

Обучение регламентированным методам лабораторной диагностики холеры с использованием набора учебных штаммов

Е.В.Растунцева, Л.А.Тихомирова, Ю.А.Попов

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация

Разработаны критерии для подбора учебных штаммов холерного вибриона и других микроорганизмов в соответствии с современными алгоритмами и методами лабораторной диагностики холеры. Сформирован набор учебных штаммов бактерий для обучения специалистов вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры на курсах профессиональной переподготовки и повышения квалификации, что позволяет освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики холеры, снизить вероятность лабораторного инфицирования возбудителем холеры обучающихся на практических занятиях, а также приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с патогенными биологическими агентами.

Ключевые слова: программы дополнительного профессионального образования, лабораторная диагностика холеры, набор учебных штаммов, биологическая безопасность

Для цитирования: Растунцева Е.В., Тихомирова Л.А., Попов Ю.А. Обучение регламентированным методам лабораторной диагностики холеры с использованием набора учебных штаммов. Бактериология. 2019; 4(1): 28–33. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-28-33

Training in regimented methods of laboratory cholera diagnostics using the panel of practice educational strains

E.V.Rastuntseva, L.A.Tikhomirova, Yu.A.Popov

RusRAPI «Microbe» of the Rosпотребнадзор, Saratov, Russian Federation

Designed have been the criteria for the selection of training cholera vibrio and other microorganism strains in accordance with modern algorithms and techniques of laboratory cholera diagnostics. The panel of educational bacterial strains for training the specialists in the sphere of microbiology and laboratory cholera diagnostics in the professional retraining and advanced vocational courses has been put together. It provides for full exploration of regimented methods of laboratory cholera diagnostics, decrease in the probability of laboratory infection with cholera in the practice classes, as well as acquiring the skills needed for work with cholera agent in accordance with normative regulations on the safe operation with pathogenic biological agents.

Keywords: syllabus and programs of further vocational education, laboratory cholera diagnostics, panel of training strains, biological safety

For citation: Rastuntseva E.V., Tikhomirova L.A., Popov Yu.A. Training in regimented methods of laboratory cholera diagnostics using the panel of practice educational strains. Bacteriology. 2019; 4(1): 28–33. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-1-28-33

Холера остается актуальным для мирового здравоохранения инфекционным заболеванием. Заболеваемость холерой регистрируется в существующих очагах инфекции в Азии, Африке, странах Карибского бассейна; в 2017 г. сформировались новые эндемичные территории в странах Африканского континента (Кения, Танзания, Малави, Демократическая Республика Конго, Южный Судан). С 2008 по 2017 гг. в мире зарегистрировано около 2,5 млн больных в разных странах, что указывает на продолжающееся,

характерное для пандемии, распространение холеры с вовлечением новых территорий и делает прогноз по холере неблагоприятным [1]. Рост миграционных потоков иностранных граждан и соотечественников усугубляет возможность завоза холеры на территорию Российской Федерации [1, 2]. Возможным риском заноса возбудителя холеры могут служить контаминированные холерными вибрионами балластные воды судов и формирующиеся на разнообразных плотных поверхностях биопленки [3]. Помимо занесен-

Для корреспонденции:

Растунцева Елена Васильевна, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Роспотребнадзора

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Телефон (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

Статья поступила 25.01.2019 г., принята к печати 25.03.2019 г.

For correspondence:

Elena V. Rastuntseva, MD, PhD, senior researcher of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI «Microbe» of the Rosпотребнадзор

Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation

Phone: (8452) 51-5230

E-mail: rusrapi@microbe.ru

The article was received 25.01.2019, accepted for publication 25.03.2019

ных из эндемичных по холере регионов токсигенных штаммов возбудителя холеры, на территории РФ ежегодно от людей и из поверхностных водоемов выделяют большое количество нетоксигенных штаммов холерного вибриона, которые могут служить причиной острых кишечных инфекций. Исследователями выявлена группа нетоксигенных штаммов холерного вибриона, представляющая эпидемиологическую опасность в связи с возможностью их реверсии в токсигенные путем фаговой конверсии [4].

Все перечисленное делает необходимым совершенствование системы эпидемиологического надзора, одной из важных составляющих которого является подготовка специалистов для обеспечения комплекса мероприятий по диагностике и профилактике холеры [5, 6].

На базе отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора реализуется многоуровневая система обучения эпидемиологическому надзору и лабораторной диагностике холеры специалистов Роспотребнадзора – противочумных институтов и станций, Центров гигиены и эпидемиологии, Управлений Роспотребнадзора, а также различных медицинских учреждений: больниц, поликлиник, учреждений Министерства обороны РФ. Для этого составлены специальные программы тематических курсов повышения квалификации по лабораторной диагностике и эпиднадзору за холерой (продолжительностью 36 и 72 ч), ежегодно проводятся семинары по данной тематике, в программу которых включают актуальные вопросы. На протяжении нескольких лет сотрудники института проводят обучение специалистов Республики Гвинея, ряда стран СНГ по программам повышения квалификации «Борьба с опасными инфекционными болезнями. Современные методы лабораторной диагностики», «Санитарная охрана территорий государств, лабораторная диагностика инфекционных болезней, биологическая безопасность, информационные технологии» и другим, где освещаются вопросы эпиднадзора, микробиологии и лабораторной диагностики холеры.

Модуль «Микробиология и лабораторная диагностика холеры», включающий теоретические и практические занятия, является одним из основных разделов программ дополнительного профессионального образования специалистов, работающих с возбудителями особо опасных инфекционных болезней: профессиональной переподготовки врачей и биологов, лаборантов по профилям «Бактериология», «Эпидемиология», «Лабораторное дело» с основами безопасной работы с патогенными биологическими агентами (ПБА) I–II групп; программ повышения квалификации «Бактериология», «Эпидемиология. Инфекционные болезни, требующие проведения мероприятий по санитарной охране территории Российской Федерации», «Особо опасные инфекции», «Подготовка личного состава специализированных противоэпидемических бригад для работы в чрезвычайных ситуациях» и других.

Для проведения практических занятий по освоению регламентированных методов диагностики холеры традиционно используют штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров классического и Эль Тор, *Vibrio cholerae* O139 серогруппы II группы патогенности. Актуальным и приоритетным направлением снижения риска обучающих технологий является замена вирулентных штаммов на авирулентные или на

штаммы с более низкой вирулентностью при условии выполнения учебного плана в полном объеме и приобретения навыков работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА [7, 8].

Нами были разработаны технические задания и критерии подбора учебных штаммов возбудителей холеры в соответствии с современными алгоритмами и методами лабораторной диагностики холеры, учебно-тематическими планами программ подготовки специалистов и результатами обучения (знания, умения, навыки).

Критериями отбора штаммов холерного вибриона в качестве учебных послужили авирулентность или низкая вирулентность, типичные для *V. cholerae* биологические, культурально-морфологические, биохимические и антигенные свойства, позволяющие изучить морфологию клеток в мазках, характер роста на плотных и жидких питательных средах, а также биологические особенности представителей различных серогрупп, сероваров и биоваров классического и Эль Тор и методы их дифференциации.

Учебные штаммы *V. cholerae* должны обладать комплексом свойств, необходимых для проведения индикации, идентификации и внутривидовой и межвидовой дифференциации возбудителя холеры регламентированными методами исследования: бактериоскопическим, бактериологическим, иммунологическим и молекулярно-генетическим [9], чувствительностью к антибактериальным препаратам, используемым для специфической профилактики холеры.

Анализ доступных нам информационных источников – литературы, патентов и других выявил отсутствие штаммов *Vibrio cholerae*, используемых для обучения регламентированным методам лабораторной диагностики холеры.

Цель исследования: формирование набора учебных штаммов бактерий для совершенствования методического обеспечения и снижения биологических рисков при подготовке специалистов по вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры.

Предлагаемый набор учебных штаммов для обучения бактериологическому методу диагностики холеры должен включать представителей следующих групп микроорганизмов.

1) Холерных вибрионов различных серологических групп, биовариантов и серовариантов – как *Vibrio cholerae classical* и *Vibrio cholerae El Tor* O1 серогруппы, так и *Vibrio cholerae* серогруппы O139, обладающих типичными морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами, стабильным антигенным строением.

2) Возбудителей гастроэнтеритов и системных инфекций – *Vibrio cholerae non O1/O139*.

3) Галофильных вибрионов, вызывающих заболевания у человека с явлениями гастроэнтерита, – *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*; вибрионов, выделяющихся из поверхностных водоемов и морей, – *V. phosphorescens (albensis)*.

4) Возбудителей острых кишечных инфекций у человека – представителей родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*.

5) Микроорганизмов, вызывающих системные инфекции у человека и выделяющихся из клинического материала и объектов окружающей среды, относящихся к роду *Pseudomonas*.

6) Возбудителя острых токсикоинфекций у человека – *Staphylococcus aureus*.

Материалы и методы

В работе использованы штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биоваров классического и Эль Тор, *Vibrio cholerae* серогруппы O139 (II группа патогенности), *Vibrio cholerae* non O1/O139 (III группа патогенности), штаммы других представителей рода *Vibrio* – *V. albensis*, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus* (IV группа патогенности), штаммы микроорганизмов родов *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*; штаммы *Staphylococcus aureus* (III–IV группы патогенности). Штаммы бактерий отобраны из числа хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») на основании паспортных данных с учетом разработанных нами критериев.

Культуры вышеперечисленных микроорганизмов выращивали на агаре и бульоне Хоттингера pH 7,6 при температуре $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ в течение 24 ч. Дополнительно штаммы родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia* засеивали на среды Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар, Симмонса; для изучения свойств *Staphylococcus aureus* делали посеvy данной культуры на агар и бульон Хоттингера pH 7,4, агар Хоттингера pH 7,4 с добавлением 3–5% крови барана, желточно-солевой агар, для определения плазмокоагулазы – в пробирки с плазмой кролика (1:5) по 0,5 мл.

Морфологию клеток исследуемых культур изучали в мазках, окрашенных по Граму, путем просмотра под увеличением $\times 400$ – 600 в световом микроскопе Микмед-5 («ЛОМО», Санкт-Петербург). Колонии просматривали под малым увеличением светового микроскопа, а также с использованием устройства для просмотра колоний в косопадающем свете под углом 45° . Подвижность микроорганизмов определяли методами висячей и раздавленной капли при просмотре под увеличением $\times 400$ – 600 светового микроскопа и посевом в столбик 0,3% агара Хоттингера. Биохимические, биологические, антигенные свойства, чувствительность к бактериофагам изучали с помощью стандартных методов, регламентированных при лабораторной диагностике холеры. Для постановки методов специфической индикации (МФА) использовали иммуноглобулины диагностические флуоресцирующие холерные адсорбированные лошадиные O1 и O139 и люминесцентный микроскоп Nikon с возможностями документирования изображений Eclipse 80i (Япония). Вирулентность и генетические характеристики штаммов *Vibrio cholerae* оценивали согласно паспортным данным.

Результаты и обсуждение

По наличию фенотипических признаков, свойственных возбудителю холеры, было отобрано 19 штаммов *V. cholerae*: 2 штамма *Vibrio cholerae cholerae*, 12 штаммов *Vibrio cholerae El Tor* сероваров Огава и Инаба, 3 штамма *Vibrio cholerae* O139 и 2 штамма *Vibrio cholerae* non O1/O139.

Для освоения принципов и методов дифференциальной диагностики с возбудителем холеры отобраны 5 штаммов других представителей рода *Vibrio*, 6 штаммов бактерий, принадлежащих к родам *Aeromonas*, *Plesiomonas*, *Pseudomonas*, 6 штаммов бактерий семейства *Enterobacteriaceae* родов *Shigella*, *Salmonella*, *Escherichia*; 2 штамма возбудителя острых токсикоинфекций у человека – *Staphylococcus aureus*.

Проведен анализ фенотипических (морфологических, культуральных, биохимических, антигенных) свойств выделенных штаммов микроорганизмов, являющихся основой для регламентированных методов индикации и идентификации холерного вибриона. С учетом полученных результатов и имеющихся паспортных данных осуществлена комплексная оценка патогенных, фено- и генотипических особенностей штаммов. Согласно полученным данным, был сформирован набор из 15 штаммов бактерий, при использовании которого слушатели курсов могут освоить весь спектр регламентированных методов индикации, идентификации возбудителя холеры и дифференциации его от других представителей рода *Vibrio* и других родов, способных вызывать заболевания у человека с явлениями гастроэнтерита.

Сформирован учебный набор штаммов бактерий для изучения микробиологии и лабораторной диагностики холеры, включающий:

- холерные вибрионы O1 и O139 серогрупп: *Vibrio cholerae* 569B серогруппа O1 биовар классический серовар Инаба, *Vibrio cholerae* KM26 серогруппа O1 биовар *El Tor* серовар Огава, *Vibrio cholerae* M-375 (170) серогруппа O139 (II группа патогенности);
- возбудители гастроэнтеритов и системных инфекций – *Vibrio cholerae* non O1/O139 M-266 (III группа патогенности);
- представители рода *Vibrio*: *Vibrio albensis* 220, *Vibrio alginolyticus* 143, *Vibrio parahaemolyticus* 616 (IV группа патогенности);
- возбудители острых кишечных инфекций у человека: *Shigella sonnei* 714; *Salmonella paratyphi* «B» M-53 (625) (III группа патогенности); *Aeromonas hydrophila* P-4499; *Plesiomonas shigelloides* 101; *Escherichia coli* O 151 1027 (IV группа патогенности);
- штаммы микроорганизмов, необходимые для дифференциальной диагностики возбудителя холеры: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* BKMB-1300, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853 (IV группа патогенности);
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) (IV группа патогенности).

Далее был определен алгоритм использования каждого штамма с учетом его биологических свойств и вирулентности для изучения микробиологии холерного вибриона и регламентированных методов индикации и идентификации возбудителя холеры в полном объеме.

Штамм *Vibrio cholerae* 569B серогруппа O1 биовар классический серовар Инаба предлагается для изучения типичных видовых свойств *V. cholerae*: морфологических, культуральных, биохимических, антигенных; для демонстрации тестов, дифференцирующих биовары классический и Эль Тор возбудителя холеры: отсутствие гемолитической активности в посевах на агаре Хоттингера pH 7,6 с добавлением 5% дефибринированной крови барана, в пробе Грейга со взвесью 1% бараньих эритроцитов в физиологическом растворе; наличие чувствительности к полимиксину В (50 ед./мл); чувствительности к холерному диагностическому бактериофагу С. Поскольку штамм продуцирует холерный токсин *in vitro* (генетические характеристики: *ctxA*⁺ *tcpA*⁺), его использование ограничивается демонстрацией изложенных признаков.

Штамм *Vibrio cholerae* KM26 серогруппа O1 биовар *El Tor* серовар Огава обладает типичными для *V. cholerae* морфо-

логическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами. Генетические характеристики: *ctxA⁻ zot tcpA⁻ toxR⁻*. Штамм используется для изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств возбудителя холеры; для освоения алгоритма лабораторной диагностики холеры, МФА, идентификации.

Штамм *Vibrio cholerae* M-375 (170) серогруппа O139 обладает типичными для микроорганизмов данной серогруппы морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами. Генетические характеристики: *ctxA⁻*. Авирулентный для кроликов-сосунков. Штамм рекомендовано использовать для изучения свойств *Vibrio cholerae* O139 серогруппы; для освоения алгоритма лабораторной диагностики холеры, МФА, идентификации.

Штамм *Vibrio cholerae* non O1/O139 M-266 (4656) целесообразно использовать на практических занятиях слушателями курсов для изучения морфологических, культуральных, биохимических свойств *Vibrio cholerae*, поскольку обладает типичными видовыми свойствами; для изучения дифференциальных биохимических тестов представителей рода *Vibrio*, для дифференциации *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп от *Vibrio cholerae* non O1/O139, а также для дифференциации *Vibrio cholerae* с микроорганизмами, сходными по морфологическим свойствам и выделяемыми из клинического материала от больных с явлениями гастроэнтерита и из внешней среды.

В состав набора включены следующие штаммы представителей рода *Vibrio*, используемые для освоения принципов и методов дифференциальной диагностики с *Vibrio cholerae*: штамм *Vibrio albensis* 220 (261–320) – для изучения способности микроорганизмов к флюоресценции в темноте, используется при изучении внутривидовых дифференциальных признаков рода *Vibrio*. Штамм *Vibrio alginolyticus* 143 представлен для изучения дифференциальных тестов представителей рода *Vibrio*, в частности, признака галофильности данной культуры – способности к росту в 1% пептонной воде с высокими концентрациями хлорида натрия (7–10%) и «феномена роения». Штамм *Vibrio parahaemolyticus* 616 – для изучения дифференциальных биохимических тестов представителей *Vibrio*; признаков дифференциации возбудителя холеры от других вибрионов, вызывающих у людей пищевые токсикоинфекции и острые кишечные инфекции при употреблении в пищу морепродуктов, подвергнутых недостаточной кулинарной обработке, и свойства галофильности.

Для изучения алгоритма дифференциации возбудителя холеры от микроорганизмов, сходных по морфологическим, культуральным и некоторым биохимическим свойствам с *Vibrio cholerae* (продуцируют индофенолоксидазу), в наборе имеются штаммы микроорганизмов, выделяемые из клинического материала от больных с острыми кишечными инфекциями и из объектов внешней среды: *Aeromonas hydrophila* P-4499, *Vibrio parahaemolyticus*, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* ВКМВ-1300, *Pseudomonas aeruginosa* ATTC 27853.

Для овладения принципами и методами дифференциальной диагностики возбудителя холеры набор содержит штаммы возбудителей токсикоинфекций и острых кишечных инфекций семейства *Enterobacteriaceae*: *Shigella sonnei*

M-88 (714), *Salmonella enterica* spp. *enterica* ser. *paratyphi* «B» M-53 (625), *Escherichia coli* 1027 O 151.

Штамм *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (209-P) включен в состав набора для изучения принципов дифференциальной диагностики возбудителя холеры с возбудителями токсикоинфекций.

Все вышеперечисленные штаммы бактерий обладают стабильными типичными морфологическими, культуральными, биохимическими, антигенными свойствами, хорошо сохраняются на искусственных питательных средах.

При составлении набора штаммов для обучения вопросам микробиологии и лабораторной диагностики холеры одними из основных задач явились минимизация риска инфицирования возбудителем холеры слушателей курсов на практических занятиях и одновременное предоставление возможности изучения морфологических, культуральных, биохимических, антигенных свойств возбудителя холеры, освоения регламентированных методов специфической индикации и идентификации в полном объеме. Для поэтапной замены вирулентных штаммов возбудителя холеры на менее вирулентные и авирулентные были подобраны штаммы холерного вибриона, представителей рода *Vibrio* и микроорганизмов, применяемых для дифференциальной диагностики возбудителя холеры, использование которых позволяет решить поставленные задачи, а также в процессе обучения приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА.

С учетом установленных биологических свойств и вирулентности микроорганизмов, включенных в набор штаммов, разработан алгоритм использования каждого штамма для изучения микробиологии холерного вибриона и регламентированных методов его индикации и идентификации, который позволяет обеспечить в полном объеме реализацию планов практических занятий учебного модуля «Микробиология и лабораторная диагностика холеры» (табл. 1).

На следующем этапе были разработаны стандартные учебные образцы, моделирующие пробы биологического материала и объектов окружающей среды, содержащие штаммы холерных вибрионов и других бактерий, включенных в набор. Пробы представляют собой образцы, с достаточной точностью имитирующие реальный биотический или абиотический объект в целях освоения методов специфической индикации и идентификации возбудителя холеры. Проба состоит из основы (биологические жидкости человека или их имитаторы, объекты окружающей среды или их имитаторы) и микроорганизмов, введенных в основу. Нами разработаны составы основ, не влияющие на качество и сроки получения результатов индикации и идентификации возбудителя холеры регламентированными методами, а также концентрации и соотношения микроорганизмов II–IV групп патогенности, входящих в состав учебных образцов.

В качестве основы при приготовлении проб были использованы:

- биологические выделения человека (испражнения);
- объекты окружающей среды (вода, смывы с объектов и другие);
- пищевые продукты плотные и жидкие (рыба и морепродукты, листья салата, молоко, напитки);

Таблица 1. Применение набора учебных штаммов на практических занятиях по микробиологии и лабораторной диагностике холеры

| Тема | Штамм |
|---|--|
| Изучение морфологических, культуральных, биологических, биохимических свойств <i>Vibrio cholerae</i> | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 |
| Освоение определения подвижности холерного вибриона методами «висячей» и «раздавленной» капли | <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 |
| Изучение морфологических и культуральных свойств <i>Vibrio cholerae</i> различных серогрупп и биоваров (демонстрация мазков с окраской по Граму и холерными флюоресцирующими иммуноглобулинами O1 и O139, посевов на плотные и жидкие питательные среды) | <i>Vibrio cholerae cholerae</i> 569B <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Escherichia coli communis</i> |
| Изучение агглютинабельности культур <i>Vibrio cholerae</i> холерными диагностическими сыворотками O1 и O139 в слайд-агглютинации и объемным методом | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 |
| Освоение лабораторной диагностики холеры бактериологическим методом | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Escherichia coli communis</i> |
| Освоение методов специфической индикации возбудителя холеры (МФА, РИВ) | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 |
| Освоение тестов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с другими представителями рода <i>Vibrio</i> , вызывающими у человека пищевые токсикоинфекции и острые кишечные инфекции и выделяемыми из воды открытых водоемов | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> 616 <i>Vibrio alginolyticus</i> 143 <i>Vibrio albensis</i> 220 |
| Освоение алгоритмов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с микроорганизмами, сходными по морфологическим, культуральным и некоторым биохимическим свойствам (оксидазоположительными) и выделяемыми из клинического материала от больных с острыми кишечными инфекциями и из объектов внешней среды | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Aeromonas hydrophila</i> P-4499 <i>Plesiomonas shigelloides</i> 101 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> BKMB-1300 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATTC 27853 |
| Освоение принципов дифференциальной диагностики <i>Vibrio cholerae</i> с возбудителями токсикоинфекций и острых кишечных инфекций семейства <i>Enterobacteriaceae</i> и <i>Staphylococcus aureus</i> у человека | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Shigella sonnei</i> 714 <i>Salmonella paratyphi</i> «B» M-53B (625) <i>Escherichia coli</i> 1027 O 151 <i>Escherichia coli communis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (209-P) |
| Приготовление проб для занятий по теме «Комплексное исследование материала, подозрительного на наличие возбудителя холеры. Контрольная бактериологическая задача» | <i>Vibrio cholerae</i> El Tor KM26 <i>Vibrio cholerae</i> M-375 (170) серогруппа O139 <i>Vibrio cholerae</i> non O1/O139 M-266 <i>Aeromonas hydrophila</i> P-4499 <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> BKMB-1300 <i>Shigella sonnei</i> 714 <i>Salmonella paratyphi</i> «B» M-53 (625) <i>Escherichia coli</i> 1027 O 151 <i>Escherichia coli communis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 (209-P) |

• имитаторы биологических жидкостей человека и объектов окружающей среды (питательный бульон pH 7,6, физиологический раствор, коллоидный раствор крахмала и другие).

При подготовке проб, содержащих холерный вибрион, для обучения его индикации МФА, реакции непрямо́й гемагглютинации (РНГА), а также выделения и идентификации *V. cholerae* ускоренным и классическим бактериологическими методами использовали авирулентные штаммы *V. cholerae* El Tor KM 26, *V. cholerae* M-375 (170) серогруппы O139, а также *V. cholerae* non O1/O139 M-266 в концентрации, достаточной для индикации методами лабораторной диагностики, регламентированными в действующих нормативно-методических документах.

При моделировании пробы из объектов окружающей среды (воды из поверхностных водоемов, сточных вод, смывов с поверхностей), проб пищевых продуктов и части проб биологического материала («испражнения больного»), которые в реальных условиях содержат смесь микроорганизмов, помимо возбудителя холеры, добавляют «фоновые» микроорганизмы. В качестве «фона» используют микроорганизмы III–IV групп патогенности, например: *Escherichia coli commu-*

nis, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* и другие. Не рекомендуется использовать в качестве фоновых культур микроорганизмы родов *Pseudomonas*, *Aeromonas* в связи с необходимостью дифференциации с *V. cholerae* (табл. 2).

Разработаны 11 проб-имитаторов для проведения практических занятий учебного модуля по следующим темам:

- «Исследование клинического материала с подозрением на холеру» (испражнений, рвотных масс, желчи больного с подозрением на холеру);
- «Исследование объектов окружающей среды на холеру» (смыва, проб воды из поверхностного водоема, сточных вод);
- «Исследование пищевых продуктов на холеру» (пробы рыбы, молока, салата);
- «Иммунологические методы в схеме лабораторной диагностики холеры»;
- «Комплексное исследование материала, подозрительного на содержание возбудителя холеры. Контрольная бактериологическая задача».

Таким образом, на основании проведенных исследований и многолетнего опыта работы сформирован набор учебных

Таблица 2. Перечень микроорганизмов, рекомендуемых для использования при подготовке проб-имитаторов

| Объекты исследования | Наименование микроорганизмов | |
|--------------------------------------|--------------------------------------|--|
| | основные | фоновые |
| Испражнения | <i>V. cholerae</i> | <i>E. coli communis</i> <i>S. epidermidis</i> |
| Рвотные массы | <i>V. cholerae</i> | <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i> |
| Смыв с поверхности | <i>V. cholerae</i> | <i>S. aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i> <i>Bac. cereus</i> |
| Проба воды из поверхностного водоема | <i>V. cholerae</i> non O1/O139 266-M | – |
| Проба сточных вод | <i>V. cholerae</i> | <i>S. epidermidis</i> <i>E. coli communis</i> <i>Bac. cereus</i> |

штаммов, который позволяет решить поставленные задачи: 1) освоить в полном объеме регламентированные методы лабораторной диагностики холеры; 2) снизить вероятность лабораторного инфицирования возбудителем холеры обучающихся на практических занятиях; 3) приобрести навыки работы с возбудителем холеры в соответствии с требованиями безопасной работы с ПБА.

Возможность реализации разнообразных образовательных программ на базе ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора позволяет следовать принципу преемственности обучения специалистов методам лабораторной диагностики холеры, начиная с курсов профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям, в дальнейшем приобретая новые теоретические знания и умения на различных курсах повышения квалификации. Это необходимо для подготовки кадров, призванных обеспечивать комплекс мероприятий по эпиднадзору за холерой на территории РФ.

Литература

1. Москвитина ЭА, Тюленева ЕГ, Кругликов ВД, Титова СВ, Водопьянов АС, Куриленко МЛ, и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2018;1:36-43. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43
2. Еровиченков АА, Зверева НН, Сайфуллин МА, Околот НВ. Профилактика заводных инфекционных заболеваний у путешественников. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2018;17(5):89-94. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-89-95
3. Чемисова ОС, Сагакянц ММ, Голенищева ЕН, Санамянц ЕМ. Оценка бактерицидной активности дезинфекционных средств в отношении возбудителя холеры для деконтаминации судовых балластных вод. Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение. 2018;7(3):15-9. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13002
4. Смирнова НИ, Агафонова ЕЮ, Щелканова ЕЮ, Агафонов ДА, Краснов ЯМ, Ливанова ЛФ, Кутырев ВВ. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2018;36(2):76-84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84
5. Санитарно-эпидемиологические правила «Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации». СП 3.1.1.2521-09
6. Методические указания «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней». МУК 4.2.2870-11
7. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)». СП 1.3.3118-13

8. Санитарно-эпидемиологические правила «Безопасность работы с микроорганизмами III–IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней». СП 1.3.2322-08
9. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры». МУК 4.2.2218-07

References

1. Moskvitina EA, Tyuleneva EG, Kruglikov VD, Titova SV, Vodop'yanov AS, Kurilenko ML, et al. Cholera: Assessment of Epidemiological Situation on Cholera around the World and in Russia in 2008–2017. Forecast for 2018. Problems of Particularly Dangerous Infection. 2018;1:36-43. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-1-36-43 (In Russian).
2. Erovichenkov AA, Zvereva NN, Sayfullin MA, Okolot NV. Prevention of Imported Infectious Diseases in Travelers. Epidemiology and Vaccinal Prevention. 2018;17(5):89-94. DOI: 10.31631/2073-3046-2018-17-5-89-95 (In Russian).
3. Chemisova OS, Sagakyants MM, Golenishcheva EN, Sanamyants EM. Evaluation of the disinfectants bactericidal activity against the causative agent of cholera for the decontamination of ship's ballast water. Infectious diseases: News, Opinions, Training. 2018;7(3):15-9. DOI: 10.24411/2305-3496-2018-13002 (In Russian).
4. Smirnova NI, Agafonova EYu, Shchelkanova EYu, Agafonov DA, Krasnov YaM, Livanova LF, Kutyrev VV. Genomic diversity of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains, isolated in the territory of Russia and neighboring states. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2018;36(2):76-84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84 (In Russian).
5. Sanitary and Epidemiological Rules "Prevention of cholera. General requirements for epidemiological surveillance of cholera in the territory of the Russian Federation". SP 3.1.1.2521-09 (In Russian).
6. Methodical Instructions "Order of the organization and carrying out laboratory diagnostics of cholera for laboratories of territorial, regional and federal levels". MUK 4.2.2870-11 (In Russian).
7. Sanitary and Epidemiological Rules "Safety of work with microorganisms of I-II groups of pathogenicity (danger)". SP 1.3.3118-13 (In Russian).
8. Sanitary and Epidemiological Rules "Safety of work with microorganisms of III-IV groups of pathogenicity (danger) and causative agents of parasitic diseases". SP 1.3.2322-08 (In Russian).
9. Methodical Instructions "Laboratory diagnostics of cholera". MUK 4.2.2218-07 (In Russian).

Информация об авторах:

Тихомирова Людмила Александровна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Попов Юрий Алексеевич, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник, исполняющий обязанности заведующего отделом образовательных программ и подготовки специалистов ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора
Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, 46
Телефон: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Information about cauthors:

Lyudmila A. Tikhomirova, PhD (Biology), senior researcher of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI "Microbe" of the Rospotrebnadzor
Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-52-30
E-mail: rusrapi@microbe.ru

Yuri A. Popov, PhD, DSc (Biology), professor, chief researcher, acting head of the department of educational programs and training of specialists, RusRAPI "Microbe" of the Rospotrebnadzor
Address: 46, Universitetskaya str., Saratov, 410005, Russian Federation
Phone: (8452) 51-5230
E-mail: rusrapi@microbe.ru