

На правах рукописи

Змеева Татьяна Алексеевна

Повышение эффективности методов санитарно-микробиологических исследований воды с использованием современных мембранных технологий и способов детекции

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Санкт-Петербург – 2017

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном военном образовательном учреждении высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Малышев Владимир Васильевич

Официальные оппоненты:

Кветная Ася Степановна – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Детский научно-клинический центр инфекционных болезней Федерального медико-биологического агентства», отдел медицинской микробиологии и молекулярной эпидемиологии, ведущий научный сотрудник отдела

Червинец Вячеслав Михайлович – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра микробиологии и вирусологии с курсом иммунологии, заведующий кафедрой

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в __.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.046.01 в Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, доцент

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Решение проблемы обеспечения населения безопасной в эпидемическом отношении доброкачественной водой является одной из важных задач в системе санитарно-эпидемиологического надзора. Актуальность темы исследования связана с нарастающим влиянием антропогенных факторов контаминации водных объектов окружающей среды возбудителями кишечных инфекций (Онищенко Г.Г., 2005; Онищенко Г.Г. и соавт. 2007, 2014; Рахманин Ю.А. и соавт., 2006, 2016; Кафтырева Л.А. и соавт., 2012; Попова А.Ю., 2014; Малышев В.В. и соавт., 2003, 2015, 2017).

Около 80% всех острых кишечных инфекций у взрослых и детей в мире обусловлено контактом с инфицированной микроорганизмами водой или нарушением санитарно-гигиенических норм при её использовании (Покровский В.И. и соавт., 1999; Тихомирова О.В. и соавт., 2003; Железова Л.И. и соавт., 2015; Мурзабаева Р.Т. и соавт., 2015; Гречанинова Т.А. и соавт., 2016).

Основными мероприятиями, направленными на снижение риска водного пути передачи кишечных патогенов, являются своевременные профилактические мероприятия, основанные на оценке качества воды по микробиологическим критериям (Рахманин Ю.А. и соавт., 2001; Alonso E. et al., 2001; Недачин А.Е. и соавт., 2005; Сбойчаков В.Б., 2007).

В практику санитарной микробиологии всё шире внедряются технологии мембранной фильтрации для решения задач, которые трудно или экономически нецелесообразно решать другими методами. Основное применение фильтрующих мембран в санитарной микробиологии воды — это концентрирование микроорганизмов на их поверхности (Барсов К.К., 1932; Kittigul L. et al., 2001; Малышев В.В. и соавт., 2016; Рахманин Ю.А. и соавт., 2016).

Проблема обеспечения качественной питьевой водой крайне важна для Вооружённых сил Российской Федерации, других силовых структур. Необходимость проведения лабораторного контроля качества воды в отрыве от базовых лабораторий в эпидемических очагах, при чрезвычайных ситуациях (катастрофы, наводнения, землетрясения, пожары), локальных вооруженных конфликтах, террористических актах и других ситуациях стоит в основе разработки и применения доступных, специфических, простых, надежных методов пробоподготовки и детекции кишечных бактерий и вирусов (Бокарев М.А., 2007; Малышев В.В., 2003; 2016).

Совершенствование методов санитарно-микробиологических исследований воды, за счет использования фильтрующих материалов, эффективных по извлекаемости микроорганизмов из воды, и современных методов их детекции, повысит оценку качества воды по микробиологическим критериям, будет способствовать снижению рисков водного пути передачи кишечных патогенов и минимизации заболеваемости населения острыми кишечными инфекциями.

Степень разработанности темы исследования

Необходимость комплексного лабораторного обследования водных объектов с определением бактериологических и вирусологических показателей связана с эпидемиологическими рисками водного пути передачи кишечных патогенов и установлением их этиологической структуры. Метод мембранной фильтрации для санитарно-микробиологического исследования воды используется и в России, и во многих странах мира. Этот метод рекомендован ВОЗ (WHO, 2004), методическими документами Роспотребнадзора РФ в качестве основного метода пробоподготовки воды (МУ 4.2.1018-01, МУК 4.2.1884-04). Постоянно развивающаяся техника мембранно-сорбционной фильтрации и синтез новых модифицированных мембран позволяют считать этот метод наиболее перспективным. При этом основой в выборе фильтрующих материалов служит такой параметр, как эффективность извлекаемости микроорганизмов из воды.

Появление новых мембран из разных синтетических материалов требуют дополнительного микробиологического изучения (Недачин А.Е. с соавт., 2005). Отсутствие достоверной информации об их эффективности приводит к расхождению между результатами санитарно-микробиологических исследований качества воды и реальной контаминацией воды бактериями и вирусами, что может быть причиной искажения эпидемиологического значения воды при анализе причин и условий возникновения заболеваний кишечными инфекциями.

Повышение требований к лабораторному контролю качества воды в стационарных и полевых условиях, при чрезвычайных ситуациях, отсутствие новых практических и теоретических исследований о пробоподготовке воды методом мембранной фильтрации, недостаток информации о материалах фильтрующих мембран и факторах, влияющих на результаты извлечения бактерий и концентрирования вирусов из воды, а также их детекции, с учетом значительной актуальности острых кишечных инфекций с водным путем передачи патогенов, явились основой настоящего исследования.

Цель исследования — определить микробиологическую значимость пробоподготовки воды фильтрующими материалами при проведении санитарно-микробиологического контроля водных объектов с использованием современных методов детекции.

Задачи исследования:

1. Оценить эффективность извлекаемости *Escherihia coli* из воды различными микрофильтрационными мембранами, методами вакуумной и напорной фильтрации.

2. Исследовать результативность концентрирования ротавирусов в режимах вакуумной и напорной фильтрации в воде с использованием разных микрофильтрационных мембран, в том числе капроновых мембран с положительным зарядом.

3. На основании использования различных методов обнаружения маркеров ротавирусов (антигенов и рибонуклеиновой кислоты) в элюатах воды оценить эффективность реакции агглютинации латекса и метода иммунохроматографического анализа в детекции вирусной контаминации воды.

4. Изучить эффективность применения фильтрационных мембран для пробоподготовки и обнаружения санитарно-показательных и патогенных микроорганизмов в водных объектах окружающей среды в натуральных исследованиях.

5. Разработать макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде в полевых условиях и оценить его работу.

Научная новизна

Впервые в экспериментальных условиях на основе изучения извлекаемости *E. coli* из воды современными фильтрующими материалами со средним диаметром пор 0,45 мкм и 0,2 мкм показана различная эффективность мембран из ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, смеси сложных эфиров целлюлозы, полиамида при вакуумной и напорной фильтрации. Приведены данные о меньшей эффективности удержания *E. coli* фильтрующими мембранами из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,2 мкм, в сравнении с теми же мембранами со средним диаметром пор 0,45 мкм. Установлено влияние микрофильтрационных полиамидных мембран на процессы изменчивости *E. coli* в виде R-модификации колоний на среде Эндо и уменьшения ферментативной активности.

Впервые научно обоснована наибольшая эффективность концентрирования ротавирусов вакуумной фильтрацией из воды, в сравнении с напорной фильтрацией, что было подтверждено микробиологическими методами (полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ, иммунохроматографический анализ, реакция агглютинации латекса).

Разработан макет переносного малогабаритного комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде, который включает установку для проведения микробиологического анализа водных сред и установку для концентрирования ротавирусов и бактериофагов из природных водных источников (получено уведомление о положительном результате формальной экспертизы заявки на изобретение, регистрационный № 2017108402 от 14.03.2017 г. и решение о выдаче патента на полезную модель, регистрационный № 2017108400 от 14.03.2017 г.). Разработанный макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде позволяет проводить санитарно-бактериологический и санитарно-вирусологический контроль водных объектов на месте отбора проб, что сокращает время получения предварительного результата по определению *E. coli* до 12 часов и детекции ротавирусов до 2,5-3 часов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Новые данные об эффективности фильтрующих материалов в отношении извлекаемости *E. coli* и концентрирования ротавирусов из воды позволяют повысить эффективность использования мембранных технологий в санитарно-микробиологических исследованиях воды. Полученные результаты различной эффективности фильтрующих материалов при напорной и вакуумной фильтрации для пробоподготовки санитарно-микробиологических исследований воды обосновывают необходимость использования фильтрующих материалов с применением вакуумной фильтрации.

Новые сведения о влиянии микрофльтрационных полиамидных фильтров с размером пор 0,2 мкм, при извлечении *E. coli* из воды, на процессы изменчивости *E. coli* имеют эпидемиологическое значение, так как изменение ее типичных свойств искажает результаты оценки реальной микробной загрязненности воды.

Использование инновационных экспериментальных микрофльтрационных мембран из капрона с положительным зарядом (Капрон+, 0,2 мкм) для концентрирования ротавирусов из воды в режиме вакуумной фильтрации позволило получить их концентрацию большую, чем при использовании известных в практике фильтрующих мембран из полиамида на порядок; в результате проведена эффективная детекция в элюатах ротавирусных маркеров (антигены) экспресс-тестами (метод иммунохроматографического анализа и реакция агглютинации латекса).

Полученные результаты экспериментальных исследований эффективности микрофльтрационных материалов для концентрирования ротавирусов из воды свидетельствуют о возможности применения простых и относительно недорогих методов детекции (иммунохроматографический анализ, реакция агглютинации латекса) при проведении санитарно-вирусологических исследований воды.

Применение разработанного макета комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде дает возможность проводить оценку безопасности водопользования населения, военнослужащих Вооружённых сил Российской Федерации, других силовых структур с достаточной эффективностью и низкими экономическими затратами в полевых условиях, в различных экстремальных ситуациях, в разных климатогеографических зонах, и осуществлять мониторинг водных объектов окружающей среды с необходимой кратностью исследований.

Материалы исследования реализованы в следующих формах:

- подготовлено учебное пособие «Использование мембранных технологий в санитарной микробиологии» (в соответствии с Планом редакционно-издательской деятельности Главного Военно-медицинского управления Минобороны России на 2016 год от 31.12.2015 г.);

- подготовлен раздел проекта методических рекомендаций для Вооруженных сил РФ по инновационной пробоподготовке возбудителей острых кишечных инфекций в водных объектах окружающей среды с помощью фльтрационных мембранных технологий и методов детекции.

Основные положения диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедрах: микробиологии; общей и военной эпидемиологии; общей и военной гигиены (с курсом военно-морской и радиационной гигиены) федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации (акт внедрения № 194 от 14.07.2017 г.). Предложенные методики по экспресс-детекции маркеров (антигены) возбудителей острых кишечных вирусных инфекций и подсчету *E. coli* в пробах воды внедрены в повседневную работу ФГКУ «985 ЦГСЭН» Минобороны России (акт внедрения № 3 от 22.02.2017 г.), в практику работы Центра исследования воды МУП города Череповца «Водоканал» (акт внедрения № 1 от

17.02.2017 г.) и Санкт-Петербургского научно-исследовательского центра экологической безопасности Российской академии наук (акт внедрения № 1 от 20.03.2017 г.).

Методология и методы исследования

Методология настоящего исследования определена проблемами, связанными с необходимостью усовершенствования приемов и методов санитарно-микробиологического контроля воды различных водных объектов. Диссертационное исследование выполнено в соответствии с паспортом научной специальности 03.02.03 – микробиология, области исследований: п.п. 2, 3, 10.

Предметом изучения были пористые микрофильтрационные материалы в виде дисков из различных синтетических полимеров. Анализ научной литературы, посвящённой оценке извлекающих свойств мембран, используемых для извлечения *E. coli* и концентрирования ротавирусов из воды, проведён на основе формально-логических методов исследования. В работе использованы бактериологические, молекулярно-генетические, электронно-микроскопические, иммунологические и статистические методы исследования.

Объём проведенных исследований

Проведены следующие экспериментальные исследования: определение эффективности извлечения фильтрующими материалами (ФМ) *E. coli* из воды — 1830, определение эффективности концентрирования ротавирусов — 4840. Изучена эффективность применения мембран в натуральных исследованиях, с использованием ФМ исследовано 282 пробы воды на определение санитарно-бактериологических и санитарно-вирусологических показателей качества воды. А также проведен ретроспективный анализ лабораторных данных, полученных из гидролого-гидрохимических и санитарно-бактериологических станций акваторий комплекса защитных сооружений Санкт-Петербурга от наводнений, Невской губы и восточной части Финского залива за период 2006–2014 гг. — 2304 пробы воды (Таблицы 1 и 2).

Таблица 1 — Направления, объём, объекты и методы бактериологических исследований

Тип исследований	Направление исследований	Объекты исследований	Методы исследований	Объём исследований
Экспериментальные	Изучение эффективности сорбции <i>E. coli</i> на исследуемых фильтрующих материалах (ФМ)	Модельный водоем <i>E. coli</i>	Бактериологический посев методом мембранной фильтрации (ММФ)	930
	Изучение эффективности извлекаемости <i>E. coli</i> на исследуемых ФМ	Модельный водоем <i>E. coli</i>	Бактериологический посев ММФ	930
Санитарно-бактериологические	Изучение эффективности мембран из нитрата целлюлозы в натуральных исследованиях	Вода поверхностных источников	Бактериологический посев ММФ на показатели: <i>E. coli</i>	282
			Общие колиформные бактерии (ОКБ)	282
			Термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ)	282
			бактерии рода <i>Salmonella</i>	282
			Определение колифагов	282

Таблица 2 — Направления, объем, объекты и методы вирусологических исследований

Тип исследований	Направление исследований	Объекты исследований	Методы исследований	Объем исследований			
				определение частиц норовирусов	определение частиц ротавирусов	определение маркеров ротавирусов	определение маркеров вируса гепатита А
Экспериментальные	Определение частиц вирусов в воде	Модельные водоемы вирусов	ЭМ	25	30	-	-
	Изучение эффективности сорбции вирусов на изучаемых ФМ	Фильтраты модельных водоемов	ОТ-ПЦР ИФА ИХА РАЛ	- - - -	- - - -	720 720 720 -	- - - -
	Изучение эффективности элюции вирусов на изучаемых ФМ	Элюаты модельных водоемов	ЭМ ОТ-ПЦР ИФА ИХА РАЛ	- - - - -	20 - - - -	- 750 750 950 230	- - - - -
Санитарно-вирусологические	Изучение эффективности мембран Капрон+, 0,2 мкм в натуральных исследованиях	Вода поверхностных источников (элюаты)	ОТ-ПЦР	-	-	282	282
			ИФА	-	-	282	282
			ИХА	-	-	282	-
			РАЛ	-	-	282	-

Штаммы микроорганизмов

При проведении экспериментальных исследований по изучению эффективности извлечения бактерий на ФМ, выполненных на различной сырьевой и технологической основе, в качестве бактериальной модели использовали штамм *E. coli* M17-02 (номер штамма в «ГКПМ - Оболенск» В-2929, ФБУН ГНЦ ПМБ). Штамм *E. coli* M17-02 рекомендован для контроля эффективности ФМ методическими указаниями МУ 2.1.4.1057-01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды».

Исследования по изучению эффективности концентрирования вирусов на фильтрующих мембранах проводили на модели ротавирусов человека HRV/SPb/884/10/05 из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава РФ. Вирусы были выделены на культуре MA104 и прошли 5 пассажей.

Фильтрующие мембраны предоставлены ЗАО «Владисарт» (Россия) (Таблицы 3 и 4).

Таблица 3 – Типы и характеристики фильтрующих мембран для извлечения *E.coli* M17-02

№ пп	Тип мембраны	Материал фильтра	Диаметр пор, мкм	Примечание
1	ФМАЦ-0,2 мкм	Ацетат целлюлозы	0,2	Рабочая поверхность – глянцевая сторона
2	ФМАЦ-0,45 мкм	Ацетат целлюлозы	0,45	Мембрана без подложки
3	ФМНЦ-0,2 мкм	Нитрат целлюлозы	0,2	Структура симметрична
4	ФМНЦ-0,45 мкм	Нитрат целлюлозы	0,45	Структура симметрична
5	ФМСЕ-0,45 мкм	Смесь сложных эфиров целлюлозы	0,45	Структура симметрична
6	ФМПА-0,2 мкм	Полиамид	0,2	Рабочая поверхность – глянцевая сторона

Таблица 4 – Типы и характеристики фильтрующих мембран для концентрирования ротавирусов из воды

№ пп	Тип мембраны	Материал фильтра	Диаметр пор, мкм	Примечание
1	ФМПА-0,2 мкм	Полиамид	0,2	Рабочая поверхность – глянцевая сторона
2	ПЭС-0,2 мкм	Полиэфирсульфон	0,2	Рабочая поверхность – глянцевая сторона
3	Капрон +,0,2 мкм	Капрон (экспериментальный материал)	0,2	Рабочая поверхность – глянцевая сторона
4	ФМСЕ- 0,22 мкм	Смесь сложных эфиров целлюлозы	0,22	Структура симметрична

Изучали эффективность пористых микрофильтрационных мембран в виде дисков диаметром 35 мм в отношении извлечения из воды *E. coli*, а также диаметром 142 мм в отношении концентрирования ротавирусов.

Методы исследования

В работе использовали методики: извлечение бактерий из воды бактериологическим посевом методом мембранной фильтрации; концентрирование вирусов напорной и вакуумной мембранной фильтрацией проб воды с последующим определением вирусных маркеров. Фильтрацию жидкостей проводили на специальных фильтрационных установках, состоящих из разного типа устройств, напорного или вакуумного насосов, и оснасток для мембран. В пробоподготовке воды на бактериологические показатели использовали приборы для фильтрации ПФФ-35 (ЗАО «Владисарт», Россия), ПФФ 35/4Б (ООО НПП «БМТ», Россия). С целью концентрирования вирусов использовали установку, которая включала фильтродержатель АСФ-011 для плоских фильтров диаметром 142 мм (ЗАО «Владисарт», Россия).

Бактериологические исследования проводили при оценке эффективности фильтрующих мембран в отношении извлечения бактерий. Эффективность извлекаемости *E.coli* из воды мембранными фильтрами определяли путем сравнения числа колоний микроорганизмов, выросших на стандартной питательной среде (агар Эндо, ООО «НИЦФ», г. Санкт-Петербург, ТУ 9385-053-39484474-2012) в результате прямого поверхностного посева суспензии культуры *E. coli* М 17-02, и числа колоний, выросших на этой же среде в результате бактериологического посева способом мембранной фильтрации, при соблюдении требований методических указаний МУ 2.1.4.1057-01 «Организация внутреннего контроля качества санитарно-микробиологических исследований воды» и ГОСТ 31955.1-2013 «Вода питьевая. Обнаружение и количественный учет *E. coli* и колиформных бактерий. Часть I. Метод мембранной фильтрации».

Эффективность концентрирования ротавирусов мембранными фильтрами, изучали путем исследования полученных фильтратов и элюатов, после фильтрации через мембраны модельных водоемов, на наличие их маркеров — антигенов (Рота-Аг) и рибонуклеиновой кислоты (РНК) ротавирусов. Определяли эффективность сорбции по наличию маркеров вирусов в исходной взвеси, и их

присутствию или отсутствию в фильтрате; эффективность элюции — по наличию или отсутствию маркеров в элюате. Для обнаружения вирусных маркеров использовали методы: полимеразная цепная реакция со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), иммуноферментный анализ (ИФА), иммунохроматографический анализ (ИХА), реакция агглютинации латекса (РАЛ).

Молекулярно-генетические исследования на выявление и дифференциацию РНК ротавирусов методом ОТ-ПЦР проводили с помощью коммерческой тест-системы «АмплиСенс® ОКИ скрин-FL» («Интерлабсервис», Москва) в соответствии с инструкцией производителя на детектирующем амплификаторе «ДТ-322» («ДНК-Технология», Россия) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Иммунологические методы применяли для определения антигенов. Антиген ротавирусов определяли методом ИФА на фотометре для микропланшет «BioRad-680» (США) тест-системой «Ротавирус-антиген-ИФА-БЕСТ» («Вектор-БЕСТ», Россия), а также иммунохроматографическими тестами SIMPLE/STICK ROTA-ADENO и SIMPLE/STICK ROTA-NORO (ESPANA), и в РАЛ — диагностикумом латексным для выявления ротавирусного антигена «Ротаскрин-латекс-тест» (ЗАО «ЭКОлаб», Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Электронной микроскопией подтверждали наличие вирусных частиц ротавирусов в модельных водоемах и полученных элюатах. Режимы электронно-микроскопического исследования кишечных вирусов отработаны на электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL, Япония) в соответствии с методиками, описанными в руководстве Doane F.W., 1994 г.

Апробацию микрофильтрационных мембран из нитрата целлюлозы и капрона с положительным зарядом проводили при исследовании проб, отобранных на гидролого-гидрохимических и санитарно-бактериологических станциях акваторий комплекса защитных сооружений Санкт-Петербурга от наводнений, Невской губы и восточной части Финского залива в 2015 году в режиме ежемесячного мониторинга. Определяли показатели бактериальной контаминации воды: общие колиформные бактерии (ОКБ), термотолерантные колиформные бактерии (ТКБ), *E. coli*, колифаги, патогены — возбудители кишечных инфекций рода *Salmonella*, а также маркеры вирусов — антиген и РНК ротавирусов группы А, антиген и РНК вируса гепатита А. Санитарно-микробиологические исследования проводили в соответствии с санитарными правилами и нормами по гигиеническим требованиям к качеству поверхностных вод СанПиН 2.1.5.980-00 «Гигиенические требования к охране поверхностных вод», методическими указаниями МУ 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов» и МУК 4.2.2029-05 «Санитарно-вирусологический контроль водных объектов».

Статистические методы обработки данных

Обработку полученных данных в экспериментальных и натурных исследованиях проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Office 2007. Используются приемы описательной статистики с определением числовых характеристик сгруппированных данных (определение средней арифметической

величины \bar{x} . Проверку гипотез проводили с определением стандартной ошибки среднего значения m_x . Достоверность результатов оценивали по t-критерию Стьюдента для вероятности 95%, результаты считали достоверными при $p < 0,05$. Применяли графический анализ связей методом построения гистограмм между различными показателями данных лабораторных исследований.

Личное участие автора в получении результатов

Личное участие соискателя заключалось в формулировании проблемы, постановке цели и задач исследования, их решении, анализа литературных данных, планировании и проведении экспериментов, статистической обработке и анализе полученных результатов. Автором выполнен весь объем бактериологических, иммунологических, молекулярно-генетических исследований. Подготовка модельных растворов, пробоподготовка, мембранная фильтрация воды, микробиологические исследования *E. coli*, рода *Salmonella*, колифагов и др.; обнаружение антигенов ротавирусов методами: ИФА, ИХА, РАЛ; молекулярно-генетические исследования (выделение РНК, постановка, учет и интерпретация результатов ОТ-ПЦР) проведены соискателем самостоятельно в лаборатории кафедры микробиологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова и микробиологической лаборатории ФГКУ «985 ЦГСЭН» Минобороны России.

Работы по повышению эффективности реакции агглютинации латекса для выявления ротавирусного антигена проведены совместно со специалистами ЗАО «ЭКОлаб» Е.А. Амелиной, И.А. Ермолаевой, О.Н. Леонтьевой под руководством профессора С.Г. Марданлы. Электронная микроскопия проведена в ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России совместно с к. б. н. А.К. Сироткиным и д. м. н. В.В. Малышевым.

Отбор проб в акваториях Невской губы и восточной части Финского залива, комплекса защитных сооружений Санкт-Петербурга от наводнений выполнен совместно со специалистами НИЦЭБ РАН к. б. н. А.Н. Шаровым и к. ф.-м. н. А.В. Ивановым.

Разработка макета универсального комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных микроорганизмов в воде, а также оценка работы его отдельных блоков и тестов, проведены совместно с профессором кафедры микробиологии, д. м. н. В.В. Малышевым и заведующим кафедрой микробиологии, д. м. н., профессором В.Б. Сбойчаковым Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова, генеральным директором ЗАО «Владисарт», к. т. н. Е.Е. Каталевским и специалистом предприятия – И.М. Куликовым.

Положения, выносимые на защиту:

1. При проведении санитарно-микробиологических исследований воды для обнаружения и количественного учета колиформных бактерий и *E. coli* с помощью бактериологического посева методом мембранной фильтрации аналитически более эффективны мембраны из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним размером пор 0,45 мкм, из имеющихся эфирцеллюлозных материалов с различным диаметром пор (0,2 мкм и 0,45 мкм) и других.

2. Установлена наибольшая эффективность концентрирования ротавирусов при вакуумной мембранной фильтрации, чем при напорной фильтрации, с использованием микробиологических методов (ПЦР, ИФА, ИХА, РАЛ) определения ротавирусных маркеров.
3. Показана возможность применения экспресс-тестов (метод иммунохроматографического анализа и реакция агглютинации латекса) для обнаружения маркеров ротавирусов (антигены) в элюатах воды при проведении санитарно-микробиологических исследований с использованием экспериментальных положительно-заряженных мембран из капрона с диаметром пор 0,2 мкм в режиме вакуумной фильтрации.

Степень достоверности и апробация результатов

О достоверности результатов свидетельствует использование сертифицированных микробиологических, иммунологических, молекулярно-генетических методов исследования, которые характеризуются высокой чувствительностью и специфичностью, а также поверенного оборудования. Объем проведенных исследований позволил провести статистическую обработку полученных данных.

Апробация диссертации проведена на межкафедральном совещании федерального государственного бюджетного военного образовательного учреждения высшего образования «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова» Министерства обороны Российской Федерации от 22 марта 2017 года, протокол № 3.

Материалы исследования доложены на: Российско-Китайской научно-практической конференции по медицинской микробиологии и клинической микологии (Санкт-Петербург, 2015 г.; 2016 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Новые методы экспресс-диагностики микроорганизмов в медицине, фармации, ветеринарии и экологии» (Санкт-Петербург, 2015 г.); научно-практической конференции «Лабораторная диагностика в решении проблем современной клинической медицины» (Санкт-Петербург, 2015 г.); заседании отделения Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов в Санкт-Петербурге и Ленинградской области (Санкт-Петербург, 2016 г.); «3-м Азиатско-Тихоокеанском конгрессе по военной медицине» (Санкт-Петербург, 2016 г.); II Национальном конгрессе бактериологов «Состояние и тенденции развития лабораторной диагностики инфекционных болезней в современных условиях» (Санкт-Петербург, 2016 г.); «Международной конференции по медицине катастроф и военной медицине» (Дюссельдорф, 2016 г.); трехстороннем форуме «Gulf of Finland Trilateral Scientific Forum» (Хельсинки, 2016 г.); Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 15-летию образования НИЦ ВМедА имени С.М. Кирова «Современные проблемы охраны здоровья военнослужащих» (Санкт-Петербург, 2016 г.); Научной конференции, посвященной тематике водоснабжения и водоотведения малых и средних городов: «Практические вопросы снижения себестоимости и улучшения качества предоставления услуг в условиях природно-климатических изменений» (Череповец, 2017 г.); Российской научно-практической конференции

«Актуальные проблемы инфекционной патологии» (Санкт-Петербург, 2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции «Инновации в медицинской, фармацевтической, ветеринарной и экологической микробиологии» (Санкт-Петербург, 2017 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных работ: 3 статьи опубликованы в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и 7 тезисов в рецензируемых изданиях.

Структура диссертации. Материалы диссертации изложены на 134 страницах машинописного текста, иллюстрированы 10 таблицами и 31 рисунком. Диссертация состоит из введения, включающего методы исследования, обзора литературы, 4 глав описания результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспектив дальнейшей разработки темы, списка сокращений, списка литературы, приложений. Список литературы включает 160 работ, из них 103 отечественных и 57 иностранных публикаций.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Изучение эффективности сорбции *E. coli* М17-02 из воды фильтрующими материалами

После фильтрации модельных водоемов вакуумной и напорной фильтрацией через ФМ, определяли общее количество колоний *E. coli*, выросших на фильтрах, в сравнении с прямым посевом. Результаты роста *E. coli* на исследуемых ФМ и на чашках Петри со средой Эндо прямым посевом после инкубации в течение (21 ± 3) ч при 37 C^0 представлены на рисунке 1.

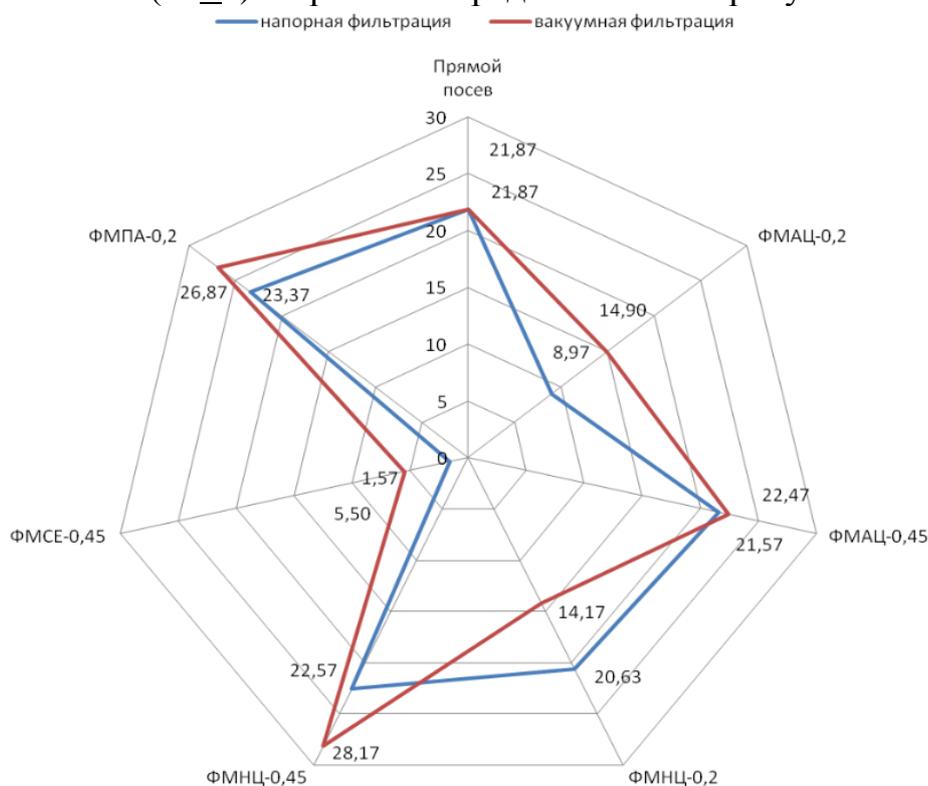


Рисунок 1 – Среднее количество колоний *E. coli* на исследуемых фильтрах в зависимости от типа фильтрации, в сравнении с прямым посевом, КОЕ (n=30)

Графическая обработка полученных результатов выявила наибольшую сорбцию бактерий на поверхности мембран ФМАЦ-0,45 мкм, ФМНЦ-0,45 мкм,

ФМПА-0,2 мкм при вакуумной и напорной фильтрации, а также на мембране ФМНЦ-0,2 мкм при напорной фильтрации; что достоверно больше, чем при прямом посеве ($p < 0,001$). Определена низкая сорбционная способность при различных условиях фильтрации у мембраны ФМСЕ-0,45, что достоверно меньше, чем выделение *E. coli* при прямом посеве ($p < 0,001$).

Анализ сравнительного изучения количества типичных колоний *E. coli*, выросших на фильтре и при прямом посеве, представлен в таблице 5.

Таблица 5 — Среднее количество общего числа и типичных колоний *E. coli* М17-02, выросших на различных фильтрующих мембранах*

Вид мембраны	Среднее количество колоний при напорной фильтрация ($\bar{x} \pm m_x$, n=30)		Среднее количество колоний при вакуумной фильтрация ($\bar{x} \pm m_x$, n=30)	
	Всего, КОЕ	Типичные, КОЕ	Всего, КОЕ	Типичные, КОЕ
ФМАЦ-0,2 мкм	8,97 \pm 0,66**	4,53 \pm 0,35	14,90 \pm 0,97**	3,73 \pm 0,36
ФМАЦ-0,45 мкм	21,57 \pm 0,28**	21,57 \pm 0,28	22,47 \pm 1,27**	22,47 \pm 1,27
ФМНЦ-0,2 мкм	20,64 \pm 1,40**	6,87 \pm 0,58	14,17 \pm 0,09**	6,20 \pm 1,32
ФМНЦ-0,45 мкм	22,57 \pm 1,51**	22,57 \pm 1,51	28,17 \pm 1,54**	26,43 \pm 1,07
ФМСЕ-0,45 мкм	1,57 \pm 0,36**	1,57 \pm 0,36	5,50 \pm 0,47**	5,50 \pm 0,47
ФМПА-0,2 мкм	23,37 \pm 1,40**	0	26,87 \pm 1,70**	0

Примечание: * — Рост на плотной питательной среде при прямом посеве — 21,87 КОЕ \pm 1,42; ** — $p < 0,001$, в сравнении с прямым посевом

Выявлены особенности роста *E. coli* на ФМ из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,2 мкм, а именно, наряду с типичными колониями был отмечен рост мелких колоний, которые в соответствии с МУ 2.1.4.1057-01 не учитываются. Мелкие темно-красные колонии на среде Эндо по МУК 4.2.1884-04 требуют дополнительного подтверждения на принадлежность к колиформным бактериям, и возможно образованы фильтрующими и «гипометаболическими» формами *E. coli*.

Рост колоний *E. coli*, сорбированных на поверхности фильтра ФМПА-0,2 мкм, характеризовался диссоциацией колоний в R-форму (процент диссоциации составил 100% при n=30, $p < 0,001$, в сравнении с прямым посевом); все колонии были бледно-розовые, без металлического блеска. Фильтры из полиамида со средним диаметром пор 0,2 мкм имели достаточную сорбционную способность, при этом рост колоний *E. coli* только в R-форме со сниженной ферментативной активностью микроорганизма затруднял в последующем подсчет колоний на поверхности фильтрующих мембран, что привело к искажению результатов реальной микробной загрязненности воды.

Оценка эффективности различных фильтрующих мембран в отношении извлечения бактерий

Сравнительная оценка удержания *E. coli* фильтрующими материалами показала наибольшую эффективность извлекаемости мембранами из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм (Рисунок 2).

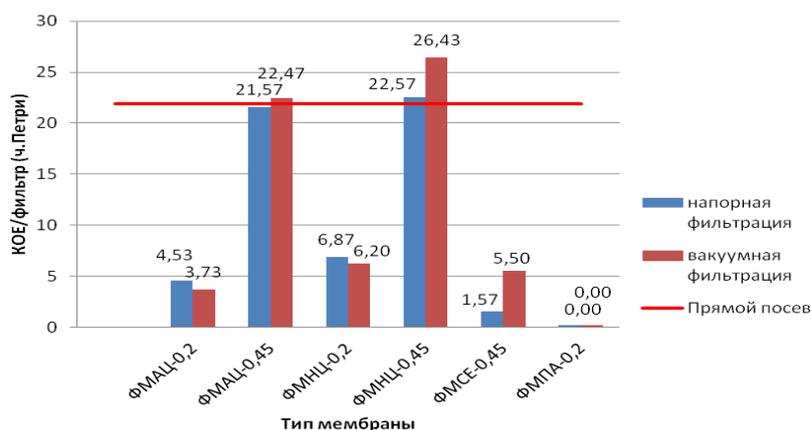


Рисунок 2 – Среднее количество типичных колоний *E. coli* на исследуемых фильтрационных мембранах, в сравнении с прямым посевом, КОЕ (n=30)

Результаты сорбции и эффективности извлекаемости *E. coli* на фильтрах ФМАЦ-0,2 мкм, ФМАЦ-0,45 мкм, ФМНЦ-0,2 мкм, ФМНЦ-0,45 мкм, ФМСЕ-0,45 мкм, ФМПА-0,2 мкм имели отличия при вакуумной и напорной фильтрации ($p > 0,05$). Наибольшая эффективность извлекаемости для мембран ФМАЦ-0,45 мкм, ФМНЦ-0,45 мкм отмечена при вакуумной фильтрации. Результаты эффективности ФМ при напорной и вакуумной фильтрации представлены на рисунках 3 и 4.

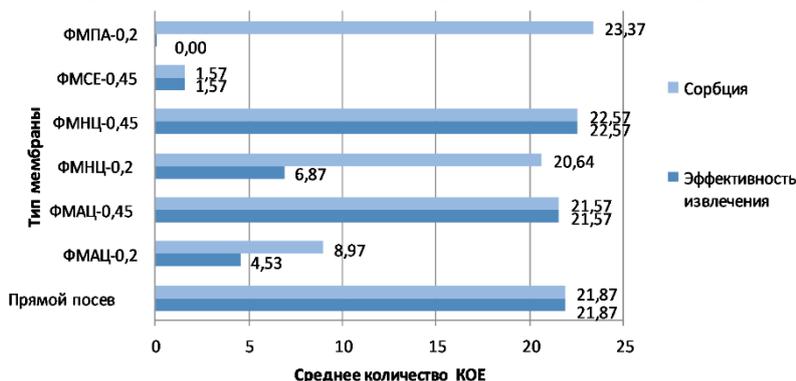


Рисунок 3 – Эффективность сорбции и извлекаемости *E. coli* фильтрующими мембранами при напорной фильтрации



Рисунок 4 – Эффективность сорбции и извлекаемости *E. coli* фильтрующими мембранами при вакуумной фильтрации

В результате экспериментальных исследований по оценке эффективности различных фильтрующих мембран при извлечении *E. coli* из воды методом мембранной фильтрации установлено, что наибольшей извлекаемостью

(удержанием) среди изученных мембран обладают мембраны из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45.

Наибольшая извлекаемость *E. coli* фильтрующими мембранами ФМАЦ-0,45 мкм и ФМНЦ-0,45 мкм получена при вакуумной фильтрации.

Изучение концентрирования ротавирусов из воды различными микрофильтрационными материалами

Эффективность сорбции ротавирусов ФМ из воды определяли по наличию их рибонуклеиновой кислоты и ротавирусных антигенов в фильтратах (Таблица 6).

Таблица 6 — Результаты определения маркеров ротавирусов в фильтратах воды

Объем проб воды, мл	Концентрация ротавирусов в 1 мл пробы	Материал мембран				Методы исследования
		ФМПА-0,2 мкм, n=30	ПЭС-0,2 мкм, n=30	Капрон+,0,2 мкм, n=30	ФМСЕ-0,22 мкм, n=30	
10,0	10 ⁷	-/-/+	-/+/+	-/-/+	-/+/+	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
100,0	10 ⁶	-/-/+	-/+/+	-/-/+	-/+/+	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
1000,0	10 ⁵	-/-/+	-/+/+	-/-/+	-/+/+	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР

Примечание: «-» — отрицательный результат; «+» — положительный результат

Результаты определения маркеров ротавирусов в фильтратах воды, представленные в таблице 6, не отличались при вакуумной и напорной фильтрации. Наибольшая сорбция ротавирусов выявлена на полиамидных мембранах: ФМПА-0,2 мкм и Капрон+,0,2 мкм; при их использовании маркеры ротавирусов детектированы в фильтратах методом ОТ-ПЦР и не определены методом ИФА, что графически изображено на рисунке 5.

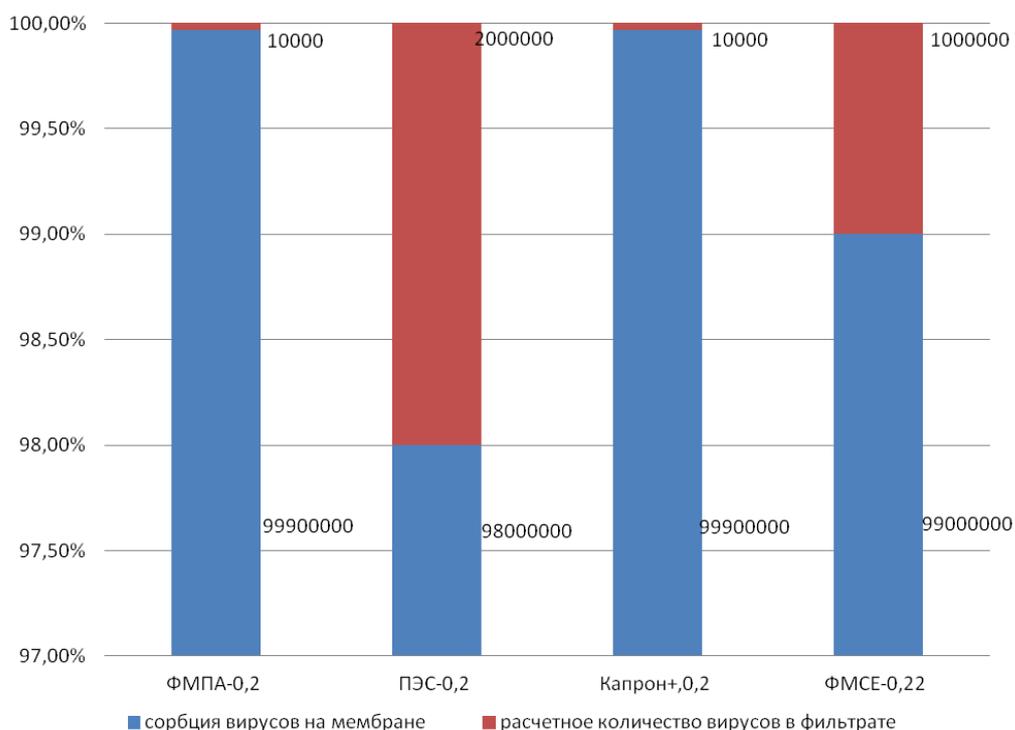


Рисунок 5 – Графическая характеристика сорбции ротавирусов на исследуемых мембранах при фильтрации 100 мл контаминированной ротавирусами воды в концентрации не 10^6/мл, n=30

Полученные элюаты исследовали на антигены и РНК ротавирусов (Таблицы 7 и 8).

Таблица 7 — Результаты определения маркеров ротавирусов в элюатах воды при напорной фильтрации

Объем воды, с концентрацией 10^7 вирионов/мл, мл	Материал мембран				Методы исследования
	ФМПА-0,2 мкм, n=30	ПЭС-0,2 мкм, n=30	Капрон+,0,2 мкм, n=30	ФМСЕ-0,22 мкм, n=30	
10,0	- / + / +	- / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
100,0	- / + / +	- / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
1000,0	- / + / +	- / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР

Примечание: «←» — отрицательный результат; «+» — положительный результат

Таблица 8 — Результаты определения маркеров ротавирусов в элюатах воды при вакуумной фильтрации

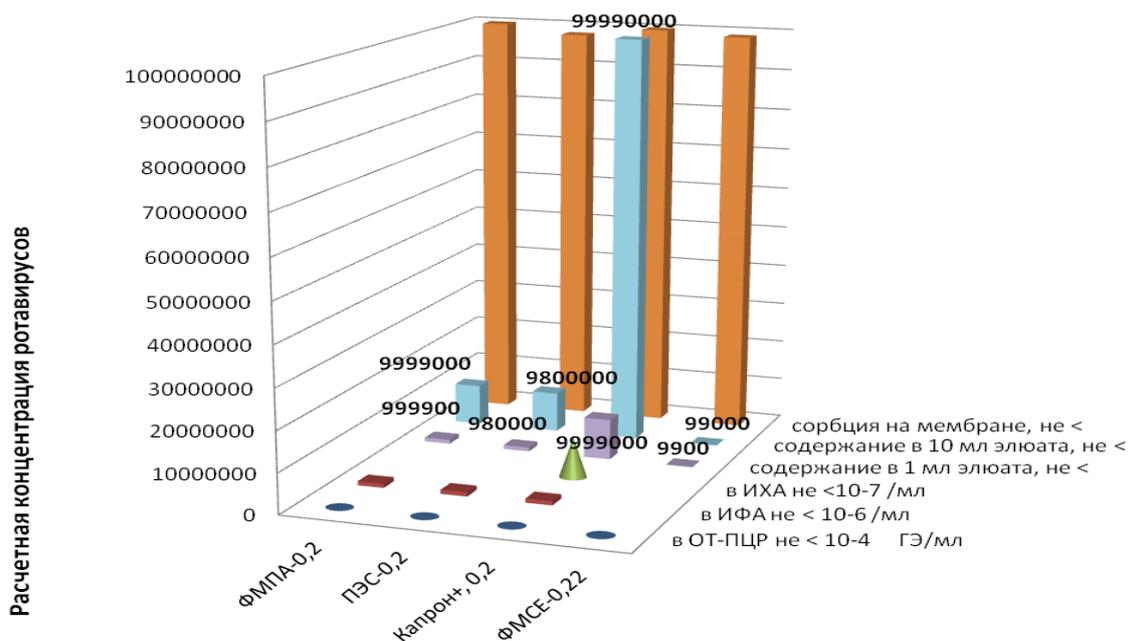
Объем воды, с концентрацией 10^7 вирионов/мл, мл	Материал мембран				Методы исследования
	ФМПА-0,2 мкм, n=30	ПЭС-0,2 мкм, n=30	Капрон+,0,2 мкм, n=30	ФМСЕ-0,22 мкм, n=30	
10,0	- / + / +	- / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
100,0	+ / + / +	- / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР
1000,0	+ / + / +	+ / + / +	+ / + / +	- / - / +	ИХА/ИФА/ОТ-ПЦР

Примечание: «←» — отрицательный результат; «+» — положительный результат

Эффективность элюции определяли расчетным методом с учетом содержания ротавирусов в элюатах. Наибольшая концентрация ротавирусов в элюатах получена с использованием мембран Капрон+, 0,2 мкм, при этом маркеры ротавирусов выявлены методами ОТ-ПЦР, ИФА, ИХА при напорной и вакуумной фильтрации.

При вакуумной фильтрации получена большая концентрация ротавирусов на мембранах ФМПА-0,2 мкм, ПЭС-0,2 мкм, чем при напорной фильтрации. Так, при фильтрации 1000,0 мл контаминированной воды этими мембранами, в элюатах получены положительные результаты методом иммунохроматографического анализа при вакуумной фильтрации и отрицательные результаты при напорной фильтрации. При фильтрации 100,0 мл контаминированной воды на мембранах ФМПА-0,2 мкм получен положительный результат при вакуумной фильтрации методом ИХА, и отрицательный результат при напорной фильтрации.

Графическое отображение результатов определения маркеров ротавирусов в элюатах после напорной фильтрации 10,0 мл, 100,0 мл и 1000,0 мл контаминированной ротавирусами воды в концентрации не $< 10^7$ /мл, на фоне сорбции на исследуемых ФМ, представлено на рисунке 6.



Типы мембран

Рисунок 6 – Результаты детекции маркеров ротавирусов в элюатах воды после пробоподготовки на исследуемых фильтрующих материалах, n=30

В результате исследования эффективности сорбции и элюции ротавирусов с мембран получены данные, свидетельствующие о наибольшей эффективности концентрирования ротавирусов на фильтрующих экспериментальных мембранах Капрон+, 0,2 мкм; а также о большей эффективности концентрирования вирусов методом вакуумной фильтрации, чем методом напорной фильтрации.

Для дальнейшего исследования эффективности экспериментальной мембраны Капрон+, 0,2 мкм концентрировали ротавирусы из различных объемов контаминированной воды (10,0 мл, 100,0 мл, 1000,0 мл и 10000,0 мл) при напорной и вакуумной фильтрации (Таблица 9).

Таблица 9 – Результаты определения антигенов ротавирусов в элюатах воды после фильтрации на экспериментальных мембранах (Капрон+, 0,2 мкм)

Объем проб воды, мл	Концентрация ротавирусов в 1 мл пробы	Количество исследований	Определение антигенов при вакуумной фильтрации				Определение антигенов при напорной фильтрация			
			ИХА-	ИХА+	РАЛ-	РАЛ+	ИХА-	ИХА+	РАЛ-	РАЛ+
10,0	10^7	30	0	30	30	0	0	30	30	0
100,0	10^7	30	0	30	30	0	0	30	30	0
1000,0	10^7	30	0	30	0	30	0	30	22	8
10000,0	10^7	10	0	10	0	10	0	10	8	2

Примечание: ИХА- — отрицательный результат в ИХА; ИХА+ — положительный результат в ИХА; РАЛ- — отрицательный результат в РАЛ; РАЛ+ — положительный результат в РАЛ

Во всех пробах методом ИХА выявлены ротавирусные антигены при напорной и вакуумной фильтрации. При вакуумной фильтрации 1000,0 мл и

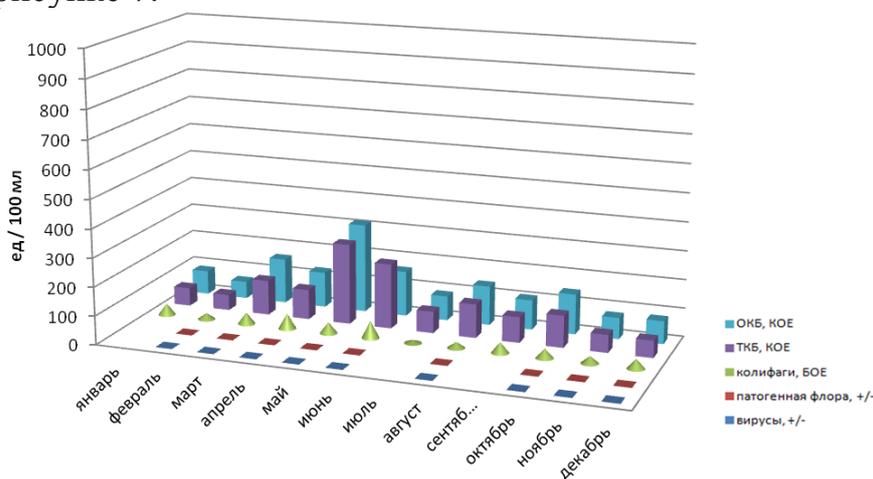
10000,0 мл выделены Рота-Аг в элюатах воды во всех пробах методами ИХА и РАЛ. При напорной фильтрации проб объемом 1000,0 мл и 10000,0 мл Рота-Аг определены в РАЛ в 8 пробах из 30, и в 2 пробах из 10, соответственно.

Оценивая результаты сорбции и элюции микрофильтрационными мембранами наибольшая эффективность концентрирования ротавирусов получена на мембранах Капрон+, 0,2 мкм. Установлено, что эффективность сорбции полиамидными мембранами в 20 раз больше, чем эффективность сорбции фильтрующими мембранами из полиэфирсульфона и смеси эфиров целлюлозы. В тоже время, эффективность концентрирования ротавирусов на фильтрующих мембранах из капрона с положительным зарядом (Капрон+, 0,2 мкм) на порядок больше, чем эффективность полиамидных мембран (ФМПА-0,2 мкм).

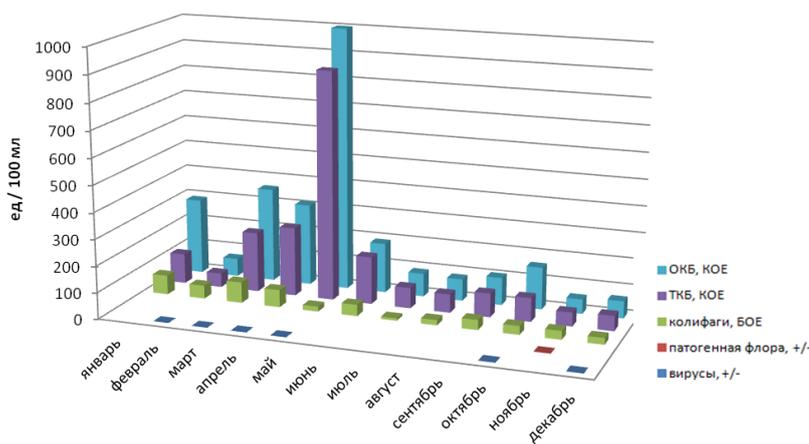
Таким образом, при вакуумной фильтрации контаминированных проб воды на фильтрах ПЭС-0,2 мкм; ФМПА-0,2 мкм; а также Капрон+, 0,2 мкм получены лучшие результаты концентрирования ротавирусов, чем при напорной фильтрации. Среди изученных фильтрующих материалов (ПЭС-0,2 мкм; ФМПА-0,2 мкм; ФМСЕ-0,22 мкм, а также экспериментальных мембран Капрон+, 0,2 мкм), максимальное количество ротавирусов из модельных проб воды извлечено с помощью капроновых мембран с положительным зарядом. В элюатах проб контаминированной ротавирусами воды в концентрации 10^7 вирионов/мл в объемах 10,0 мл, 100,0 мл, 1000,0 мл маркеры ротавирусов определены при вакуумной фильтрации с использованием методов ОТ-ПЦР и ИФА, и экспресс-тестов (ИХА, РАЛ).

Применение мембран при проведении санитарно-микробиологических исследований водных объектов

Научно обоснована эффективность мембран ФМАЦ-0,45 мкм, ФМНЦ-0,45 мкм для извлечения *E. coli* и ФМ Капрон+, 0,2 мкм для концентрирования ротавирусов из воды. С целью подтверждения результатов экспериментальных исследований ФМ проведено комплексное санитарно-бактериологическое и санитарно-вирусологическое исследование воды в акваториях комплекса защитных сооружений города Санкт-Петербурга от наводнений и Невской губы с использованием наиболее эффективных мембран, что позволило получить объективную оценку качества воды изучаемых акваторий по санитарно-микробиологическим показателям. Результаты вышеуказанных исследований северной части акватории Невской губы среднемноголетние и в 2015 г. представлены на рисунке 7.



а.



б.

Рисунок 7 – Показатели бактериальной и вирусной контаминации северной части акватории Невской губы в 2015 г. (а), в сравнении со среднеголетними (б)

В результате комплексного исследования санитарно-микробиологического состояния водоемов установлена контаминация бактериями и вирусами отдельных участков акваторий комплекса защитных сооружений Санкт-Петербурга от наводнений, Невской губы и восточной части Финского залива, включая загрязнение патогенной кишечной микрофлорой с максимумом загрязнения в мае-июне. Таким образом, с использованием современных мембран в 2015 г. выявлена контаминация воды кишечными вирусами практически за время всего периода наблюдения, за исключением января, июля и сентября, что позволило получить более объективную картину загрязненности изучаемых акваторий.

Пробоподготовка и детекция кишечных бактерий и вирусов в воде непосредственно на месте отбора проб

С целью проведения санитарно-микробиологического контроля водных объектов разработан макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных бактерий и вирусов в воде. В основу макета комплекта была заложена идея разработки мобильного, малогабаритного оборудования для обнаружения кишечных микроорганизмов на месте отбора проб при проведении санитарно-бактериологического и санитарно-вирусологического контроля водных объектов. Макет комплекта приведен на рисунке 8.



Рисунок 8 – Макет комплекта для пробоподготовки и детекции кишечных бактерий и вирусов в водных объектах

С использованием материалов диссертации разработаны отдельные элементы макета комплекта, где предусмотрено их многократное использование в полевых условиях. Все элементы комплекта при необходимости могут быть заменены, или доукомплектованы. Для забора проб воды и создания вакуума при концентрировании могут использоваться ручной или электрический насос. Предлагается использовать стерильные картонные подложки с питательной средой в чашках Петри из нержавеющей стали, либо одноразовые пластиковые чашки, для обнаружения кишечной палочки и колиформных бактерий. Фильтрующая платформа для концентрирования кишечных вирусов уменьшена в диаметре до 90 мм и представляет собой сборный держатель из нержавеющей стали, в который заправляется стерильная микрофильтрационная мембрана. Мембранный фильтр после концентрирования помещается в металлическую, из нержавеющей стали, чашку Петри, куда вносится элюирующий буферный раствор для смыва вирусов. Определение вирусных маркеров (антигены) в полевых условиях проводится методом иммунохроматографического анализа и в реакции агглютинации латекса.

Весь комплект оборудования предлагается разместить в упаковке — чемодане из прочного пластика, предназначенного для доставки в необходимое место любым транспортом или вручную. Стало возможным обходиться без наиболее трудоемкого этапа — транспортировки и хранения больших объемов проб воды (10 л), а также подготовить пробы для исследования, получив элюаты в объеме 8,0–10,0 мл, которые занимают значительно меньше места.

Применение инновационных фильтрующих мембран из капрона с положительным зарядом позволяет получить наибольшую концентрацию вирусов из воды, что расширяет перечень используемых методов их детекции, ввиду повышения концентрации вирусосодержащего материала. В свою очередь, применение современных расходных материалов и реагентов (экспресс-тесты, питательные подложки и др.), более простых в использовании, способных храниться при менее жестких температурных режимах, чем питательные среды, приготовленные в стационарных условиях, приводит к низким эксплуатационным расходам на реагенты и меньшим трудозатратам на проведение исследований.

Таким образом, с помощью комплекта может быть решена задача пробоподготовки и детекции кишечных бактерий и вирусов в воде непосредственно на месте отбора проб, что сокращает время получения предварительного результата по определению *E. coli* до 12 часов и детекции ротавирусов до 2,5–3 часов. Это позволяет проводить санитарно-микробиологический контроль качества воды в полевых условиях, в экстремальных ситуациях, в разных климато-географических зонах, и вести мониторинг водных объектов окружающей среды с достаточно высокой эффективностью и низкими экономическими затратами.

ВЫВОДЫ

1. В условиях влияния «стрессовых» факторов фильтрации наибольшей извлекаемостью *E. coli* из воды обладают мембраны из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм при вакуумной фильтрации, которые можно рекомендовать к применению на практике; менее

эффективны мембраны из ацетата целлюлозы, нитрата целлюлозы, полиамида со средним диаметром пор 0,2 мкм и мембраны из смеси сложных эфиров целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм при разных режимах фильтрации, что не позволяет их использовать при проведении микробиологического контроля качества воды.

2. Максимальная степень сорбции и элюции ротавирусов наблюдается у микрофильтрационных капроновых мембран с положительным зарядом с диаметром пор 0,2 мкм, при использовании которых в элюатах воды получена большая на порядок концентрация вирусов, чем при использовании полиамидных мембран.

3. При сравнительном изучении напорной и вакуумной фильтрации вирусов получена наибольшая концентрация ротавирусов из воды с помощью капроновых мембран с положительным зарядом и диаметром пор 0,2 мкм в режиме вакуумной фильтрации. При их использовании в полученных элюатах воды определены ротавирусные маркеры методами полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции, иммуноферментного анализа, и более простыми и экономичными экспресс-тестами (метод иммунохроматографического анализа и реакция агглютинации латекса).

4. Проведено комплексное обследование водных объектов окружающей среды с определением бактериальной и вирусной контаминации воды в акваториях комплекса защитных сооружений г. Санкт-Петербурга от наводнений, Невской губы и восточной части Финского залива с помощью эффективных пористых микрофильтрационных мембран и вакуумного режима пробоподготовки. Это позволило обнаружить санитарно-показательные и патогенные микроорганизмы, маркеры кишечных вирусов в большем количестве проб, по сравнению с результатами среднемноголетних исследований, и повысить качество санитарно-микробиологической оценки воды.

5. На основании интеллектуальной проработки решаемых задач и полученных в исследовании материалов разработан макет комплекта для пробоподготовки и проведения санитарно-микробиологических исследований воды в полевых условиях. Показана возможность повышения эффективности санитарно-микробиологических исследований воды за счет подбора наиболее эффективных микрофильтрационных мембран для извлечения бактерий и концентрирования вирусов из воды, использования эффективного вакуумного режима фильтрации и внедрения экспресс-тестов детекции вирусных маркеров (метод иммунохроматографического анализа и реакции агглютинации латекса).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

С учетом полученных результатов и наличия на рынке большого разнообразия фильтрующих материалов из различного сырья, необходимо в практике контроля качества воды широко применять фильтры из ацетата целлюлозы и нитрата целлюлозы со средним диаметром пор 0,45 мкм для определения санитарно-бактериологических показателей (*E. coli*, общие колиформные бактерии и термотолерантные колиформные бактерии), а также инновационные микрофильтрационные мембраны из капрона с положительным зарядом в режиме вакуумной фильтрации для определения санитарно-вирусологических показателей.

Необходимо внести предложения о включении данной информации в

нормативные документы по санитарно-микробиологическому контролю водных объектов окружающей среды.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Планируется проведение изучения эффективности микрофилтрационных мембран по извлекаемости бактерий рода *Salmonella* из воды для включения в комплект.

Предполагается исследование индикаторных полосок для обнаружения кишечной палочки и колиформных бактерий в пробах воды и укомплектования ими переносного комплекта.

Целесообразно разместить содержимое комплекта в специальном пластиковом термоконтейнере (с регулируемым температурным режимом) для обнаружения кишечных патогенов в объектах окружающей среды в условиях Арктики.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Малышев, В.В. Инновации в пробоподготовке и определении возбудителей (и их маркеров) острых кишечных вирусных инфекций / В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков, **Т.А. Змеева** // Проблемы медицинской микологии — СПб., 2015. — т. 17. - № 2. — С.106.

2. **Змеева, Т.А.** Методы мембранной технологии в пробоподготовке и детекции ротавирусов в водных объектах / **Т.А. Змеева**, В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков, С.С. Котов // Проблемы медицинской микологии — СПб., 2016. — т. 18. - № 2. — С. 68–69.

3. **Змеева, Т.А.** Применение современных мембранных технологий в санитарно-микробиологических и санитарно-вирусологических исследованиях водных объектов / **Т.А. Змеева**, В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков, С.С. Котов // Инфекция и иммунитет. — СПб., 2016. — т. 6. - № 3. — С. 253–254.

4. Малышев, В.В. Качество воды и заболеваемость острыми кишечными вирусными инфекциями детей и взрослых в России / В.В. Малышев, **Т.А. Змеева**, Т.В. Носкова // Инфекция и иммунитет. — СПб., 2016. — т. 6. - № 3. — С. 269.

5. Малышев, В.В. Микробиологический мониторинг возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, в условиях медицинского учреждения / В.В. Малышев, Д.В. Разумова, **Т.А. Змеева**, Т.В. Носкова, Е.Ф. Аверина // Инфекция и иммунитет. — СПб., 2016. — т. 6. - № 3. — С. 269–270.

6. Малышев, В.В. Инновации в организации микробиологических исследований в полевых условиях / В.В. Малышев, **Т.А. Змеева**, В.Б. Сбойчаков, С.С. Котов, Т.В. Носкова // Инфекция и иммунитет. — СПб., 2016. — т. 6. - № 3. — С. 268–269.

7. Малышев, В.В. Результаты санитарно-микробиологического и санитарно-вирусологического мониторинга акватории Невской губы и восточной части Финского залива. Современное состояние / В.В. Малышев, **Т.А. Змеева**, Р.Р. Михайленко, Т.В. Носкова // Инфекция и иммунитет. — СПб., 2016. — т. 6. - № 3. — С. 270–271.

8. **Змеева, Т.А.** Применение фильтрующих материалов для обнаружения кишечных бактерий в водных объектах окружающей среды / **Т.А. Змеева**,

В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков, С.С. Котов // Медицинский алфавит. Эпидемиология и гигиена. — 2017. — т. 1. - № 6. — С. 9–13.

9. Малышев, В.В. Оценка вирулицидных свойств дезинфицирующего вещества на основе полигексаметиленгуанидина гидрохлорида и алкилдиметилбензиламмония хлорида для профилактики инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи / В.В. Малышев, Т.А. Змеева, В.Б. Сбойчаков, Е.А. Аверина // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2017. — № 1. — С. 119–123.

10. Змеева, Т.А. Совершенствование контроля качества воды с использованием мембранных технологий и методов детекции / Т.А. Змеева, В.В. Малышев, В.Б. Сбойчаков, В.Я. Апчел, С.Г. Марданлы, Е.Е. Каталевский // Вестник Российской военно-медицинской академии. — 2017. — № 1. — С. 142–146.

Список сокращений

БОЕ	– бляшкообразующая единица
ИФА	– метод иммуноферментного анализа
ИХА	– иммунохроматографический анализ
Капрон+, 0,2 мкм	– фильтрующие мембраны из капрона с положительным зарядом с диаметром пор 0,2 мкм
КОЕ	– колониобразующая единица
ММФ	– метод мембранной фильтрации
ОКБ	– общие колиформные бактерии
ОТ-ПЦР	– метод полимеразной цепной реакции со стадией обратной транскрипции для РНК-содержащих вирусов
ПЭС-0,2	– фильтрующие мембраны из полиэфирсульфона с диаметром пор 0,2 мкм
РАЛ	– реакция агглютинации латекса
РНК	– рибонуклеиновая кислота
Рота-Аг	– антиген ротавирусный
ТКБ	– термотолерантные колиформные бактерии
ФМ	– фильтрующие мембраны
ФМАЦ-0,2 мкм	– фильтрующие мембраны ацетатцеллюлозные с диаметром пор 0,2 мкм
ФМАЦ-0,45 мкм	– фильтрующие мембраны ацетатцеллюлозные с диаметром пор 0,45 мкм
ФМНЦ-0,2 мкм	– фильтрующие мембраны нитратцеллюлозные с диаметром пор 0,2 мкм
ФМНЦ-0,45 мкм	– фильтрующие мембраны нитратцеллюлозные с диаметром пор 0,45 мкм
ФМСЕ-0,22 мкм	– фильтрующие мембраны из смеси сложных эфиров целлюлозы с диаметром пор 0,22 мкм
ФМСЕ-0,45 мкм	– фильтрующие мембраны из смеси сложных эфиров целлюлозы с диаметром пор 0,45 мкм
ФМПА-0,2 мкм	– фильтрующие мембраны полиамидные с диаметром пор 0,2 мкм
ЭМ	– электронная микроскопия
\bar{x}	– средняя арифметической величины
m_x .	– стандартная ошибка среднего значения
p	– уровень значимости – величина, используемая при тестировании статистических гипотез