

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 $D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S nj(nj-1)$, D – 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).

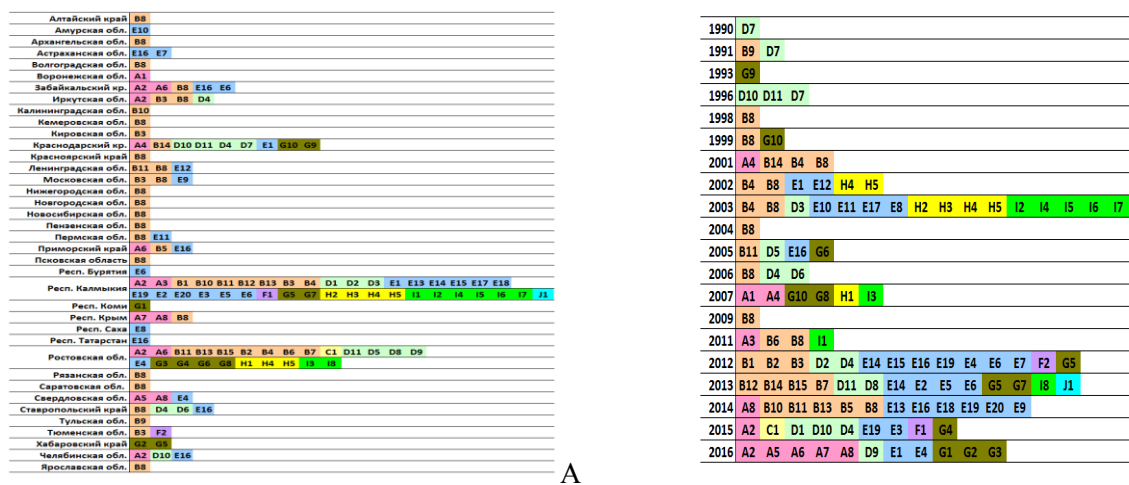


Рисунок 3 – Распределение ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор по субъектам России (А) и по годам (Б) с 1989 г. по 2016 г.

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).

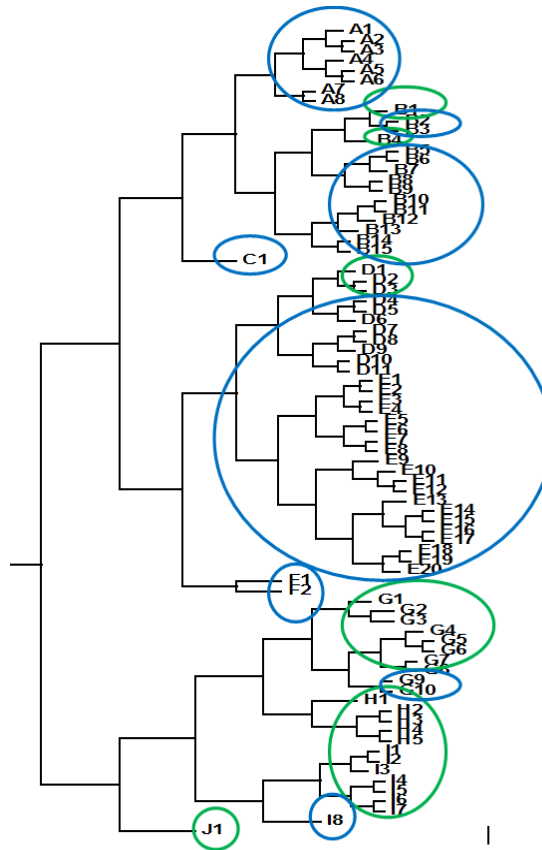


Рисунок 4 – Дендрограмма ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор *ctxA-tcpA*⁺ и *ctxA-tcpA*⁻, выделенных из ООС на территории России с 1989 г. по 2016 г.

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)**