждый шаг увеличения концентрации исследуемого ингредиента были выбраны те же параметры, что и в предыдущих частях исследования.

Было выявлено, что оптимальные концентрации L-Аргинина солянокислого находятся в интервале от 1,0 до 1,6 %. Штаммы *V. cholerae* non O1/ non O139 P-9741, *A. hydrophila* P-6052, *E. coli* 18 (1015), *P. vulgaris* НХ 19 (12932) при этом проявляли типичную для каждого из них ферментативную активность, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

При посеве тест-штамма холерного вибриона в конструируемую среду и культивировании в ней в течение 12-24 ч при 37°C он вызывал пожелтение как ее скошенной части, так и «столбика» вследствие накопления кислых продуктов за счет ферментации сахарозы при отсутствии дигидролазы аргинина и не образовывал чёрного преципитата в толще среды, так как не выделял сероводород.

Штамм *A. hydrophila* P-6052 в течение 12-24 ч при 37°C вызывал переход цвета скошенной части вариантов конструируемой среды от зелёного к синему. Синяя или желтая окраска «столбика» среды появлялась вследствие накопления щелочных (дигидролаза аргинина) или кислых продуктов. Так же обнаружили то,

что этот штамм не обладал способностью образовывать сероводород как на опытных вариантах разрабатываемой среды, так и на агаре Клигlera, взятом в качестве контрольного.

При культивировании *E. coli* 18 (1015) на вариантах конструируемой среды цвет скошенной части и «столбиков» последней оставался исходным – зелёным. Это свидетельствует об отсутствии у данного микроорганизма способностей утилизировать сахарозу с выделением кислых продуктов и образовывать сероводород, а так же дигидролазы аргинина.

При выращивании *P. vulgaris* НХ 19 (12932) на вариантах конструируемого АЖС-агара происходило закисление всего объёма среды (в пробирках), сопровождающееся изменением цвета последней от зелёного к жёлтому. Данный факт указывает на способность утилизировать сахарозу, а так же на отсутствие дигидролазы аргинина у этого штамма.

В «столбиках» наблюдалось образование чёрных «пятен» и «следов» по ходу укола петлёй, свидетельствующих о наличии продукции сероводорода.

4.4 Оптимизация содержания солевых компонентов и агара микробиологического в конструируемой среде АЖС-агар

4.4.1 Оптимизация содержания хлорида натрия в конструируемой среде АЖС-агар

В ходе проведения этой части работы оптимизацию концентрации натрия хлористого в конструируемой среде осуществляли на её вариантах, содержащих питательную основу, сахарозу и аргинин в количествах, соответствующих найденным в предыдущих сериях экспериментов оптимальным значениям указанных параметров. Приращение концентрации хлорида натрия осуществляли с шагом 0,1 % в диапазоне 0,1 – 3,0 %.

Оптимальный диапазон концентраций натрия хлористого в составе разрабатываемой среды составлял от 0,4 до 0,6 %. Указанный диапазон соответствует изоосмии среды для взятых в работу штаммов микроорганизмов, которые проявляли свои биохимические признаки согласно их таксономическому

положению так же, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

4.4.2 Оптимизация содержания натрия серноватистокислого 5-водного в конструируемой среде АЖС-агар

Приращение концентрации натрия серноватистокислого осуществляли с шагом 0,005 % в диапазоне 0 - 0,1 %. Данные эксперименты проводили с использованием варианта среды, содержащего питательную основу, сахарозу, аргинин, натрий хлористый, в установленных в предыдущих сериях экспериментов оптимальных концентрациях.

Обнаружено, что в диапазоне концентраций от 0,02 до 0,04 %, который был определен нами как оптимальный, взятые в работу штаммы микроорганизмов проявляли свои биохимические свойства согласно их таксономическому положению, также как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

4.4.3 Поиск оптимальной концентрации соли Мора в составе разрабатываемой питательной среды АЖС-агар

Поиск частного оптимума концентрации соли Мора в разрабатываемой питательной среде проводили путем тестирования ее вариантов, содержащих данный ингредиент в концентрациях от 0 до 0,1 % с шагом 0,005 %. При этом другие компоненты среды были представлены в ранее установленных оптимальных концентрациях.

Обнаружили, что оптимальные концентрации соли Мора находятся в интервале от 0,01 до 0,04 %. Введение в состав разрабатываемой питательной среды данного ингредиента в количествах, соответствовавших установленному оптимальному диапазону, способствовало проявлению ожидаемых биохимических активностей штаммов холерного вибриона (ферментация сахарозы, отсутствие ферментации аргинина, отсутствие продукции сероводорода), аэромонад (ферментация сахарозы и аргинина, отсутствие продукции сероводорода), кишечной палочки (отсутствие ферментации сахарозы, аргинина и продукции сероводорода) и протей (ферментация сахарозы, отсутствие

ферментации аргинина и наличие продукции сероводорода) в установленных временных точках от момента внесения культуры в среду.

4.4.4 Оптимизация содержания калия фосфорнокислого двузамещённого 3-водного в составе конструируемой среды АЖС-агар

Калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) является одним из компонентов буферной системы в составе разрабатываемой питательной среды. Его роль заключается в предупреждении сильного сдвига pH среды в кислую сторону вследствие ферментации сахарозы, что препятствует своевременному изменению цвета столбика и скошенной части среды в синий при ферментации аргинина и накоплении щелочных продуктов (основной диагностический критерий при идентификации штаммов аэромонад).

Нахождение частного оптимума содержания калия фосфорнокислого двузамещенного 3-водного ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$) в составе конструируемой среды осуществляли с шагом в диапазоне концентраций указанного компонента 0 - 0,3 % с шагом 0,005 %. Данные эксперименты проводили с использованием варианта среды, содержащего упомянутые выше ингредиенты, находящиеся в ранее установленных значениях их оптимальных концентраций.

В ходе работы было найдено значение концентрации $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$, находящееся в диапазоне от 0,01 до 0,04 %. Это обеспечивало своевременный и чётко регистрируемый переход цвета индикатора из первоначально жёлтого в синий при культивировании штамма *A.caviae*. Тест-штаммы других микроорганизмов проявляли при использовании вариантов среды с оптимальными значениями концентраций калия фосфорнокислого двузамещённого 3-водного типичные биохимические свойства в отношении всех субстратов АЖС-агара согласно их таксономическому положению также, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клигlera-ГРМ.

4.4.5 Оптимизация содержания агара микробиологического в составе конструируемой среды АЖС-агар

В данной части работы применяли микробиологический агар, соответствующий требованиям ГОСТ 17206-96. Поиск оптимального значения его

концентрации осуществляли диапазоне 0,9 до 1,6% включительно с шагом в 0,1 %.

Оптимальные значения концентрации микробиологического агара находились в диапазоне 1,1-1,3 %. При этом взятые в работу штаммы микроорганизмов проявляли свои биохимические свойства согласно их таксономическому положению также, как и на контрольных средах Мёллера с аргинином, Гисса с сахарозой, Клиглера-ГРМ.

4.5 Оптимизация значения pH конструируемой среды АЖС-агар

Определение оптимума pH в конструируемой среде АЖС-агар («Аргинин - железо - сахарозный агар») проводили на её вариантах, содержащих ПППД или пептон ферментативный, сахарозу, натрий хлористый, L-Аргинин солянокислый, натрий серноватистокислый, соль Мора, калий фосфорнокислый двузамещённый 3-водный в количествах, соответствующих найденным в предыдущих сериях экспериментов оптимальным значениям указанных параметров. В качестве базового уровня pH было принято его значение в контрольной среде Мёллера с аргинином – 6,4. Шаг приращения значения pH питательной среды составил 0,1. Оценивали соответствие каждого варианта среды с различным значением pH в исследуемом диапазоне требуемым временным параметрам перехода цвета индикатора в зависимости от ферментативных активностей тест-штаммов микроорганизмов.

Установили, что оптимальный уровень pH конструируемой среды составил 6,7. При этом взятые в работу штаммы микроорганизмов при культивировании на данном варианте АЖС-агара вызывали характерные изменения скошенной части и «столбика» конструируемой среды (в пробирке) в течение 12–24 ч от момента внесения инокула культуры.

4.6 Подбор индикаторной системы в состав конструируемой среды АЖС-агар

В связи с тем, что ферментативную активность культивируемых микроорганизмов в отношении субстратов среды (сахарозы и аргинина) оценивали по изменению цвета «столбика» и скошенной части АЖС-агара в

качестве важнейшего ингредиента следует рассматривать индикаторную систему, представляющую собой один или несколько индикаторов, внесённых в состав среды.

В настоящем исследовании были использованы следующие индикаторы: бромтимоловый синий, крезоловый красный, бромфеноловый красный, нейтральный красный, феноловый красный, тимоловый синий, фуксин кислый, фуксин основной, бромкрезоловый пурпурный, метиловый красный, а также комплексный индикатор, состоящий из бромтимолового синего и крезолового красного.

Выявили, что применение комплексного индикатора (бромтимоловый синий - крезоловый красный) в составе конструируемой среды наиболее целесообразно. Это позволяет визуально регистрировать изменение pH среды как в кислую (пожелтение относительно исходного зеленого цвета), так и в щелочную (посинение относительно исходного зеленого цвета) стороны при культивировании на ней взятых в работу штаммов микроорганизмов в течение 12 - 24 часов. Были найдены оптимальные диапазоны концентраций бромтимолового синего – 0,03–0,1 г/л (в виде 1,6 % спиртового раствора); крезолового красного - 0,005–0,03 г/л (в виде 0,1 % спиртового раствора).

4.7 Характеристика питательной среды АЖС-агар по основным физико-химическим и биологическим показателям

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

- ПППД – 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;
- pH 6,7.

АЖС-агар в своём оптимальном составе характеризуется следующими физико-химическими показателями:

- прозрачность и цветность – питательная среда прозрачная или слегка опалесцирующая, зелёного цвета; консистенция среды – студнеобразная;
- pH среды $6,7 \pm 0,1$;
- аминный азот (в %) – $0,118 \pm 0,004$;
- общий азот (в %) – $0,352 \pm 0,002$;
- прочность студня готовой среды (в г) – 330 ± 50 ;
- содержание натрия хлорида (в %) – $0,52 \pm 0,05$;
- содержание углеводов с учётом входящей в состав сахарозы (в %) – $0,205 \pm 0,002$.

Общий вид сконструированной питательной среды в первичной упаковке представлен на рисунке 6.

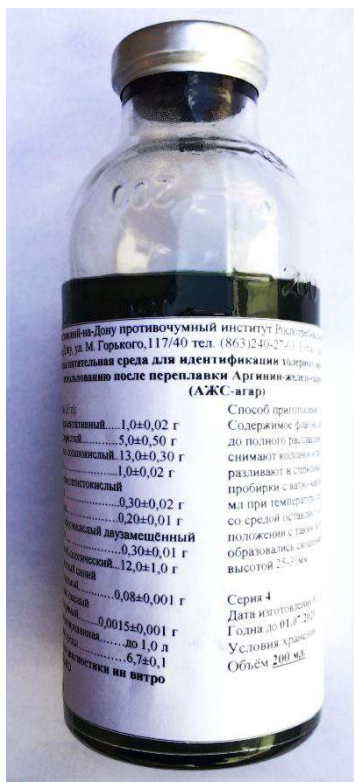


Рисунок 6 - Общий вид разработанной среды АЖС-агар в первичной упаковке

При оценке биологических показателей (дифференцирующих свойств) АЖС-агара в качестве тест-штаммов были отобраны следующие микроорганизмы: *V. cholerae* O1 classical P-1 (145), *V. cholerae* O1 El Tor M-878, *V. cholerae* O139 MO45, *V. cholerae* non O1/ non O139 P-9741, *A. hydrophila* P-6052, *E. coli* 18, *P. vulgaris* HX 19 № 222.

Тест-штаммы холерного вибриона при культивировании в АЖС-агаре при $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ вызывали появление жёлтой окраски скошенной части и «столбика» среды вследствие накопления кислых продуктов без образования чёрного преципитата (за счет образования сероводорода) в «столбике». При культивировании в данной среде *A. hydrophila* P-6052 цвет скошенной части среды от исходного зеленого меняется на синий, а «столбика» - на синий или желтый. Продукция сероводорода при этом отсутствует. При культивировании в АЖС-агаре тест-штамма штамм кишечной палочки первоначально зеленый цвет среды не изменяется. Для тест-штамма вульгарного протей характерно изменение цвета скошенной части и «столбика» среды от зеленого к желтому и наличие черного преципитата, связанного с продукцией H_2S .

4.8 Результаты авторских испытаний АЖС-агара с использованием музейных штаммов холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и вульгарного протей

Дифференцирующие свойства АЖС-агара в сравнении со контрольными средами - декарбоксилазным бульоном Мёллера с аргинином (HiMedia), средой Гисса-ГРМ с сахарозой и агаром Клиглера-ГРМ изучали с использованием 19 штаммов холерного вибриона (*V. cholerae* O1 El Tor - 9 штаммов; *V. cholerae classical* O1 - 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*).

Было установлено, что при культивировании в АЖС-агаре, как и в контрольных средах, все использованные штаммы холерного вибриона изменяли исходный цвет сред на желтый. При этом продукцию сероводорода не регистрировали.

Взятые в опыт аэромонады при культивировании в АЖС-агаре изменяли его цвет на синий (за исключением *A. caviae* P-6051, при выращивании которого цвет «столбика» среды остался желтым 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 Клиглера-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 зеленого 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.

Также 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 черный преципитат сульфида железа в «столбике», свидетельствующий о продукции сероводорода. На контрольных средах данный штамм протей 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 от штаммов других взятых в опыт микроорганизмов (Рисунок 7).



Рисунок 7 - Цвет АЖС-агара при посеве в него тест-штаммов микроорганизмов - целевых аналитов

4.9 Изучение стабильности питательной среды АЖС-агар и

воспроизводимости полученных при её использовании результатов

В данном разделе исследования согласно требованиям ГОСТ Р ИСО 23640-2015 «Изделия медицинские для диагностики IN VITRO. Оценка стабильности для диагностики *in vitro*» [36] проводили изучение стабильности физико-химических и биологических показателей питательной среды АЖС-агар.

Стабильность – способность медицинского изделия для диагностики *in vitro*, находящегося в определенных условиях, сохранять на протяжении периода годности свои свойства в пределах, установленных изготовителем.

Исследование стабильности отобранных образцов АЖС-агара проводили в реальном масштабе времени с целью верификации заявленного на основании опыта применения аналогичных медицинских изделий срока годности (один год). Также изучали стабильность в процессе применения после первого вскрытия первичной упаковки.

Изучение стабильности питательной среды АЖС-агар проводили в объеме периодических испытаний на соответствие требованиям и согласно методам, описанным в ТУ (ТУ 20.59.52-001-01898316-2019) на настоящий препарат.

В ходе выполнения исследования изучены три серии (партии) образцов (серия 1 от 02.07.2018 г.; серия 2 от 09.07.2018 г.; серия 3 от 16.07.2018 г.). От каждой

серии брали 28 флаконов по 200,0 мл среды каждый в интервалы времени, охватывающие предполагаемый срок годности (один год): в начале (I), в середине (II) и через неделю после окончания срока годности (III). Образцы хранились при температуре 2–8° С.

В таблицах 24 и 25 приведены сроки и результаты проведения исследования трёх серий указанного медицинского изделия для диагностики *in vitro*.

Таблица 24 - Сроки проведения исследования долговременной стабильности

Номер серии	Дата изготовления	Сроки проведения исследований долговременной стабильности		
		Начало срока годности	Середина срока годности	Через неделю после окончания срока годности
		I	II	III
1	02.07.2018	02.07.2018 – 06.07.2018	09.01.2019 – 15.01.2019	09.07.2019 – 16.07.2019
2	09.07.2018	09.07.2018-13.07.2018	14.01.2019 – 18.01.2019	16.07.2019 – 20.07.2019
3	16.07.2018	16.07.2018-20.07.2018	17.01.2019 – 23.01.2019	23.07.2019 – 27.07.2019

При изучении стабильности питательной среды АЖС-агар в процессе применения исследовали три серии (партии) образцов 017-7; 017-8; 017-9, даты изготовления 30, 31.07.17 г. и 03.08.2017 г. – по 28 флаконов с 200,0 мл среды каждой. Для отражения обычных условий применения исследование проводили в несколько этапов: через три дня (I), через шесть дней (II) и через десять дней (III) после вскрытия первичной упаковки – флакона. Результаты исследования приведены в таблице 25.

Таблица 25 - Результаты исследования стабильности питательной среды АЖС-агар в процессе применения

Наименование показателя	Характеристика по ТУ 20.59.52-001-01898316-2019	Результаты исследования		
		I	II	III
1	2	3	4	5
Внешний вид	Студнеобразная масса зелёного цвета	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Прозрачность и цветность	Готовая среда, разлитая в пробирки в объёме 8 мл, прозрачная или слегка опалесцирующая, зелёного цвета	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях

Продолжение таблицы 25

Концентрация водородных ионов (рН)	6,7±0,1	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Аминный азот	0,118±0,004	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Хлориды готовой среды, %	0,52±0,05	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Прочность студня готовой среды, г	330±50	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Дифференцирующие свойства	Чёткая визуальная дифференциация по цвету скошенной части и столбика среды между тест-штаммами холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и протей	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях
Показатель стабильности основных биологических свойств микроорганизмов.	Тест-штаммы микроорганизмов целевых анализов прошедшие пассаж через АЖС-агар, должны обладать типичными морфологическими, биохимическими, серологическими свойствами.	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях	Соответствует в трёх сериях

Полученные данные свидетельствуют о стабильности АЖС-агара. Заявленный на основании опыта применения аналогичных медицинских изделий срок годности – 1 год – подтверждён исследованием долговременной стабильности в реальном времени. Срок возможного использования изделия после вскрытия первичной упаковки – 10 дней – так же подтверждён исследованием стабильности в процессе применения в реальном времени.

Проведены также исследования по воспроизводимости результатов исследования физико-химических и биологических показателей трёх серий питательной среды АЖС-агар (Таблица 26).

Таблица 26 - Воспроизводимость результатов исследования физико-химических и биологических показателей медицинского изделия АЖС-агар с использованием трёх установочных серий данного изделия

№ п/п	Показатель	Значение по требованиям ТУ 20.59.52-001-01898316 -2019	Среднее арифметическое показателя по трём сериям изделия	Среднее квадратичное отклонение	Коэффициент вариации, %
1	Внешний вид	Студнеобразная масса зелёного цвета	Студнеобразная масса зелёного цвета	Качественный показатель	Качественный показатель
2	Прозрачность и цветность	Готовая среда, разлитая в пробирки в объёме 8 мл, прозрачная или слегка опалесцирующая, зелёного цвета	Готовая среда, разлитая в пробирки в объёме 8 мл, прозрачная или слегка опалесцирующая, зелёного цвета	Качественный показатель	Качественный показатель
3	рН готовой среды	6,7±0,1	6,67	0,047	0,704
4	Аминный азот готовой среды, %	0,118±0,004	0,119	0,0026	2,19
5	Хлориды готовой среды, %	0,52±0,05	0,50	0,013	2,6
6	Прочность студня готовой среды, г	330±50	323,33	17,01	5,26
7	Температура плавления студня готовой среды, °С	95±5	95,7	2,63	2,75
8	Продолжительность плавления студня готовой среды, мин	50±5	51	3,56	7,0
9	Температура застудневания готовой среды, °С	35±1,5	35,17	0,85	2,4
10	Дифференцирующие свойства	Чёткая дифференциация по цвету скошенной части и столбика среды между тест-штаммами холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и протей	Чёткая дифференциация по цвету скошенной части и столбика среды между тест-штаммами холерного вибриона, аэромонад, кишечной палочки и протей	Качественный показатель	Качественный показатель

При анализе полученных в настоящей части исследования данных следует сделать вывод, что результаты, получаемые на питательной среде АЖС-агар, воспроизводятся с высокой степенью точности и соответствуют требованиям оформляемых нормативно-технических документов.

4.10 Результаты испытаний АЖС-агара при исследованиях проб из водных объектов

Результаты посевов материала 375 подозрительных колоний убедительно свидетельствуют, что на АЖС-агаре можно было четко дифференцировать холерные вибрионы (преимущественно не O1/не O139 серогрупп) от аэромонад по изменению цвета «столбика» и скошенной части среды от исходного зеленого к желтому или желто-зеленому 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 идентичный вид. Сравнивали по эффективности два метода: посев материала вышеуказанных колоний на АЖС-агар и исследование последних методом MALDI-TOF масс-спектрометрии. При исследовании 81 колонии этими методами было установлено совпадение результатов на 98,8 % (Таблица 27).

Таблица 27 - Результаты сравнительного изучения эффективности методов идентификации колоний: посева в АЖС-агар и MALDI-TOF масс-спектрометрии

Номера выделенных колоний	Результаты, полученные при помощи АЖС-агара	Результаты, полученные при помощи метода MALDI-TOF масс-спектрометрии
1, 2, 44, 46, 64, 66, 67	<i>Aeromonas</i>	<i>A. caviae</i>
37, 43, 50, 61, 71	<i>Aeromonas</i>	<i>A. veronii</i>
45, 68	<i>Aeromonas</i>	<i>A. hydrophila</i>
47	<i>Proteus</i>	<i>A. hydrophila</i>
3 - 36; 38 - 42; 48, 49; 51 - 60; 62, 63, 65, 69, 70; 72 - 81	<i>Vibrio</i>	<i>V. cholerae</i>

Результаты сравнительного изучения показали возможность успешного применения сконструированной среды на IV - V этапах лабораторной диагностики холеры в качестве среды для первичной идентификации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведённый нами всесторонний анализ научной литературы подтверждает господствующую парадигму о важной роли дрожжей в качестве субстрата и источника ферментов для различных технологических процессов в пищевой, микробиологической и биомедицинской отраслях [160, 169]. Широкое использование дрожжей в различных областях обусловлено высоким содержанием белка, нуклеотидов, витаминов в составе их клеток [131, 148], а также гено- и фенотипическим разнообразием [98, 179]. Пекарские дрожжи являются одним из наиболее перспективных, широко доступных источников сырья для производства питательных сред и обладают особенностями метаболизма, позволяющими управлять процессами их промышленного культивирования [19, 154, 191].

Были разработаны на основе ПППД три новых среды для выявления и исследования возбудителя холеры: ХДС-Н, ХДС-агар и ХДС-бульон.

При их конструировании находили частные оптимумы концентраций ПППД, натрия хлористого, натрия фосфорнокислого двузамещенного двенадцативодного, агар-агара бактериологического (в случае плотной питательной среды), а также показателя концентрации водородных ионов pH. При проведении оптимизации состава конструируемых сред критериями отклика на приращение концентрации каждого ингредиента служили: чувствительность, показатель прорастания, эффективность (выход биомассы штамма с 1,0 мл среды), диаметр и морфология колоний (для плотной питательной среды), стабильность свойств тест-штамма.

Разработанная среда ХДС-агар имела следующий состав:

- ПППД – из расчёта $(0,05 \pm 0,01)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 4,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 6,0 г;
- агар микробиологический (по ГОСТ 17206-96) – 13,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1) – до 1,0 литра.

Оптимальный состав накопительной среды для холерного вибриона ХДС-Н (в концентрированном варианте по аналогии с основным раствором пептона) был следующим (на 1,0 л среды):

- ПППД – из расчёта $(0,22 \pm 0,02)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 50,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 5,0 г;
- калий азотнокислый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4217-77) – 1,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. № 1) – до 1 литра.

После проведенной оптимизации ХДС-бульон состоял из следующих ингредиентов (на 1,0 л среды):

- ПППД – из расчёта $(0,07 \pm 0,005)$ % по аминному азоту;
- натрий хлористый ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4233-77) – 5,0 г;
- натрий фосфорнокислый двузамещённый 12-водный ЧДА или ХЧ (по ГОСТ 4172-76) – 6,0 г;
- вода дистиллированная (по ГОСТ Р 58144-2018, Изм. №1) – до 1 литра.

Изучение предлагаемых питательных сред на основе ПППД в сравнении с используемыми в практике зарегистрированными в установленном порядке аналогами производства ФГУП НПО «Микроген» проводили с использованием 28 штаммов *V. cholerae* различных биоваров и серогрупп.

В ходе проведённых исследований было установлено, что ХДС-агар в полной мере соответствовал требованиям МУ 3.3.2.2124-06 и по своим биологическим показателям не только не уступал среде сравнения, но и превосходил её 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. Это свидетельствует о преимуществах использованного в составе плотной питательной среды для холерного вибриона панкреатического перевара пекарских дрожжей перед предложенным ранее и описанным в литературе панкреатическим гидролизатом казеина [42, 46, 48, 112, 113, 119].

При проведении авторских испытаний было установлено, что преимуществами перед контрольной средой ФГУП НПО «Микроген» в отношении семи взятых в работу штаммов холерного вибриона характеризовались обе сконструированные жидкие питательные среды: ХДС-Н и ХДС-бульон.

Наряду с авторскими испытаниями на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора были проведены предрегистрационные испытания опытных сред ХДС-агара и ХДС-Н. Результаты проведенных испытаний показали, что по всем оцениваемым показателям обе опытные среды не уступали контрольным средам другого производителя – ФБУН ГНЦ ПМБ, п. Оболенск.

Преимущества разработанных плотной и жидких питательных сред на основе ПППД перед используемыми в практике аналогами производства НПО «Микроген» [119] в отношении штаммов *V.cholerae* O139 имеют особое значение в связи с большим эпидемическим потенциалом серовара «Бенгал», вызвавшим в первой половине 90-х годов XX века серьёзные эпидемические проявления холеры в ряде стран Юго-восточной Азии.

Было проведено сравнительное изучение роста бактериальных популяций холерного вибриона, кишечной палочки и протей в опытной и контрольной жидких накопительных средах в первые шесть часов культивирования. Были построены кривые роста популяций данных штаммов. Анализ построенных кривых показал, что на обеих средах латентная фаза у *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 (100 мин) была короче, чем у *E. coli* 18 (1015) (160 мин) и *P. vulgaris* 14 (140 мин). На экспериментальной и контрольной средах в течение этого периода количество жизнеспособных клеток в популяции *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 сохранялось приблизительно на одном уровне, а в популяциях *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 – снижалось с 20-й по 40-ю минуту от начала культивирования в 2,1 – 2,8 раз. Отмеченный факт может свидетельствовать о лучшей и более быстрой адаптации *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 к обеим средам.

Начало экспоненциальной фазы роста популяции *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 на ХДС-Н и 1 % пептонной воде регистрировали в одной временной точке (100 мин). У штаммов *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14 эта фаза начиналась на обеих средах значительно позднее (со 160-й и 140-й минуты, соответственно).

Для каждого из микроорганизмов было рассчитано время генерации от начала экспоненциальной фазы роста его популяции до 360-й минуты культивирования. На ХДС-Н и 1 % пептонной воде этот показатель составил: у *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 – 18 мин, у *E. coli* 18 (1015) – 28 мин, у *P. vulgaris* 14 – 27 мин. К концу 6-го часа от начала культивирования на обеих средах число КОЕ *V.cholerae* non O1/ non O139 P-9741 было на два порядка выше, чем у *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14.

Таким образом, при равных низких посевных дозах как на среде ХДС-Н, так и на 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* non O1 / non O139 P-9741 по сравнению с *E. coli* 18 (1015) и *P. vulgaris* 14. Таким образом, полученные при использовании разработанной среды ХДС-Н результаты подтверждают литературные данные [88, 184] о том, что за счёт малого времени генерации *V.cholerae* на щелочных жидких накопительных средах рост этого микроорганизма в первые 6 часов культивирования происходит быстрее, чем у сопутствующей микрофлоры.

Изучена возможность использования разработанного ХДС-бульона в качестве среды накопления холерного энтеротоксина (СТ) в сравнении с контрольными средами - бульоном Мартена pH 7,7±0,1, средой АКІ.

Было установлено, что штаммы холерного вибриона – продуценты энтеротоксина (*V.cholerae* O1 classical 569В, *V.cholerae* O1 El Tor 1310 и *V.cholerae* O139 16077) характеризовались способностью продуцировать СТ при их выращивании в ХДС-бульоне и выделять его в среду культивирования. Присутствие данной токсической субстанции в супернатантах, полученных из

бульонной культуры данных штаммов после инкубации при 33°C в условиях непрерывного шуттелирования с частотой 180 качаний в минуту, подтверждалось постановкой теста в культуре клеток СНО-К1. При использовании опытной среды положительную реакцию в виде удлинения клеток регистрировали до разведения супернатанта 1/1280. Аналогичный результат был достигнут при использовании контрольной среды - бульона Мартена pH 7,7±0,1. Вторая контрольная среда АКІ, приготовленная из дорогостоящих импортных компонентов - бактопептона и дрожжевого экстракта производства Becton Dickinson, лишь незначительно превосходила разработанный ХДС-бульон по этому показателю. Из литературных источников известно, что для накопления СТ и изучения энтеротоксинпродуцирующей активности штаммов холерного вибриона могут быть использованы лишь среды из дорогостоящих белковых гидролизатов животного происхождения – бактопептона и казаминовых кислот [171, 180, 181]. В противовес этому нами была научно обоснована возможность применения для указанной цели питательной среды на основе дрожжевого гидролизата без компонентов животного происхождения. Полученные результаты свидетельствуют о том, что ХДС-бульон может рассматриваться как одна из немногих сред, используемых в мировой практике для накопления СТ из штаммов-продуцентов.

Представляло интерес изучить возможность скрининга культур холерных вибрионов по критерию энтеропродуцирующей активности *in vitro* при их выращивании в разработанном дрожжевом бульоне.

В работе были использованы 33 токсигенных штамма холерного вибриона, 30 из которых были изолированы из клинического материала в период эпидемических проявлений холеры в Республике Татарстан в 2001 г., а три - из объектов окружающей среды в г. Ростове-на-Дону. В качестве контрольных питательных сред использовали среды лабораторного изготовления - бульон Мартена pH 7,7±0,1 и АКІ. Сконструированная питательная среда совпадала с бульоном Мартена pH 7,7±0,1 по титрам СТ в отношении 31 штамма (28 - из г. Казань и три - из г. Ростова-на-Дону) *V. cholerae* и превосходила упомянутую

выше контрольную среду в десять раз в отношении одного штамма холерного вибриона – *V. cholerae* O1 El Tor 18333, выделенного в г. Казань.

Только один штамм - *V. cholerae* O1 El Tor 18346 характеризовался более высокой продукцией СТ на бульоне Мартена pH $7,7 \pm 0,1$.

Проводя данную часть работы, отметили то, что титры СТ в тесте на культуре клеток СНО-K1 при применении ХДС-бульона соответствовали таковым, полученным в ходе использования бульона Мартена pH $7,7 \pm 0,1$. Также выявили, что обе среды по титрам СТ в вышеуказанном тесте практически одинаково незначительно уступали среде АКІ.

Полученные результаты свидетельствуют о возможности применения ХДС-бульона в качестве среды накопления СТ и скрининга штаммов *V. cholerae* по критерию энтеропродуцирующей активности *in vitro*.

Проведены межлабораторные комиссионные испытания ХДС-бульона (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.).

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, содержавших 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 ПППД 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. Ростова-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.

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 не O1/не O139 серогрупп ежегодно.

Проведённые испытания разработанных сред ХДС-Н и ХДС-агар в тактико-специальном учении СПЭБ 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 ТСУ 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 СПЭБ открывает перспективы их включения в таблицу 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 расчетов 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 (акт комиссионной проверки от 25.12.2002 г.) среды ХДС-Н продемонстрировали её полное соответствие требованиям национальных стандартов и заявленным в инструкции по изготовлению и контролю (утверждена директором ФГУЗ РостНИПЧИ Роспотребнадзора 29.12.2005 г.) показателям качества. На данную среду получены акты внедрения от ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (от 11.11.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (от 11.10.2024 г.), референс-центра по мониторингу за холерой (от 11.11.2024 г.) и СПЭБ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (от 08.08.2024 г.).

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).

Получены акты внедрения в практику на ХДС-агар от ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (от 11.11.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (от 10.10.2024 г.), а также акты о внедрении в практику работы референс-центра по мониторингу за холерой (от 01.10.2024 г.) и СПЭБ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (от 08.08.2024 г.).

В результате проведенных исследований была разработана питательная среда АЖС-агар. 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 (ПППД или пептона ферментативного), сахарозы, L-Аргинина солянокислого, солевых компонентов (натрия хлористого, натрия серноватисто-кислого, соли Мора, калия фосфорнокислого двузамещенного 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).

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

- ПППД – 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;
- сахароза 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 серноокислая 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;
- pH 6,7.

Дифференцирующие свойства АЖС-агара в сравнении со контрольными средами - декарбоксилазным бульоном Мёллера с аргинином (HiMedia), средой Гисса-ГРМ с сахарозой и агаром Клиглера-ГРМ изучали с использованием 19 штаммов холерного вибриона (*V. cholerae* O1 El Tor - 9 штаммов; *V. cholerae classical* O1 - 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*).

Все штаммы холерного вибриона в процессе культивирования как в АЖС-агаре, так и в контрольной среде вызывали изменение цвета сред с зеленого на жёлтый без образования сероводорода.

Представители рода *Aeromonas* изменяли исходный зеленый цвет опытной среды на синий благодаря накоплению продуктов расщепления аргинина, сдвигающих pH в щелочную сторону. Эта реакция доминировала над закислением, связанным с ферментативным расщеплением сахарозы. Только у *A. caviae* P-6051 «столбик» среды оставался желтым 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 Клиглера-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 зеленого 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 черный 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.

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 были подтверждены его срок годности – 1 год, срок возможного использования настоящего препарата после вскрытия первичной упаковки – 10 дней при соблюдении необходимых температурных режимов.

Оформлены, одобрены Ученым 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 не O1/не O139 серогрупп) от аэромонад по изменению цвета «столбика» и скошенной части среды от исходного зеленого к желтому или желто-зеленому 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 [4, 92, 112, 119, 139, 186].

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.)

Получены акты внедрения в практику на АЖС-агар от ФКУЗ Астраханская противочумная станция Роспотребнадзора (от 07.11.2024 г.), ФКУЗ Иркутский противочумный институт Роспотребнадзора (от 07.11.2024 г.), а также акты о внедрении в практику работы референс-центра по мониторингу за холерой (от 18.09.2024 г.) и СПЭБ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (11.09.2024 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 объем мониторинговых исследований на холеру, и, частично, лабораторий регионального и федерального уровней [87].

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 СОКРАЩЕНИЙ

ГРМ – гидролизат рыбной муки

КОЕ – колониеобразующие единицы

МЗ СССР – Министерство Здравоохранения Союза Советских Социалистических Республик

м.к. – микробные клетки

СП – санитарные правила

СПЭБ – специализированная противоэпидемическая бригада

СЭДХ-М – среда элективно-дифференциальная для выделения холерного вибриона модифицированная

ТСУ – тактико-специальные учения

ФКУЗ – Федеральное Казённое Учреждение Здравоохранения

ХДС-агар – холерная дрожжевая среда агаризованная (агаризованная питательная среда на основе ПППД для выделения и культивирования холерного вибриона)

ХДС-бульон – холерная дрожжевая среда – бульон (жидкая питательная среда для культивирования холерного вибриона на основе ПППД)

ХДС-Н – холерная дрожжевая среда накопительная (жидкая накопительная питательная среда для выделения и культивирования холерного вибриона на основе ПППД)

ЭДОС – экстракт дрожжевой очищенный сухой

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.В. Мониторинг состояния европейского угря *Anguilla anguilla* L. Вислинского (Калининградского) залива по бактериологическим параметрам / Е.В. Авдеева, О.В. Казимирченко // Фундаментальные исследования. - 2005. - № 8. - С.50 - 51.
2. Авдеева, Н.Г. Использование сред из аутолизатов пекарских дрожжей для культивирования холерного вибриона и получения токсина / Н.Г. Авдеева, И.А. Дятлов, О.М. Космоенко // Материалы научно-практической конференции, посвящённой 100-летию образования противочумной службы России. (Саратов, 5-6 июня 1997 г.)- Саратов. - 1997.- Ч.2.- С.241 - 242.
3. Авторское свидетельство на изобретение № 1081843 СССР, МКИ А23J1/14 Способ получения белкового гидролизата из подсолнечного шрота / Милютин В.Н., Фоменко И.М., Рожков Е.В., Пасхалова Л.В., Харабаджахьян Г.Д., Копылов В.А., Буряков В.Г., Шерemet О.В.; заявитель и патентообладатель Ростовский-на-Дону государственный научно-исследовательский противочумный институт № 3575402/28-13 заявл. 21.04.83; опубл. 07.11.86 - 6 с.
4. Адамов, А.К. Холерные вибрионы / А.К. Адамов, М.С. Наумшина - Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1984. - 328с.
5. Азаргинова, Ф.С. Применение пшеничного экстракта для стимуляции роста холерного вибриона / Ф.С. Азаргинова // Известия Иркутского противочумного института Сибири и Дальнего Вост. - 1954. - Т.12.- С. 122 - 125.
6. Актуальные проблемы холеры / Под ред. В.И.Покровского, Г.Г. Онищенко. - М.: ГОУ ВУНЦ МЗ, 2000. - 384с.
7. Александровская, Н.Б. Биохимическая характеристика дрожжевых автолизатов: Автореферат дисс.... канд. биол. наук: 03.02.05 / Александровская Наталья Борисовна. - Рига, 1956. - 14 с.
8. Альпер-Юльчевская, Б.А. Питательные среды из пивных и хлебных дрожжей / Б.А. Альпер-Юльчевская // Лабораторная практика. - 1940. - №10. - С. 1 - 2.

9. Ананичев, А.В. Гидролиз дрожжей *Sacharomyces cerevisiae* и *Candida lipolytica* с помощью комплексных ферментативных препаратов / А.В. Ананичев, М.О. Рожанский, В.М. Беликов // Прикладная биохимия и микробиология - 1970. - Вып. VI. - № 6. - С. 272.
10. Антонычева, М.В. Питательные среды для культивирования чумного микроба на основе сухого автолизата пекарских дрожжей, полученного по усовершенствованной технологии: Автореф. дисс... канд. мед. наук: 03.02.03 /Антонычева Марина Владимировна - Саратов, 2012. - 24 с.
11. Аристовский, В.М. Учебник медицинской микробиологии /В.М. Аристовский, И.Е Минкевич, С.М. Фрид - М.: Медгиз, 1945. - 492с.
12. Артёменко, В.Д. Сравнительное изучение физико-химических свойств пептонов, используемых в производстве сухого щелочного агара / В.Д. Артёменко //Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 1977- № 2. - С. 125 - 129.
13. Афанасьев, М.В. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio* / М.В. Афанасьев, Л.В. Миронова, Е.А. Басов, А.С. Остяк, Е.С. Куликалова, Л.Я. Урбанович, С.В. Балахонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2014. - № 3.- С. 22 - 29.
14. Бабёнышев, Б.В. Скрининг штаммов холерного вибриона по скорости роста в микробиологическом анализаторе «Бактрак 4300» / Б.В. Бабёнышев, В.Н. Савельев Г.М. Грижебовский [и др.] // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2010.- Вып. 23. - С. 89 - 93.
15. Бароян, О.В. Холера Эль-Тор / О.В. Бароян. - М.: Медицина, 1971. - 255с.
16. Баскина, Л.А. Изучение дрожжевых питательных сред для приготовления кишечных вакцин /Л.А. Баскина, Н.Г. Щербина, В.Г. Здродовская // Бюллетень по обмену опытом институтов эпидемиологии и микробиологии. - 1947. - №5/23. - С. 19 - 30.

17. Баснакьян, И.А. Культивирование микроорганизмов с заданными свойствами / И.А. Баснакьян. – М.: Медицина, 1992. - 188 С.
18. Беленёва, И.А. Распространение ферментов углеводного обмена среди морских микроорганизмов в Японском и Южно-Китайском морях / И.А. Беленёва, В.В. Агаркова, А.Д. Кухлевский, Т.Н. Звягинцева // Микробиология. - 2010.- Т. 79, № 6. - С.793 - 800.
19. Бендас, Л.Г. Кормовые дрожжи как исходное сырьё питательных сред для культивирования микробов /Л.Г. Бендас, Н.В. Сидорчук // Лабораторное дело. - 1970. - № 1. - С. 43 - 45.
20. Бендас, Л.Г. Ферментативные гидролизаты кормовых дрожжей – основа бактериологических питательных сред: автореферат дисс... канд. биол. наук: 03.02.05/ Бендас Лариса Георгиевна – М., 1971. - 20 с.
21. Бендас, Л.Г. Стимулятор бактериального роста из кормовых дрожжей /Л.Г. Бендас, Б.М. Раскин // Лабораторное дело. - 1974.- № 1. - С. 43 - 46.
22. Биологическая химия / Под ред. Б.И. Збарского, И.И. Иванова, С.Р.Мардашева. - М.: Медгиз, 1960. - 490 с.
23. Биохимия. Химические реакции в живой клетке. / Под ред. А.Е. Браунштейна, Л.М. Гинодмана, Е.С. Северина.- Т.1.-М.: Мир, 1980. - 407 с.
24. Бланков, Б.И. О заменителях питательных сред / Б.И. Бланков, Н.И. Грязнов // Методические материалы для городских и районных санитарно - бактериологических лабораторий. - Свердловск: 1942. - 29 с.
25. Борисов, Л.Б. Краткий справочник микробиологической терминологии / Л.Б. Борисов, И.С. Фрейдлин. - Л.: Медицина, 1975. - 136 с.
26. Борисенко, Е.Г. Изготовление питательных сред из биомассы углеводородокисляющих дрожжей / Е.Г. Борисенко // Прикладная биохимия и микробиология - 1967.- Т. 3, Вып. 2.- С. 221 - 224.
27. Борисенко, Е.Г. Конструирование питательных сред из кислотных гидролизатов белково-витаминных препаратов / Е.Г. Борисенко // Лабораторное дело. - 1967. - № 8. - С. 498 - 501.

28. Борисенко, Е.Г. Культивирование микроорганизмов на питательных средах, приготовленных из продуктов микробиологического синтеза / Е.Г. Борисенко // Лабораторное дело. - 1968. - № 3. - С. 184 - 185.
29. Буряков, Б.Г. Опыт экспериментально-производственного выпуска белково-витаминной дрожжевой питательной основы (пептона Д) / Б.Г. Буряков, Г.Д. Харабаджахан, С.А. Угримов [и др.] // Тезисы областной конференции «Проблемы медицинской и санитарной микробиологии города» (Ростов-на-Дону, 16-17 июля). - Ростов-на-Дону. - 1987. - С. 91 - 92.
30. Витт, С.В. Аминокислотный состав автолизатов пекарских дрожжей и некоторых аминокислотных смесей / С.В. Витт, М.Б. Сапоровская, Е.Д. Пасконова [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. -1975.- Т. 11, Вып. 3. - С. 418 - 422.
31. Габричевский, Г.Н. Медицинская бактериология/ Г.Н. Габричевский. 4-е изд. - М.: 1909. - 560 с.
32. Горобец, О.Б. Влияние микроводорослей на жизнеспособность микроорганизмов в естественной и искусственной среде обитания / О.Б. Горобец, Л.П. Блинкова, А.П. Батуро // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2001.- № 1.- С. 104 - 108.
33. ГОСТ 13807-76. Пептон сухой ферментативный для бактериологических целей. Технические условия. - Режим доступа: http://www.standartgost.ru/g/ГОСТ_13805-76 (дата обращения 21.03.2021).
34. ГОСТ Р ЕН 12322-2010. Изделия медицинские для диагностики *in vitro*. Питательные среды для микробиологии. Критерии функциональных характеристик питательных сред. - Режим доступа: http://www.standartgost.ru/g/ГОСТ_Р_ЕН_12322-2010 (дата обращения 21.03.2021).
35. ГОСТ Р ИСО 23640-2015. Изделия медицинские для диагностики *IN VITRO*. Оценка стабильности для диагностики *in vitro*. - Режим доступа: http://www.standartgost.ru/g/ГОСТ_Р_ИСО_23640-2015 (дата обращения 21.03.2021).

36. Готтшалк, Г. Метаболизм бактерий / Г. Готтшалк: перевод с англ. - М.: Мир, 1982. - 310 с.
37. Губарев, Е.М. Биохимия чумного микроба / Е.М. Губарев, Н.Н. Ивановский. - М.: Медгиз, 1958. - 144 с.
38. Гусев, М.В. Микробиология: Учеб. для студ. биол. специальностей ВУЗов - 4-е изд., стер. //М.В. Гусев, Л.А. Минеева - М.: Издательский центр «Академия» - 2003. - 464 с.
39. Дейкина, В.Г. О содержании витаминов группы В в кормовых дрожжах различных предприятий / В. Г. Дейкина, Г.И. Помелова, Н.С. Соболева // Гидролизная и лесохимическая промышленность. - 1984. - №1.- С. 11 - 12.
40. Диагностика особо опасн. и малоизвестн. инфекций (Лабораторные методы исследования). - Ростов-на-Дону: Издательство Ростовского университета, 1970. - 270 с.
41. Диагностические препараты. Каталог продукции. - Оболенск, 2014. - 93 с.
42. Донская, Т.Н. К вопросу о лабораторной диагностике в современных условиях /Т.Н. Донская, А.С. Васенин, И.А. Касьян [и др.] // Холера: Материалы проблемной комиссии Межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону. - 1995. - С. 147 - 148.
43. Дятлов, И.А. Разработка технологии производства дрожжевого автолизата как основы конструирования питательных сред для возбудителей особо опасных инфекций / И.А. Дятлов, Н.Г. Авдеева, О.М. Космоенко // В сб.: Разработка и производство диагностических сухих питательных сред и микротестсистем: Материалы международной научно-практической конференции (Махачкала, 24-25 мая 1998 г.) - Махачкала. - 1998. - С. 18 - 19.
44. Елинов, Н.П. Химическая микробиология / Н.П. Елинов - М.: Высшая школа. 1989, - 448 с.
45. Ерёмин, С.А. Методы и технологии культивирования холерного вибриона / С.А. Ерёмин, Ю.А. Алёшина, А.В. Комиссаров [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 2013.- Вып. 4. - С. 95 - 101.

46. Ефимова, Н.П. Использование биомассы клостридий перфрингенс в производстве питательных сред для культивирования некоторых патогенных бактерий / Н.П. Ефимова, Г.Н. Новосёлова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Материалы 1-го Всесоюзного рабочего совещания. - Махачкала. - 1975. - С. 156 - 158.
47. Заднова, С.П. Штаммы *Vibrio cholerae* с изменённой экспрессией генов вирулентности: Автореф. дисс..... докт. биол. наук: 03.02.03 / Заднова Светлана Петровна - Саратов, 2009. - 45 с.
48. Захарова, Т.Л. Новый эффективный способ получения очищенной В-субъединицы холерного токсина и моноклональных антител к ней / Т.Л. Захарова, Е.А. Михеева, Н.А. Осина // Проблемы особо опасных инфекций - 2015. - Вып. 2. - С. 79 - 82.
49. Иванова, Н.Г. Осветлённый экстракт автолизированных дрожжей – высококачественный препарат для приготовления питательных сред / Н.Г. Иванова, О.А. Сухих, Э.А. Шишкова, Г.Б. Бравова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем. Материалы 3-ей Международной научно-практической конференции (Махачкала, 23-24 мая 2001 г.) - Махачкала. - 2001. - С. 12 - 13.
50. Инструкция по организации и проведению противохолерных мероприятий: офиц. текст. - М.:, 1995. – 71 с.
51. Каминский, Л.С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. Применение статистики в научной и практической работе врача / Л.С. Каминский. - 2-е изд., перераб. и доп. - Л.: Медицина, 1964. - 252 с.
52. Канчух, А.А. Утилизация аминокислот холерными вибрионами при размножении в накопительной дрожжевой среде / А.А. Канчух, М.А. Хазан, Л.Б. Милютина, М.С. Дрожевкина, В.Н. Милютин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 1980. - № 7. - С. 117 - 118.

53. Карпузиди, К.С. Изучение основных биологических свойств чумного микроба при выращивании и длительном хранении его на средах, содержащих стимулятор роста (лизат микробов- «кормушек») / К.С. Карпузиди, А.М. Хохлова // Труды Ростовского-на-Дону государственного научно-исследовательского противочумного института. - Ростов-на-Дону. - 1956.- Т. 10. - С. 60 - 63.
54. Карташёва, Л.Д. Питательные среды для возбудителя чумы и роль пептидов в их стандартизации /Л.Д. Карташёва // Проблемы медицинской и санитарной микробиологии города: Тезисы областной конференции - Ростов-на-Дону. - 1987.- С. 99 - 100.
55. Карташёва, Л.Д. Гидролизат белка пшеничных отрубей – новая основа микробиологических питательных сред и его характеристика / Л.Д. Карташёва, О.В. Шеремет // Проблемы особо опасных инфекций - Саратов, 1994. - Вып. 5. - С. 130 - 138.
56. Козлов, Ю.А. Питательные среды в медицинской микробиологии / Ю.А. Козлов. - М.: Медгиз, 1950. - 252 с.
57. Коробкова, Е.И. Живая противочумная вакцина / Е.И. Коробкова. М.: Медгиз, 1956. - 207 с.
58. Коробкова, Е.И. Микробиология и эпидемиология холеры / Е.И. Коробкова. - М.: Медгиз, 1959. - 304 с.
59. Котенева, Е.А. Основные тенденции использования MALDI-TOF масс-спектрометрии в работе микробиологических и клинических лабораторий / Е.А. Котенева // Материалы IX Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора (Иркутск, 5-7 декабря 2017 г.). - Иркутск. - 2017. - С. 72 - 73.
60. Крушельницкий, Р.В. Использование отходов производства гидролизатов пекарских дрожжей для приготовления белковой питательной среды / Р.В. Крушельницкий, М.В. Антонычева, С.Р. Нижегородцев [и др.] // Международные медико-санитарные правила и реализация глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями в государствах-участниках

- СНГ: Материалы VIII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ (Саратов, 26-27 сентября). - Саратов. - 2007. - С. 236 - 237.
61. Кузнецова, К.Ю. Мировой опыт развития законодательства в области обеспечения безопасности питьевой воды и анализ показателей безопасности питьевой воды и воды водоисточников, учитываемых директивой ЕС «О безопасной воде» / К.Ю. Кузнецова // Здоровье населения и среда обитания. - 2015 - № 7(268). - С. 52 - 55.
 62. Кузькин, Б.П. Исследование клинического материала и проб из объектов окружающей среды по эпидемическим показателям / Б.П. Кузькин, А.Н. Куличенко, О.В. Малецкая [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 2015. - Вып. 2. - С. 17 - 21.
 63. Куклина, Н.Г. Конструирование питательных сред для выделения и индикации бактерий рода *Aeromonas* / Н.Г. Куклина, И.Г. Горшков, Д.А. Викторов, Д.А. Васильев // Вестник ветеринарии. - 2013.- № 1(64). - С.75 - 77.
 64. Лабинская, А.С. Руководство по медицинской микробиологии. Книга II. / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова. - М.: Издательство БИНОМ, 2011. - 1151 с.
 65. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней: Практическое руководство / Под ред. Г. Г. Онищенко, В.В. Кутырева. - М.: ЗАО «ШИКО», 2013. - 560 с.
 66. Ленинджер, А. Биохимия. /А. Ленинджер. - М.: Мир - 1982. - 310 с.
 67. Лобанов, В.В. Плазмокоагулирующие, фибринолитические и протеолитические свойства патогенных и непатогенных холерных вибрионов [Текст] / В.В. Лобанов. В кн.: Актуальные вопросы микробиологии. - М.: - 1970. - С. 80 - 81.
 68. Лобанов, В.В. Получение холерного токсина на среде из очищенного дрожжевого экстракта в различных условиях культивирования. /В.В. Лобанов, В.Н. Милютин, В.А.Копылов [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 1979. - № 5. - С. 24 - 27.

69. Лобанов, В.В. Изучение токсинопродукции при культивировании холерных вибрионов на новых питательных средах [Текст] / В.В. Лобанов, Е.В. Рожков // Микробиология, лабораторная диагностика и специфическая профилактика карантинных инфекций - Саратов. - 1989. - С. 117 - 123.
70. Ломов, Ю.М. Оценка эпидемической значимости свежевыделенных холерных вибрионов с помощью ИФА в варианте двойных антител / Ю.М. Ломов, В.В. Лобанов, О.И. Сальникова // Эпидемиология и инфекционные болезни - 2001. - № 3. - С. 30 - 32.
71. Мазрухо, А.Б. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированной противэпидемической бригады при работе в очаге холеры / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов [и др.] // Здоровье населения и среда обитания. - 2009. - № 11. - С. 8 - 16.
72. Мазрухо, А.Б. Резерв питательных сред специализированной противэпидемической бригады для работы в очаге холеры: проблемы формирования, поддержания и обновления / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону. - 2010.- Вып. 23.- С. 128 - 132.
73. 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, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич // Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. - 2010. - № 3. - С. 75 - 80.
74. 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 // Проблемы особо опасных инфекций - 2011.- № 3(109). - С. 54 - 57.

75. Мазрухо, А.Б. Современные тенденции в области изучения метаболизма и особенностей питания холерных вибрионов. / А.Б. Мазрухо, В.В. Лобанов // Проблемы особо опасных инфекций - 2012. - Вып. 112. - С. 35 - 38.
76. Мазрухо, А.Б. Результаты мониторинга за холерными вибрионами Таганрогского залива Азовского моря в 2011-2012гг. / А.Б. Мазрухо, В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, Э.А. Москвитина, И.С. Шестиалтынова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2013.- № 6. - С.39 - 42.
77. Матвеев, В.Е. Изучение влияния режимов гидролиза белково-витаминных концентратов на состав гидролизатов и их эффективность при синтезе лизина / В.Е. Матвеев, З.М. Зайцева, В.С. Роговер [и др.] // Прикладная биохимия и микробиология. - 1985. - Т. XXI, Вып. 4. - С. 520 - 527.
78. Меньшикова, Е.А. Количественные и качественные изменения микробиоценоза водоёмов г. Ростова-на-Дону в течение года / Е.А. Меньшикова, Е.М. Курбатова, Д.А. Левченко [и др.] // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора. - Ростов-на-Дону. - 2018. - Вып. 31.- С. 86 - 89.
79. Месрбяну, Л. Физиология бактерий / Л. Месрбяну, Э. Пэунеску. - Бухарест: Изд-во «Меридиане», 1963. - 808 с.
80. Методические указания: 4. Методы контроля. Медицинские иммунобиологические препараты. Методы контроля медицинских иммунобиологических препаратов, вводимых людям: МУК 4.1/4.2.588-96 (утверждены заместителем Главного санитарного врача Российской Федерации 31.10.1996). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 1996. - 52 с.
81. Методические указания: Контроль диагностических питательных сред по биологическим показателям для возбудителей чумы, холеры, сибирской язвы, туляремии, бруцеллёза, легионеллёза: МУ 3.3.2.2124-06 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 17.08.2006). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2006. - 22 с.

82. Методические указания: Лабораторная диагностика холеры: МУК 4.2.2218-07 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 31.05.2007). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. - 87 с.
83. Методические указания: Методы контроля бактериологических питательных сред: МУК 4.2.2316-08 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 18.01.2008) М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. - 52 с.
84. Методические указания: Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней: МУК 4.2.2870-11 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 17.05.2011). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2011. - 89 с.
85. Методические указания: Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного регионального уровня: МУК 4.2.3746-22 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 12.05.2022). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. - 39 с.
86. Методические указания: Методы лабораторной диагностики холеры: МУК 4.2.3745-22 (утверждены Главным санитарным врачом Российской Федерации 12.05.2022). М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2022. - 79 с.
87. Методы общей бактериологии. В трёх томах / Под ред. Ф. Герхардта и др.- М.: Мир, 1983. - 536 с.
88. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов /Под ред. В.Н. Милюткина. - Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1981. - 176 с.
89. Мецлер, Д. Биохимия. Т.2 / Д. Мецлер / Под ред. А.Е. Браунштейна, Л.М. Гиномдана, Е.С. Северина. - М.: Мир, 1980. - 606 с.

90. Микробиология и лабораторная диагностика холеры (краткое руководство) / Под ред. М.С. Дрожевкиной и В.Н. Милютин. - Ростов-на-Дону: Ростовское книжное издательство, 1975. - 136 с.
91. Милютин, В.Н. Новая питательная среда из углеводородокисляющих дрожжей для выращивания патогенных микробов / В.Н. Милютин, Н.Ф. Касаткин, Л.Б. Елисова, М.С. Дрожевкина, А.А. Канчух, Н.Г. Ованесова, Н.Л. Кириллова [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 1975. - № 6. - С. 30 - 34.
92. Милютин, В.Н. Методические указания по приготовлению и применению дрожжевых питательных сред для диагностики холеры / В.Н. Милютин, Л.Б. Елисова, Т.И. Харитоновна [и др.] - Ростов-на-Дону: , 1975. - 8 с.
93. Милютин, В.Н. Разработка сухой основы питательных сред из кормовых углеводородокисляющих дрожжей для бактериологических целей. Сообщ.1. Способ очистки водного экстракта кормовых дрожжей и получение экстракта в сухом виде / В.Н. Милютин, В.А. Копылов, А.Б. Габрилович [и др.] // Разработка и стандартизация микробиологических питательных сред для диагностики инфекционных заболеваний и производство медико-биологических препаратов: Тезисы координационного совещания (Махачкала, 22-24 сентября 1982 г.) - Махачкала. - 1982. - С. 117 - 118.
94. Москвитина, Э.А. Холера в период седьмой пандемии: особенности эпидемиологии и профилактики / Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, О.Л. Адаменко [и др.] // Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2012.- Вып. № 25 - С. 17 - 22.
95. Неклюдов, А.Д. Получение белковых гидролизатов с заданными свойствами / А.Д. Неклюдов, С.М. Навашин // Прикладная биохимия и микробиология. - 1985. - Т. XXI, Вып. 1 - С. 3 - 17.
96. Нестерова, Г.Ф. Дрожжи / Г.Ф. Нестерова, Я.О. Соом, К.С. Петровский, М.А. Самсонов – Б.М.Э. – М.: Советская энциклопедия. - 1977. - С. 485 - 489.
97. Нетрева, Т.М. Питательная среда из эмбрионального белка для выращивания возбудителя чумы / Т.М. Нетрева, В.И. Вейнблат, Т.П. Боровикова, Л.С.

- Зимарина // Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. - Саратов. - 1991. - С. 145 - 149.
98. Никанорова, Б.А. Производственные питательные среды на основе ферментативных гидролизатов, полученных с использованием протеолитически активных дрожжевых автолизатов вместо панкреатина / Б.А. Никанорова, Л.А. Коротеева // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Материалы 1-го Всесоюзного рабочего совещания. - Махачкала. - 1975.- С. 160 - 162.
99. Никифоров, А.К. Разработка питательных сред на основе непищевого сырья для глубинного культивирования штаммов холерного вибриона / А.К. Никифоров, М.В. Антонычева, О.В. Волох [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 2015. - Вып. 1. - С.85 - 88.
100. Новаковская, С.С. Справочник технолога дрожжевого производства /С.С. Новаковская. – М.: Пищевая промышленность, 1973. - 288 с.
101. Носкова, Л.И. Сухая казеиновая среда для выращивания холерного вибриона / Л.И. Носкова, Л.И. [и др.] // Доклады Иркутского противочумного института. - Иркутск. - 1962.- № 4. - С. 78 - 81.
102. Овсова, Л.М. Влияние различных аминокислот и солей аммония в составе синтетической питательной среды на продукцию холерного энтеротоксина /Л.М. Овсова, А.Б. Мазрухо, Ю.М. Ломов [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 2003.- № 3. - С. 16 - 21.
103. Овчаров, А.К. Гидролиз сухих дрожжей *Candida guilliermondii* ферментами *Actinomyces rimosus* / А.К.Овчаров, М.О. Рожанский, А.И. Семиолов // Прикладная биохимия и микробиология - 1971. - № VII. - С. 19 - 23.
104. Олли, В.Д. К вопросу о культивировании холерного вибриона на жидких питательных средах / В.Д. Олли, Л.С. Петрова // Труды института «Микроб». - Саратов. - 1958.- № 2. - С. 360 - 370.
105. Определитель бактерий Берджи. 9-е изд. М.: Мир, 1997. - Т. 1.- 450с.

- 106.Павлович, С.А. Медицинская микробиология в графах / С.А. Павлович - Мн.: Высшая школа, 1986. - 255 с.
- 107.Патент РФ 2375440 Российская Федерация, МПК C12N 1/16 Способ получения автолизата дрожжей / Оганесянц Л.А., Бакулин В.П., Рейтблат Б.Б., Дубинчук Л.В., Соколов А.А., Чапликене В.И.; заявитель и патентообладатель «Всероссийский научно-исследовательский институт пивоваренной, безалкогольной промышленности» Российской академии сельскохозяйственных наук. № 20071140827/13 заявл. 07.11.2007; опубл. 20.05.2009 - 7 с.
- 108.Плоскирев, Н.В. Руководство по микробиологической диагностике инфекционных болезней / [Н.В. Плоскирев [и др.]; под общ. ред. К.И. Матвеева; редкол. Т.И. Буланова [и др.]. Изд. 2-е, перераб. и доп. - М.: Медицина, 1973. - 624 с.
- 109.Поляк, М.С. Питательные среды для медицинской и санитарной микробиологии / М.С. Поляк, В.И. Сухаревич, М.Э. Сухаревич - СПб.: ЭЛБИ - СПб. - 2008. - 352 с.
- 110.Прокофьева, Т.И. Подбор питательных сред для выращивания холерного вибриона / Т.И. Прокофьева // Материалы по обмену опытом. - М.: 1960. - 2(58). - С. 10 - 17.
- 111.Раскин, Б.М. Питательные среды, состояние и перспективы разработок / Б.М. Раскин // Сборник трудов: Разработка и стандартизация бактериологических питательных сред. - М.: - 1980. - С. 3 - 9.
- 112.Рожков, Е.В. Азотистая питательная основа из изолята белка шрота семян подсолнечника / Е.В. Рожков, В.А. Копылов, А.В. Гончаров [и др.] // Актуальные вопросы разработки препаратов медицинской биотехнологии: Тезисы конференции (Махачкала, 26-27 мая 1988 г.) - Махачкала. -1988. - С.20 - 21.
- 113.Саяпина, Л.В. Обеспечение препаратами, предназначенными для профилактики и диагностики холеры / Л.В. Саяпина, И.В. Касина, И.С.

- Барулина // Холера и патогенные для человека вибрионы: Юбилейный выпуск. - Ростов-на-Дону. - 2009. - Вып. 22.- С. 138-140.
- 114.Смирнова, Н.И. Эволюция генома возбудителя холеры / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология - 2010. - № 4 - С. 11 - 19.
- 115.Смирнова, Г.А. Изучение влияния пептидного и аминокислотного состава питательных основ на параметры роста микроорганизмов / Г.А. Смирнова, В.А. Мельникова, Б.М. Раскин, Е.Л. Целигорова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 1987. - № 11. - С. 26 - 30.
- 116.Справочник по микробиологическим питательным средам / Под ред. М.М. Меджидова. - М.: Медицина, 2003. - 203 с.
- 117.Старцева, О.Л. Совершенствование биотехнологии производства питательных сред для культивирования чумного микроба на основе сырья животного и растительного происхождения: Автореферат дисс... канд. биол. наук: 03.02.05 / Старцева Ольга Леонидовна. - Ставрополь, 2005. - 21 с.
- 118.Стейниер, Р. Мир микробов. Т.2 / Р. Стейниер, Э. Эдельберг, Дж. Ингрэм. М.: Мир, 1979. - 320 с.
- 119.Татаринова, С.Д. Основные питательные среды, их использование в работе с энтеробактериями / С.Д. Татаринова. М.: Медицина, 1980. - 28 с.
- 120.Телесманич, Н.Р. Роль лектинов в изменчивости холерных вибрионов (биотехнологические аспекты использования) / Н.Р. Телесманич, Ю.М. Ломов, А.Б. Мазрухо // Главный врач. - 2011. - № 3 (26). - С. 58 - 61.
- 121.Телишевская, Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л.Я. Телишевская. М.: Аграрная наука, 2000. - 295 с.
- 122.Тимаков, В.Д. Микробиология / В.Д. Тимаков. М.: Медицина, 1973. - 431 с.
- 123.Титова, С.В. Ситуация по холере в мире в 2018 году, прогноз на 2019 год. Научное обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, О.С. Чемисова, Р.В. Писанов [и др.] // Холера и патогенные для

- человека вибрионы: Сборник статей проблемной комиссии. - Ростов-на-Дону. - 2019. - Вып. 32. - С. 12 - 21.
- 124.Ткаченко, И.Н. Разработка технологий получения гидролизатов из молок лососевых рыб / И.Н. Ткаченко, Л.Д. Тимченко, Л.С. Катунина, О.Л. Старцева // Современные аспекты эпидемиологического надзора за особо опасными инфекционными заболеваниями на Юге России: Материалы научно-практической конференции (Ставрополь, 21-22-марта 2007г.) - Ставрополь. - 2007.- Ч. 11. - С. 137 - 139.
- 125.Трофименко, Н.З. Питательные среды на дрожжевых гидролизатах для выращивания холерных вибрионов / Н.З. Трофименко, З.И. Васильева, Л.С. Минаева, А.Д. Сафонова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Материалы 1-го Всесоюзного рабочего совещания. - Махачкала. - 1975. - С. 23 - 25.
- 126.Фердман, Д.Л. Биохимия / Д.Л. Фердман. М.: Высшая школа, 1966. - 643 с.
- 127.Фаддеева, Т.Д. Холера и борьба с ней / Т.Д. Фаддеева. М.: Медгиз, 1959. - 230 с.
- 128.Фараджаева, Е.Д. Производство хлебопекарных дрожжей / Е.Д. Фараджаева, Н.А. Болотов. СПб.: Профессия, 2002. – 168 с.
- 129.Хаптанова, Н.М. Сравнительная оценка гидролизатов как основы при конструировании питательной среды для культивирования *Listeria monocytogenes* / Н.М. Хаптанова, А.С. Остязк, С.В. Лукьянова, В.И. Кузнецов, Н.М. Андреевская, С.Н. Адамович, И.А. Ушаков, С.В. Юденич, С.В. Балахонов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2021. - Т. 98, № 4. - С. 481 - 485.
- 130.Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований / Под ред. А.С. Лабинской [и др.] - М.: Медицина, 2005. - 600 с.
- 131.Черкасова, Л.С. Питательная среда для выделения *Neisseria meningitidis* / Л.С. Черкасова, И.С. Королёва, И.М. Грубер [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии - 2008.- № 1. - С.69 - 71.

132. Шамсудинова, Б.М. Технология получения экстракта хлебных дрожжей на основе продукции Махачкалинского дрожжевого завода /Б.М. Шамсудинова // Актуальные вопросы разработки и производства диагностических питательных сред и тест-систем: Материалы 3-й Международной научно-производственной конференции (Махачкала, 23-24 мая 2001 г.) - Махачкала. - 2001. - С. 24 - 25.
133. Шарова, И.Н. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней / И.Н. Шарова, Е.С. Казакова, С.А. Портенко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций - 2013. - Вып. 2. - С. 46 - 48.
134. Шепелин, А.П. Использование унифицированной белковой основы при производстве питательных сред для диагностики ООИ / А.П. Шепелин, М.В. Храмов, М.Н. Мартовецкий [и др.] // Чрезвычайные ситуации международного значения в общественном здравоохранении и санитарная охрана территорий государств-участников СНГ: Материалы VII Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ. - Оболенск. - 2006. - С. 255 - 256.
135. Шепелин, А.П. Роль и место микробиологии в решении вопросов модернизации здравоохранения / А.П. Шепелин, И.А. Дятлов. Оболенск: А-Принт, 2012. - 111 с.
136. Шепелин, А.П. Питательные среды. Справочник бактериолога / А.П. Шепелин, А.Ю. Миронов, К.А. Шепелин. М.:, 2015. - 195 с.
137. Шлегель, Г. Общая микробиология / Г. Шлегель. М.: Мир, 1987. - 567 с., ил.
138. Щипелева, И.А. Аналитический обзор результатов научно-исследовательской работы ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора за период с 2010 по 2014гг. / И.А. Щипелева, С.В. Титова, В.Д. Кругликов [и др.] // Современные аспекты изучения особо опасных и других инфекционных болезней: Материалы научно-практической конференции, посвящённой 80-летию Ростовского-на-Дону научно-

- исследовательского противочумного института. - Ростов-на-Дону: Мини Тайп. - 2014. - С. 12 - 25.
- 139.Энциклопедический словарь медицинских терминов. / Под ред. Б.В. Петровского: в трёх томах: М.: Советская энциклопедия, 1982.
- 140.Эртуганова, З.Л. Некоторые рекомендации по рациональному использованию хлебных дрожжей в производстве сухих питательных сред / З.Л. Эртуганова, Л.Д. Газиумарова // Разработка новых и усовершенствование существующих сухих диагностических и производственных питательных сред, их стандартизация и методы контроля: Материалы 1-го Всесоюзного рабочего совещания. - Махачкала. - 1975. - С. 86 - 88.
- 141.Abbott, S.L. The Genus *Aeromonas*: Biochemical Characteristics, Atypical Reactions, and Phenotypic Identification Schemes / S.L. Abbott, W.K.W. Cheung, J.M. Janda // J. of Clin. Microbiol. - 2003. - Vol. 41, № 6. - P. 2348 - 2357.
- 142.Abuaita, B.H. Bicarbonate induces *Vibrio cholerae* virulence gene expression by enhancing ToxT activity / B.H. Abuaita, J.H. Whithey //Infect. Immun. - 2009. - Vol.77, № 9. - P. - 4111 - 4120.
- 143.Abulhassan, A.M. Baker's yeast quality evaluation for repacking and storage under Sudan condition / A.M. Abulhassan, A.S. Sayied // J. Applied and Industrial Sciences. - 2013. - Vol. 1, № 2. - P. 6 - 15.
- 144.Agarwala, S. The enzymatic of glutathione of *Vibrio cholerae* / S. Agarwala, V. Moban Rao, D. Shrivastava // Experientia (Basel). - 1953. - № 9. - P. 257 - 259.
- 145.Agarwala, S.C. Metabolism of purine and pyrimidine compounds by Vibrios / S.C. Agarwala, C.R.K. Murti, D.L. Shrivastava // Enzymologia - 1954. - Vol. 16, № 5. - P. 322 - 328.
- 146.Afsar, A. Sugars inhibit expression of the rugose phenotype of *Vibrio cholerae* / A. Afsar, J.G.Morris, J.A.Johnson // J. Clin. Microbiol. - 2005. - Vol. 43. - P. 1426 - 1429.
- 147.Atlas, R. Handbook of microbiological media For Examination of Food / R. Atlas, L. Parks / Boca Raton, Fla.: CRC Press inc., 1993. - P. 356.

148. Benktander, J. The repertoire of glycosphingolipids recognized by *Vibrio cholerae* / J. Benktander, O. Angström, H. Karlsson [et al.] // PLoS One. - 2013. - Vol. 8, № 1. - P. 53999 - 5400.
149. Bergey's manual of systematic bacteriology 2nd Ed. Vol. 2. The Proteobacteria. Part B. The Gammaproteobacteria / Garrity G. Holt (editor). - Springer, 2005. - P. 1106.
150. Bonev, S.I. Comparative Study of Media for Determination of Lysine Decarboxylase Activity / S.I. Bonev, Z. Zakhariev, P. Gentchev // Appl. Microbiol. - 1974. - Vol. 27, № 3. - P. 464 - 468.
151. Breker, M. A novel single-cell screening platform reveals proteome plasticity during yeast stress responses / M. Breker, M. Gymrek, M. Schuldiner // J. Cell Biology. - 2013. - Vol. 200, № 6. - P. 839 – 850.
152. Brennan, T.C.R. Physiological and transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to d-limonane show changes to the cell wall but not to the plasma membrane / T.C.R. Brennan, J.O. Krömer, L.K. Nielsen // Appl. Environ. Microbiol. - 2013. - Vol. 79, № 12. - P. 3590 - 3600.
153. Burrows, W. Cholera toxins: Quantitative of the frog skin reaction and its relation to experimental enteric toxicity / W. Burrows, G.M. Musteikis, N.B. Oza, N.K. Dutta // J. Infect. Dis. - 1965. - Vol. 115, № 8. - P. 1 - 15.
154. Cakar, Z.P. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for improved industrially important properties / Z.P. Cakar, B. Turanly-Yildiz, C. Alkim // FEMS Yeast Res. - 2012. - Vol. 12, № 2. - P. 171 - 182.
155. Callahan, L. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence II. Skin permeability factor (cholera enterotoxin production in chemically defined media) / L. Callahan, N. Ryder, S. Richardson // Infect. Immun. - 1971. - Vol. 4, № 5. - P. 611 - 618.
156. Callahan, L. Biochemistry of *Vibrio cholerae* virulence. III. Nutritional requirements for toxin production and the effects of pH on toxin elaboration in chemically defined media / L. Callahan, S. Richardson // Infect. Immun. - 1973. - Vol. 7, № 4. - P. 567 - 572.

- 157.Clement, T. Metabolic responses of *Saccharomyces cerevisiae* to valine and ammonium pulses during four - stage continuous wine fermentation / T. Clement, M. Perez, J.R. Mouret [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. - 2013. - Vol. 79, № 8. - P. 2749 - 2758.
- 158.Coelho, A. A proteome reference map for *Vibrio cholerae* by 2DE and MALDI-TOF MS/MS / A. Coelho, de Oliveira Santos E., M.L. Faria, D.P. de Carvalho, W.M. von Kruger [et al.] // Wei Sheng Wu Xue Bao. - 2009. - Vol. 49, № 6. - P. 746 - 758.
- 159.Comstock, L.E. The capsule and O Antigen in *Vibrio cholerae* O139 Bengal are Associated with a Genetic Region Not Present in *Vibrio cholerae* O1 /L.E. Comstock, D. Maneval, Jr., P. Panigahi, A. Joseph, M.M. Levine, J.B. Kaper, J.G. Morris Jr., J.A. Johnson // Infect. and Immun.- 1995. - Vol. 63, № 1 - P. 317-323.
- 160.Crèpin, L. Nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases / L. Crèpin, T. Nidelet, J. Sanchez et al. // Appl. Environ. Microbiol. - 2012. - Vol.78, № 22. - P. 8102 - 8111.
- 161.DaSilva, N.A. Introduction and expression of genes for metabolic engineering application in *Saccharomyces cerevisiae* / N.A. DaSilva, S. Sriknshnan // FEMS Yeast Res. - 2012. - Vol. 12, № 2. - P. 197 - 214.
- 162.De, S.N. Enterotoxicity of bacteria-free culture-filtrate of *V.cholerae* / S.N. De // Nature. - 1959. - Vol. 183. - № 4674. - P.73 - 74.
- 163.Difco & BBL Manual. Manual of Microbiological Culture Media; Ed. Mary Jo Zimbro [et al.] - 2nd Ed. - BD Diagnostic Systems, 7 Loveton Circle Sparks, MD 21152, 2009. - 700 p.
- 164.Difco Culture media and reagents for microbiology and clinical laboratory procedures. - PO BOX 1058A, Detroit Mi 48232 USA, 1992. - 130 p.
- 165.Dueñas-Sánchez, R. Transcriptional regulation of fermentative and respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* industrial baker's strains / R. Dueñas-Sánchez, G. Guhérrez, A.V. Rincón et al. // FEMS Yeast Res. - 2012. - Vol. 12, № 6. - P. 625 - 636.

166. Edward, J.E. Jr. Recent innovative studies with *Saccharomyces* / J.E. Edward Jr. // J. Med. Microbiol. - 2012. - Vol. 61, № 7. - P. 895 - 903.
167. Erdem, B. Biochemical identification and numerical taxonomy of *Aeromonas spp.* isolated from food samples in Turkey / B. Erdem, E. Kariptas, E. Cil, K. Isik // Turk. J. Biol. - 2011. - Vol. 35, № 1. - P. 463 - 472.
168. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* / S.M. Faruque, M.J. Albert, J.J. Mekalanos // Microbiol. Mol. Biol. Rev. - 1998. - Vol. 62. - P. 1301 - 1314.
169. Felsenfeld, O. Review of recent trends in research and control of cholera / Ed. by O. Felsenfeld. - Geneva: WHO, 1965. - 73 p.
170. Finkelstein, R.A. Nutrient requirements of *Vibrio cholerae* / R.A. Finkelstein, C.E. Lankford // Bact. Proc. - 1955. - G. 60.- P. 49.
171. Finkelstein, R.A. Crystalline cholera toxin and toxoid / R.A. Finkelstein, J.J. Lospalluto // Science. -1972. - Vol. 175, № 4021. - P. 529 - 530.
172. Gèlinas, P. Inventionals on Baker's Yeast strains and speciality ingredients / P. Gèlinas // Recent Patents on Food, Nutritional Agriculture. - 2009. - Vol. 1, № 2. - P.104 - 132.
173. Guerrant, R.L. Cyclic adenosine monophosphate and alternation of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive *in vitro* assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* / R.L. Guerrant, L.L. Burton, T.C. Schnaitan, L.I. Redhun, A.G. Gilman // Infect. Immun.. - 1974. - Vol. 10. - P. 320 - 327.
174. Hanscho, M. Nutritional requirements of the BY of *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications // M. Hanscho, D.E. Ruckebauer, N. Chauhan [et al.] // FEMS Yeast Res. - 2012. - Vol. 12, № 7. - P. 796 - 808.
175. Henley, E.C. Protein quality evaluation by protein digestibility-corrected amino acid scoring / E.C. Henley, J.M. Keister // Food Technology. - 1994. - № 4. - P. 74 - 77.

176. International Center for Diarrheal Research, Bangladesh Cholera Group. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal // Lancet. - 1993. - № 342. - P. 387 - 390.
177. Iwanaga, M. New medium for the production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 biotype *El Tor* / M. Iwanaga, T. Kuyyakanond // J. Clin. Microbiol. - 1985. - Vol. 22, № 3. - P. 405- 408.
178. Iwanaga, M. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water / M. Iwanaga, T. Kuyyakanond // J. Clin. Microbiol. - 1987. - Vol. 25, № 12. - P. 2314 - 2316.
179. Janda, J.M. *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity and Infection / J. Michael Janda and Sharon L. Abbott // Clin. Microbiol. Rev. - 2010. - Vol. 23 - № 1. P. 35-73.
180. Kang-Mu, Lee Activation of cholera toxin production by anaerobic respiration of trimethylamine N-oxide in *Vibrio cholerae* / Kang-Mu Lee, Yongin Park, Wasimul Bari et al. // J. Biol. Chem. - 2012. - Vol. 287, № 47. - P. 39742 - 39752.
181. Kaper, J.B. Cholera / J.B. Kaper, J. G. Morris Jr., M.M. Levine // Clin. Microbiol. Rev. - 1995. - Vol. 22, № 6. - P. 48 - 86.
182. Kayshner, C.A. *Vibrio* [Электронный ресурс] / C.A. Kayshner, De Paola Angelo Jr. // In: Bacteriological Analytic Manual, 2004. Режим доступа: <http://www.fda.gov/food and drug/ bacteriological analytic manual chapter 9>.
183. Kligler, I.J. A simple medium for the differentiation of members of the typhoid-paratyphoid group / I.J. Kligler // Am. J. Public Health. - 1917. - Vol. 7, P. 1042 - 1044.
184. Koch, W. A cholera medium with more than tenfold yield / W. Koch, D. Kaplan // Bull. Health Org. - 1952. - Vol. 7, № 3. - P. 353 - 356.
185. Krishna Murti, C.R. Enzyme activity of soluble cytoplasmatic fraction of *Vibrio cholerae* with special reference to aldolase, isocitrate, glucose-6-phosphate & malic dehydrogenase/ C.R. Krishna Murti // Indian J. of Biochemistry - 1964. - Vol. 1, № 2. - P. 61 - 65.
186. Kusama, H. Production of biologically active substances by two strains of *Vibrio cholerae* / H. Kusama, J.P. Craig // Infect. Immun. - 1970. - Vol. 1, № 1. - P. 80 -87.

187. Lesmana, M. The evaluation of alkaline peptone water for enrichment of *Vibrio cholerae* in feces / M. Lesmana, R.C. Rockhill, D. Sutanti, A. Sutomo // South Asian J. Trop. Med. Publ. Health. - 1985. - Vol. 16, № 2. - P. 265 - 267.
188. Li, Yi. Engineering of TEV protease variants by yeast ER sequestration screening (YESS) of combinatorial libraries / Yi. Li, M.C. Gerbard, Li Qing [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. - 2013. - Vol. 210, № 18. - P. 7229 - 7234.
189. Manual of BBL products and laboratory procedures. 6th Ed., 1991. - 172 p.
190. Manual of clinical microbiology/Ed. in Chef Murray P.R. / ASM Press: Washington D.C., 1999. - 2700p.
191. Merck Microbiology Manual 12th Ed., 2005. - 688 p.
192. Methods. 8th Ed. / C.H. Collins, P.M. Lyan, J.M. Grange, J.O. Falkinham III. - London: Hodder Heading Group. Arnold, 2004. - 355 p.
193. Microbiology Manual. MERCK, LPRO UBA - V, 1996.-316p.
194. Mishra, A. Mutation in *tcp R* gene (Vc 0832) of *Vibrio cholerae* O1 causes loss of tolerance to high osmolarity and affects colonization and virulence in infant mice // A. Mishra, R. Shrivastava, C. Pruzzo, B.S. Shrivastava // J. Med. Microbiol. - 2003. - Vol. 52, P. 933 - 939.
195. Moeller, V. Simplified tests for some Amino Acid decarboxylases and for the Arginine Dihydrolase System / V. Moeller // Acta Pathol. Microbiol. Scand. – 1955. - Vol. 36, № 2. - P. 158 - 172.
196. Nair, G.B. Spread of *Vibrio cholerae* O139 Bengal in India / G.B. Nair, T. Ramamurthy, S.K. Bhattacharya, A.K Mukopadhy, S. Garg, M.K. Bhattacharya, T. Takeda, T. Shimada, B.C. Deb // J. Infect. Dis. - 1994. - № 169. - P. 1029-1034.
197. O'Brien, Maru. Modified taurocholate-tellurite-gelatin agar for improved differentiation of *Vibrio* species / Maru O'Brien, R. Colwell // J. Clin Microbiol. - 1985. - Vol. 22, № 6. - P. 1011 - 1013.
198. Ogawa, N. Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical and physiologic features / N. Ogawa, Chi-Meng Tzeng, C. D. Fraley, A. Kornberg // J. Bacteriol., 2000. - Vol. 182, № 23. - P. 6687 - 6693.

- 199.Orozco, H. Oxidative stress tolerance, adenilate cyclase, and autophagia are key in the chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* during winemaking / H. Orozco, E. Matallana, A. Aranda // Appl. Environ. Microbiol. - 2012. - Vol. 78, № 8. - P. 2748 - 2757.
- 200.Pazzaglia, G. High Frequency of Coinfecting Enteropathogens in Aeromonas-Associated Diarrhea of Hospitalized Peruvian Infants / G. Pazzaglia, R.B. Sack, E. Salazar et. al. // J. of Clin. Microbiol. - 1991. - Vol. 29, № 6. - P. 1151 - 1156.
- 201.Ramamurthy, T. Emergence of novel strain of *Vibrio cholerae* potential in southern and eastern India / T. Ramamurthy, S. Garg, R. Sharma, S.K. Bhattacharya, G.B. Nair, T. Shimada, T. Takeda, T. Karasawa, H. Kuzamo, A. Pal, Y. Takeda // Lancet. - 1993. - № 341. - P. 703 - 704.
- 202.Richardson, S.H. Factors influencing in vitro skin permeability factor production by *Vibrio cholerae* / S.H. Richardson // J.Bacteriol. - 1969. - Vol. 100, № 1. - P. 27 - 34.
- 203.Richardson, S.H. Factors influencing toxigenicity in *Vibrio cholerae* / S.H. Richardson // Symp. on cholera. - Tokyo, 1971. - P. 34 - 43.
- 204.Russel, F.F. The isolation of typhoid bacilli from urine and feces with the description of a new double sugar tube medium / F.F. Russel // J. Med. Res. - 1911. - Vol. 25. - P. 217.
- 205.Ryan, K.J. Sherris Medical Microbiology 4th ed. / K.J. Ryan, C.G. Ray (editors) / Mc Grow Hill. - 2004. - 979 p.
- 206.Shi, R.P.R. Evidence supporting predicted metabolic pathways for *Vibrio cholerae*: gene expression data and clinical tests / R.P.R. Shi, G.K. Schoolnik [et al.] // Nucleic Acids Res.. - 2006. - Vol. 34, № 8. - P. 2438 - 2444.
- 207.Silva, A.J. Contribution of hemagglutinin/protease and motility to the pathogenesis of *El Tor* biotype cholera / A.J. Silva, G.J. Leitch, A. Camilli, J.A. Benitez // Infect. Immun. - 2006. - Vol. 74. - P.2074 - 2079.
- 208.The HiMedia Manual for Microbiology Laboratory Practice. - HiMedia Laboratories Pvt Ltd., 1998. - 524 P.
- 209.The Oxoid Manual. 3rd Ed. (revised). - OXOID Ltd., Tonbridge, Kent, 1979. - 295 p.

210. The OXOID MANUAL. 9th Ed. / Compiled by E.Y. Bridson - OXOID Ltd., Wade Road, Basingstoke, Hampshire, RG24 8PW, England. - 2006. - 624 p.
211. Thompson, F.L. Biodiversity of Vibrios / F.L. Thompson, T. Iida, J. Swings // Microbiol. and Mol. Biol. Rev. - 2004. - Vol. 68, № 3. - P. 403 - 431.
212. Votruba, J. Application of modified Rosenbrock's method for optimization of nutrient media used in microorganism culturing / J. Votruba, P. Pilát, A. Prokop // Biotechnol. Bioeng. - 1975. - Vol. XVII, № 12. - P. 1833 - 1837.
213. Wkly Epidem. Rec. 2014. – Cholera. Vol. 89, № 31. - P. 345 - 355. - Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/242249>.
214. Wordend, Z. Trophic regulation of *Vibrio cholerae* in coastal marine water / Z. Wordend, M. Slidel, S. Smirza [et al.] // Environ. Microbiol. – 2006. - Vol. 8, № 1. - P. - 21-29.

СПИСОК НАУЧНЫХ ПУБЛИКАЦИЙ

1. **Каминский, Д.И.** Изучение возможности использования ХДС-агара для культивирования и выделения холерных вибрионов / **Д.И. Каминский**, А.Б. Мазрухо, К.К. Рожков, 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) Координационного 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, **Д.И. Каминский**, Л.М. Овсова, Л.П. Алексеева // В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2002. - Вып. 15. - С. 41 - 42.
3. Мазрухо, А.Б. Новая накопительная питательная среда 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 сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2002. - Вып. 15. - С. 81 - 82.
4. **Каминский, Д.И.** Результаты использования нового комплекса сред для диагностики холеры при исследовании проб воды на территории Ростова-на-Дону в 2000-2001 г.г. / **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. Мазрухо, А.Б. Новая накопительная питательная среда ХДС-Н для культивирования и выделения холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, К.К. Рожков, К.Б. Криваченко, Л.М. Овсова, Б.Л. Мазрухо, В.Д. Кругликов, И.С. Шестиалтынова, Э.Г. Цедова, О.Г. Булахова, С.С. Хвацева / В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2002. - Вып. 16. - С. 239 - 241.
 6. **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.**
 7. Мазрухо, А.Б. Результаты использования комплекса сред для культивирования и выделения холерного вибриона на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей при мониторинге водных объектов г. Ростова-на-Дону в 2000-2003 годах / А.Б. Мазрухо, **Д.И. Каминский**, К.К. Рожков, В.Д. Кругликов, Б.Л. Мазрухо, Л.М. Овсова, К.Б. Криваченко, И.С. Шестиалтынова, Е.П. Авдеева, В.В. Лобанов, Э.Г. Цедова, О.Г. Булахова, Л.И. Анисина // В сборнике: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии (46.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2003. - Вып. 16. - С. 81 - 83.
 8. **Мазрухо, А.Б. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора**

- при работе в очаге холеры / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков, И.М. Алутин, В.Д. Кругликов, Ю.М. Пухов, В.И. Прометной, А.В. Тришина // **Здоровье населения и среда обитания.** - 2009. - № 11. - С. 8 - 16.
9. Мазрухо, А.Б. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических 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 (109). - С. 75 - 80.
 10. Мазрухо, А.Б. Результаты использования нового комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения специализированной противоэпидемической бригады / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков // **Известия высших учебных заведений: Северо-Кавказский регион. Естественные науки.** - 2011. - № 3. - С. 101 - 105.
 11. Мазрухо, А.Б. Сравнительная оценка белковых гидролизатов в аспекте создания 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 // **Клиническая лабораторная диагностика.** - 2011. - № 6. - С. 48 - 52.
 12. Мазрухо, А.Б. Результаты использования нового комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения специализированной противоэпидемической бригады / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Ю.М. Ломов, Н.Р. Телесманич, К.К. Рожков // **Проблемы особо опасных инфекций.** - 2011. - № 3 (109). - С. 54 - 57.
 13. Мазрухо, А.Б. Преимущества и перспективы использования панкреатического перевара пекарских дрожжей в качестве основы питательных сред для холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, В.В. Лобанов // В сборнике: **Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы**

проблемной комиссии (46.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. - Ростов-на-Дону, 2012. - Вып. 25. - С. 53 - 55.

14. **Каминский, Д.И.** Совершенствование питательных сред для выращивания некоторых возбудителей опасных инфекций / **Д.И. Каминский, К.К. Рожков, В.В. Лобанов, А.Б. Мазрухо** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 2017. - № 2. - С. 104 - 110.
15. 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 со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России (Ростов-на-Дону, 24 октября 2017 г.). - Ростов-на-Дону, 2017. - С. 206 - 212.
16. **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» МЗ Краснодарского края (Краснодар, 31 мая - 1 июня 2018 г.). - Краснодар, 2018. - С. 100 - 102.
17. Соков, Д.В. Изучение питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» в ходе её клинических испытаний / Д.В. Соков, **Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, О.Г. Сокиркина, В.В. Лобанов** // В сборнике: Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы XII Всероссийской

- научно-практической конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора (Ростов-на-Дону, 21-22 октября 2020 г.). - Ростов-на-Дону, 2020. - С. 413 - 415.
18. Мазрухо, А.Б. Изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» при проведении её 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.
 19. 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.
 20. Мазрухо, А.Б. Изучение эффективности питательной среды «Аргинин-железо-сахарозный агар» в ходе мониторинга поверхностных водоёмов и сточных вод на наличие холерного вибриона / А.Б. Мазрухо, Д.И. Каминский, Л.М. Овсова, О.Г. Сокиркина, 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 им. Ю.А. Овчинникова. - 2021. - Т. 17, № 2. - С. 69 - 75.
 21. Каминский, Д.И. Разработка технологии изготовления панкреатического гидролизата пекарских дрожжей как основы питательных сред холерного вибриона / Д.И. Каминский, А.Б. Мазрухо, Д.В. Соков // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. - 2024. - Т. 20, № 4. - С. 6 - 14.
 22. 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., Алутин 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.

23.Патент 2392310 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01) C12Q 1/04 (2006.01). Среда для обогащения холерного вибриона / Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин 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.

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