

для обеспечения оперативного реагирования на чрезвычайные ситуации биологического характера¹.

В последние годы появились доказательства того, что в окружающей среде встречаются микроорганизмы, обладающие разнообразными маркерами антибиотикорезистентности. При этом водная среда обеспечивает идеальные условия для приобретения и распространения устойчивости к антибиотикам [5, 6]. Штаммы холерных вибрионов non-O1/non-O139, являясь автохтонными обитателями водной среды, известны как возбудители острых кишечных инфекций различной степени тяжести [7–10].

Во многих работах отмечено нарастание числа резистентных и полирезистентных штаммов холерных вибрионов non-O1/non-O139 серогрупп с течением времени в различных географических зонах [11–13].

Согласно данным ретроспективных исследований, штаммы, выделенные ранее в ряде регионов России, не обладали антибиотикорезистентностью, тогда как выделенные в Ростовской области имели до 18 различных профилей, включающих чувствительные, и с множественной устойчивостью (от 1 до 6 маркеров у одного штамма) [14]. Штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139 серогрупп могут быть резервуарами различных комбинаций генов антибиотикорезистентности, которые способны передаваться патогенным штаммам холерных вибрионов [15, 16]. Знание распространенности устойчивости к противомикробным препаратам в этих серогруппах представляет интерес, поскольку благодаря своим специфическим генетическим возможностям и экологическим характеристикам холерные вибрионы non-O1/non-O139 могут быть средством передачи генов устойчивости во всех водных средах – как внутри видов бактерий, так и между бактериальными родами. В геноме холерных вибрионов non-O1/non-O139 серогрупп обнаружены специализированные мобильные структуры, содержащие маркеры устойчивости к АБП, которые создают оптимальные условия для горизонтального переноса генов и способствуют увеличению доли резистентных микроорганизмов [17, 18].

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора регулярно осуществляет мониторинг холерных вибрионов в водных объектах окружающей среды г. Ростова-на-Дону с комплексным сравнительным анализом фенотипических и генотипических свойств выделенных культур и изучением их антибиотикорезистентности. Увеличение числа резистентных к АБП штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139, вариабельность спектра антибиотикоустойчивости вызывают интерес и требуют проведения исследований для на-

копления базовой информации и расширения взаимодействия с органами Роспотребнадзора в субъектах Российской Федерации.

Цель исследования – изучение чувствительности/устойчивости к АБП штаммов холерных вибрионов non-O1/non-O139 серогрупп, выделенных в 2016–2018 гг. из городских водных объектов.

Материалы и методы. Изоляты *V. cholerae* non-O1/non-O139 были получены при мониторинге холерных вибрионов в водоемах г. Ростова-на-Дону с мая по сентябрь 2016–2018 гг. Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с Методическими указаниями (МУК 4.2.2218–07)², дополнительно использовали масс-спектрометрический анализ (Bruker Daltonics, Германия). Обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения фирмы Bruker Daltonics (Германия): flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11) в соответствии с Методическими рекомендациями (МР 4.2.0089–14)³.

Штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139 серотипировали в реакции слайд-агглютинации, используя набор сывороток диагностических холерных non-O1/non-O139 серогрупп моноспецифических кроличьих против типовых штаммов холерных вибрионов O2-O84 серогрупп [19].

Резистентность к АБП определяли методом серийных разведений. Оценку антибиотикочувствительности вибрионов проводили с использованием рекомендованных для экстренной профилактики и лечения холеры препаратов (доксциклина, ципрофлоксацина, ко-тримаксазола, фуразолидона, гентамицина, налидиксовой кислоты, хлорамфеникола, ампициллина, цефтриаксона) в соответствии с МУК 4.2.2495–09⁴.

Контроль качества питательной среды и антибактериальных препаратов осуществлялся с использованием референтных тест-штаммов *Vibrio cholerae* non O1 KM 162 (P 9741), *Escherichia coli* ATCC 25922.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью стандартных средств программы «Microsoft Office Excel». Статистическую значимость различий выборочных долей определяли с помощью Z-критерия Фишера с уровнем значимости ($p \leq 0,05$).

Результаты исследования. В процессе проведения мониторинга из точек отбора было выделено в 2016 г. 196 штаммов, в 2017 г. – 75 шт., 2018 г. – 90 шт. *V. cholerae* non-O1/non-O139.

Все изолированные штаммы относились к типичным представителям семейства Vibrionaceae, рода *Vibrio*, вида *V. cholerae*, non-O1/non-O139 серогрупп. Были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам, обладали оксидазной активностью,

¹ Об основах государственной политики Российской Федерации в области обеспечения химической и биологической безопасности на период до 2025 года и дальнейшую перспективу (утв. Президентом РФ 11 марта 2019 г. Указ N 97). Доступно по <http://kremlin.ru/acts/bank/44066>. Ссылка активна на 17 февраля 2020 г.

² МУК 4.2.2218–07 «Лабораторная диагностика холеры» (утв. Главным Государственным санитарным врачом РФ 31.05.2007).

³ МР 4.2.0089–14 «Использование метода времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для индикации и идентификации возбудителей I–II групп патогенности» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Главным государственным санитарным врачом РФ 24 апреля 2014 г.).

⁴ МУК 4.2.2495–09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сальмонеллез, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам» М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 59 с.

фуразолидон и фуразолидон /ампициллин. В 2016 г. их доля составила 21,4 % и 14,8 %, в 2017 г. — 20,0 % и 10,6 %, а в 2018 г. — 20,0 % и 15,5 % соответственно.

Среди устойчивых к трем АБП имели фенотип ампициллин / фуразолидон / ко-тримоксазол в 2016 г. 15,3 % от общего числа микроорганизмов, в 2017 г. — 9,3 %, в 2018 г. — 11,1 %. При анализе долей микроорганизмов, чувствительных к трем и более АБП, были зарегистрированы статистически значимые различия, что свидетельствует о нарастании в 2018 г. множественно резистентных микроорганизмов, относящихся к холерным вибрионам non-O1/non-O139 серогрупп.

Заключение

Проведен сбор и анализ данных о серотипах и резистентности к АБП 361 штамма *V. cholerae* non-O1/non-O139, выделенных в процессе мониторинга в гидроэкосистемах г. Ростова-на-Дону в 2016–2018 гг.

Установлено, что в изучаемый период циркулировали штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139, которые были отнесены к 17 серогруппам, доминировали представители O16 и O76 серогрупп. У них не были обнаружены гены холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии. Анализ серотипирования штаммов в 2016–2018 гг. в сравнении с предыдущими исследованиями (2003–2008 гг., 2009–2011 гг.) [20, 25] не выявил значительных изменений в составе доминирующих серогрупп холерных вибрионов.

Проведенные ранее (в 2011–2014 гг.) мониторинговые исследования по изучению чувствительности/устойчивости к АБП штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139 выявили, что 17,6 % изолятов были чувствительны ко всем антибиотикам [14]. В нашем исследовании таких штаммов в 2016–2017 гг. не выделено, в 2018 г. их доля составила 2,2 %, что свидетельствует о резком сокращении доли чувствительных ко всем АБП микроорганизмов. Резистентностью к фуразолидону в 2011–2014 гг. обладали 47 % штаммов, в 2016–2017 гг. их доля увеличилась до 100 % [14, 20].

Доли штаммов, устойчивых к ампициллину, ко-тримоксазолу, цефоперазону колебались в зависимости от года наблюдения незначительно. Зафиксировано статистически значимое увеличение с 2016 по 2018 г. доли штаммов, устойчивых к налидиксовой кислоте (с 4 % до 13,3 %) и хлорамфениколу (с 0,5 % до 4,4 %).

В результате мониторинга с 2016 по 2018 г. зарегистрировано статистически значимое различие увеличения долей полирезистентных штаммов холерных вибрионов non-O1/non-O139 серогрупп. Среди них самым распространенным был фенотип ампициллин / фуразолидон / ко-тримоксазол.

Впервые на территории Российской Федерации изучена и установлена устойчивость штаммов холерных вибрионов, выделенных из окружающей среды, к имипенему, которая была дополнена устойчивостью к фуразолидону и ко-тримоксазолу. Поскольку патогенные штаммы *V. cholerae* имеют ту же нишу, что и штаммы холерных вибрионов non-O1/non-O139 серогрупп, устойчивость к противомикробным

соединениям может передаваться от непатогенных к патогенным микроорганизмам.

Появление изолятов, устойчивых к карбапенемам, а также увеличение доли полирезистентных микроорганизмов вызывают серьезную обеспокоенность и подчеркивают необходимость систематического мониторинга антимикробной резистентности у потенциально патогенных видов *Vibrio cholerae* для контроля дальнейшего распространения антибиотико-резистентности в регионе.

Список литературы

(пп. 1–5, 7–10, 13, 15, 17, 18, 21–24 см. References)

- Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н. и др. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, ее объем, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. 2013. Т. 58. № 5–6. С. 38–48.
- Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 2. С. 14–23.
- Утепова И.Б., Сагиев З.А., Алыбаев С.Д. и др. Характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Казахстана // ACTA BIOMEDICA SCIENTIFICA. 2017. Т. 2. № 5. Ч. 1. С. 100–105.
- Селянская Н.А., Веркина Л.М., Архангельская И.В. и др. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов неO1/не O139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области в 2011–2014 гг. // Здоровье населения и среда обитания. 2015. № 7 (268). С. 33–36.
- Захарова И.Б., Водяницкая С.Ю., Подшивалова М.В. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139, выделенных из балластных вод судов и акватории портов Ростовской области // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015. Т. 20. № 3. С. 47–50.
- Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Ишина Е.В. и др. Оценка метода серологической идентификации *Vibrio cholerae* не O1 // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2001. № 4. С.75–78.
- Березняк Е.А., Тришина А.В., Селянская Н.А. и др. Антибиотикоустойчивость штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, изолированных из гидроэкосистем в 2016–2017 гг. в Ростове-на-Дону // Журнал микробиология, эпидемиология и иммунобиология. 2019. № 2. С. 87–91.
- Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б. и др. Холерные вибрионы неO1/неO139, выделенные в ходе мониторинга водоемов и стоков Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год // Проблемы особо опасных инфекций. 2013. № 4. С. 48–50.

References

- Bassetti M, Pecori D, Peghin M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria-resistant infections: epidemiology, clinical issues and therapeutic options. *Ital J Med.* 2016; 10(4):364–375. DOI: <https://doi.org/10.4081/ijtm.2016.802>
- Curcio D. Multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: are you ready for the challenge? *Curr Clin Pharmacol.* 2014; 9(1):27–38. DOI: <https://doi.org/10.2174/15748847113089990062>
- World Health Organization. Global Action Plan on Antimicrobial Resistance. Available at: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en/> Accessed: 17 Feb 2020.
- World Economic Forum. Available at: <https://www.weforum.org/events/world-economic-forum-annual-meeting-2018>. Accessed: 17 Feb 2020.
- Delgado-Gardea MC, Tamez-Guerra P, Gomez-Flores R, et al. Multidrug-resistant bacteria isolated from surface water in Bassaseachic Falls National Park, Mexico. *Int J Environ Res Public Health.* 2016; 13(6):E597. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph13060597>

6. Vinogradova KA, Bulgakova VG, Polin AN, *et al.* Microbial antibiotic resistance: resistome, its volume, diversity and development. *Antibiotiki i Himioterapiya*. 2013; 58(5-6):38-48. (In Russian).
7. Newton A, Kendall M, Vugia DJ, *et al.* Increasing rates of vibriosis in the United States, 1996–2010: review of surveillance data from 2 systems. *Clin Infect Dis*. 2012; 54(Suppl 5):S391–S395. DOI: <https://doi.org/10.1093/cid/cis243>
8. Ottaviani D, Leoni F, Rocchegiani E, *et al.* Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *Int J Food Microbiol*. 2009; 132(1):47–53. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodmicro.2009.03.014>
9. Schirmeister F, Dieckmann R, Bechlers S, *et al.* Genetic and phenotypic analysis of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from German and Austrian patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014; 33(5):767–78. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10096-013-2011-9>
10. Trubiano JA, Lee JY, Valcanis M, *et al.* Non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* bacteraemia in an Australian population. *Intern Med J*. 2014; 44(5):508–11. DOI: <https://doi.org/10.1111/imj.12409>
11. Monakhova EV, Arkhangel'skaya IV. Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups in etiology of acute intestinal infections: current situation in Russia and around the world. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*. 2016; (2):14–23. (In Russian).
12. Utepova IB, Sagiev ZA, Alybaev SD, *et al.* Characteristics of cholera strains isolated in Kazakhstan. *ACTA BIOMEDICA SCIENTIFICA*. 2017; 2(5, Pt 1):100-105. (In Russian).
13. Siriphap A, Leekitcharoenphon P, Kaas RS, *et al.* Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169324>
14. Selyanskaya NA, Verkina LM, Arkhangelskaya IV, *et al.* Monitoring of antimicrobial resistance of strains of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 serogroups isolated from environmental objects of the Rostov Region in 2011–2014. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2015; (7(268)):33–36.
15. Rodriguez-Blanco A, Lemos ML, Osorio CR. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(5):2619–26. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.05997-11>
16. Zakharova IB, Vodyanitskaya SYu, Podshivalova MV, *et al.* Molecular genetic characterization of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated from ship ballast and port surface water in Rostov region. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(3):47–50. (In Russian).
17. Baron S, Lesne J, Jouy E, *et al.* Antimicrobial susceptibility of autochthonous aquatic *Vibrio cholerae* in Haiti. *Front Microbiol*. 2016; 7:1671. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01671>
18. Carraro N, Rivard N, Ceccarelli D, *et al.* IncA/C conjugative plasmids mobilize a new family of multidrug resistance islands in clinical *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from Haiti. *mBio*. 2016; 7(4):e00509-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00509-16>
19. Avdeeva EP, Mazruho BL, Ishina EV, *et al.* Evaluation of the method of serological identification of non-O1 *Vibrio cholerae* isolates. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2001; (4):75–78. (In Russian).
20. Bereznyak EA, Trishina AV, Selyanskaya NA, *et al.* Antibiotic sensitivity of *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 strains isolated from hydroecosystems in 2016–2017 in Rostov-on-Don. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2019; (2):87–91. (In Russian). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-87-91>
21. Mangat CS, Boyd D, Janecko N, *et al.* Characterization of VCC-1, a novel ambler class A carbapenemase from *Vibrio cholerae* isolated from imported retail shrimp sold in Canada. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 60(3):1819–25. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.02812-15>
22. Hammerl JA, Jäckel C, Bortolaia V, *et al.* Carbapenemase VCC-1—producing *Vibrio cholerae* in coastal waters of Germany. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23(10):1735–37. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2310.161625>
23. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Ther Adv Infect Dis*. 2016; 3(1):15–21. DOI: <https://doi.org/10.1177/2049936115621709>
24. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012; 18(3):268–281. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
25. Grigorenko LV, Kruglikov VD, Mazrukho AB, *et al.* Cholera vibrios non-O1/non-O139 isolated in the process of epidemiological monitoring over Rostov-on-Don water basins and drain sewage system within the period of 2009–2011. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii*. 2013; (4):48–50. (In Russian). DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2013-4-48-50>

Контактная информация:

Березняк Елена Александровна, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора
e-mail: labbiobez@mail.ru

Corresponding author:

Elena A. **Bereznyak**, MD, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Laboratory for Biological Safety and Treatment of Especially Dangerous Infections, Rostov-on-Don Anti-Plague Research Institute of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing
e-mail: labbiobez@mail.ru

