

ЛЕВЧЕНКО Дарья Александровна

**АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО
МОНИТОРИНГА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ В ОБЪЕКТАХ
ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ с 1989 г. ПО 2016 г.**

03.02.03 – микробиология

**АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук**

Саратов-2018

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

Научный руководитель: доктор медицинских наук
Кругликов Владимир Дмитриевич

Официальные оппоненты:

Савельев Вилорий Николаевич, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией холеры и других кишечных инфекций

Осина Наталья Александровна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией молекулярной диагностики

Ведущая организация:

Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «18» апреля 2018 г. в 10.00 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 (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 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 исследования и степень разработанности проблемы

Современный этап развития седьмой пандемии холеры в мире характеризуется широким распространением, проникновением в новые регионы, регистрацией эпидемий, вспышек и спорадических заболеваний, связанных с заносами этой инфекции. В этой связи определенное значение приобретают и эволюционные изменения генома *Vibrio cholerae* El Tor [Горяев А.А. с соавт., 2011; Шашкова А.В. с соавт., 2012; Агафонов Д.А. с соавт., 2013; Кульшань Т.А. с соавт., 2015]. За последние десять лет эпидемиологическую ситуацию по этой инфекции в России определяли имевшие место эпизодические заносы без распространения (2010 г., 2012 г., 2014 г.), а также не связанные с ними единичные случаи обнаружения в объектах окружающей среды (ООС) токсигенных, наряду с ежегодным выделением десятков нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 без эпидосложнений по холере [Безсмертный В.Е. с соавт., 2003, 2006-2009; Ежова М.И. с соавт., 2011; Иванова С.М. с соавт., 2012, 2013].

Анализ данных литературы указывает на значительный диапазон экологической толерантности водной популяции холерных вибрионов Эль Тор, у которых выработались приспособительные механизмы, способствующие разным срокам существования в различных климато-географических условиях [Ерошенко Г.А. с соавт., 2008; Смирнова Н.И. с соавт., 2011; Монахова Е.В., 2012; Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Москвитина Э.А. с соавт., 2015; Онищенко Г.Г. с соавт., 2015, 2016; Титова С.В. с соавт., 2015, 2016; Monakhova E.V., 2010; Ali M. *et al.*, 2012]. Стоит отметить, что на отдельных территориях России (Краснодарский край р. Агура 2015 г.) нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 выделялись на протяжении более одного месяца в количестве, превышающем 100 штаммов. В то же время доказано, что водные экосистемы являются резервуаром генов патогенности холерных вибрионов [Куликалова Е.С. с соавт., 2015; Титова С.В. с соавт., 2016; Monakhova E.V., 2010]. Особое внимание привлекают случаи обнаружения в ООС штаммов холерных вибрионов O1, не содержащих ген холерного токсина, но имеющих кластер VPI (*tcpA* и *toxT*), что может иметь значение в этиологии вспышек и спорадических случаев диарейных заболеваний. Данные штаммы с большей вероятностью могут колонизировать кишечник, и, как следствие,

способны вызывать спорадические случаи заболевания у людей и вспышки острых кишечных инфекций (ОКИ) [Гриднева Л.Г. с соавт., 2014; Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Kumar P. *et al.*, 2011]. Это связано и с наличием ряда генетических детерминант дополнительных токсинов, количество и уровни экспрессии которых могут различаться от штамма к штамму [Монахова Е.В., 2012; Осина Н.А. с соавт., 2013; Куликалова Е.С. с соавт., 2015; Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Ali M. *et al.*, 2012]. При оценке результатов мониторинга холеры в ООС, сравнивая разные популяции нетоксигенных штаммов холерных вибрионов (в аспекте их происхождения, сходства и различия) применяют различные молекулярно-биологические методы с разной дискриминирующей силой [Кульшань Т.А. с соавт., 2015; Смирнова Н.И. с соавт., 2015; Титова С.В. с соавт., 2015, 2016].

Вместе с тем, на сегодняшний день не существует единого подхода позволяющего комплексно охарактеризовать и систематизировать данные изучения различных по происхождению и токсигенности штаммов *V. cholerae* O1, O139, выделенных из ООС в процессе многолетних мониторинговых исследований на территории России; фенотипическим признакам и генотипическим свойствам с учетом углубленного молекулярно-биологического исследования доступным и экономичным методом ПЦР. Не установлено минимальное количество генетических детерминант, определение которых дает достоверное представление о происхождении (сходстве / различии) штаммов и позволяет проводить их генотипирование с привязкой к временному и пространственному формату, что в свою очередь расширяет наши представления о способности к переживанию популяции нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, изолированных из ООС на территориях субъектов Российской Федерации.

Цель исследования: изучение фенотипического и генотипического разнообразия штаммов холерных вибрионов O1, O139 различной эпидзначимости, выделенных с 1989 г. по 2016 г. из объектов окружающей среды различных регионов бывшего СССР, федеральных округов и субъектов России.

Задачи исследования:

1. Ретроспективный сравнительный анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов O1, O139 различной эпидзначимости из водных объектов окружающей среды на административных территориях бывшего СССР,

федеральных округов и субъектов Российской Федерации с 1989 г. по 2016 г. с учетом особенностей их биологической характеристики в пространственном и временном (по годам) форматах.

2. Изучение фено- и генотипических свойств нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, изолированных из объектов окружающей среды, в расширенном диапазоне детерминант факторов патогенности.

3. Создание пополняемой базы данных ГИС «Холера 1989-2014» с учетом молекулярно-биологических свойств штаммов и алгоритма работы с ней как с инструментом информационного анализа результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории России. Интеграция базы данных ГИС в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

4. Разработка способа генотипической идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР и определение минимально необходимого количества генетических детерминант, детекция которых позволит с высокой степенью дискриминации определять генотипы данных штаммов.

5. Генотипирование нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor по минимальному набору генетических детерминант с последующим информационно-сравнительным анализом холерных вибрионов различной эпидзначимости и серологической принадлежности, выделенных за 27 летний период на территории бывшего СССР и Российской Федерации.

Научная новизна исследования. Впервые разработан способ идентификации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor методом ПЦР-генотипирования на основе детекции минимального количества генов-мишеней, что позволяет достоверно классифицировать и систематизировать вышеуказанные культуры при проведении микробиологического мониторинга за холерой. Способ подтвержден заявкой на изобретение «Способ идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» (заявка на изобретение № 2017127665, приоритет от 01.08.2017 г.). Впервые по результатам ПЦР-анализа, проведенного по набору минимального количества генетических детерминант (14), была показана

гетерогенность нетоксигенных штаммов *V. cholerae*. С помощью предложенного способа удалось установить у 408 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов 81 генотип, составивший десять кластеров, которые обнаруживаются в водных ООС на территории федеральных округов (ФО) и субъектов Российской Федерации на протяжении от одного года до нескольких лет.

Впервые создана пополняемая база данных (БД) ГИС «Холера 1989-2014», которая содержит данные, позволяющие систематизировать результаты микробиологических и молекулярно-биологических исследований штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС при осуществлении мониторинга на территории России. ГИС обеспечивает сравнительный анализ изолированных штаммов холерных вибрионов различной токсигенности, а именно: по фенотипу и генотипу, что способствует повышению эффективности мониторинговых исследований на территории Российской Федерации в текущем временном периоде и на перспективу.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Ретроспективный информационный анализ динамики выделения и биологических свойств 1158 штаммов *V. cholerae* O1, O139 различной токсигенности, изолированных из объектов окружающей среды на территориях бывшего СССР, федеральных округов и субъектов Российской Федерации за 27-летний период показал значимость микробиологической составляющей мониторинговых исследований.

2. Результаты изучения фено- и генотипических свойств *V. cholerae* O1, O139, выделенных из водных объектов, свидетельствуют о целесообразности совершенствования методов генотипирования нетоксигенных штаммов.

3. С помощью разработанного нами методического подхода сформирован минимальный набор из 14 генов-мишеней, который оказался достаточным для дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1. Предложенный метод обладает высокой дискриминирующей силой и может быть использован для ПЦР-генотипирования штаммов, выделяемых в процессе мониторинга.

4. Применение разработанной пополняемой базы данных ГИС «Холера 1989-2014» позволяет проводить сравнительный анализ фено- и генотипических

свойств групп штаммов холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на различных административных территориях в разные временные периоды.

Теоретическая и практическая значимость. Охарактеризованы штаммы *V. cholerae* O1, O139, поступившие в референс-центр по мониторингу холеры на территории Российской Федерации, на основе чего разработана пополняемая БД ГИС «Холера 1989-2014» (свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055, 2014 г.), позволяющая наглядно оценить реальную ситуацию по контаминации ООС штаммами *V. cholerae* O1, O139 в динамике по ФО, субъектам и конкретным водным объектам.

Проведен сравнительный анализ фено- и генотипических свойств штаммов *V. cholerae* O1, O139 с учетом количественной динамики и повторяемости выделения (по годам) культур на территории России за 27-летний период во временном и пространственном форматах.

Разработаны методические рекомендации «ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов», которые одобрены Ученым советом ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора и утверждены директором (протокол № 2 от 05.04.2017 г.). Методические рекомендации были внедрены в работу сотрудников лаборатории диагностики ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 02.05.2017 г.) и лабораторию холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 27.04.2017 г.).

БД ГИС «Холера 1989-2014» в 2015 г. интегрирована в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (http://gis.antiplague.ru/s_cholera-genes.php), доступный всем сотрудникам Роспотребнадзора (по логину и паролю). БД ГИС была использована в научно-исследовательской работе специалистов лаборатории диагностики ООИ в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 02.05.2017 г.). Полученные сведения диссертационного исследования используются при чтении лекции по микробиологии и лабораторной диагностике

холеры на курсах дополнительного послевузовского образования при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Личный вклад автора в исследование. Работа выполнена в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в лаборатории микробиологии холеры в рамках трех плановых научно-исследовательских государственных тем: «Изучение циркуляции холерных вибрионов в водоёмах и стоках г. Ростова-на-Дону с комплексной оценкой эпидемической опасности выделенных культур» (№ гос. регистрации 1020.0 800412); «Разработка ГИС «Распространение холерных вибрионов в объектах окружающей среды на территории России 1989-2004, 2009-2014 гг.» (№ гос. регистрации 01201002618), по данной НИР написан заключительный отчет «Создание ГИС «Распространение холерных вибрионов O1, O139 в объектах окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2014 гг.»»; «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Ростовской области» (№ гос. регистрации 01201352135), в 2017 г. подготовлен заключительный отчет «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации». Личный вклад автора состоит в анализе литературных данных и информационного материала при планировании, определении цели работы, поиске наиболее эффективных путей реализации поставленных задач, в выполнении бактериологических, серологических, молекулярно-биологических исследований, в анализе, систематизации и статистической обработке полученных научных результатов, оформлении патента и методических рекомендаций; написании диссертации и автореферата. Фаготипирование выполняли совместно с заведующей лабораторией бактериофагов к.м.н. Н.Е. Гаевской. VNTR-генотипирование, а также работу по созданию БД ГИС выполняли совместно с руководителем группы вирусологии к.м.н. А.С. Водопьяновым.

Степень достоверности и апробация работы. Степень достоверности полученных результатов базировалась на современной информационно-аналитической методологии комплексного подхода к учету полученных результатов мониторинга холерных вибрионов в ООС за 27-летний период на

территории России в формате пространственной и временной динамики с применением ГИС-технологий, а также характеристике биологических свойств штаммов, включая эффективность методов молекулярно-генетического типирования нетоксигенных штаммов, основанную на использовании статистических методов интерпретации данных. Все исследования выполнены на оборудовании прошедшем метрологическую поверку. Материалы диссертации представлены на научных конференциях: проблемная комиссия «Холера и патогенные для человека вибрионы» в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (г. Ростов-на-Дону, 2013-2016 гг.); VII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы диагностики инфекционных заболеваний (микробиология, биотехнология, эпидемиология, паразитология)» (г. Ростов-на-Дону, 2015 г.); Всероссийское совещание специалистов Роспотребнадзора (г. Ростов-на-Дону, 2016 г.); научно-практическая конференция «Диагностика и профилактика инфекционных болезней на современном этапе» (г. Новосибирск, 2016 г.); межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы диагностики и профилактики инфекционных и паразитарных заболеваний на юге России» (г. Ростов-на-Дону, 2016 г.); международный форум специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» «Актуальные вопросы инфекционной патологии Министерства здравоохранения РФ» (г. Краснодар, 2016 г., 2017 г.); региональная научная конференция «Актуальные вопросы эпидемиологии, микробиологии и диагностики инфекционных и паразитарных заболеваний в Ростовской области» (г. Ростов-на-Дону, 2017 г.).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 45 печатных работ, из них, 8 – в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России», а также в 37 тезисах.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 157 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, пяти глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 30 таблицами и 22 рисунками. Библиография содержит ссылки на 211 публикаций, из которых 156 отечественных и 55 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. В работе было использовано 1158 штаммов холерных вибрионов O1, O139 серогрупп, полученные из музея живых культур ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. При работе с культурами холерных вибрионов были использованы питательные среды и методы идентификации выделенных культур с определением эпидзначимости в соответствии с МУК 4.2.2218-07, фаготипирование с использованием «Методических указаний по применению прямого фаготипирования возбудителя холеры Эль Тор» (1983 г.). С 2016 г. для родовой и видовой идентификации выделенных штаммов холерных вибрионов нами был использован метод MALDI-TOF масс-спектрометрии, который проводили с использованием масс-спектрометра Autoflex-speed Bruker Daltonics (Германия) с программным обеспечением Biotyper [Телесманич Н.Р. с соавт., 2014; Балахонов С.В. с соавт., 2016]. Для углубленной генотипической характеристики была использована репрезентативная выборка составившая 408 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1. Подготовка материала для расширенного ПЦР-анализа проводилась, согласно МУ 1.3.2569-09. ПЦР-генотипирование исследуемых штаммов проводили с применением праймеров для детекции набора из 39 генов. Результаты генотипирования исследуемых нетоксигенных штаммов холерных вибрионов сравнивали с результатами различных методов изучения генетической характеристики, в частности с результатами VNTR-типирования [Водопьянов А.С. с соавт., 2001; Мишанькин Б.Н. с соавт., 2003]. Кластерный анализ распределения аллелей локусов VNTR и ПЦР-генотипов был проведен с использованием метода UPGMA и ГИС «Холера. Штаммы-VNTR» [Водопьянов А.С. с соавт., 2007]. Статистическую обработку полученных результатов данного исследования проводили с помощью компьютерной программы «СТАТИСТИКА» (StatSoftRussia). Качественную силу связи между явлениями оценивали по величине значений и

достоверности коэффициентов корреляции. Расчет дискриминирующей силы, вычисляли по формуле Симпсона [Struelens M.J. *et al.*, 1996].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Ретроспективный информационный анализ результатов мониторинга холерных вибрионов O1, O139 в объектах окружающей среды на территориях федеральных округов Российской Федерации и их субъектов с 1989-2016 гг.

Проведенный ретроспективный анализ результатов мониторинговых исследований на вибриофлору в пространственном формате показал, что за исследуемый период из ООС были изолированы штаммы *V. cholerae* на территориях всех ФО, но не всех субъектов, входящих в них. В то же время, считаем необходимым отметить, что на трех административных территориях России (Республика Бурятия, Калининградская и Псковская области) штаммы начали обнаруживаться только с 2013 г. На территории Центрального ФО было изолировано 55 штаммов холерных вибрионов (4,7% от общего количества изолированных культур на территории Российской Федерации (РФ); Южного ФО – 656, что составило 56,6%; Северо-Западного ФО – 53 (4,6%); Дальневосточного ФО – 156 (13,5%); Сибирского ФО – 141 (12,2%); Уральского ФО – 30 (2,6%); Приволжского ФО – 60 (5,2%); Северо-Кавказского ФО – 7(0,6%).

При анализе распределения выделенных штаммов по субъектам России установлено, что большее количество изолятов из ООС обнаруживалось на территориях Южного ФО (Республики Калмыкия – 28,7%, Ростовской области – 13,1%, Краснодарского края – 9,8%) и Дальневосточного ФО (Приморского края – 10,7%) (рис. 1).



Рисунок 1 – Распределение штаммов холерных вибрионов различной эпидзначимости (в % от общего количества исследуемых штаммов), выделенных из ООС, по территориям субъектов РФ с 1989 г. по 2016 г.

Далее мы провели анализ обнаружения изучаемых штаммов на основе принципа компарментарности, то есть в контексте взаимодополнения пространственного (ФО и их субъекты), временного (периодичности обнаружения) и количественного параметров конкретными объектами их выделения (пресные и морские поверхностные водоемы, сточные воды и др.), а также характеристикой эпидзначимости изолированных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. На основе анализа повторяемости по годам (в течение изучаемого периода) выделения нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1, O139 нами были установлены ООС, в которых холерные вибрионы либо переживали от года до нескольких лет, либо представляли собой новые заносы. К таким водоемам относились р.: Москва, Дон, Темерник, Элистинка (включая пруды связанные с ней), Волга, Нева (в устье – место впадения в Финский залив Балтийское море), Амур. Полученные данные позволили нам судить о том, что водные экосистемы Южного ФО (Республика Калмыкия и Ростовская область) имеют наиболее благоприятные условия для переживания в них на протяжении ряда лет нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, но не исключая при этом новые заносы.

2 Сравнительная характеристика фено- и генотипических свойств штаммов холерных вибрионов O1, O139, выделенных из объектов окружающей среды на различных территории России с 1989 г. по 2016 г.

В итоге проведения в референс-центре по мониторингу холеры на территории Российской Федерации определения родовой и видовой принадлежности и анализа фенотипических свойств 1158 штаммов, выделенных из ООС за изучаемый период, нами было установлена их типичность. 1090 штаммов (из общего количества) относились к *V. cholerae* O1; десять штаммов – к *V. cholerae* O139, а 58 культур – к *V. cholerae* R-вариант (рис. 2).

По нашим данным, в среднем за один год на территории ФО и субъектов России было выделено $6,6 \pm 1,4$ штаммов холерных вибрионов, чувствительных к фагу эльтор; а также $0,75 \pm 0,4$ штаммов чувствительных к классическому фагу. Количество резистентных штаммов холерных вибрионов к вышеуказанным фагам составило 81,7%.

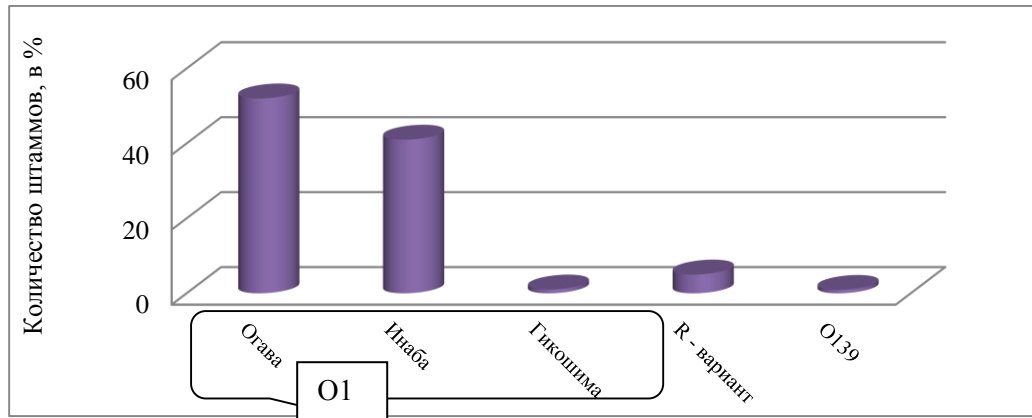


Рисунок 2 – Результаты (в %) серологического исследования штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС на территории Российской Федерации с 1989 г. по 2016 г.

Далее, удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 177 (15,3%) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. Культуры, принадлежащие к 5, 13, 16 и 17 фаготипам, обнаруживались на протяжении не более двух-трех лет. Вместе с тем, штаммы холерных вибрионов, имеющие 4, 10, 11, 14 и 19 фаготип, выделялись не более одного года. Изоляты *V. cholerae* O1 El Tor с 15 фаготипом обнаруживались в ООС разных субъектов России на протяжении почти всего исследуемого периода.

При определении эпидзначимости показано, что 15 из 1158 штаммов, изолированных из ООС в разные годы на территориях субъектов Центрального ФО, Южного ФО, Северо-Западного ФО и Дальневосточного ФО, по результатам ПЦР-генотипирования были отнесены к токсигенным: из них 14 – к штаммам холерных вибрионов O1 Эль Тор и один штамм к классическому биовару. Установлено, что все токсигенные штаммы содержали кластеры: CTXφ, RTX, *tol*; гены RS1-, RS2-элементов; острова патогенности VPI-I и VPI-II; T6SS; а также гены *cef*, *hapR*, *toxR*, *mshA*, *wbe*, но не содержали: *stn/sto*, *slt1*, *tdh*, *trh*, *wbf*, остальные гены (T3SS) присутствовали в различных сочетаниях. Биоинформационный анализ результатов секвенирования показал, что большинство токсигенных штаммов относились к генетически измененным [Писанов Р.В. с соавт., 2015]. Исключение составляли два типичных штамма, выделенных из ООС на территории Ростовской области: в 1999 г. – *V. cholerae* O1 classical Ogawa (поверхностный водоем) и в 2000 г. – *V. cholerae* O1 El Tor Inaba (стоки).

Что касается нетоксигенных холерных вибрионов O1 Эль Тор, составляющих подавляющее большинство штаммов, выделенных из ООС на

территории России, то с учетом их генотипической вариабельности мы посчитали целесообразным проведение их углубленного генотипирования путем разработки дополнительного подхода к их систематизации. В соответствии с этим, нами было проведено ПЦР-генотипирование репрезентативной выборки из 408 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных из ООС на различных территориях РФ, по расширенному спектру, включающему 39 генетических детерминант факторов патогенности. При анализе полученных результатов нами было установлено, что 343 нетоксигенных культуры холерных вибрионов содержали гены *tol*-кластера, а также: *attRS*, *toxR*, *hapR*, *cef*, *hcp* и *wbe* и не имели генов кластера СТХφ, а также *sit1*, *tdh*, *trh*, *wbf*. Другие генетические детерминанты (RS1-, RS2-элементов, кластера RTX, острова патогенности VPI-II, T3SS, T6SS, *mshA* и *stn/sto*) присутствовали в различных сочетаниях. Остальные 65 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor отличались от вышеупомянутых наличием генов острова патогенности VPI-I. Полученные результаты анализа пространственной, временной, микробиологической и генетической характеристик изученных штаммов, в своей совокупности, позволили перейти к следующему этапу работы – разработке единой, пополняемой БД ГИС «Холера 1989-2014» и алгоритму работы с ней.

3 Разработка пополняемой базы данных ГИС «Холера 1989-2014»

Полученные данные по количеству, фено- и генотипической характеристики выделенных из ООС штаммов холерных вибрионов O1, O139 были сгруппированы в электронные таблицы, которые послужили основой для создания пополняемой БД ГИС «Холера 1989-2014», которая позволила проводить анализ распространения в ООС *V. cholerae*, учитывая пространственную и временную характеристики штаммов (то есть динамику обнаружения); определять сходства и различия штаммов по фенотипическим и расширенным генетическим свойствам (то есть давать микробиологическую характеристику штаммам).

На современном этапе, наряду с имеющимися разными генетическими методиками типирования (ПЦР, VNTR, INDELL и др.), не существует универсального метода для изучения нетоксигенных штаммов, кроме секвенирования, использование которого в данной ситуации считаем экономически не оправданным и не всегда доступным. В связи с этим, при выделении нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor была очевидной необходимость

разработки эффективного нового методического подхода к их систематизации и определения происхождения (занос или переживание) путем генотипирования с последующим сравнением установленных генотипов изолированных штаммов и обнаруженных ранее. Нами был разработан дополнительный доступный метод ПЦР-генотипирования, основанный на детекции минимального количества генетических детерминант факторов патогенности.

4 Алгоритм расчета минимального числа генов-мишеней для детекции при ПЦР-генотипировании и определение генотипов репрезентативной выборки нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор

Дискриминирующая сила генотипирования штаммов, основанная на ПЦР исследовании расширенной детекции детерминант факторов патогенности *V. cholerae* O1 El Tor напрямую зависит от числа изучаемых генов, но с их увеличением удлиняется и время исследований. Подбор минимального числа генов-мишеней (с учетом вариабельности генетических детерминант) проводили, используя статистическую обработку данных с помощью разработанной авторами таблицы, с использованием, введенного «коэффициента совместимости» (КС). КС – повторяемость сочетанных генов (выражается количественно – от нуля до 20). Чем больше значение коэффициента, тем в большей степени отражена целесообразность сочетания вариабельных генетических детерминант. При генотипировании по 39 генетическим детерминантам факторов патогенности холерных вибрионов, результаты базировались на учете детекции генов, имеющих наибольший КС в разных парных комбинациях. Комбинации с показателем КС от нуля до единицы (*ctxAB*, *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*; *hapR*; *toxR*; *slt1*; *tdh*; *trh*; *wbe*; *wbf*; *attRS*; *hcp*; *cef*; *tolQRA*) для системы генотипирования не использовали. Сначала нами были проанализированы информативные комбинации (табл. 1), имеющие КС более десяти, а именно: один ген из острова VPI – *tcpA*; гены острова VPI2 – *int*, *nanH*, *vce*; ген кластера RTX – *acd-rtxA*; гены T6SS – *vspD*; *pbd-vgrG3*; *acd-vgrG1*; *mshA*; а также один из генов T3SS – *vcsN2* и *stn/sto*. В результате было отобрано 11 генетических детерминант.

В процессе дальнейшей работы был проведен анализ, который позволил нам отобрать еще три гена с КС от семи до двух: ген *rstA* (RS1, RS2 элементов); *rtxC* (один из генов кластера RTX), а также ген T3SS – *vasK*. Анализ сочетания парных

генетических детерминант из 39 генов позволил нам составить комбинацию минимального количества (14) генов-мишеней для последующего определения их дискриминирующей силы (разрешающей способности) при генотипировании.

Таблица 1 – Коэффициент «совместимости» парных комбинаций генов для ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов

Гены	<i>rstA</i>	<i>tcpA elt</i>	<i>int</i>	<i>nan H</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>	<i>mshA</i>	<i>stn/sto</i>
<i>rstA</i>		0	2	2	1	2	2	0	1	2	1	1	1	2
<i>tcpA elt</i>	0		13	18	10	6	19	5	12	2	14	16	16	14
<i>int</i>	2	13		8	14	1	11	13	8	0	7	9	10	14
<i>nan H</i>	2	18	8		15	2	17	13	19	0	19	21	18	9
<i>vce</i>	1	10	14	15		6	16	11	11	2	11	12	13	15
<i>rtxC</i>	2	6	1	2	6		5	6	5	0	3	5	5	6
<i>acd-rtxA</i>	2	19	11	17	16	5		14	20	0	18	19	18	6
<i>acd-vgrG1</i>	0	5	13	13	11	6	14		5	2	10	11	11	15
<i>pbd-vgrG3</i>	1	12	8	19	11	5	20	5		2	20	19	20	12
<i>vasK</i>	2	2	0	0	2	0	0	2	2		0	0	0	2
<i>vcsN2</i>	1	14	7	19	11	3	18	10	20	0		4	18	10
<i>vspD</i>	1	16	9	21	12	5	19	11	19	0	4		20	10
<i>mshA</i>	1	16	10	18	13	5	18	11	20	0	18	20		7
<i>stn/sto</i>	2	14	14	9	15	6	6	15	12	2	10	10	7	

Дискриминационную (разделение по признаку) способность исследуемого

набора генов определяли по формуле Симпсона, где $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$, – индекс дискриминирующей силы, N – число штаммов, S – число генотипов и n_j – количество штаммов j генотипа.

При учете результатов генотипирования по 39 генам удалось установить принадлежность изучаемых штаммов к 90 уникальным генотипам, объединенным в десять кластеров, дискриминирующая сила – 0,924. На основании генотипирования, проведенного по результатам ПЦР детекции с помощью установленного набора из 14 генов-мишеней, исследуемые культуры *V. cholerae* O1 были также объединены в десять кластеров, включающих 81 генотип. Дискриминирующая сила составила – 0,921 (табл. 2).

В результате проведенных исследований были разработаны методические рекомендации «ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов», утверждены директором (протокол № 2 от 05.04.2017 г.), внедрены в работу лаборатории диагностики ООИ института (акт внедрения от 02.05.2017 г.) и лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора (акт внедрения от 27.04.2017 г.).

Таблица 2 – ПЦР-характеристика по 14 генам-мишеням репрезентативной выборки нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации в 1989-2016 гг.

№ п/п	Кластер	RS1, RS2	VPI-I	VPI-2			RTX		T6SS			T3SS		Кол-во штаммов	
				rsxA	tcpA	int	nanH	vce	rtxC	acd-rtxA	acd-vgrG1	pbd-vgrG3	vasK		vcsN2
1	A (A1-A8)	-*	-	+/-	+/-	+/-	+	+	-	+	+	+	+	-	47
2	B (B1-B15)	+/-**	+/-	+	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	+	+	+/-	+/-	74
3	C (C1)	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	1
4	D (D1-D11)	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-	+	-	-	+/-	121
5	E (E1-E20)	-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	-	+/-	+	-	-	+/-	99
6	F (F1-F2)	-	-	+/-	-	-	-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	13
7	G (G1-G10)	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	+	-	-	+/-	25
8	H (H1-H5)	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-	17
9	I (I1-I8)	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+/-	10
10	J (J1)	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+	1
Всего															408

Примечание:

* – отсутствие гена по результатам ПЦР-анализа;

** – наличие либо отсутствие гена по результатам ПЦР-анализа.

Способ генотипической идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант подтвержден заявкой на изобретение (заявка на изобретение № 2017127665, приоритет от 01.08.2017 г.).

Прикладной характер разработанного подхода к определению значимости нетоксигенных штаммов *V. cholerae* продемонстрировано на рисунке 3 (А и Б).

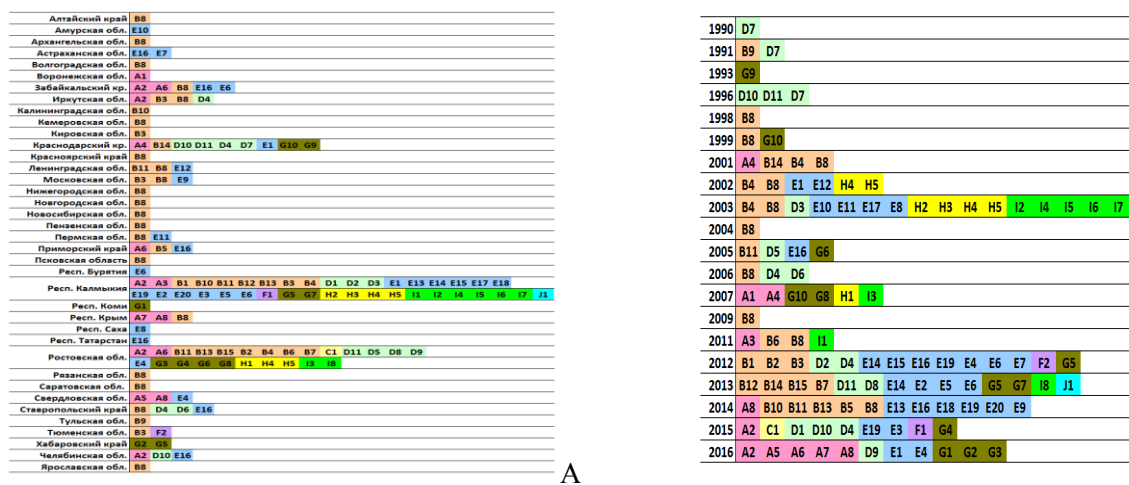


Рисунок 3 – Распределение ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор по субъектам России (А) и по годам (Б) с 1989 г. по 2016 г.

Показано, что изоляты холерных вибрионов *ctxA-tcpA*⁺ делятся на две группы и образуют как общие кластеры с культурами *ctxA-tcpA*⁻, так и отдельные, что явились основанием для проведения дальнейших исследований по генотипированию нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁺ (рис. 4).

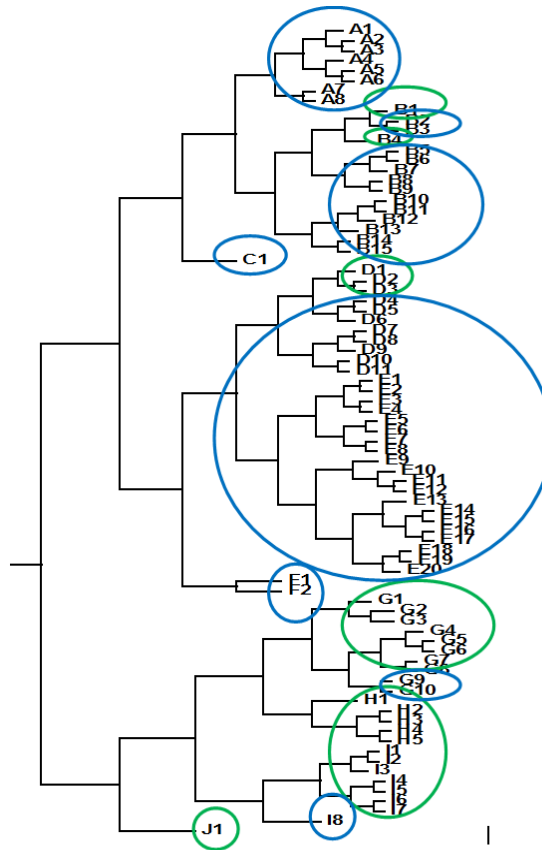


Рисунок 4 – Дендрограмма ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор *ctxA-tcpA*⁺ и *ctxA-tcpA*⁻, выделенных из ООС на территории России с 1989 г. по 2016 г.

Пояснения к дендрограмме:

нетоксигенные изоляты холерных вибрионов O1 Эль Тор с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁺ - выделены зеленым цветом. Синим цветом - обозначены нетоксигенные штаммы с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*⁻.

5 Прикладное использование способа генотипирования нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor по минимальному набору генов-мишеней при анализе результатов мониторинга холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды на различных территориях России

Нами было отобрано 65 штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор *ctxA-tcpA*⁺, которые были изолированы на территориях: Республики Калмыкия – 39 штаммов, Ростовской области – 22 штамма, Хабаровского края – три штамма, Республики Коми – один штамм. По результатам генетических исследований был

проведен кластерный анализ, позволивший объединить 65 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы: по данным ПЦР-анализа в 26 генотипов, составивших шесть кластеров с дискриминирующей силой 0,93, а по данным VNTR-анализа в 19 генотипов составивших шесть кластеров с дискриминирующей силой 0,83. Совпадения по результатам VNTR и ПЦР-генотипирования были установлены в 80% случаев. На наш взгляд, данные по генетической характеристике изученных штаммов *ctxA-tcpA+* позволили нам обосновать предположение о заносном происхождении вышеуказанных культур, которые, попадая в ООС на территорию России, могут непродолжительно сохраняться (переживать). По результатам ПЦР-генотипирования по 14 структурным генам-мишеням культуры *V. cholerae* O1 El Tor, выделенные до 2015 г. из ООС на территории Краснодарского края принадлежали к различным генотипам (A4, B14, D7, D10, D11, E1, G10). Однако в 2015 г. выявился новый генотип D4, ранее не встречающийся на данной территории, что позволило судить о заносе.

Таким образом, нами было проведено сравнительное изучение динамики выделения, а также фенотипа и токсигенности 1158 штаммов холерных вибрионов O1, O139, изолированных из ООС на административных территориях бывшего СССР и субъектов России с 1989 г. по 2016 г. Создана пополняемая БД ГИС «Холера 1989-2014», которая позволяет проводить анализ распространения в ООС *V. cholerae*, учитывая пространственную и временную характеристики штаммов; определять сходства и различия штаммов по фенотипическим и расширенным генетическим свойствам. Нами было определено минимальное количество генов-мишеней (14) с высокой дискриминирующей силой (0,921), детекция которых дает возможность достоверно систематизировать нетоксигенные штаммы холерных вибрионов путем ПЦР-генотипирования, а также разработан методический подход по ПЦР-генотипированию вышеуказанных изолятов.

ВЫВОДЫ

1. Проведенный ретроспективный анализ результатов мониторинговых исследований на вибриофлору в пространственном формате показал, что за исследуемый период из ООС были изолированы штаммы *V. cholerae* O1 El Tor на территориях всех ФО, но не всех субъектов, входящих в них.

2. Показано, что за изучаемый период наибольшее количество изолированных из ООС штаммов *V. cholerae* было зарегистрировано в Южном ФО (Республика Калмыкия и Ростовская область). Большинство выделенных культур холерных вибрионов О1 Эль Тор являлись нетоксигенными, однако на фоне эпидблагополучия продолжалось обнаружение единичных эпидзначимых штаммов (Ростовская область). Установлено, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* О1 El Tor Ogawa преобладали на территориях Южного ФО и Уральского ФО, а серовара Inaba – на территории остальных ФО.

3. Разработана пополняемая БД ГИС «Холера 1989-2014» с учетом молекулярно-биологических свойств штаммов холерных вибрионов, которая позволяет оценить результаты микробиологического мониторинга и выявить сходные по микробиологическим и генетическим свойствам штаммы холерных вибрионов. БД ГИС интегрирована в геоинформационный портал ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

4. Определено минимальное количество генов-мишеней (14) с высокой дискриминирующей силой (0,921), детекция которых дает возможность достоверно систематизировать нетоксигенные штаммы *V. cholerae* путем ПЦР-генотипирования. Разработан методический подход по ПЦР-генотипированию вышеуказанных изолятов. Показана большая разрешающая способность метода ПЦР-генотипирования в сравнении с VNTR-типированием.

5. С помощью предложенного метода удалось установить у 408 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов 81 генотип, составивший десять кластеров, а также сделать заключение о завозном происхождении культур *V. cholerae* О1 с генетической характеристикой *ctxA-tcpA+*.

6. С применением разработанного способа ПЦР-идентификации по 14 генам-мишеням установлена принадлежность нетоксигенных штаммов холерных вибрионов О1 Эль Тор, выделенных в разные годы (1993, 1999 и 2007 гг.) из р. Агура к одному генотипу – G10 и выявить принадлежность штаммов, изолированных в 2015 г., к новому (ранее не встречавшемуся на этой территории), генотипу – D4, что свидетельствовало об их заносном характере. Полученные данные подтвердили результаты VNTR-типирования.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Мазрухо, А.Б. Результаты мониторинга за холерными вибрионами в акватории Таганрогского залива Азовского моря в 2011-2012 гг. / А.Б. Мазрухо, В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, Э.А. Москвитина, И.С. Шестиалтынова, О.А. Подойницына, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов, **Д.А. Зубкова**, Т.А. Кудрякова, М.И. Ежова, Н.Н. Ускова, М.В. Скачко // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2013. – №6. – С. 39-42. **(из Перечня ВАК)**

2. Водопьянов, А.С. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году / А.С. Водопьянов, А.Б. Мазрухо, С.О. Водопьянов, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, И.П. Олейников, **Д.А. Зубкова**, Е.В. Монахова, Л.В. Григоренко // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2014. – №2. – С. 46-51. **(из Перечня ВАК)**

3. **Зубкова, Д.А.** Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA-tcpA+*, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы / **Д.А. Зубкова**, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, С.О. Водопьянов // Здоровье население и среда обитания. – 2014. – №9. – С. 32-34. **(из Перечня ВАК)**

4. Водопьянов, А.С. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, **Д.А. Зубкова**, М.И. Ежова // Здоровье население и среда обитания. – 2015. – № 5. – С. 41-44. **(из Перечня ВАК)**

5. **Левченко, Д.А.** ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / **Д.А. Левченко**, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, С.В. Титова, И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, М.И. Ежова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – №6. – С. 19-25. **(из Перечня ВАК)**

6. **Левченко, Д.А.** Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации с 1989 по 2016 гг. с помощью авторской ГИС / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, М.И. Ежова // Вестник Пермского университета. Серия: Биология. – 2017. – №1. – С. 112-117. **(из Перечня ВАК)**

7. **Левченко, Д.А.** Гено- и фаготипы нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории России в 2016 г. / Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, Н.Е. Гаевская, М.И. Ежова // Вода: химия и экология. – 2017. – №7. – С. 17-24. **(из Перечня ВАК)**

8. Кругликов, В.Д. Геоинформационные технологии как инструмент информационного анализа в рамках обеспечения мониторинга инфекционных заболеваний, в том числе особо опасных инфекций на территории России / В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, И.В. Архангельская, С.В. Титова, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, М.И. Ежова, А.Р. Квасов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. – 2017. – №3, Т. 13. – С. 71-77. **(из Перечня ВАК)**

9. **Зубкова Д.А.,** Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С., Архангельская И.В., Ежова М.И., Ускова Н.Н. Свидетельство о государственной регистрации базы данных № 2014621055. Геоинформационная система «Холера 1989-2014». – 2014.

10. Кругликов, В.Д. Сравнительный анализ прикладного использования ПЦР и VNTR-генотипирования штаммов холерных вибрионов O1 *ctxA-tcpA+* / В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, А.С. Водопьянов, И.В. Архангельская, М.И. Ежова // Молекулярная диагностика. – 2017. – Т.1. – С. 341-342.

11. Кругликов, В.Д. Генотипическая характеристика штаммов *V. cholerae* O1 *ctxA-tcpA+* как этиологического фактора диарейных заболеваний / Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Архангельская И.В., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2017, Т. XXVII, № 5 (Прилож. №50, Матер. XXIII РГЭН). – С. 91. **(из перечня ВАК)**