

**А.Б.Мазрухо, Д.И.Каминский, Ю.М.Ломов, Н.Р.Телесманич, К.К.Рожков, В.Д.Кругликов, Е.В.Гончаренко, А.В.Тришина, Ю.М.Пухов, В.И.Прометной, Н.Л.Пичурина**

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НОВОГО КОМПЛЕКСА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХОЛЕРЫ В ХОДЕ ТАКТИКО-СПЕЦИАЛЬНОГО УЧЕНИЯ СПЕЦИАЛИЗИРОВАННОЙ ПРОТИВОЭПИДЕМИЧЕСКОЙ БРИГАДЫ**

*Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону*

Проведена апробация нового комплекса питательных сред для диагностики холеры на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей в ходе опытно-исследовательского тактико-специального учения (ТСУ) специализированной противочумной бригады (СПЭБ). Показано, что разработанный комплекс превосходит по эффективности используемые в практике аналоги, а входящие в его состав среды являются перспективными для включения в мобилизационный резерв СПЭБ.

*Ключевые слова:* питательные среды, холера, холерный вибрион, лабораторная диагностика, специализированная противочумная бригада, чрезвычайные ситуации.

**A.B.Mazrukho, D.I.Kaminsky, Yu.M.Lomov, N.R.Telesmanich, K.K.Rozhkov, V.D.Kruglikov, E.V.Goncharenko, A.V.Trishina, Yu.M.Pukhov, V.I.Prometnoy, N.L.Pichurina**

## **Results of Application of the New Nutrient Media Set for Cholera Diagnostics within the Frames of the Special Tactical Training Exercises for Specialized Anti-Epidemic Team**

*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don*

Carried out is approbation of the new nutrient media set for cholera diagnostics on the basis of bakers' yeast pancreatic digest within the frames of the special tactical training exercises for specialized anti-epidemic team (SAET). It is demonstrated that the developed nutrient media set compare favourably with its analogues, commonly used for practical procedures; and its constituent media have a potential to be included into the SAET mobilization reserve.

*Key words:* nutrient media, cholera, cholera vibrio, laboratory diagnostics, specialized anti-epidemic team (SAET), emergency situations.

Одной из приоритетных задач специализированной противочумной бригады (СПЭБ) в зоне чрезвычайной ситуации (ЧС), обусловленной или осложненной возникновением очага холеры, является проведение большого объема исследований материала от людей (больных, контактных, декретированных контингентов населения) и из объектов окружающей среды (прежде всего, воды и продуктов питания). Возможности лабораторной базы модернизированной СПЭБ, развертываемой в модулях на основе автошасси [1] и пневмокаркасных систем [8], позволяют исследовать до 500 проб (3000 анализов) в сутки. Бактериологический метод исследований, направленный на выделение и идентификацию штаммов холерного вибриона, в настоящее время остается одним из ведущих методов лабораторной диагностики холеры. Для обеспечения работы лабораторий СПЭБ с использованием бактериологического метода в очаге холеры ежедневно требуются питательные среды 16 наименований в общем количестве до 158 л [3]. Изготовление такого объема сред высокого качества в автономных условиях требует, с одной стороны, современных мобильных и производительных технических систем варки и розлива, с другой – наличия недорогой питательной основы (белкового гидролизата), которая была бы единой для всего ассортимента сред культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, используемых бригадой.

С 1999 г. в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте ведется разработка питательных сред для диагностики опасных инфекционных болезней на основе белкового гидролизата, представляющего собой панкреатический перевар пекарских дрожжей. К настоящему времени способ получения указанного белкового гидролизата, а также две питательные среды на его основе защищены патентами на изобретения [5, 6, 10].

В рамках данного направления был создан комплекс питательных сред для культивирования, выделения и идентификации холерного вибриона, который успешно прошел лабораторные испытания с использованием коллекционных и свежевыделенных штаммов *Vibrio cholerae*, а также апробацию на базе бактериологических лабораторий ФГУЗ «Северо-Кавказская противочумная станция» Роспотребнадзора, МЛПУЗ Горбольница № 1 им. Н.А.Семашко (Ростов-на-Дону), лаборатории особо опасных инфекций ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Ростовской области». Ранее нами показаны преимущества сред разработанного комплекса перед используемыми в практике коммерческими аналогами в ходе многолетнего мониторинга воды поверхностных водоемов и стоков на наличие холерного вибриона [2, 4]. Результаты мониторинга свидетельствуют, что использование сконструированных питательных сред уже на этапе их лаборатор-

ных испытаний способствовало реальному обеспечению санитарно-эпидемиологического благополучия на территории Ростовской области.

Целью работы явилась апробация созданного комплекса питательных сред для диагностики холеры в ходе тактико-специального учения (ТСУ) на тему: «Выдвижение, развертывание и организация работы СПЭБ на базе мобильного комплекса (МК СПЭБ) в автономных условиях по индикации и идентификации холерных вибрионов».

### Материалы и методы

В настоящем исследовании были использованы разработанные в Ростовском-на-Дону научно-исследовательском противочумном институте питательные среды для диагностики холеры на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей, входящие в состав нового комплекса:

1. *ХДС (холерная дрожжевая среда) – агар – агаризованная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,05 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 4,0 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 6,0 г; агар-агар микробиологический – 12,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – 7,8±0,2.*

2. *ХДС-Н (холерная дрожжевая среда накопительная) – жидкая накопительная питательная среда для культивирования и выделения холерного вибриона следующего состава (из расчета на 1,0 л концентрированной среды): панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,2 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 50,0 г; калий азотнокислый – 1,0 г; натрий фосфорнокислый двузамещенный 12-водный – 5,0 г; pH готовой среды – 8,2±0,2.*

3. *ХДС-РГ (холерная дрожжевая среда для определения расщепления глюкозы) – полужидкая питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку расщепления глюкозы в аэробных и анаэробных условиях следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,013 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; калий фосфорнокислый двузамещенный 3-водный – 0,4 г; Д-глюкоза кристаллическая – 10,0 г; бромтимоловый синий водорастворимый – 0,03 г (или 1 % водный раствор – 3 мл); агар-агар бактериологический – 3,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – 7,8±0,2.*

4. *ХДС-ОДДА (холерная дрожжевая среда для определения декарбоксилаз и дегидролаз аминокислот) – жидкая питательная среда для идентификации холерного вибриона по признаку ферментации аминокислот следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,013 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; Д-глюкоза кристаллическая – 1,0 г; вода дистиллированная – 1,0 л; бромкрезоловый пурпурный (1,6 % спиртовый рас-*

твор) – 0,6 мл; крезоловый красный (0,1 % спиртовый раствор) – 5,0 мл; L-аминокислота – 10,0 г (варианты с аргинином, лизином, орнитинем и контрольный вариант – без аминокислоты); pH готовой среды – 6,45±0,05.

5. *ХДС-ПУДА (холерная дрожжевая среда полиглюкозная дифференциальная агаризованная) – глюкозо-лактозная агаризованная дифференциальная питательная среда для первичной идентификации холерного вибриона следующего состава: панкреатический перевар пекарских дрожжей – 0,06 % (по аминному азоту); натрий хлористый – 5,0 г; натрий сернистокислый безводный – 0,4 г; натрия тиосульфат – 0,16 г; железо (II) сернокислое 7-водное – 0,5 г; Д-глюкоза кристаллическая – 1,0 г; α-Д-лактоза 1-водная – 10,0 г; феноловый красный (0,2 % раствор в 50 % этиловом спирте) – 12,0 мл; агар-агар бактериологический – 11,0 г; вода дистиллированная – до 1,0 л; pH готовой среды – 7,8±0,2.*

Данные опытные среды были изготовлены в ходе ТСУ в мобильной лаборатории на базе тягача КАМАЗ 43118 «Блок поддержки бактериологических исследований» с использованием следующего технологического оборудования: автоматической мобильной средоварки Master Clave 528 (производительностью 28 л готовой среды за один цикл), модуля для стерильного розлива сред APS 320/90, штатного автоклава данной мобильной лаборатории HVE-50.

Контрольными средами служили агар щелочной сухой, пептон основной сухой, среда Клиггера сухая производства ФГУП НПО «Микроген», питательные среды для определения декарбоксилаз орнитина и лизина сухие производства ООО «БиоКомпас-С», приготовленные по инструкциям производителей. В качестве контрольных были также использованы среды лабораторного изготовления: Мёллера и Хью-Лейфсона. Все контрольные среды были предварительно протестированы по основным биологическим показателям на соответствие требованиям МУ 3.3.2.2124-06 и МУК 4.2.2316-08.

### Результаты и обсуждение

При подготовке тактико-специального учения СПЭБ, проведенного в период с 26 по 30 июля 2010 года специалистами института была разработана оригинальная легенда, согласно которой имел место занос холеры в город N гражданкой X., прибывшей из Индии, где она находилась в командировке. Был введен в действие режим ЧС, реализованы схемы оповещения и сбора личного состава СПЭБ и осуществлена мобилизация бригады с целью проведения мероприятий по локализации и ликвидации возникшей вспышки холеры. В ТСУ приняли участие 46 членов СПЭБ и сотрудников института, задействованы восемь единиц автотранспорта, в том числе четыре мобильные лаборатории на базе шасси автомобиля КАМАЗ 43118 и прицепа СЗАП 8305: «Индикационная лаборатория», «Бактериологическая лаборатория», «Блок

поддержки бактериологических исследований» и «Универсальный штабной жилой модуль». После совершения марша и прибытия колонны в пункт дислокации полевого лагеря СПЭБ было проведено развертывание подразделений бригады на базе указанных мобильных лабораторий для работы в автономном режиме. Электроснабжение полевого лагеря СПЭБ осуществлялось с помощью четырех штатных дизельных электрогенераторов мощностью от 9,0 до 12,0 кВт/ч. Вода для обеспечения функционирования мобильных лабораторий и хозяйственно-бытовых нужд была резервирована во встроенных емкостях каждого модуля, заполненных через быстроразъемные соединения.

Личным составом СПЭБ согласно требованиям СП 3.1.1.2521-09 [9] проведено обследование эпидемического очага, разработан оперативный план противоэпидемических мероприятий. Сотрудниками бригады организовано выявление и контроль исполнения медицинского наблюдения за 30 лицами, контактировавшими с больными и вибрионосителями, отбор точечных проб из сети пунктов отбора проб воды на территории города N.

Исследование 20 поступивших учебных проб, в том числе 10 проб из реальных объектов окружающей среды (вода поверхностных водоемов и стоков) и 10 проб (семь из которых были искусственно контаминированы токсигенным штаммом *V. cholerae eltor* 5879 до конечной концентрации в пробе от  $10^3$  до  $10^7$  м.к./мл), имитирующих, согласно легенде, клинический материал от больных, вибрионосителей и лиц, контактировавших с ними, осуществляли в соответствии с требованиями МУК 4.2.2218-07 с использованием всех современных методов, рекомендованных практическим руководством по лабораторной диагностике опасных инфекционных болезней [7]. Посев материала с целью биологического обогащения и последующего выделения штаммов *V. cholerae* проводили параллельно на опытные (ХДС-Н и ХДС-агар) и контрольные (основной пептон, 1 % пептонная вода и щелочной агар) питательные среды. Идентификацию подозрительных колоний и выделенных культур проводили также параллельно с использованием опытных (ХДС-ПУДА, ХДС-РГ, ХДС-ОДДА) и контрольных (агар Клигlera, среда Хью-Лейфсона, среда Мёллера, коммерческие среды для определения декарбоксилаз аминокислот) дифференциально-диагностических сред.

Исследование поступивших в ходе ТСУ учебных проб проведено на базе мобильных лабораторий СПЭБ «Индикационная лаборатория» и «Бактериологическая лаборатория». Использование разработанного на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей комплекса питательных сред для диагностики холеры позволило выделить и идентифицировать семь токсигенных штаммов *V. cholerae eltor* из 10 проб, имитирующих клинический материал от больных, вибрионосителей и контактных, а также один атоксигенный штамм *V. cholerae eltor* из

10 проб реальных объектов окружающей среды. При параллельном применении контрольных сред из проб, имитирующих клинический материал, были изолированы и идентифицированы как *V. cholerae eltor* (токсигенные) только пять штаммов, а в пробах объектов окружающей среды холерный вибрион не обнаружен.

На средах разработанного комплекса холерный вибрион был выделен из всех семи искусственно контаминированных штаммом *V. cholerae eltor* 5879 проб (с конечной концентрацией данного микроорганизма  $10^3$ ,  $10^5$  и  $10^7$  м.к./мл), в то время как с помощью контрольного комплекса сред возбудитель холеры был изолирован только из проб, содержащих указанный штамм *V. cholerae* в концентрациях  $10^5$  и  $10^7$  м.к./мл. Этот факт свидетельствует о более высокой чувствительности опытных сред ХДС-Н и ХДС-агара по сравнению с контрольными средами аналогичного назначения (основным пептоном, приготовленной из него 1 % пептонной водой и щелочным агаром).

Выделение в ходе ТСУ атоксигенного штамма *V. cholerae eltor* из реальной пробы воды открытого водоема только с помощью сред разработанного комплекса подтверждает полученные ранее в результате многолетнего мониторинга водных объектов данные [3] о преимуществе этих сред перед используемыми в микробиологической практике.

Применение входящих в состав разработанного комплекса цветных дифференциально-диагностических питательных сред на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей (ХДС-РГ, ХДС-ОДДА, ХДС-ПУДА) для идентификации изолированных в процессе настоящего ТСУ штаммов холерного вибриона показало, что по дифференцирующим свойствам и срокам ферментации углеводов и аминокислот данные питательные среды не отличались от аналогичных контрольных сред (Хью-Лейфсона, Клигlera, Мёллера, коммерческих сред для определения декарбоксилаз аминокислот), но при этом характеризовались более низкой себестоимостью и единой универсальной питательной основой.

Результаты диагностических исследований с использованием комплекса разработанных на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей питательных сред в развернутых мобильных лабораториях позволили своевременно дать адекватную оценку сложившейся ситуации по заносу холеры на территорию города N и откорректировать оперативный план противоэпидемических мероприятий, направленных на локализацию и ликвидацию эпидемического очага.

Таким образом, тематические тактико-специальные учения СПЭБ позволяют не только дать практические навыки работы в условиях различных ЧС личному составу бригад, но и провести апробацию новых диагностических препаратов, в том числе питательных сред. Разработанный на основе панкреатического перевара пекарских дрожжей новый комплекс питательных сред для диагностики холеры

превосходит по эффективности применения используемый в микробиологической практике традиционный комплекс сред аналогичного назначения. Среды предлагаемого комплекса являются перспективными для включения в мобилизационный резерв СПЭБ.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Казакова Е.С., Карнаухов И.Г., Шарова И.Н., Касьян И.А., Осина Н.А., Портенко С.А. и др. Организация мобильного комплекса специализированной противоэпидемической бригады противочумного института. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2010; 2:24–7.
2. Каминский Д.И., Мазрухо А.Б., Ломов Ю.М., Рожков К.К., Криваченко К.Б., Овсова Л.М. и др. Оценка жидкой накопительной среды ХДС-Н для культивирования и выделения холерного вибриона. Биотехнология. 2003; 4:70–4.
3. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Алутин И.М. и др. Алгоритм и тактика обеспечения питательными средами специализированных противоэпидемических бригад Роспотребнадзора при работе в очаге холеры. Здоровье населения и среда обитания. 2009; 11:8–16.
4. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Телесманич Н.Р. Использование новых питательных сред на этапах подготовки сотрудников специализированных противоэпидемических бригад к работе в зонах чрезвычайных ситуаций. Медико-биологические и социально-психологические проблемы безопасности в чрезвычайных ситуациях. 2010; 3:75–80.
5. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин И.М. Способ получения белкового гидролизата. Патент РФ 2375441, опубл. 10.12.2009. Бюл. № 34.
6. Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Рожков К.К., Алутин И.М. Среда обогащения для выделения холерного вибриона Патент РФ 2392310, опубл. 20.06.2010. Бюл. № 17.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. Лабораторная диагностика опасных инфекционных болезней. Практическое руководство. М.: Медицина, ЗАО «Шико»; 2009. С. 61–99.
8. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., редакторы. СПЭБ. Саратов: ОАО «Приволжское издательство»; 2008. С. 10, 12–14, 79–82.
9. Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации: СП 3.1.1.2521-09. М.; 2010.
10. Черехаина И.Я., Фецайлова О.П., Балахнова В.В. и др. Способ определения зараженности продовольствия патогенными биологическими агентами в условиях чрезвычайных ситуаций. Патент РФ 230656, опубл. 27.03.2009. Бюл. № 9.

### References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Kazakova E.S., Karnaykhov I.G., Sharova I.N., Kas'yan I.A., Osina N.A., Portenko S.A., et al. [Organization of laboratory mobile complex of specialized anti-epidemic team of institute for plague control]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 2:24–7.
2. Kaminsky D.I., Mazrukho A.B., Lomov Yu.M., Rozhkov K.K., Krivachenko K.B., Ovsova L.M., et al. [Assessment of the liquid accumulative medium KHDS-N for cholera vibrio cultivation and isolation]. Biotechnology. 2003; 4:70–4.
3. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Alutin I.M. et al. [Algorithm and tactics of provision with nutrient media, designed for the Rospotrebnadzor specialized anti-epidemic teams for their work in cholera foci]. Zd. Nas. Sreda Obit. 2009; 11:8–16.
4. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Telesmanich N.R. [Application of the new nutrient media at the stage of SAET members training for operations in emergency zones]. Med.-Biol. Sots.-Psikh. Probl. Bezop. v Chrezvych. Sit. 2010; 3:75–80.
5. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Rozhkov K.K., Alutin I.M. [Method of protein hydrolyzate obtainment]. RF Patent 2375441. 10 Dec 2009.
6. Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Rozhkov K.K., Alutin I.M. [Enrichment Medium for Cholera Vibrio Isolation]. RF Patent 2392310. 29 Jun 2010.
7. Onishchenko G.G., Kutuyrev V.V., editors. [Laboratory diagnostics of particularly dangerous infectious diseases. Guidelines]. Moscow: Meditsina, ZAO "Shiko"; 2009. P. 61–99.
8. Onishchenko G.G., Kutuyrev V.V., editors. [SAET]. Saratov: ОАО "Privolzh. Izd."; 2008. PP. 10, 12–14, 79–82.
9. [Cholera Prophylaxis. General Requirements for Cholera Epidemiological Surveillance Procedures in the Territory of the Russian Federation: SR 3.1.1.2521-09]. Moscow; 2010.
10. Cherepakhina I.Ya., Fetseylova O.P., Balakhnova V.V. et al. [Detection Method of the Infection Rate in Foods, Exposed to Pathogenic Biological Agents in Emergency Situations]. RF Patent 2350656. 27 Mar 2009.

### Authors:

Mazrukho A.B., Kaminsky D.I., Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Rozhkov K.K., Kruglikov V.D., Goncharenko E.V., Trishina A.V., Pukhov Yu.M., Prometnoy V.I., Pichurina N.L. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. M.Gor'kogo St., 117/40, Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru

### Об авторах:

Мазрухо А.Б., Каминский Д.И., Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Рожков К.К., Кругликов В.Д., Гончаренко Е.В., Тришина А.В., Пухов Ю.М., Прометной В.И., Пичурина Н.Л. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

Поступила 17.05.11.