

На правах рукописи

**Сизова Юлия Владимировна**

**ВЛИЯНИЕ СТРЕССОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ НА  
ТОКСИНОПРОДУКЦИЮ И ДРУГИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ  
ВИБРИОНОВ O1 СЕРОГРУППЫ**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Саратов

2018

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

**Научный руководитель:** **Черепяхина Ирина Яковлевна**, доктор медицинских наук

**Официальные  
оппоненты:**

**Викторов Дмитрий Викторович**, доктор биологических наук, доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по научно-экспериментальной работе

**Комиссаров Александр Владимирович**, доктор биологических наук, доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий отделом экспериментальных фармацевтических форм

**Ведущая организация:** Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «18» апреля 2018 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
доктор биологических наук

А.А. Слудский

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Продолжающаяся с 1961 г. и по настоящее время 7-ая пандемия холеры, обусловленная токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор и появление в 90-х годах прошлого столетия генетически измененных штаммов, вызвавших интенсивное распространение холеры в странах Азии и Африки, сохраняет угрозу завоза инфекции в Российскую Федерацию [Смирнова Н.И. с соавт., 2010, 2011; Nair G.V. et al., 2002; Faruque S.M. et al., 2007]. Характерной особенностью возбудителя холеры является чередование его пребывания в инфицированном макроорганизме с последующим существованием в природных экосистемах. Смена экологической ниши сопровождается появлением новых или модифицированных биологических свойств, которые облегчают адаптацию холерных вибрионов к измененным условиям существования. Биологической функцией адаптации микроорганизмов является стресс [Титов В.Н., 2010]. Понятием «стресс» определяют общий комплекс неспецифических компенсаторно-приспособительных процессов, развивающихся у организмов в ответ на воздействие чрезвычайных раздражителей – стрессоров [Баснакьян И.А., 2003]. Основные стрессоры для микробной популяции – высокие или низкие температуры, рН, дефицит железа, отсутствие глюкозы, рост при низком парциальном давлении кислорода.

**Степень разработанности темы исследования.** В настоящее время одними из наиболее распространенных неблагоприятных факторов для холерных вибрионов при попадании в организм человека являются кислая среда желудочного сока и воздействие желчи, а при переходе в водную экосистему вибрион испытывает сложности в питании, воздействие необычной температуры и осмотической среды [Заднова Н.И. с соавт., 2014; Chatterjee S. et al., 2007; Silva A.J., Venitez J.A., 2016]. Известно, что холерные вибрионы в неблагоприятных условиях (воздействие хлора, кислого или щелочного рН, ультрафиолетового излучения, осмотического и оксидативного стресса) «включают» механизмы множественной стрессорной устойчивости, в частности, экспрессируют ряд белков, продуцируют экзополисахарид, входящий в состав биопленок [Баснакьян И.А., 2002; Шумков М.С., 2007; Ткаченко А.Г., 2010]. При определенных стрессовых условиях происходит модификация генов, ответственных за патогенность и персистенцию [Заднова С.П. с соавт., 2009; Смирнова Н.И. с соавт., 2010, 2011; Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Плеханов Н.А., 2017].

Влияние стрессового воздействия на биологические свойства холерных вибрионов, их фенотип и генотип изучено недостаточно. В какой степени

возбудитель холеры модифицирует патогенные и культуральные свойства – вопрос остается до настоящего времени практически неизученным. Не изучено, в частности, как влияет кислота желудочного сока, желчь, рН среды, снижение парциального давления кислорода, низкая температура на такие важные свойства как токсинопродукция, агглютинабельность холерными сыворотками и продукция экзополисахарида. Кроме того, у холерных вибрионов есть ряд свойств, которые обуславливают их персистентный потенциал. Это признаки, которые могут играть роль в формировании бактерионосительства и в поддержании жизнеспособности вибрионов в объектах окружающей среды [Бухарин О.В., Дерябин Д.Г., 1997; Балахнова В.В. с соавт., 2010; Коршенко В.А., 2016].

В этой связи особую актуальность приобретает изучение роли стресса в модификации признаков, участвующих в формировании персистентного потенциала холерных вибрионов, таких как продукция экзополисахарида (основы биопленок), антилизотимная, антикомплементарная, антилактоферриновая активности, активность антиоксидантных ферментов (каталазы и супероксиддисмутазы).

Изучение влияния различных стрессоров и их комбинаций на такие важные свойства как токсинопродукция, агглютинабельность, а также свойства, обуславливающие персистентный потенциал, актуально и представляет несомненный научный интерес, поскольку может способствовать расширению наших знаний о биологии возбудителя холеры, патогенезе заболевания и решению ряда практических задач при проведении эпиднадзора за этой инфекцией.

**Цель исследования:** изучить влияния стрессового воздействия на патогенные, культуральные и персистентные свойства холерных вибрионов O1 серогруппы различной эпидемической значимости. Оценить роль отдельных стрессоров в патогенезе и персистенции возбудителя холеры.

**Основные задачи исследования:**

1. Изучить влияние различных стрессоров на уровень продукции холерного токсина, сравнить их воздействие на типичные штаммы и геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор, занесенные на территорию Российской Федерации в 1993-2014 г.г.
2. Изучить влияние моно- и полистрессоров (температуры, кислоты, желчи, высокого рН, микроаэрофильных условий, анаэробнобиоза) на агглютинабельность холерных вибрионов O1 серогруппы.
3. Оценить влияние стрессовых воздействий на образование биопленок и продукцию экзополисахарида, сравнить роль различных стрессоров на процесс адаптации холерных вибрионов различной эпидемической значимости к

неблагоприятным факторам окружающей среды.

4. Охарактеризовать влияние стрессоров на продукцию кадаверина, рассматриваемого в настоящее время как персистентный фактор у микроорганизмов, и уровень антилизосимной активности холерных вибрионов O1 серогруппы.

#### **Научная новизна и теоретическая значимость.**

- Установлена прямая взаимосвязь воздействия моно- и полистрессоров с ответной реакцией вибрионов, различающихся по эпидемической значимости. В опытах, моделирующих воздействие стрессоров на возбудителя холеры в организме человека, отмечается резкое повышение количества продуцируемого холерогена; напротив, в речной воде при низкой температуре и гипоксии – показатели быстро снижаются.

- Показано, что фенотипические изменения уровней токсинопродукции, коррелирующие в эксперименте со степенью и видом стрессового воздействия, не сопровождаются утратой профага *CTX $\phi$* , несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина, а также других значимых участков генома, что подтверждается в полногеномном секвенировании и INDEL-типировании исходных и стрессированных культур.

- Впервые показано, что холерные вибрионы O1 серогруппы после стрессового воздействия образуют как внутриклеточный, так и внеклеточный полиамин кадаверин, количество которого прямо коррелирует с патогенностью возбудителя холеры, по мере снижения эпидемической значимости вибрионов отмечается снижение значений суммарной продукции кадаверина: в микроаэрофильных условиях - с 445,0 мкг/мл у *ctx+tcp+* и 435,8 мкг/мл у *ctx-tcp+* штаммов до 292,5 мкг/мл у *ctx-tcp-* штаммов. Отработан метод определения полиамина кадаверина у холерных вибрионов и получен патент на изобретение «Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп» RU № 2566558 от 29.09.2015г.

- Впервые доказана роль гипоксии в адаптивном изменении антигенного состава холерных вибрионов O1 серогруппы, приводящее к утрате агглютинабельности у 50-70% штаммов, что может вызывать затруднения при идентификации культур и следует учитывать при проведении мониторинга.

- Доказана стрессорная роль низкой температуры и гипоксии на процесс выживания и образования биопленок *V. cholerae* O1, различающихся по эпидемической значимости.

- Установлено влияние стресса на антилизосимную активность: у токсигенных штаммов показатели снижались в меньшей степени, чем у нетоксигенных холерных вибрионов O1 серогруппы.

### **Научно-практическая ценность работы.**

Разработаны, одобрены решением Ученого Совета ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (протокол №12 от 04.12.2014 г.) и утверждены директором института методические рекомендации «Методики создания условий стресса для холерных вибрионов при изучении персистентного потенциала возбудителя холеры». Данные методики используются в НИР ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акты о внедрении от 22.05.2017 г. и 24.05.2017 г.)

Результаты исследований по определению продукции кадаверина используются при выполнении научных тем ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт о внедрении от 19.05.2017 г.).

Полученные сведения диссертационного исследования используются при чтении лекций по микробиологии и лабораторной диагностике холеры на курсах дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Стрессорное воздействие в виде низкой температуры, гипоксии, кислоты, желчи, высокого рН оказывает выраженное влияние на фенотип холерных вибрионов O1 серогруппы, заключающееся в вариабельности токсинопродукции, модификации поверхностных структур, биопленкообразования, активности факторов, роль которых в персистенции холерных вибрионов доказана.

2. Стрессовые факторы, имитирующие воздействие на холерные вибрионы в организме человека, вызывают повышение продукции холерного токсина, что свидетельствует об активации экспрессии генов *ctxAB*, кодирующих основной фактор патогенности. Низкая температура как стрессор, имитирующий условия окружающей среды в речной воде в холодное время года, в течение 1-2 месяцев вызывает снижение продукции холерного токсина вплоть до полной его утраты.

3. Изменения активности изучаемых свойств, связанные со стрессовым воздействием, не связаны с утратой генов, кодирующих продукцию холерогена, экзополисахарида, что подтверждено специальными исследованиями в ПЦР на наличие генов *ctxAB*, *tcpA*, *vps*.

4. В условиях длительной гипоксии холерные вибрионы O1 серогруппы включают механизмы адаптации к действию стрессоров путем модификации поверхностных структур, выражающейся в снижении или утрате агглютинабельности холерными сыворотками, что может вызывать затруднения при идентификации культур.

5. Стресс оказывает влияние на свойства, обуславливающие

персистентный потенциал холерных вибрионов в опытах, моделирующих условия существования в различных экологических нишах: биопленкообразование, продукцию полиамина кадаверина, антилизоцимную активность. Показатели биопленкообразования коррелируют с показателями выживания холерных вибрионов O1 серогруппы и зависят от эпидемической значимости штаммов. Уровень антилизоцимной активности зависит от стрессового воздействия - вызывая в одних случаях повышение, в других – снижение признака. Количество продуцируемого кадаверина прямо коррелирует с патогенностью культур и источником выделения штамма.

**Апробация работы.** Материалы диссертации доложены на конференциях молодых ученых ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (2011- 2017 гг.), на заседаниях проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» межведомственного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране РФ (2007 – 2017 гг.), на VII и VIII, IX Всероссийских научно-практических конференциях молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Санкт-Петербург, 2015 г., г. Москва, 2016г., г. Иркутск, 2017 г.), представлены в материалах научной конференции, посвященной 120-летию ФНЦ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана (г. Москва, 2011 г.), региональной научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области», посвященной 95-летию со дня образования государственной санитарно-эпидемиологической службы России (г. Ростов-на-Дону, 2017г.)

Исследования выполнены в рамках двух плановых тем № 0120.0707272 (097-4-07) «Свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов» и № 0120.1252079 (151-4-12) «Влияние стрессорных воздействий на свойства, обуславливающие персистенцию холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды».

**Публикация результатов исследования.** Материалы исследований отражены в 18 научных работах, 6 - в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, утвержденных ВАК Министерства образования и науки России и рекомендованных для публикации основных научных результатов диссертации на соискание ученой степени, а также в патенте «Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп» RU № 2566558 от 29.09.2015 г.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 143 страницах, состоит из введения, главы обзора литературы, четырех глав собственных исследований (в том числе одной главы с описанием материалов и методов),

заклучения и выводов, иллюстрирована 13 рисунками и 21 таблицами. Библиография содержит ссылки на 257 публикаций (в т.ч. 94 работы отечественных и 163 - зарубежных авторов).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

**Материалы и методы.** В работе использовано 24 штамма *V.cholerae* O1серогруппы, выделенных на территории России, Индии, Ирака от людей и из воды открытых водоемов в период с 1962 по 2014 гг.: основная коллекция - 14 штаммов с различными формулами эпидемической значимости, выделенные от человека и из объектов окружающей среды; в опытах по изучению влияния стресса на токсинопродукцию дополнительно исследовали 10 эпидемически значимых штаммов. Перед началом работы штаммы холерных вибрионов были охарактеризованы в соответствии с Методическими указаниями 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры».

Для определения токсинопродукции исходных и стрессированных культур использовали методику M. Ivanaga et al. [Ivanaga M. et al., 1986]. Количественный уровень продукции холерного токсина определяли в GM<sub>1</sub>-ИФА по стандартной методике. В качестве положительного контроля использовали очищенный холерный токсин (производство «Calbiochem»). Количество продуцируемого холерного токсина определяли с помощью калибровочной кривой и выражали в мкг/мл. Для интерпретации результатов нами были введены условные значения токсинопродукции: низкая – менее 0,3 мкг/мл, средняя – 0,31 до 5 мкг/мл, высокая – 5 и более мкг/мл.

Способность к биопленкообразованию холерных вибрионов изучали по методике P.L. Watnick et al. [Watnick P.L. et al., 1999] в среде M9. Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре Cary50 при длине волны 570 нм. Для оценки биопленкообразования были приняты следующие критерии: низкая способность к биопленкообразованию – значения ОП от 0 до 0,1; средняя – 0,2-0,4; высокая степень – свыше 0,5.

Для определения продукции кадаверина использовали методику S.Cortacero-Ramirez et al. [Cortacero-Ramirez S. Et al., 2007] с нашими модификациями (патент «Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп» RU № 2566558 от 29.09.2015г.), адаптированными с точки зрения требований биологической безопасности при работе с микроорганизмами II группы патогенности.

Определение антилизоцимной активности (АЛА) проводили согласно методикам, приведенным в «Методических рекомендациях по изучению свойств, обуславливающих персистенцию холерных вибрионов». Для оценки уровня АЛА были приняты следующие критерии: низкий – 1-2 мкг/мл; средний –



3-5 мкг/мл; высокий – свыше 5 мкг/мл.

Для определения сохранения детерминант патогенности в условиях стрессового воздействия культуры холерных вибрионов были охарактеризованы с помощью ПЦР на наличие генов *ctxAB*, *tcpA* с помощью коммерческого набора «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» (производство ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) и генов *vps* [Водопьянов А.С., 2011, Монахова Е.В., 2012], а также проведено полногеномное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina). Сборку контигов осуществляли с помощью программы Velvet. Библиотеки готовили с помощью коммерческого набора Nextera DNA Library Preparation Kit (Illumina), а для секвенирования полученных библиотек использовали набор-картридж MiSeqv.2 ReagentsKit 300 CyclesPE (Illumina). Биоинформационный анализ проводили с помощью программ GeneExpert и SeqAnalyzer, разработанных во ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора с использованием ресурсов геномной базы данных NCBI. INDEL-типирование проводили по 9 локусам по методике, предложенной А.С. Водопьяновым с соавт. [2015].

#### **Влияние стрессового воздействия на продукцию холерного токсина**

На первом этапе работы было установлено, что музейные токсигенные холерные вибрионы в разной степени продуцируют холерный токсин: из 15 - два штамма обладали высокой активностью *in vitro* – 10,0 мкг/мл токсина (*V.cholerae classical 569B* и *V.cholerae El Tor 1310*), 2 - средним уровнем - 0,31 мкг/мл (*V.cholerae El Tor 17427* и *18588*), остальные штаммы оказались слабопродуцирующими.

В экспериментах, моделирующих условия, в которых вибрионы находятся в макроорганизме (воздействие низкого и высокого рН, гипоксии) большинство штаммов активно реагировало на стресс, повышая продукцию холерогена до среднего и высокого уровня. При этом, рассматривая последовательность воздействия стрессоров в соответствии с этапами прохождения вибрионов по желудочно-кишечному тракту человека, можно сказать, что активация экспрессии генов *ctxAB* начиналась уже на этапе воздействия на вибрионы кислой среды желудка - штаммы, имеющие изначально низкий уровень продукции холерогена, активнее реагировали на изменение среды в кислую сторону, что выражалось в повышении токсинопродукции до 60 раз, в то время как штаммы холерных вибрионов со средним исходным уровнем реагировали меньше – токсинопродукция увеличилась в 4 раза (рис.1).

Воздействие желчи, наоборот, вызывало у ряда штаммов незначительную ингибицию продукции холерогена, что связано (по данным литературы) с отрицательной регуляцией белка *ToxT*, ответственного за активацию

транскрипции генов, кодирующих холерный токсин и пили адгезии, и только у 3 генетически измененных штаммов *V.cholerae* 18826, 19188 и 19241 показатели возросли в 5 -10 раз. В щелочных условиях (рН 9,0) токсинопродукция исследованных штаммов увеличивалась до 40 раз.

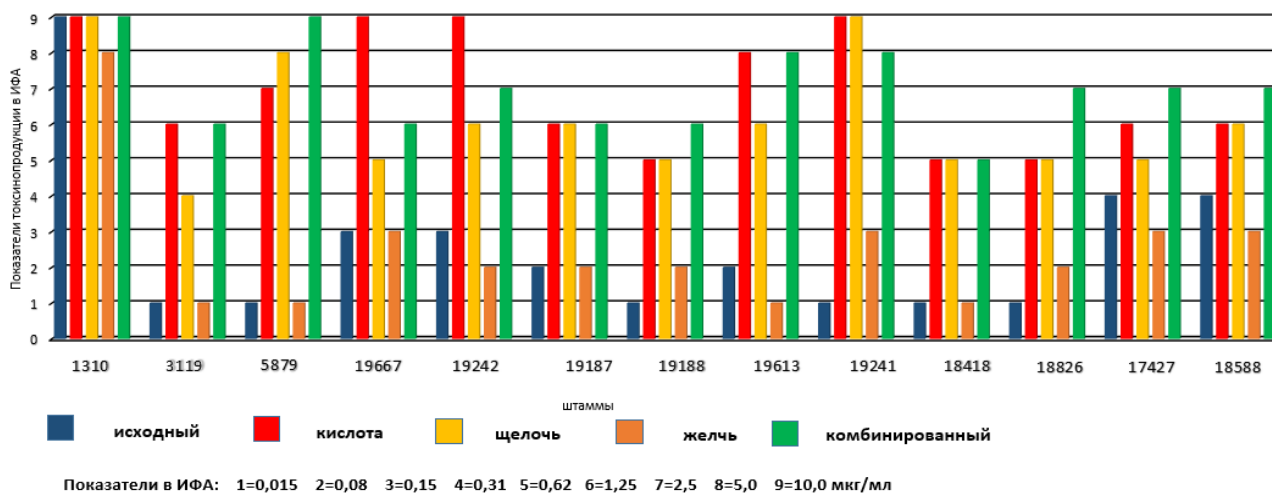


Рисунок 1 - Токсинопродукция холерных вибрионов в условиях стрессоров, воздействующих в организме человека.

Таким образом, было установлено, что условия, имитирующие стрессовое воздействие на вибрионы в желудке и кишечнике человека, вызывали резкое повышение продукции экзотоксина, что свидетельствовало об активации экспрессии в условиях макроорганизма генов *ctxAB*, кодирующих основной фактор вирулентности – холерный токсин. При этом отличия в реакции на стресс между типичными и генетически измененными вариантами в этих условиях не имели статистически достоверных показаний и носили штаммовый характер.

При переходе из макроорганизма в окружающую среду холерные вибрионы сталкиваются с воздействием таких стрессоров как низкая температура, осмолярность среды, сложности в питании. При имитации данных факторов (гипоксия, 4<sup>0</sup>С) отмечали увеличение показателей токсинопродукции у большей части исследуемых штаммов в течение первых 14 дней, что, вероятно, связано с адаптивными регуляторными процессами (рис.2).

Через месяц стрессового воздействия показатели резко снижались у большей части штаммов, вплоть до полного исчезновения признака к концу второго месяца (за исключением *V.cholerae El Tor* 1310, 3119 и 19667), несмотря на рост культуры и сохранение генов *ctxAB*. Через три месяца культивирования при низких температурах ни одна их культур не выросла, показатели токсинопродукции были отрицательными, гены *ctxAB* не обнаружены.

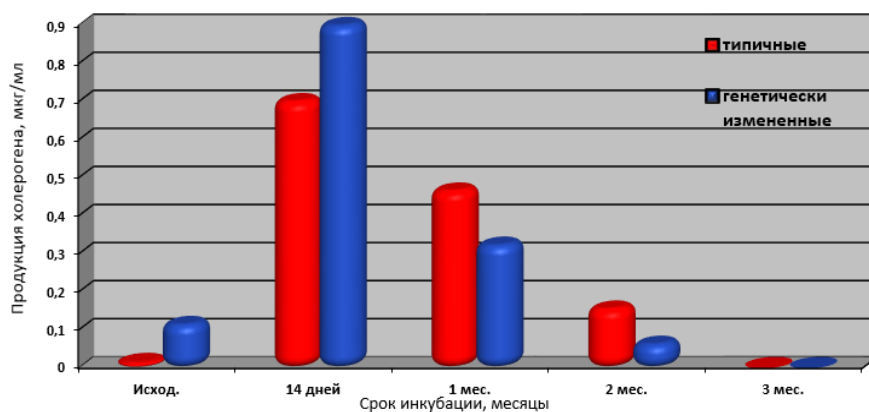


Рисунок 2 - Средние показатели токсинопродукции типичных и генетически измененных холерных вибрионов при инкубации в речной воде при 4<sup>0</sup>С.

При проведении опытов, моделирующих условия окружающей среды в теплое время года в водоемах Российской Федерации (22-24<sup>0</sup>С) или в эндемичных очагах холеры при длительной инкубации (9 месяцев) у классических холерных вибрионов наблюдалось сохранение токсинопродукции на протяжении двух месяцев, к третьему месяцу они погибали, гены *ctxAB* в среде не обнаруживались, у Эль Тор вибрионов исследования показали постепенное (на протяжении всего срока наблюдения) снижение токсинопродукции практически у всех изучаемых штаммов. При этом у генетически измененных штаммов, которые выделяются с 1991 года, показатели были в 2-8 раз выше, чем у типичных штаммов, что может характеризовать их как варианты с повышенной вирулентностью (рис.3).

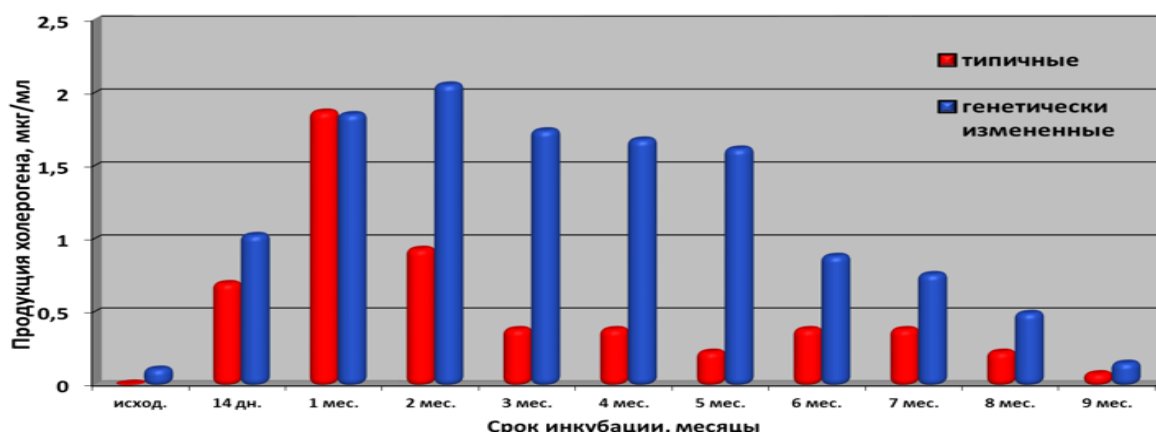


Рисунок 3 - Средние показатели токсинопродукции типичных и генетически измененных холерных вибрионов при инкубации в речной воде при 22-24<sup>0</sup>С.

При моделировании условий пребывания вибрионов в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время при разных температурах токсигенные холерные вибрионы Эль Тор переживали снижение температуры до 10<sup>0</sup>С в течение первого месяца с сохранением незначительной части популяции, у 9 из 13 штаммов наблюдали снижение количества токсина, что, вероятно, связано с отсутствием необходимости продукции этого белка в речной воде в больших количествах и энергетически невыгодно вибрионам. В течение второго месяца

при 10<sup>0</sup>С вибрионы штаммов *V.cholerae* 1310, 3119, 19241, 18826, 17427 не обнаруживались ни в исходных посевах, ни после культивирования в бульоне АКІ, гены *ctxAB* в среде не выявлялись. При дальнейшем снижении температуры до 4<sup>0</sup>С ни сами холерные вибрионы, ни гены токсинопродукции не обнаруживались.

Таким образом, было показано, что токсигенные холерные вибрионы могут выживать в стерильной речной воде при температуре 22<sup>0</sup>С-24<sup>0</sup>С достаточно продолжительный срок с сохранением продукции холерного токсина, т.е. оставаясь эпидемически значимыми. Не исключено, что в условиях методически очень сложного длительного эксперимента с необеззараженной речной водой, содержащей органические и неорганические загрязнения, зоо- и фитопланктон, бактериофаги, большое количество конкурирующей микрофлоры, сроки персистенции могут меняться.

При понижении температуры до 10<sup>0</sup>С и ниже токсинопродукция снижалась и к 5 месяцу инкубации практически отсутствовала, но на протяжении 4 летне-осенних месяцев при 22<sup>0</sup>С и 10<sup>0</sup>С показатели у генетически измененных вариантов были в среднем в 2-4 раза выше (рис.4).

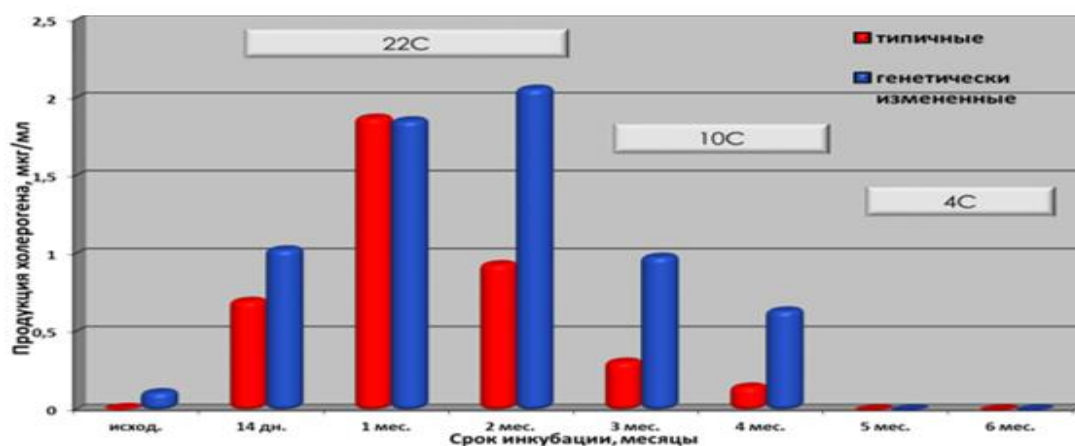


Рисунок 4 - Средние показатели токсинопродукции при длительной инкубации типичных и генетически измененных холерных вибрионов в речной воде при постепенной смене температур.

В популяции клеток вибрионов, выживших после низкотемпературного стресса утраты профага *CTXφ*, несущего гены, ответственные за синтез холерного токсина, в наших экспериментах не отмечено, о чем свидетельствуют данные полногеномного секвенирования и INDEL-типирования исходных и стрессированных культур. Возможно, изменение токсинопродукции в стрессовых условиях связано не с реорганизацией генома, а с изменением экспрессии каскада регуляторных генов *ToxR-S*, *ToxT*, регуляция которых находится в непосредственной зависимости от состояния кворум-сенсинга бактериальной культуры *V.cholerae* и управляется малыми РНК [Писанов Р.В., Симакова Д.И., 2016; SongT. et al., 2008].

## Влияние стрессового воздействия на агглютинабельность холерных вибрионов O1 серогруппы

Пребывание в разных экологических нишах, изобилующих различными агрессивными компонентами (детергентами и др.) может приводить к появлению измененных форм, затрудняющих выделение и идентификацию холерных вибрионов при осуществлении лабораторной диагностики. В связи с этим представляло интерес изучение влияния ряда стрессоров на один из наиболее важных при проведении идентификации *V.cholerae* признаков - агглютинабельность холерными сыворотками.

В результате исследования было обнаружено, что в микроаэрофильных условиях, начиная с четвертого дня наблюдения, имело место постепенное снижение агглютинабельности холерной O1 сывороткой (до 1/4 – 1/16 титра) и серовароспецифическими сыворотками Огава и Инаба (до 1/2 – 1/4 титра) и изменение морфологии колоний – у большинства штаммов они приобрели слизистый характер, с трудом снимаясь петлей. Специальными экспериментами показано повышение продукции экзополисахарида у стрессированных культур. К 11 дню исследования более 70% штаммов *V.cholerae* O1 почти полностью утратили способность агглютинироваться O1 холерной сывороткой (титр <1/16) и серовароспецифическими сыворотками (табл.1).

Таблица 1 - Агглютинабельность холерных вибрионов Эль Тор в условиях гипоксии

№ п/п	Характеристика	Источник выделения	№ штамма	Серовар	Результаты агглютинации с холерными сыворотками**								
					O1			Огава			Инаба		
					исходный	4 сутки	11 сутки	исходный	4 сутки	11 сутки	исходный	4 сутки	11 сутки
1	ctx+tcp+	Больные	18418	Огава	T	1/4T	<1/16T	T	1/4T	<1/16T	отр.	отр.	отр.
			18826	Инаба	T	1/16T	<1/16T	отр.	отр.	отр.	T	1/2T	1/2T
		Носители	17427	Огава	T	1/8T	<1/16T	1/2T	1/4T	<1/16T	1/4T	отр.	отр.
			18588	Огава	T	1/8T	<1/16T	T	1/2T	1/4T	1/4T	отр.	отр.
			19241	Инаба	T	1/8T	<1/16T	отр.	отр.	отр.	T	1/4T	<1/16T
2	ctx-tcp+	Больные	18118	Огава	T	1/4T	1/8T	T	1/2T	<1/16T	1/4T	отр.	
			18775	SR	T	1/8T	<1/16T	T	1/2T	1/4T	1/4T	1/4T	<1/16T
		Носители	18257	Огава	T	1/4T	1/8T	1/2T	1/4T	1/4T	отр.	отр.	отр.
			18117	Огава	T	1/4T	<1/16T	1/4T	1/4T	<1/16T	отр.	отр.	отр.
			18969	Огава	T	1/4T	<1/16T	T	1/2T	1/4T	отр.	отр.	отр.
3	ctx-tcp-	Больные	18246	Инаба	T	1/8T	<1/16T	отр.	отр.	отр.	1/2T	1/2T	1/2T
			18750	Огава	T	1/16T	<1/16T	T	1/4T	<1/16T	отр.	отр.	отр.
		Носители	18774	Огава	T	1/2T	1/8T	T	1/2T	1/4T	1/4T	отр.	отр.
			17899	Инаба	T	1/4T	<1/16T	отр.	отр.	отр.	T	1/2T	<1/16T

Примечание: \* - штамм *V. cholerae* El Tor 18775 в условиях гипоксии утратил агглютинабельность РО – сывороткой через 4 суток, у остальных культур агглютинабельность РО-сывороткой не появилась;  
 \*\* - опыт проводился трехкратно, результаты были идентичными;  
 отр. - результат отрицательный; T - титр.

Таким образом, можно предположить, что в условиях длительной гипоксии холерные вибрионы включают механизмы адаптации к действию стрессоров, в том числе путем фенотипической модификации поверхностных структур, возможно, за счет частичной экранизации О-антигена ЭПС, что может привести к затруднениям при идентификации выделенных культур холерных вибрионов.

При изучении влияния желчи, как и комбинированного стрессового воздействия, изменения в агглютинабельности практически отсутствовали. Взятый в опыт *SR*-вариант стал агглютинироваться РО-сывороткой на два разведения выше, т.е. степень его диссоциации увеличилась. Вероятно, поэтому при изоляции вибрионов от больных людей и вибрионосителей титры в реакциях агглютинации, как правило, бывают высокими. И только длительная персистенция в организме человека (вибрионоительство) или в объектах окружающей среды в условиях гипоксии может приводить к снижению агглютинабельности.

Непродолжительное (6 дней) культивирование холерных вибрионов в речной воде при 4<sup>0</sup>С в микроаэрофильных условиях не вызывало каких-либо дополнительных значимых изменений в агглютинабельности холерными сыворотками. Однако отмечали изменение поверхностных структур микробных клеток, начинающееся с *SR*-диссоциации: *SR*-штамм стал агглютинироваться РО-сывороткой на два разведения выше, и у 2 штаммов, выделенных от больных людей (*V. cholerae* *ElTor* 18118 и 18246) появилась способность агглютинироваться РО сывороткой до титра.

### **Влияние стрессового воздействия на свойства, обуславливающие персистентный потенциал холерных вибрионов**

В процессе эволюции холерный вибрион Эль Тор приобрел ряд свойств, способствующих длительному персистированию не только в организме человека, но и в окружающей среде: способность к образованию биопленок, основным фактором устойчивости которых является экзополисахаридный матрикс, продукция полиаминов, в частности – кадаверина, антилизозимная активность и др. Дальнейшие исследования проводились в направлении изучения влияния различных стрессоров на способность к биопленкообразованию. При изучении влияния факторов, которым подвергаются холерные вибрионы в организме человека было показано, что на эпидемически значимые (*ctx+tcp+*) штаммы вибрионов Эль Тор максимальное влияние оказывал комбинированный стресс, после воздействия которого вибрионы образовывали в качестве защиты наиболее выраженную биопленку, кислота и желчь (как монострессоры) оказывали менее повреждающее действие, щелочное рН практически не оказывало влияния на уровень продукции (рис.5).

У нетоксигенных вибрионов с генотипом *ctx-tcp+* активное образование биопленок стимулировали все стрессоры. Полученные данные подтверждают, что эта группа штаммов обладает более выраженными адаптивными способностями, чтобы противостоять стрессовым воздействиям среды в кишечнике

человека и выживать определенное время в организме вибриононосителя (пример – вспышка в Каменском районе Ростовской области в 2005 году, обусловленная *V.cholerae ctx-tcp+*, при которой выявлено всего 2 больных и 32 вибриононосителя).

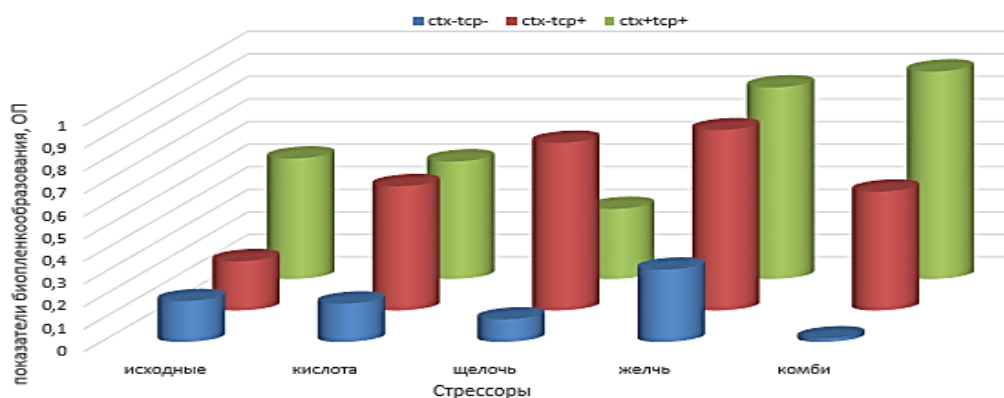


Рисунок 5 - Уровни биопленкообразования холерных вибрионов Эль Тор при стрессе, обусловленном воздействием факторов желудочно-кишечного тракта человека.

Нетоксигенные *ctx-tcp-* штаммы после воздействия почти всех видов стресса (кроме желчи) снижали способность к продукции биопленок, что косвенно свидетельствует об отсутствии способности длительно сохраняться в организме человека в указанных стрессовых условиях. Таким образом, было показано, что эпидемически значимые холерные вибрионы и холерные вибрионы, обладающие генами токсинкорегулируемых пилей адгезии, более устойчивы к указанным видам стрессового воздействия по сравнению с нетоксигенными и неадгезивными штаммами.

В серии пролонгированных опытов (9 месяцев), проводимых с использованием речной воды, было установлено, что токсигенные (*ctx+tcp+*) вибрионы Эль Тор при 22<sup>0</sup>С на протяжении всего срока исследования формировали «слабые» биопленки, а при 4<sup>0</sup>С к 3 месяцу исследования показатели были отрицательными (рис.6).

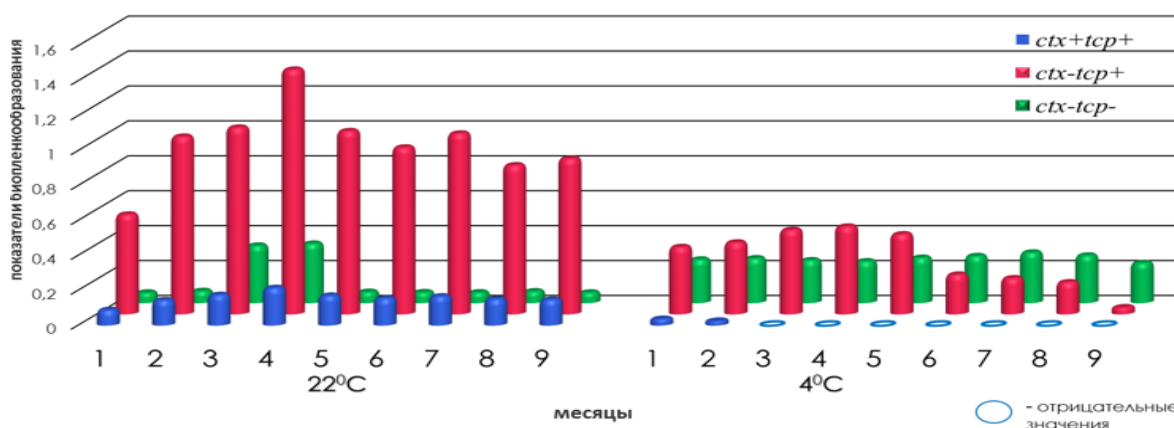


Рисунок 6 - Сравнение уровней биопленкообразования у вибрионов Эль Тор в речной воде при 22<sup>0</sup>С и 4<sup>0</sup>С в течение 9 месяцев.

При этом было установлено, что выжившие планктонные клетки при этой температуре через 2 месяца составляли всего десятые доли процента и часть штаммов через 2-3 месяца при 4<sup>0</sup>С формировали, наряду с типичными колониями, «ругозные» варианты (рис.7).

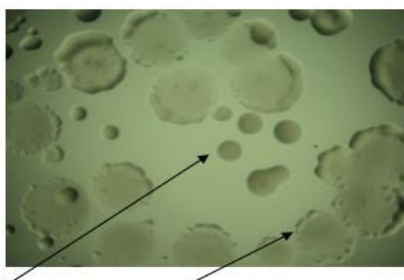


Рисунок 7 - Типичные и «ругозные» варианты холерных вибрионов (*V. cholerae* El Tor 18418 в речной воде через 2 месяца при 4<sup>0</sup>С).

У нетоксигенных *ctx-tcp-* вибрионов, напротив, большая часть популяции сохранялась при 4<sup>0</sup>С (показатели биопленкообразования были выше, чем при 22<sup>0</sup>С) на протяжении всего срока исследования. Холерные вибрионы, у которых отсутствовали гены токсинопродукции, но имелись гены *tcp*, сохранялись на протяжении всего срока исследования при обеих температурах, но продукция ЭПС была гораздо выше при 22<sup>0</sup>С. У вибрионов этой группы к концу 9 месяца при 22<sup>0</sup>С выживало 10% популяции клеток (наиболее высокий показатель среды всех изучаемых вибрионов), при 4<sup>0</sup>С – всего 0,7. Классические холерные вибрионы в речной воде отмирали в течение первых месяцев даже при температуре 22<sup>0</sup>С и биопленки не формировали.

При моделировании условий пребывания холерных вибрионов в речной воде в летнее, осеннее, зимнее время при разных температурах (2 месяца - 22<sup>0</sup>С, 2 месяца – 10<sup>0</sup>С, 5 месяцев - 4<sup>0</sup>С) отмечали, что токсигенные холерные вибрионы Эль Тор при постепенном снижении температуры выживали только при температурах 22<sup>0</sup>С и 10<sup>0</sup>С, при 4<sup>0</sup>С живых клеток обнаружено не было (рис.8).

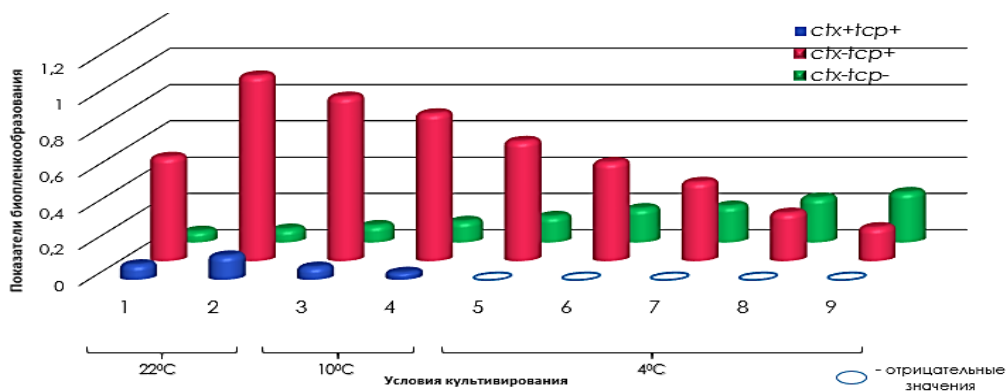


Рисунок 8 - Биопленкообразование вибрионов Эль Тор в речной воде в течение 9 месяцев при изменении температуры культивирования.

Снижение количества живых вибрионов в речной воде коррелировало со снижением показателей биопленкообразования (коэффициент корреляции –



0,9-0,98). Нетоксигенные штаммы сохранялись на протяжении всего эксперимента, хотя количество клеток к концу исследования было невелико (0,8% от исходного показателя). Способность к биопленкообразованию к концу исследования при 4<sup>0</sup>C были выше, чем в начале эксперимента, вероятно, в результате адаптации к стрессовым условиям обитания. Высоко устойчивыми к стрессу оказались штаммы с генотипом *ctx-tcp+*, лишенные генов токсинообразования, которые выживали на протяжении всего срока исследования и показывали самые высокие значения.

Таким образом, можно констатировать, что эпидемически значимые токсигенные холерные вибрионы в условиях стерильной речной воды достаточно быстро (в течение 2-3 месяцев) погибают, гибель идет тем быстрее, чем ниже температура. Показатели выживания коррелируют с показателями биопленкообразования. Нетоксигенные (*ctx-tcp+* и *ctx-tcp-*) вибрионы выживают в речной воде и сохраняют биопленки достаточно продолжительное время, что свидетельствует об их выраженном персистентном потенциале.

Еще одним механизмом защиты от воздействия неблагоприятных факторов среды являются полиамины, в частности кадаверин. В ответ на стресс происходит синтез полиаминов, защищающих холерные вибрионы как путем заполнения пориновых каналов (внутриклеточный кадаверин), так и путем изоляции клеток от вредного окружения (внеклеточный кадаверин), способствуя тем самым сохранению популяции возбудителя и развитию инфекции. В наших опытах впервые было показано, что холерные вибрионы Эль Тор образовывали как внутриклеточный, так и внеклеточный кадаверин в значительном количестве. При этом отмечается снижение значений суммарной продукции кадаверина по мере снижения эпидемической значимости (рис.9).

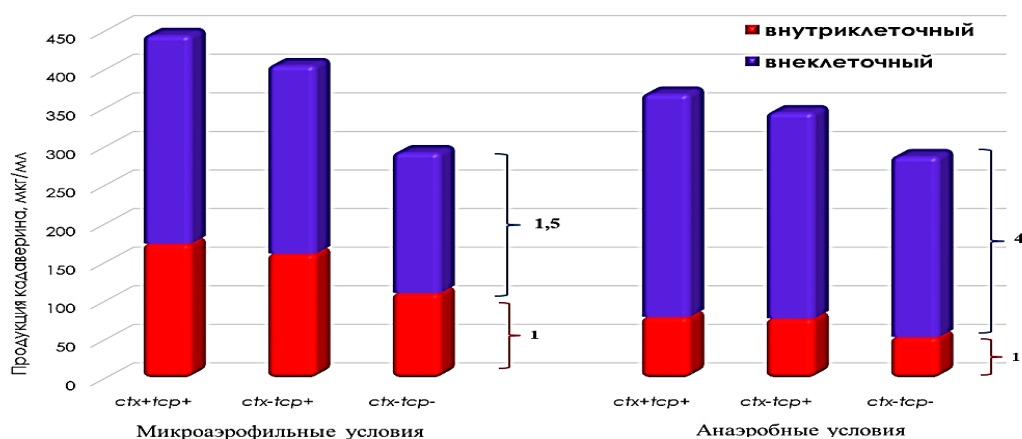


Рисунок 9 - Сравнение уровней продукции кадаверина у вибрионов Эль Тор при разном содержании кислорода.

При этом показано, что в микроаэрофильных условиях тонкого кишечника соотношение внутри- и внеклеточного кадаверина практически равно- 1:1,5, а в

анаэробных условиях толстого кишечника преобладает синтез внеклеточного кадаверина - соотношение 1:4.

При изучении вариабельности антилизотимной активности (АЛА) при температуре воды открытых водоемов в летнее время (22-24<sup>0</sup>С), в микроаэрофильных условиях было показано, что у *ctx+tcp+* штаммов значения снижались всего на 2-3 мкг/мл, а у нетоксигенных – до 12 мкг/мл).

В опытах, моделирующих воздействие стрессоров в организме человека, установлено, что холерные вибрионы классического биовара и эпидемически значимые вибрионы биовара Эль Тор практически не реагировали на стрессовые воздействия (рис.10). В группах нетоксигенных вибрионов средние показатели АЛА резко снижались, что свидетельствует об их способности к фенотипической вариабельности признака в зависимости от условий обитания.

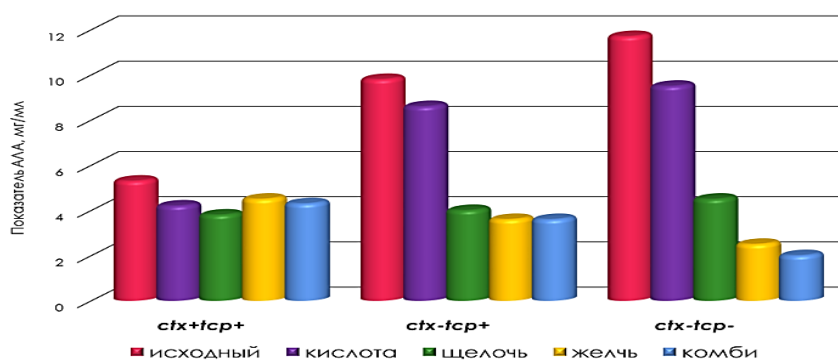


Рисунок 10 - Оценка АЛА холерных вибрионов O1 серогруппы после воздействия различных стрессоров.

Таким образом, было показано, что холерные вибрионы Эль Тор обладают способностью к фенотипической вариабельности АЛА в зависимости от температурных и других условий обитания холерных вибрионов. По результатам влияния комбинированного стресса, максимально приближенного к внутренней среде организма человека, наиболее «стойкими» оказались токсигенные *ctx+tcp+* варианты (снижение АЛА всего на 19%), у атоксигенных (*ctx-tcp+* и *ctx-tcp-*), соответственно, показатели снижались на 63,3% и 83,0%.

Принимая во внимание современные природные и социальные условия (глобальное потепление, неудовлетворительное состояние водоснабжения и канализования), оценка диапазона вариабельности фено- и генотипических свойств холерных вибрионов, персистирующих в стрессовых условиях окружающей среды, является вкладом в изучение биологии возбудителя холеры, раскрывая некоторые аспекты и механизмы персистенции *V.cholerae* в различных экологических нишах и может иметь значение при решении ряда вопросов, связанных с совершенствованием эпидемиологического надзора за холерой, в частности, в обосновании к выбору времени, объектов исследования с учетом экологических условий поверхностных водоемов.

Результаты исследования, патент, методические рекомендации могут быть использованы микробиологами, изучающими вопросы персистенции холерных вибрионов и других возбудителей инфекционных заболеваний в организме человека и объектах окружающей среды. В связи с большой экологической пластичностью холерных вибрионов, актуальным является дальнейшее изучение генетических аспектов персистенции для определения механизмов и факторов выживания и адаптации возбудителя.

## ВЫВОДЫ

1. В зависимости от эпидемической значимости холерные вибрионы O1 серогруппы по-разному реагируют на воздействие различных стрессовых факторов в экспериментах, имитирующих пребывание холерных вибрионов в организме человека и объектах окружающей среды. Изменения фенотипа (токсинопродукции, продукции экзополисахарида, агглютинабельности, ряда персистентных свойств) носят регуляторный характер и не связаны с утратой генов, кодирующих указанные признаки, что подтверждено с помощью ПЦР-анализа, полногеномного секвенирования и INDEL-типирования.

2. Воздействие кислоты, щелочи, желчи, гипоксии (стрессоров, воздействующих на возбудителя в организме человека) вызывает повышение продукции холерогена как у типичных, так и у генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1.

3. При моделировании условий пребывания холерных вибрионов в речной воде при температуре 22<sup>0</sup>C-24<sup>0</sup>C токсигенные холерные вибрионы Эль Тор персистируют достаточно продолжительный срок с сохранением продукции холерогена. При этом средние показатели токсинопродукции у генетически измененных вариантов в 2-8 раз выше, чем у типичных. При понижении температуры до 10<sup>0</sup>C и ниже уровни токсинопродукции в популяции вибрионов в течение 1-2 месяцев снижаются до нулевых значений и не сопровождаются потерей генов *ctxAB*.

4. Показано, что у токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов при персистенции в условиях окружающей среды, сопровождающихся длительной гипоксией, происходит снижение или утрата агглютинабельности холерными сыворотками, что может вызывать затруднения при идентификации выделенных культур. Низкотемпературный стресс в комбинации с гипоксией индуцирует *SR*-диссоциацию холерных вибрионов и образование «ругозных» форм.

5. Практически все стрессоры, имитирующие влияние эндогенных факторов желудочно-кишечного тракта человека на холерные вибрионы O1 серогруппы, играют роль в активации процесса биопленкообразования у токсигенных

( $ctx^+tcp^+$ ) и нетоксигенных ( $ctx^-tcp^+$ ) вариантов. У нетоксигенных ( $ctx^-tcp^-$ ) холерных вибрионов после воздействия почти всех видов стресса активность образования экзополисахарида снижается, что косвенно свидетельствует об отсутствии у них способности длительно сохраняться в организме человека в указанных стрессовых условиях.

6. Токсигенные холерные вибрионы в условиях низкотемпературного стресса в стерильной речной воде слабо образуют экзополисахарид и в течение 2-3 месяцев погибают. Нетоксигенные ( $ctx^-tcp^+$  и  $ctx^-tcp^-$ ) вибрионы выживают в речной воде и сохраняют биопленки достаточно продолжительное время, что свидетельствует об их более выраженном персистентном потенциале.

7. Установлено, что эпидемически значимые холерные вибрионы в ответ на длительное воздействие гипоксии, оксидативного стресса продуцируют большее количество внутри- и внеклеточного полиамина - кадаверина, чем *V.cholerae* O1, лишенные генов токсино- и пилепродукции.

8. Комбинированный стресс, имитирующий факторы организма человека, и стрессоры, влияющие на популяцию возбудителя холеры в водных объектах окружающей среды, вызывают резкое снижение антилизотимной активности у нетоксигенных ( $ctx^-tcp^+$  и  $ctx^-tcp^-$ ) вариантов холерных вибрионов, у эпидемически значимых ( $ctx^+tcp^+$ ) - значения АЛА колебались незначительно, что косвенно свидетельствует о роли этого «малого признака персистенции» в патогенезе холеры.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

### Статьи в реферируемых научных журналах ВАК РФ

1. **Сизова, Ю.В.** Вариабельность свойств, характеризующих способность к выживанию холерных вибрионов, в биопленочных сообществах / **Ю.В. Сизова, И.Я. Черепяхина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова** и др. // **Проблемы особо опасных инфекций.** - 2012.- Вып.3 (113). - С.54-57.
2. **Сизова, Ю.В.** Роль температуры в реализации антилизотимной активности холерных вибрионов / **Ю.В. Сизова, И.Я. Черепяхина, Е.В. Сизова, В.В. Балахнова** // **Здоровье населения и среда обитания.** - 2013.- №5. – С.30-32.
3. **Сизова, Ю.В.** Вариабельность токсинопродукции холерных вибрионов под влиянием стрессорных эндогенных факторов желудочно-кишечного тракта человека / **Ю.В. Сизова, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепяхина, В.В. Евдокимова, Л.П. Алексеева** // **Здоровье населения и среда обитания.** - 2015.- №9. - С. 51-55.
4. **Сизова, Ю.В.** Роль температуры поверхностных водоемов в персистенции и биопленкообразовании холерных вибрионов различной эпидемической значимости / **Ю.В. Сизова, И.Я. Черепяхина, О.С. Бурлакова** // **Современные проблемы науки и образования.** - 2015. - №5.-URL: [www.science-](http://www.science-)

education.ru/128-22554.

5. **Сизова, Ю.В.** Роль кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу, обусловленному гипоксией / **Ю.В. Сизова**, Р.В. Писанов, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова // **Проблемы особо опасных инфекций**. - 2016. - №2. - С.87-90.

6. **Сизова, Ю.В.** Фенотипический и генотипический анализ токсинопродукции типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов в стрессовых условиях окружающей среды / **Ю.В. Сизова**, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, И.Я. Черепихина, О.С.Бурлакова // **Современные проблемы науки и образования**. - 2017.- №3.- URL:<http://www.science-education.ru/article/view?id=26439>.

7. Патент на изобретение RU № 2566558 от 29.09.2015г. «Способ определения кадаверина при моделировании стрессовых ситуаций *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп»/ Ю.В. Сизова, Р.В. Писанов, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепихина.

#### Другие публикации

1. Черепихина, И.Я. Антилизозимная активность холерных вибрионов и сальмонелл / И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова, Л.Н. Терновская, А.В. Алешукина, О.С. Бурлакова, О.П. Фецайлова, О.И. Помухина, **Ю.В. Сизова**, В.А. Подройкина // **Холера и патоген. для человека вибр.:**Матер.совещ. и пробл. комис.- Ростов- на-Дону, 2007. - Вып.20. - С.71-74.

2. Черепихина, И.Я. Экологическая детерминированность некоторых факторов персистенции холерных вибрионов / И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова, О.И. Помухина, О.П. Фецайлова, Е.К. Гончаров, В.А. Трубникова, С.В. Титова, **Ю.В. Сизова**, В.А. Подройкина // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер.совещ. и пробл. комис. – Ростов-на-Дону, 2008. – Вып. 21. - С.82-86.

3. Черепихина, И.Я. Фенотипический анализ персистентного потенциала холерных вибрионов / И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова, В.А. Коршенко, **Ю.В. Сизова** и др. // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер.пробл. комиссии. - Ростов-на-Дону, 2012. -Вып.25. - С.132-135.

4. Сизова, Е.В. Изучение влияния гипоксии на антигенные свойства и фаголизабельность холерных вибрионов / Е.В. Сизова, И.Я. Черепихина, В.В.Балахнова, О.С. Бурлакова, О.И. Помухина, **Ю.В.Сизова** и др. // **Холера и патоген. для чел-ка вибр.:**Матер.совещ. специалистов Роспотребнадзора – Ростов-на-Дону, 2013. –Вып. 26.- С.162-168.

5. **Сизова, Ю.В.** Влияние гипоксии на антилизозимную активность / **Ю.В.Сизова**, И.Я. Черепихина, В.В. Балахнова, О.С. Бурлакова // **Холера и патоген. для чел-ка вибр.:**Матер.совещ. специалистов Роспотребнадзора. –

Ростов-на-Дону, 2013. – Вып. 26.- С.202-205.

6. **Сизова, Ю.В.** Роль полиамина кадаверина в адаптации холерных вибрионов к стрессу в условиях изменяющейся газовой среды / **Ю.В.Сизова**, Р.В. Писанов, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина, В.В. Балахнова // **Холера и патоген. для чел-ка вибр.:** Матер.совещ. специалистов Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27. - С.142-144.

7. **Сизова Ю.В.** Влияние различных стрессоров на формирование биопленки и продукцию экзополисахарида у холерных вибрионов / **Ю.В. Сизова**, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина, О.П. Фецайлова // **Холера и патоген. для человека вибр.:** Матер.пробл. комиссии. – Ростов-на-Дону, 2015. – Вып.28. - С.78-81.

8. **Сизова, Ю.В.** Влияние температуры на токсинопродукцию холерных вибрионов в речной воде / **Ю.В. Сизова**, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина, Л.П. Алексеева и др.// **Здоровье населения и среда обитания.** - 2016.- № 6. - С. 54-56.

9. **Сизова, Ю.В.** Влияние стрессоров на антилизоцимную активность холерных вибрионов в условиях, моделирующих *in vitro* внутреннюю среду организма человека/ **Ю.В. Сизова** // **Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области:** Матер.регион. научно-практич. конф., посвящ. 95-летию со дня образ. гос. сан.-эпид. службы России. - Ростов-на-Дону, 2017г.-С. 155-157.

#### **Тезисы докладов на конференциях**

1. Балахнова, В.В. Роль биопленочных сообществ в экологии холерных вибрионов серогруппы O1/ В.В.Балахнова, О.С. Бурлакова, В.А. Подройкина, **Ю.В. Сизова**, И.Я. Черепахина // **Матер.науч. конф., посвящ. 120-летию ФНЦ гигиены им. Ф.Ф. Эрисмана.** - М., 2011. - №5.- С.38.

2. **Сизова, Ю.В.** Влияние стрессоров на продукцию токсина холерными вибрионами / **Ю.В. Сизова**, О.С. Бурлакова, И.Я. Черепахина // **VII Всероссийская научно-практич. конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Современные проблемы эпидемиологии и гигиены.** - Санкт-Петербург, 2015.- С.184-186.

3. **Сизова, Ю.В.** Влияние стрессоров на образование биопленки холерными вибрионами в условиях, моделирующих *in vitro* внутреннюю среду организма человека / **Ю.В. Сизова**, О.С. Бурлакова // **VIII Всероссийская научно-практич. конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. Современные проблемы эпидемиологии и гигиены.**- М., 2016 г.-С.196-199.