

УДК 616.932:579.843.1:001.89

**С.В. Титова, И.А. Щипелева, Л.П. Алексеева, Е.И. Марковская**

**ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИХ РАБОТ, ВЫПОЛНЯЕМЫХ В РАМКАХ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ ПРОБЛЕМНОЙ КОМИССИИ «ХОЛЕРА И ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ВИБРИОНЫ» КООРДИНАЦИОННОГО НАУЧНОГО СОВЕТА ПО САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЙ ОХРАНЕ ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

*Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора  
Россия, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40. E-mail: plague@aaanet.ru*

Научная тематика всех противочумных институтов, выполняемая в рамках Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, скорректирована с целью повышения их эффективности, практической значимости, оптимизации сроков выполнения и комплексности исследований. В результате проведенной работы для того, чтобы исключить дублирование тематики, было принято решение о комплексной межинститутской разработке десяти наиболее актуальных, на сегодняшний день, приоритетных направлений исследований по Проблеме «Холера ...».

*Ключевые слова:* холера, научная тематика, противочумные институты.

**S.V. Titova, I.A. Shchipeleva, L.P. Alekseeva, E.I. Markovskaya**

**PERSPECTIVE DIRECTIONS OF SCIENTIFIC RESEARCH CARRIED OUT WITHIN THE FRAMEWORK OF ACTIVITY OF COMMISSION FOR THE PROBLEM “CHOLERA AND HUMAN PATHOGENIC VIBRIOS” OF THE COORDINATION SCIENTIFIC COUNCIL ON SANITARY/EPIDEMIOLOGICAL PROTECTION OF THE TERRITORY OF THE RUSSIAN FEDERATION**

*Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of the Federal Agency on Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision,  
117/40 M. Gorky Street, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru*

The scientific thematics of all the Anti-Plague institutes, fulfilled within the framework of activity of Commission for the problem “Cholera and human pathogenic vibrios” of the Coordination Scientific Council on sanitary-epidemiological protection of the territory of the Russian Federation, has been adjusted with the aim to enhance effectiveness and practical significance as well as to optimize the time frames and comprehensiveness of research works. In the result, to exclude topic duplication, a decision has been taken about integrated interinstitute development of the most currently actual priority directions of investigations on the problem “Cholera and human pathogenic vibrios”.

*Key words:* cholera, scientific thematics, Anti-Plague institutes.

По Решению Проблемной комиссии 48.04. «Холера и патогенные для человека вибрионы» Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (2015 г.), вся научная тематика по холере была пересмотрена.

Переходящие темы всех противочумных институтов, посвященные Проблеме «Холера и патогенные для человека вибрионы», были скорректированы с целью повышения их эффективности, практической значимости, оптимизации сроков выполнения и комплексности исследований. Сроки выполнения части научно-исследовательских работ (НИР) были сокращены. Кроме 8 НИР, в соответствии с планом завершаемых в 2015 г., досрочно была завершена разработка еще пять тем. В результате проведенной работы для того, чтобы исключить дублирование тематики, было принято решение о комплексной межинститутской разработке десяти наиболее актуальных на сегодняшний день, приоритетных направлений исследований по Проблеме «Холера ...».

Задача совершенствования эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации решается в рамках 3 НИР совместно тремя институтами: ФКУЗ Ростовским-на-Дону противочумным институтом Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутским НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора и ФКУЗ Российским НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. В ходе выполнения данного направления исследований будет дано научное обоснование районирования административных территорий РФ по типам эпидемических проявлений холеры с определением соответствующей тактики надзора [1]. Будут совершенствованы методы организации и проведения противочумных мероприятий. Запланирована переработка действующих санитарных правил (СП) по эпидемиологическому надзору за холерой на территории РФ, в т.ч. будут определены санитарно-противоэпидемические (профилактические) мероприятия в случае выделения от людей и из объектов окружающей среды нетоксигенных, но содержащих токсинрегулируемые пили (ctxAB- tcrA+) штаммов [2]. Для оценки состояния и тенденций заболеваемости холерой, характеристики причинно-следственных связей активизации эпидемического процесса при холере на различных территориальных уровнях, а также составления ежегодных прогнозов по эпидемиологической ситуации по холере на глобальном уровне и в России – будет продолжено создание информационного фонда по холере за счет формирования проблемно-ориентированных баз данных и пополнения баз данных ГИС «Холера Эль-Тор. Мир» (глубина ретроспективы – с 1961 г.), «Холера Эль-Тор. СНГ. Россия» (с 1970 г.), «Холера, обусловленная ctx-холерными вибрионами. Россия» (с 1999 г.), «Холерные вибрионы. Россия» (с 1990 г.) «Холера 1989-2014» и «Холера. Штаммы - VNTR».

Совместно с Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора продолжается работа по научному обоснованию внедрения положений Международной конвенции о контроле и управлении судовыми балластными водами и осадками на

территории РФ с целью предотвращения заноса возбудителя холеры и других патогенных для человека вибрионов [3]. Будут представлены предложения к эпиднадзору за холерой в части, касающейся мониторинга воды поверхностных водоемов в акватории международных портов, и дополнения к СП «Профилактика холеры». Осуществляется эпидемиологическая оценка способов деконтаминации водяного балласта, оценена возможность применения химических препаратов, их влияние на экосистему и эксплуатационные свойства балластных танков.

Изучению экологии возбудителя холеры посвящено две научных темы ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора, выполняемые совместно с ФБУН Ростов НИИМП Роспотребнадзора, Управлением Роспотребнадзора по Ростовской области и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». В ходе выполнения данных НИР предполагается определение возможного происхождения токсигенных культур, выяснение родственных связей между атоксигенными культурами, а также оценка роли природных популяций холерных вибрионов, циркулирующих в России, как резервуаров разных аллелей генов факторов патогенности и персистенции. Получены сведения о характере взаимодействия и возможном конкурентном воздействии представителей аутохтонной вибриофлоры в отношении завозных токсигенных холерных вибрионов. Разработан способ оценки внутривидовой конкурентной активности вибрионов, как в планктонной форме, так и в составе биопленки с помощью INDEL-маркеров [4,5]. Осуществляется работа по определению роли биопленки *Vibrio cholerae* в повышенной инфекциозности, в обеспечении персистенции холерных вибрионов во внешней среде, в противостоянии воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды, дезинфектантов и антибиотиков [6,7]. Разработаны методы получения биопленок, отвечающие требованиям биологической безопасности при работе с возбудителями II группы патогенности [8]. В процессе исследования будет проведен сравнительный биоинформационный анализ факторов персистенции штаммов холерных вибрионов, различающихся по способности к выживанию в объектах окружающей среды; будет оценен вибриопейзаж и создан паспорт поверхностных водоемов г. Ростова-на-Дону. По результатам выполнения данных НИР будут проведены мероприятия по улучшению санитарно-гигиенического состояния поверхностных водоёмов г. Ростова-на-Дону для обеспечения биологической безопасности при проведении массовых мероприятий с международным участием в 2018 г.

Вопросы совершенствования мониторинга холерных вибрионов, выделенных от людей и из объектов окружающей среды, решаются совместно ФКУЗ Ростовским-на-Дону противочумным институтом Роспотребнадзора, ФКУЗ Иркутским НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора, ФКУЗ Ставропольским НИПЧИ Роспотребнадзора и ФКУЗ Российским НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках одной общей НИР. Продолжается сравнительное изучение свойств штаммов холерных вибрионов, выделенных

из объектов окружающей среды, на разных территориях России. Осуществляется изучение стабильности отдельных генетических локусов разных групп штаммов *V. Cholerae* в неблагоприятных условиях окружающей среды. Система мониторинга будет дополнена молекулярно-генетическим анализом основных генов патогенности, кодирующих биосинтез энтеротоксина *V. Cholerae* Эль Тор или классического типов с помощью разработанных ПЦР-тест систем. Предполагается разработка схемы молекулярного типирования галофильных вибрионов, изолируемых от больных и из объектов окружающей среды.

Осуществляется сравнительный анализ результатов и оптимизация алгоритма молекулярного типирования штаммов холерных вибрионов. Будет дана оценка эффективности подходов к молекулярному типированию в рамках оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа для выяснения путей заноса и распространения холеры на территории, а также при изучении эволюционной истории патогена. Разработан новый комплексный метод VNTR-, INDEL- типирования штаммов [9].

Запланированы сравнительные (мультицентровые) испытания эффективности и диагностической ценности MALDI-ToF масс-спектрометрической идентификации микроорганизмов в системе микробиологического мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды в сопоставлении с классической бактериологической идентификацией и молекулярно-генетическим определением таксономической принадлежности изолируемых культур. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ включен в схему бактериологического исследования на холеру.

На территориях, относящихся к разным типам по эпидемическим проявлениям холеры, в стационарных точках отбора проб осуществляется ретроспективный и оперативный анализ показателей высеваемости микроорганизмов рода *Vibrio* [10]. На основании данных ретроспективного анализа планируется разработка и внедрение алгоритма мониторинговых исследований вибриофлоры с учетом внутрисубъектовой дифференциации по степени риска сохранения и накопления в водных объектах микроорганизмов рода *Vibrio*. Будет дана оценка полноты охвата диагностическими исследованиями на холеру контингентов риска, определенных нормативными документами.

В комплексном анализе механизмов изменения вирулентных, иммуногенных и адаптивных свойств природных штаммов возбудителя холеры в современный период его эволюции принимают участие все противочумные институты. Всего в данном направлении выполняется три НИР. В ходе выполнения тем будут разработаны молекулярно-генетические критерии оценки эпидемического и патогенетического потенциала возбудителей и вероятности их сохранения в объектах окружающей среды. Будет осуществлен анализ генетического разнообразия интегративных конъюгативных элементов штаммов *V.cholerae*, изолированных на территории РФ, оценка их роли в формировании комбинаций генов, расширяющих адаптационный потенциал микроорганизма. Будет создана электронная

база данных нуклеотидных последовательностей ICE. Запланировано изучение молекулярных механизмов персистенции и закономерности адаптации типичных, генетически измененных и авирулентных штаммов *V. cholerae*(в т.ч. в составе биоопленки и при переходе в некультивируемое состояние). Предполагается изучение состава, генетической структуры и особенностей функционирования микробного сообщества (метабенома) в водных объектах и организме экспериментальных животных, выявление направлений взаимодействия возбудителя холеры с другими представителями микробиоценоза, оценка потенциала для трансформации биологических свойств *V. cholerae*, в т.ч. патогенного потенциала, в определенных экологических нишах. Будут выработаны предложения по дополнению систем генодиагностики вирулентности у *V.cholerae* O1 серогруппы с учетом РНКомных данных.

Предполагается конструирование донорных штаммов, способных к переносу профага СТХф классического типа в типичные штаммы *V.cholerae* биовара Эль Тор для последующего получения геновариантов, содержащих профаг СТХф классического типа. Будут изучены структуры ключевых генов патогенности у полученных геновариантов на основе секвенирования.

Осуществляется полногеномное секвенирование токсингенных и нетоксингенных, но содержащих токсинрегулируемые пили (*ctxAB- tcrA+*) штаммов *V. cholerae*. Планируется разработка и государственная регистрация пакета программ для анализа полногеномных сиквенсов вибрионов.

В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора для анализа полногеномных сиквенсов разработана программа SeqAnalyzer, позволяющая проводить быстрый анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae*, что позволяет определять вид, серогруппу, биовар анализируемого штамма, а также ряд мобильных генетических элементов и островков. Важной особенностью является возможность определения кратности варибельных tandemных повторов, что имеет существенное значение для эпидемиологического анализа. Программа и методические рекомендации по ее использованию находятся на официальном интернет-сайте института [11].

В направлении Создания новых эффективных штаммов-продуцентов антигенов для их использования при изготовлении холерных иммунодиагностических и иммунопрофилактических препаратов специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора будет дана расширенная молекулярная характеристика и пройден паспортизация имеющихся на сегодняшний день плазмид, включая секвенирование клонированных в их составе генов и биоинформационный анализ их продуктов. Будут сконструированы новые плазмиды, более эффективно экспрессирующие гены холерного токсина, гемолизина и нейраминидазы *V.cholerae* под контролем мощных промоторов, входящих в состав векторов нового поколения. Предполагается создание штаммов *Escherichiacoli* – суперпродуцентов белков *V.cholerae*, необходимых для фундаментальных исследований и получения основ диагностических и вакцинных пре-



паратов. Специалистами ФКУЗ Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора на основе нетоксигенного варианта штамма геноварианта P18899-Д впервые получен штамм P18899-Д(рIEM3), активно продуцирующий иммунную В-субъединицу холерного токсина. Этот штамм может быть использован в качестве продуцента В-субъединицы холерного токсина для изготовления иммунодиагностических препаратов, а также холерных химических вакцин [12].

В ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора совместно с ФКУЗ Российский НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора осуществляются исследования по созданию новых эффективных фаговых препаратов для диагностики патогенных вибрионов. Осуществлен поиск вирулентных рас диагностических холерных фагов, активных в отношении фагоустойчивых штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор. Получен диагностический холерный фаг для идентификации холерных вибрионов Эль Тор [13].

Изучению механизмов формирования у возбудителя холеры устойчивости к антимикробным соединениям и поиску высокоспецифичных ингибиторов факторов резистентности посвящено исследование ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора, в рамках которого с использованием ГИС-технологий будет создана пространственно-ориентированная база данных резистентности штаммов холерных вибрионов, выделенных на различных территориях РФ от людей и из водных источников. Для преодоления антибиотикорезистентности штаммов *V. Cholera* будут отобраны эффективные комбинации антибактериальных препаратов, а также комбинации антибиотиков с различными биологически активными веществами.

В направлении оптимизации специфической профилактики холеры совместно ФКУЗ Ростовским-на-Дону противочумным институтом Роспотребнадзора и ФКУЗ Российским НИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора предполагается изучение при экспериментальной холере возможности повышения иммуногенных и протективных свойств таблетированной холерной бива-

лентной химической вакцины с помощью разных по происхождению иммуномодуляторов.

С целью оптимизации лабораторной диагностики холеры и других патогенных вибрионов на основе новых диагностических технологий специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора разработана и готовится к государственной регистрации тест-система видо- и серовароспецифических моноклональных антител пероксидазных конъюгатов, предназначенная для идентификации и дифференциации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп в прямых вариантах ИФА [14].

Получен и охарактеризован препарат термостабильного гемолизина *V. parahemolyticus*. Оценена диагностическая значимость полученных сывороток к термостабильному прямому гемолизину с целью их последующей государственной регистрации [15].

Специалистами ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и ФКУЗ Иркутский НИПЧИ Сибири и Дальнего Востока Роспотребнадзора разрабатываются ПЦР-тест-системы для детекции галофильных вибрионов в исследуемом материале.

Специалистами ФКУЗ Ставропольский НИПЧИ Роспотребнадзора разрабатываются ПЦР-тест системы обеспечивающие возможность детекции, идентификации и генотипирования *V.cholerae* Эль Тор типичных токсигенных и генетически измененных вариантов. Для мониторинга возбудителя холеры в объектах окружающей среды планируется использование магнитоносительных технологий.

Вся тематика, выполняемая противочумными институтами в рамках Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы», соответствует направлениям Отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016-2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями», утвержденной Приказом Роспотребнадзора № 5 от 13.01.2016 г.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии: от общей тактики до дифференцированного объема мероприятий с учетом районирования страны по типам эпидемических проявлений холеры (Сообщение 1) // Здоровье населения и среда обитания. - 2015. - № 9. - С. 43-47.
2. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. и др. Совершенствование эпидемиологического надзора за холерой в России в период седьмой пандемии (Сообщение 2) // Здоровье населения и среда обитания. - 2015. - № 10. - С. 47-51.
3. Водяницкая С.Ю., Лях О.В., Кругликов В.Д. и др. О мероприятиях по внедрению конвенции о контроле судовых балластных вод и осадков и управлении ими (2004г.) в Российской Федерации // Матер. VII Ежегод. Всерос. Конгресса по инф. бол-ням с международ. участ.- М., 2015. // Инф. болезни.-2015.- Т.13, Приложение 1.- С.77-78.
4. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П. и др. Анализ внутривидовой конкуренции штаммов *Vibrio cholerae* с помощью INDEL-маркеров // Здоровье населения и среда обитания. - 2016. - № 4. - С. 35-28.
5. Водопьянов С.О., Титова С.В., Водопьянов А.С. и др. Анализ внутривидовой конкуренции *Vibrio cholerae* в биопленках // Известия ВУЗ Сев.- Кав. Региона.- Естественные науки.- 2016.- № 1. - С. 49 - 53.
6. Селянская Н.А., Титова С.В., Веркина Л.М. и др. Антибиотикорезистентность биопленок холерных вибрионов // Общие угрозы – совместные действия. Ответ гос-в БРИКС на вызовы опас. инф. болезней: Матер.международ. конф.- М., 2015.- С.338 - 340.
7. Титова С.В., Веркина Л.М., Кирилова О.Д. и др. Действие перекиси водорода и хлорамина Б на биопленки холерных вибрионов // Дезинфекционное дело.-2015.-№3.-С.6-13.
8. Титова С.В., Кушнарёва Е.В. Использование нового метода изучения динамики образования биопленок холерными вибрионами в условиях, приближенных к естественным // Известия ВУЗ Сев.-Кав. Региона.- Естественные науки.- 2014.- № 5.- С. 73-77.

9. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Писанов Р.В. и др. Алгоритм анализа результатов полногеномного секвенирования на примере штаммов возбудителя холеры, выделенных на территории Российской Федерации // Молекулярная диагностика. 2014. Том 1. С.461-462.
10. Балахонов С.В., Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю. и др. Актуальные вопросы совершенствования мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов в системе эпидемиологического надзора за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып.28.-С.37-44.
11. Титова С.В., Москвитина Э.А., Монахова Е.В. и др. Современные подходы к мониторингу холеры // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып.28.-С.10-16.
12. Щелканова Е.Ю., Кульшань Т.А., Заднова С.П. и др. Конструирование штамма-продуцента В-субъединицы холерного токсина на модели атоксигенного варианта *Vibrio cholerae*// Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер.пробл. комиссии.- Ростов-на-Дону, 2015.- Вып.28.-С.144-146.
13. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д. и др. Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных для человека вибрионов // Клин.лаб. диагностика.-2015.- №4.-С.62-64.
14. Алексеева Л.П., Козлова Г.А., Маркина О.В. и др. Использование моноклональных пероксидазных конъюгатов для идентификации холерных вибрионов серогрупп О1, О139 в реакции дот-иммуноанализа // Клиническая лабораторная диагностика . - 2013. - № 3. -С. 26-29.
15. Даликова Р.Р., Чемисова О.С., Писанов Р.В. и др. Получение иммунных сывороток к термостабильному прямому гемолизину *Vibrioparaahaemolyticus* // Матер. VII Ежегод. Всерос. Конгресса по инф. бол-ням с международ. участ.- М., 2015. // Инф. болезни.-2015.- Т.13, Прилож.1.- С.103.

Получена: 05.08.2016

Received: 05.08.2016