

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
«ИРКУТСКИЙ ОРДЕНА ТРУДОВОГО КРАСНОГО ЗНАМЕНИ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ СИБИРИ И  
ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ  
ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

*На правах рукописи*

**Хунхеева Жанна Юрьевна**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИЙ  
МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO* В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ  
ПРИМОРСКОГО КРАЯ**

**1.5.11 – микробиология**

**Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата медицинских наук**

**Научный руководитель:  
доктор медицинских наук  
Л. В. Миронова**

**Иркутск – 2023**

## СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	13
1. СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ И ПИЩЕВЫМ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯМ, ОБУСЛОВЛЕННЫМ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМ ВИБРИОНОМ, НА ГЛОБАЛЬНОМ И РЕГИОНАЛЬНОМ УРОВНЯХ .....	13
1.1 Ситуация по холере в мире, России, Приморском крае .....	13
1.2 Ситуация по пищевым токсикоинфекциям, обусловленным парагемолитическим вибрионом, в мире, России, Приморском крае .....	18
2. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ И ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПАТОГЕНОВ .....	23
2.1 Факторы патогенности холерного вибриона и особенности геномной организации различных групп патогена .....	23
2.2 Факторы патогенности парагемолитического вибриона и особенности геномной организации различных групп патогена .....	26
3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ И ПИЩЕВЫХ ТОКСИКОИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМ ВИБРИОНОМ .....	30
3.1 Молекулярно-генетические методы типирования холерного вибриона .....	32
3.2 Молекулярно-генетические методы типирования парагемолитического вибриона ..	39
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	45
2.1 Материал .....	45
2.1.1 Информационные данные .....	45
2.1.2 Бактериальные штаммы .....	45
2.1.3 Препараты .....	47
2.2 Методы исследования .....	50
2.2.1 Ретроспективный анализ .....	50
2.2.2 Бактериологический метод .....	50
2.2.3 Молекулярно-генетические методы .....	50
2.2.3.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР) .....	51
2.2.3.2 Мультилокусный анализ числа варьируемых тандемных повторов (MLVA) .....	53
2.2.3.3 Полногеномное секвенирование и <i>in silico</i> мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) .....	54
2.2.4 Экспериментальное исследование стабильности MLVA-генотипа .....	56
2.3 Статистический и биоинформационный анализы .....	56
ГЛАВА 3. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ И ПИЩЕВЫМ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯМ ГАЛОФИЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ .....	58
3.1 Оценка рисков завоза холеры на территорию Приморского края различными видами транспорта .....	58
3.2 Анализ закономерностей выявления холерного вибриона в поверхностных водоемах Приморского края .....	74
3.3 Заболеваемость пищевыми токсикоинфекциями, обусловленными парагемолитическим вибрионом, в Приморском крае .....	81

3.4 Анализ закономерностей выявления параземолитического вибриона в поверхностных водоемах Приморского края.....	85
ГЛАВА 4. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА <i>VIBRIO</i> , ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ.....	91
4.1 Фенотипические свойства штаммов <i>V. cholerae</i> , выделенных на территории Приморского края .....	91
4.2 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов <i>V. cholerae</i> .....	94
4.3 Фенотипические свойства штаммов <i>V. parahaemolyticus</i> , выделенных на территории Приморского края .....	100
4.4 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов <i>V. parahaemolyticus</i> .....	104
ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ .....	112
5.1 MLVA-типирование штаммов холерного вибриона различной эпидемической значимости.....	112
5.2 MLVA-типирование штаммов параземолитического вибриона, выделенных из различных источников .....	118
5.3 Типирование параземолитического вибриона на основании анализа геномов.....	122
ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ (MLVA) В ТИПИРОВАНИИ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА.....	128
6.1 Эффективность MLVA-типирования <i>V. cholerae</i> .....	128
6.2 Эффективность MLVA-типирования <i>V. parahaemolyticus</i> .....	136
ЗАКЛЮЧЕНИЕ .....	140
ВЫВОДЫ.....	148
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ .....	150
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	151

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

В настоящее время единичные случаи и вспышки холеры в мире рассматриваются как чрезвычайная ситуация в области санитарно-эпидемиологического благополучия и требуют проведения оперативных мероприятий по санитарной охране территории. Седьмая пандемия холеры, начавшаяся в 60-х годах прошлого века, этиологическим агентом которой является токсигенный холерный вибрион биовара Эль Тор, характеризуется максимальной продолжительностью по сравнению с шестью предыдущими и охватывает наибольшее число стран на всех континентах [126, 166, 241].

Торгово-экономические, туристические взаимосвязи России с эндемичными и неблагополучными по холере странами определяют возможность завоза инфекции в субъекты Российской Федерации с возможным развитием локальных вспышек.

Приморский край в настоящее время является одним из интенсивно развивающихся субъектов РФ, на территории которого расположены стратегически важные международные транспортные узлы, значимые в становлении и развитии торгово-экономических и туристических взаимосвязей с зарубежными странами, в т.ч. с неблагополучными по холере. Наличие разветвленной гидрологической сети на территории края, представленной крупными реками с многочисленными мелководными заводьями, эстуариями, наряду с климатическими особенностями, создают оптимальные условия для накопления и размножения возбудителя холеры в случае попадания микроорганизма в поверхностные водоемы. Кроме этого, необходимо отметить, что на территории Приморского края протекают реки, берущие начало на территории КНР, или на значительном своем протяжении являющиеся трансграничными (рр. Раздольная, Нестеровка, Уссури, Туманная, Сунгач, оз. Ханка).

Актуальной проблемой для Приморского края является широкое распространение в водных экосистемах другого клинически значимого микроорганизма рода *Vibrio* – *V. parahaemolyticus*. Одним из факторов, способствующих длительной персистенции патогена, является наличие в регионе водных объектов с повышенным содержанием солей, а широкое употребление в пищу морепродуктов жителями Приморского края создает риск возникновения спорадических и вспышечных случаев пищевой токсикоинфекции (ПТИ), что имело место в 1997, 2012 гг. [8, 27]. В этиологии ПТИ

галофильной этиологии во всем мире, особенно в странах Азии, доминирующее значение имеют так называемые пандемические варианты парагемолитического вибриона, среди которых наиболее распространенным является *V. parahaemolyticus* O3:K6 серогруппы, впервые вызвавший серьезные эпидемические осложнения в 1996 г. в Индии [177, 208, 268].

Разнообразие клинико-эпидемиологических проявлений, обусловленных микроорганизмами рода *Vibrio*, в т.ч. регистрация завозов холеры на территорию Приморского края и ассоциированные с завозом острые вспышки холеры, спорадические случаи и вспышки пищевых токсикоинфекций, обусловленных галофильными вибрионами, обнаружение *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* в поверхностных водоемах края определяют необходимость изучения популяций на генетическом уровне для оценки эффективности применения различных методов в микробиологическом мониторинге и при проведении расследований спорадических и групповых случаев заболеваний, вызванных указанными патогенами, в рамках совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и другими патогенными вибрионами.

Одним из проявлений геномного полиморфизма бактерий, используемым в генотипировании, являются тандемные повторы, проявляющие вариабельность по количеству повторяющихся элементов в определенном локусе [227, 233, 266, 267, 279]. Мультилокусный VNTR-анализ – MLVA (multilocus variable number tandem repeat analysis) нашел широкое применение в эпидемиологических, филогенетических исследованиях, изучении генетического разнообразия микробных популяций. Однако, если для типирования холерного вибриона данный метод достаточно широко используется, то типирование парагемолитического вибриона данным методом до настоящего времени в РФ не проводилось, несмотря на ряд преимуществ в сравнении с другими молекулярно-генетическими подходами. Также в последнее время интенсивно развивающаяся технология высокопроизводительного полногеномного секвенирования (WGS) дала импульс к развитию мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) на основе WGS (cgMLST, wgMLST, rMLST) [129, 169, 178, 190, 282]. Эти подходы к типированию являются мощным инструментом для выявления клональных особенностей различных групп микроорганизмов, в том числе и на внутривидовом уровне [129]. Кроме этого, массив данных полногеномного секвенирования служит

основой для *in silico* MLST, которое может использоваться для получения широкого спектра характеристик микроорганизма по локусам генов жизнеобеспечения [169].

**Цель** – оценка генетического разнообразия популяций микроорганизмов рода *Vibrio* в Приморском крае для совершенствования микробиологического мониторинга холеры и инфекций, вызванных парагемолитическим вибрионом.

### **Задачи**

1. Оценить риски завоза холеры и охарактеризовать ситуацию по пищевым токсикоинфекциям, обусловленным галофильными вибрионами, в Приморском крае.
2. Провести анализ распространенности микроорганизмов рода *Vibrio*, в частности *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, в поверхностных водоемах Приморского края.
3. Охарактеризовать выделенные штаммы холерного и парагемолитического вибрионов по комплексу фенотипических и молекулярно-генетических свойств.
4. Провести молекулярно-генетическое типирование *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае, и оценить эффективность MLVA-типирования в рамках микробиологического мониторинга.

### **Научная новизна работы**

Установлены закономерности распространения холерного и парагемолитического вибрионов в поверхностных водоемах Приморского края с учетом временного параметра выделения штаммов, высеваемости по отдельным районам, типам стационарной точки.

Выявлены особенности структурной организации генома выделенных в Приморском крае штаммов холерного вибриона в отношении основных и дополнительных генов патогенности, пандемичности и персистенции. Выделенные из поверхностных водоемов штаммы *V. cholerae* O1, R-варианты, не O1/O139 серогруппы характеризуются отсутствием основных генов патогенности при наличии отдельных дополнительных генов патогенности и персистенции. В геноме единичных изолятов вибриона выявлены фрагменты «островов пандемичности».

Установлено присутствие полного набора исследуемых «островов патогенности» (VPaI-1 – VPaI-7) в геномах патогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, обусловивших групповые случаи ПТИ (2012 г.). Непатогенные клинические и водные штаммы

*V. parahaemolyticus* демонстрируют вариабельность по наличию и структуре «островов патогенности».

Показана клональность штаммов парагемолитического вибриона, выделенных при групповых случаях ПТИ в Приморском крае на основании MLVA-типирования. Полученные результаты указывают на перспективность применения MLVA-типирования при расследовании групповых случаев заболеваний, вызванных *V. parahaemolyticus*.

Выявлена высокая вариабельность MLVA-профилей холерного и парагемолитического вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды Приморского края.

По результатам MLST определены аллели генов «домашнего хозяйства» парагемолитического вибриона и проведено сопоставление их с сиквенс-типами вибрионов, размещенных в базе PubMLST. Установлена принадлежность патогенных клинических штаммов *V. parahaemolyticus* (2012, 2017 гг.) к клональному комплексу CC3, широко распространенному в мире. Изоляты парагемолитического вибриона, выделенные из поверхностных водоемов Приморского края, характеризуются гетерогенностью по структуре генов «домашнего хозяйства», для отдельных штаммов определены сиквенс-типы. Установлена идентичность сиквенс-типов одно/двух локусных VNTR-генотипов *V. parahaemolyticus*.

Сравнительный анализ глобального распространения идентифицированных среди изолятов *V. parahaemolyticus* из Приморского края сиквенс-типов показал, что ряд сиквенс-типов, в т.ч. отнесенных к пандемичному клональному комплексу, выявлен у парагемолитического вибриона, циркулирующего на территории Китая.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

Установлены различия по набору и структуре «островов патогенности» штаммов парагемолитического вибриона разной эпидемической значимости. Идентифицированы не зарегистрированные ранее в международной базе данных PubMLST сиквенс-типы парагемолитического вибриона.

Доказана эффективность применения MLVA в качестве скринингового метода типирования как водных, так и клинических изолятов холерного вибриона, тогда как в отношении парагемолитического вибриона данный подход целесообразен при расследовании эпидосложнений для установления звеньев эпидемической цепи и

малоинформативен для дифференциации выделенных из поверхностных водоемов штаммов.

Созданы и зарегистрированы база данных «*V. cholerae*. Сибирь и Дальний Восток – Амплификационный профиль\_MLVA-генотип» (свидетельство о государственной регистрации № 2016620904 от 01.07.2016 г.), программа для ЭВМ «Электронный паспорт штамма *V. cholerae*» (свидетельство о государственной регистрации № 2019661763 от 06.09.2019 г.).

Разработаны и одобрены решением Ученого Совета ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол решения Ученого Совета № 5 от 06.06.2019 г.) методические рекомендации «VNTR-типирование штаммов *Vibrio parahaemolyticus*».

Материалы, представленные в работе, вошли в нормативные документы федерального уровня МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры», МУК 4.2.3746-22 «Организация и проведение лабораторной диагностики холеры в лабораториях различного уровня», и в основу информационных писем «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2013 г. и прогнозе на 2014 г.», «О ситуации по холере в Сибирском и Дальневосточном регионах в 2014 г. и прогнозе на 2015 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2015 г. и прогнозе на 2016 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2016 г. и прогнозе на 2017 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2017 г. и прогнозе на 2018 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2018 г. и прогнозе на 2019 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2019 г. и прогнозе на 2020 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2020 г. и прогнозе на 2021 г.», «О ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке в 2021 г. и прогнозе на 2022 г.».

Информация об MLVA-профилях штаммов холерного и парагемолитического вибрионов может использоваться при оперативном эпидемиологическом анализе для выявления источников и факторов передачи при холере и инфекциях, вызванных холерными вибрионами не O1/O139 серогруппы и парагемолитическим вибрионом.

Полученные данные по генотипированию холерного и парагемолитического вибрионов используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.



### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Интенсивные миграционные потоки в Приморский край из неблагополучных по холере стран и многолетнее обнаружение в водоемах нетоксигенных *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп свидетельствуют о высоком эпидемическом потенциале региона в плане риска завоза холеры и возможности реализации водного пути передачи инфекции. Обусловленные *V. parahaemolyticus* пищевые токсикоинфекции на территории Приморского края регистрируются в виде групповых и спорадических случаев заболевания, в водоемах отдельных муниципальных образований края парагемолитические вибрионы обнаруживаются ежегодно.

2. Популяции нетоксигенного холерного вибриона в водных объектах Приморского края на фоне эпидемиологического благополучия лишены основных генов патогенности и гетерогенны по наличию дополнительных детерминант патогенности, персистенции и пандемичности и кластеризуются на ПЦР-генотипы. Токсигенные *V. cholerae* в поверхностных водоемах региона обнаруживаются только в период эпидемических осложнений и демонстрируют генетическую однородность по комплексу основных и дополнительных детерминант патогенности.

3. Выделенные из поверхностных водоемов и при спорадических случаях ПТИ изоляты парагемолитического вибриона демонстрируют отсутствие основного гена патогенности (*tdh*) и неоднородность по наличию дополнительных детерминант патогенности. Клинические изоляты *V. parahaemolyticus*, вызвавшие групповые случаи ПТИ, несут в геноме основные и дополнительные детерминанты патогенности (в т.ч. «остров патогенности») и принадлежат к глобально распространенному клональному комплексу, что свидетельствует об их высоком патогенном потенциале.

4. По структуре переменных тандемных повторов персистирующие в водоемах Приморского края холерные и парагемолитические вибрионы высоко разнообразны, в то время как клинические изоляты *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* характеризуются незначительным полиморфизмом локусов с территориальной и временной привязкой их MLVA-профилей.

5. Метод MLVA эффективен для оперативного генотипирования клинических и водных изолятов холерного вибриона. При типировании *V. parahaemolyticus* метод позволяет выявить эпидемиологические взаимосвязи в рамках расследования групповых

случаев ПТИ, но характеризуется низкой информативностью при исследовании водных изолятов патогена.

### **Степень достоверности и апробация работы**

Все исследования осуществлялись на современном оборудовании, прошедшем метрологическую поверку. Полученный значительный объем данных обработан с использованием методов статистического и биоинформационного анализов.

Материалы работы представлены на конференциях различного уровня:

- III Межрегиональная научно-практическая конференция молодых ученых «Человек: здоровье и экология» (г. Иркутск, 2013 г.);
- IV Региональная научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии на Дальнем Востоке Российской Федерации» к 90-летию ФКУЗ «Хабаровский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии» Роспотребнадзора (г. Хабаровск, 2015 г.);
- Международная конференция «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества (ШОС) в противодействии угрозе инфекционных болезней» (г. Сочи, 2015 г.);
- Заседание Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории РФ и совещание специалистов по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой (г. Ростов-на-Дону, 2014-2020 гг.);
- XIII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Москва, 2016 г.);
- IX Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 2017 г.);
- X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Иркутск, 2017 г.);
- Межрегиональная научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Диагностика, профилактика и эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекционными болезнями» (г. Иркутск, 2018 г.);

- Межгосударственная научно-практическая конференция «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ, в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы», посвященная 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (г. Саратов, 2018 г.);
- Научно-практическая конференция «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями» (г. Иркутск, 2019 г.);
- XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Ростов-на-Дону, 2020 г.);
- XV Межгосударственная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (г. Иркутск, 2021 г.).

Работа выполнялась в рамках тем НИР «Эколого-эпидемиологические и молекулярно-биологические закономерности проявлений седьмой пандемии холеры в Сибири и на Дальнем Востоке» (№ ГР 01201068, 2011-2015 гг.), «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации» (№ ГР 01201352135, 2013-2017 гг.), «Молекулярные основы персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов различного происхождения» (№ ГР АААА-А16-116070610105-6, 2016-2018 гг.), «Экологические, эволюционные и молекулярно-генетические аспекты адаптации и персистенции микроорганизмов рода *Vibrio* в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока» (№ ГР ААА-А18-11802099003-1, 2018-2021 гг.).

### **Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 16 работ, из них 5 в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ», одна – в зарубежной печати.

### **Объем и структура работы**

Работа изложена на 183 страницах машинописного текста и состоит из обзора литературы, четырех глав собственных исследований. Работа иллюстрирована 35

рисунками, 37 таблицами. Список использованной литературы включает 288 работ, из них 86 работ отечественных авторов и 202 – зарубежных.

#### **Место выполнения работы**

Работа выполнена в лаборатории холеры Федерального казенного учреждения здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

#### **Методология и методы исследования**

Методология настоящего исследования спланирована исходя из поставленных цели и задач. Проведение исследований осуществлялось с применением микробиологического, молекулярно-генетического методов, статистического и биоинформационного анализов.

#### **Вклад автора**

Автор непосредственно осуществлял поиск и анализ литературных данных, касающихся темы научно-исследовательской работы, участвовал в формировании концепции исследования, выполнял бактериологические и молекулярно-генетические исследования холерного и параземолитического вибрионов, осуществлял сбор, систематизацию первичных данных и статистическую обработку полученных результатов. Полногеномное секвенирование штаммов параземолитического вибриона и анализ структуры геномов проведены совместно со специалистами лаборатории холеры ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. СИТУАЦИЯ ПО ХОЛЕРЕ И ПИЩЕВЫМ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯМ, ОБУСЛОВЛЕННЫМ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМ ВИБРИОНОМ, НА ГЛОБАЛЬНОМ И РЕГИОНАЛЬНОМ УРОВНЯХ

#### 1.1 Ситуация по холере в мире, России, Приморском крае

Холера – особо опасная инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, характеризующаяся диарейным синдромом, реализуемая водным, пищевым и контактно-бытовыми путями [126, 166, 240, 241]. Несмотря на усиленные меры борьбы с холерой, она остается одной из актуальных и социально значимых инфекционных болезней в структуре мировой заболеваемости [37-39, 42, 57].

Регистрация случаев холеры в отдельных странах Африки, Азии, Америки, возможность выноса инфекции на свободные от холеры территории, биологические особенности возбудителя характеризуют нестабильную эпидемиологическую обстановку по холере в мире [104-110, 215]. По данным сводного отчета ВОЗ за период 1970-2021 гг. в мире зарегистрировано свыше 11 млн случаев холеры, из которых 41,2 % приходится на страны Африки, 39,0 % – на страны Азии и 19,5 % – на страны Америки (рисунок 1) [104-110, 215]. В странах Европы случаи холеры носят преимущественно завозной характер, на их долю приходится 0,1 %.

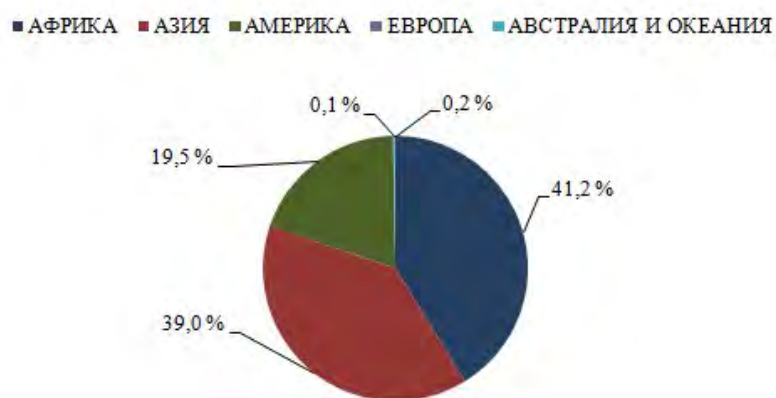


Рисунок 1 – Структура заболеваемости холерой в мире (1970-2021 гг.)

При этом количество больных на различных территориях было неравномерным по различным периодам (рисунок 2). Вспышки холеры, начавшиеся в 1991 году в странах Южной Америки, – в Перу (734 751 случай), Колумбии (36 676 случаев), Бразилии (172 471 случай), Эквадоре (93 906 случаев), Гватемале (73 803 случая),

Мексике (45 568 случаев) – обусловили высокие показатели заболеваемости на Американском континенте. В этот же период выявлены так называемые генетически измененные варианты холерного вибриона Эль Тор, несущие в геноме аллель гена биосинтеза субъединицы В холерного токсина *ctxB*, характерную для вибриона классического биовара [209].

С 2000 г. по 2009 г. наибольшее количество больных зарегистрировано на Африканском континенте (рисунок 2). В этот период в Африке крупные вспышки отмечены в Демократической Республике Конго (ДРК) (202 708 случаев), Южной Африке (160 428 случаев), Мозамбике (124 576 случаев), Танзании (58 348 случаев), Нигерии (42 926 случаев), Замбии (37 072 случая).

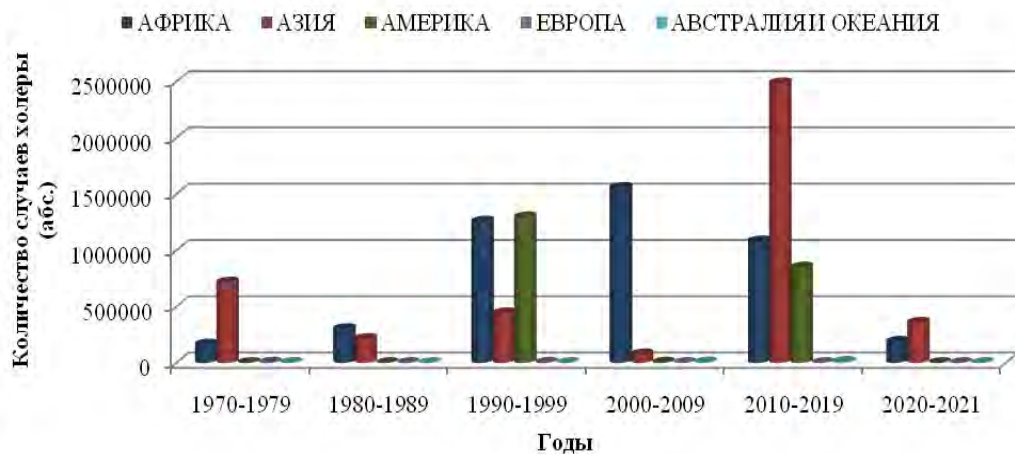


Рисунок 2 – Количество случаев холеры за период с 1970 г. по 2021 г.

В период 2010-2019 гг. высокие уровни заболеваемости выявлены в Азии. Существенный вклад в структуру заболеваемости внесла ситуация по холере в охваченном войной Йемене, где в 2017 г. зарегистрировано беспрецедентное количество больных – 1 032 481 [106]. Также на этот период пришлась эпидемия холеры на о. Гаити, начавшая в конце 2010 г. после землетрясения.

Нестабильная эпидемиологическая ситуация в мире обуславливает риск завоза холеры на территорию Российской Федерации с возможным развитием острых вспышек. В начале VII пандемии холера была неоднократно занесена на территорию Сибири и Дальнего Востока: вспышки в гг. Омске (1972 г.), Барнауле, Новосибирске (1973 гг.), заносы в гг. Якутск (1970 г.), Тюмень, Красноярск, Сургут (1973 г.), Ишим (1974 г.), Ялуторовск (1975 г.), Омск, Новосибирск (1994 г.), регистрация случаев

вибрионительства в гг. Омске (1976 г.), Красноярске (1976, 1979 гг.), Уссурийске (1982 г.) [79]. Одно из крупных эпидемических осложнений в РФ на современном этапе VII пандемии, связанное с завозом холеры возвратившимися из Саудовской Аравии паломниками, зарегистрировано в 1994 г. в Республике Дагестан [53]. За период вспышки выявлено 1 119 больных и 1 240 вибрионителей. Столь высокое количество инфицированных связано с особенностями традиций местного населения, связанных с проведением различных мероприятий [53].

В 1999 г. крупные вспышки холеры произошли на территории Дальнего Востока, в т.ч. в Приморском крае и Сахалинской области, которым предшествовал завоз холеры в гг. Уссурийск и Южно-Сахалинск [54, 55]. Формированию очагов, связанных со скрытым завозом холеры, способствовали благоприятные для накопления и размножения токсигенного холерного вибриона условия окружающей среды. Оценка эпидемиологических признаков вспышек с учетом характера водопользования, выделение токсигенных изолятов из поверхностных водоемов свидетельствовали о водном пути передачи инфекции [55].

В 2001 г. в г. Казани зарегистрирована вспышка холеры с регистрацией 52 больных и 18 вибрионителей, возникшая при купании населения в загрязненном сточными водами водоеме [51]. В следующем году культура нетоксигенного холерного вибриона сероварианта Огава была выделена от больной сальмонеллезом в Республике Калмыкии [2].

В период с 2004 г. по 2010 г. неоднократно регистрировались случаи холеры завозного происхождения. Так, в 2004 г. установлен завоз холеры в Республику Башкортостан [31, 75]. Обусловленная *V. cholerae* O1 Эль Тор с генотипом *ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* вспышка острой кишечной инфекции с реализацией водного пути передачи возникла в Ростовской области в 2005 г. [56, 57]. Также в 2005 г. холера была занесена из Таджикистана на территорию Тверской области и г. Москвы [75].

В 2006 г. зарегистрированы завозы холеры без распространения инфекции в Мурманскую область [75]. Ретроспективно на основании нарастания титров антител при серологическом исследовании парных сывороток крови и результатов ПЦР проб дуоденального содержимого выявлены случаи холеры и вибрионительства в г. Белорецке Республики Башкортостан у лиц, вернувшихся из Индии [78]. В

последующем завозные случаи холеры из Индии выявлены в 2010, 2012, 2014 гг. в г. Москве [74].

Кроме регистрации в отдельные периоды обусловленных завозами локальных вспышек холеры и единичных завозных случаев, ситуация по холере в РФ характеризуется выделением из поверхностных водоемов преимущественно нетоксигенных холерных вибрионов O1, O139 и других серологических групп. При обследовании поверхностных водоемов за период с 2009 г. по 2018 г. на территории страны выделено 744 штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и *V. cholerae* O139, характеризующихся различным набором основных детерминат патогенности, в 29 субъектах РФ [37]. Единичные случаи обнаружения токсигенных холерных вибрионов Эль Тор в поверхностных водоемах имели место в Республике Крым (2010 г.) и Ростовской области (2011, 2014 гг.) [37].

Одним из трех субъектов РФ и единственным в Сибири и на Дальнем Востоке, отнесенным в соответствии с СанПиН 3.3686-21 ко II типу территорий по эпидемическим проявлениям холеры, является Приморский край [67].

Первая официально зарегистрированная вспышка холеры в г. Владивостоке датирована 1886 г. в период V пандемии холеры [41]. В последующем завозы регистрировались в 1890, 1895 гг. на фоне активизации судоходства в азиатские страны – Японию, Китай, Корею [41]. В работе А.И. Крушанова «Хроники Владивостока» имеются упоминания о случаях холеры в 1885, 1892 гг., однако официальных данных нет [41].

В период VI пандемии, совпавшей с развитием в Приморском крае транспортных путей, холера в регион завезена трижды: в 1902, 1909, 1910 гг. В 1902 г. инфекция была завезена из Харбина (Китай) прибывшим железнодорожным транспортом больным (в г. Владивостоке заболело 339 человек, умерло – 249, в г. Никольск-Уссурийске заболело 65 человек, умер – 31), в 1909 г. – из Кореи (в г. Владивостоке заболело 143 человека, умерло – 90) [40, 41]. В 1910 г. холера зарегистрирована среди пассажиров, в т.ч. иностранных граждан, на пароходе «Тунгуз», прибывшем из Николаевска-на-Амуре и перевозившем закончивших сезонные работы рабочих и продукты питания [40].

В период с 1922 г. по 1988 г. для въезда на территорию г. Владивостока в отношении въезжающих лиц осуществлялся усиленный пограничный контроль, что позволило минимизировать риск завоза холеры. Крупное осложнение



эпидемиологической обстановки по холере в виде острой вспышки на территории края произошло в 1999 г. Осложнение эпидситуации началось с завоза холеры водителями, прибывшими из г. Дунин (КНР) в г. Уссурийск [54]. Позже в краевом центре зафиксированы множественные очаги холеры, связанные с различными источниками водопользования. Продолжительность вспышки составила 35 дней – с 23 августа по 24 сентября, в период которой было выявлено 23 больных и 5 вибрионосителей с изоляцией из клинического материала токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор сероварианта Огава [54].

Основная роль в распространении холеры в регионе в период вспышки принадлежала поверхностным водоемам и сточным водам, из проб которых было изолировано 11 культур токсигенного *V. cholerae* O1 серогруппы. В поверхностных водоемах токсигенные холерные вибрионы обнаруживались в пробах воды бухты Горностай, ручья в п. Рыбачий, Первой речки, у причала около торгового порта [54].

Вместе с тем, необходимо отметить, что гидрологическая сеть бассейна Японского моря, омывающего Приморский край, представлена 55 024 реками общей протяженностью 110 009 км и имеет густой разветвленный характер (густота речной сети 1,08 км/км<sup>2</sup>) [43]. На территории края протекают крупные реки, берущие начало в сопредельной стране – КНР (рр. Раздольная, Нестеровка), и являющиеся трансграничными водоемами (рр. Туманная, Уссури, Сунгач, оз. Ханка). Административный центр г. Владивосток расположен на полуострове Муравьева-Амурского, который омывается водами Амурского и Уссурийского заливов, являющимися естественными акваториями залива Петра Великого Японского моря. Водосборный бассейн залива Петра Великого образован такими крупными реками как Раздольная, Артемовка, Партизанская. Гидрологической особенностью Приморского края, как и любого региона, имеющего выход к морю, является наличие эстуариев – участков в устье рек на границе смешения речной и морских вод, хорошо прогреваемых в летнее время [125]. Установлено, что химический состав эстуариевых вод в большей степени зависит от региональных особенностей, в т.ч. связанных с деятельностью человека, и минералогическим составом речной воды [10, 76, 77]. Проблема антропогенного воздействия на прибрежные воды, особенно залива Петра Великого, в последние годы стоит остро, что связано с интенсификацией экономического развития Приморского края (строительство и реконструкция портов, промышленных

предприятий, мостов, дорог, прокладка газовых и нефтяных трубопроводов и т.д.) и туристической деятельностью [14, 50, 82].

В связи с этим, важной составляющей эпидемиологического надзора за холерой в Приморском крае, как и в целом в России, является микробиологический мониторинг поверхностных водоемов на наличие возбудителя холеры с учетом дифференцированного подхода к его осуществлению в зависимости от типа территории по проявлениям холеры [57]. Значение поверхностных водоемов является одним из решающих в развитии взрывного характера эпидосложнений и оказывает существенное влияние на основные эпидемические закономерности холеры [26]. Необходимо отметить, что до 1999 г. Приморский край относился к III типу подтипу IIIA территорий по проявлению холеры, однако возникшая вспышка холеры в 1999 г. обусловила перевод территории на II тип [57].

Исследование поверхностных водоемов Приморского края на наличие в них возбудителя холеры начато в 70-х годах прошлого столетия и носило поначалу периодический характер [41]. До 1976 г. *V. cholerae* Эль Тор в водоемах края не обнаруживалась, а первая культура нетоксигенного холерного вибриона Эль Тор была изолирована в августе 1976 г. из проб воды р. Нестеровки [41]. С того времени нетоксигенные холерные вибрионы практически ежегодно выделялись из водоемов края с расширением мест циркуляции. По данным А.К. Адамова с соавт. [1] за период с 1976 г. по 1988 г. для бактериологического анализа была отобрана 35 571 проба воды поверхностных водоемов, 2 210 проб сточных вод. Согласно государственным докладам о состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае, за период 2012-2018 гг. изолировано 906 штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы из поверхностных водоемов и обследовано 64 793 человека с клиническими симптомами, не исключаящими холеру [44-49]. Во всех случаях при исследовании клинического материала получен отрицательный результат бактериологических исследований.

## **1.2 Ситуация по пищевым токсикоинфекциям, обусловленным параземолитическим вибрионом, в мире, России, Приморском крае**

Другим значимым в инфекционной патологии близкородственным к *V. cholerae* патогеном и широко распространенным в поверхностных водоемах является

*Vibrio parahaemolyticus*, признанный во всем мире этиологическим агентом пищевых токсикоинфекций (ПТИ) в регионах, где население широко употребляет в пищу морепродукты. Возбудитель был впервые выявлен при вспышке кишечной инфекции в Японии в 1950 г., в период которой после употребления сардин заболело 272 человека и умерло 20 человек [131].

Как показывает анализ литературных данных, глобальная эпидемиологическая ситуация по кишечным инфекциям, обусловленным парагемолитическим вибрионом, характеризовалась спорадической заболеваемостью в отдельных приморских странах до 1996 г. [208]. Появление так называемых пандемичных клонов парагемолитического вибриона различных серогрупп после 1996 г. вызвало значительное увеличение количества случаев пищевых токсикоинфекций, обусловленных данным вибрионом, особенно в странах Юго-Восточной Азии [208]. Пандемичная группа парагемолитического вибриона представлена 21 серогруппой, наиболее изученной из которой является *V. parahaemolyticus* O3:K6 серогруппы [146, 208]. Впервые он был идентифицирован у больного с симптомами острой кишечной инфекции в 1996 г. в Калькутте, на территории которой возбудитель ранее не обнаруживался [208]. Об изоляции штаммов O3:K6 серогруппы, аналогичных выделенным штаммам в Калькутте, было сообщено при вспышках в странах Юго-Восточной Азии, а также на побережьях Атлантического океана и Персидского залива [268]. Инфекция, обусловленная парагемолитическим вибрионом пандемического клона, была выявлена на юге Таиланда у 317 больных кишечной инфекцией [177]. Семьдесят шесть процентов изолированных от больных штаммов имели специфические маркеры (*tdh* +, *trh* + и уникальную *toxRS* последовательность), характерные для пандемической группы, и были представлены четырьмя серогруппами (O3:K6, O1:K25, O1:K41 и O4:K12) с доминированием вибрионов O3:K6.

На территории Китая за период с 2007 г. по 2012 г. выявлено 1 488 случаев кишечных инфекций, обусловленных парагемолитическим вибрионом [184]. Доминирующие позиции в структуре серогрупповой принадлежности *V. parahaemolyticus* принадлежат вибрионам O3:K6, O1:K25, O1:KUT, O3:K68, O4:K68, O4:K8, O3:K29 серогрупп [184, 287]. В городах Китая (Шанхай, Веньчжоу) парагемолитический вибрион часто выявляется у больных гастроэнтеритом, помимо других возбудителей кишечных инфекций бактериальной и вирусной природы [143,

278]. Выловленные из Желтого моря на юге Китая ракообразные характеризуются обсеменностью парагемолитическим вибрионом, среди которого встречаются обладающие патогенными свойствами изоляты [148]. При этом по результатам мультилокусного сиквенс-типирования наиболее распространенный среди клинических изолятов сиквенс-тип ST3 часто обнаруживают и у штаммов, выделенных из морепродуктов, что свидетельствует об этиологической значимости водных вибрионов в развитии токсикоинфекций [287].

На Американском континенте в отдельных странах неоднократно регистрировались случаи гастроэнтерита, вызванного пандемическим клоном парагемолитического вибриона O3:K6 серогруппы [268]. Данные изоляты были впервые обнаружены в Перу в 1996 г. (свыше 100 случаев) [268]. В последующем пандемические *V. parahaemolyticus* выявлены в Чили (1998 г., свыше 16 800 случаев заболевания), в США (1998 г., свыше 700 случаев), в Бразилии (2001 г., свыше 18 случаев), в Мексике (2004 г., свыше 1200 случаев). Однако, несмотря на преобладание *V. parahaemolyticus* O3:K6 серогруппы, в некоторых странах Северной и Южной Америки наблюдалось уменьшение числа клинических случаев, вызванных вибрионом O3:K6 и увеличение числа случаев, связанных с новым серовариантом O3:K59. Так, если в Чили до 2006 г. каждый случай пищевой токсикоинфекции был ассоциирован с парагемолитическим вибрионом O3:K6 серогруппы, то позднее (в 2007 г.) он выявлен только в 73 % случаев [150]. В 11 % случаев был идентифицирован *V. parahaemolyticus* O3:K59, генетически отличавшийся от ранее выявляемых вариантов, но имевший в структуре генома гены «островов патогенности» [150]. Наблюдаемое уменьшение количества случаев инфекции авторы соотнесли с возможностью снижения уровня потребления сырых морепродуктов в результате общественной кампании по охране здоровья. В США по данным отчетов о вспышках кишечных инфекций CDC в период с 1998 г. по 2008 г. зафиксирована 71 вспышка, обусловленная *V. parahaemolyticus*, с регистрацией 1 221 случая заболевания [254].

В Европе случаи кишечных инфекций, обусловленные парагемолитическим вибрионом, регистрируются не так часто, как в странах Азии и Америки. Однако, в отдельных европейских странах в силу благоприятных климатических условий *V. parahaemolyticus* широко распространен в поверхностных водоемах и является этиологически значимым в развитии кишечных инфекций [196]. К таким регионам

относится Галисия на северо-западе Испании, где на протяжении длительного периода, начиная с 1998 г., регистрируются эпидемические проявления ОКИ галофильной этиологии [196]. В целом, в Испании парагемолитический вибрион был изолирован от больных в Барселоне (1986, 1987, 1999 гг.), Сарагосе (1993 г.) и Мадриде (1998, 2000 гг.) [198]. Исследование прибрежных вод на наличие галофильных микроорганизмов в Германии показало наличие этих бактерий в водоемах и их сезонное распространение, при этом заболеваемость инфекциями, вызванными галофильными патогенами, характеризовалась низким уровнем [154]. В период с 1993 г. по 2013 г. было сообщено о 13 случаях заболевания, ассоциированных с галофильными вибрионами [154].

На территории России галофильные вибрионы, в т.ч. *V. parahaemolyticus*, встречаются преимущественно в морских прибрежных водах. Микроорганизм широко распространен в водах Азовского, Черного, Каспийского, Балтийского и Японского морей [9, 19, 21-24]. Впервые в СССР галофильные вибрионы из поверхностных водоемов были изолированы в 1972 г. из морской воды и рыб Черного моря [23], от больных – в 1973 г. в г. Новороссийске [21]. Спорадическая заболеваемость регистрировалась в гг. Новороссийск, Одесса, Керчь, Ялта, Бердянск, Красноводск [24]. Серьезные эпидемические проявления ПТИ были отмечены в 80-х годах прошлого столетия на побережье Азовского моря [24]. Количество выделенных от больных штаммов парагемолитического вибриона достигало 450 (1984 г.) [24].

В Приморском крае эпидемиологическая ситуация по ПТИ, вызванным галофильными вибрионами, согласуется с глобальной тенденцией распространения парагемолитического вибриона. Так, с 1976 г. по 1996 г. в г. Владивостоке регистрировались единичные случаи ОКИ галофильной этиологии на фоне циркуляции вибриона в поверхностных водоемах [73]. В 1997 г. в г. Владивостоке в июле-августе зарегистрирована вспышка кишечной инфекции продолжительностью около месяца с вовлечением в эпидемический процесс 63 человек. Фактором передачи явились морепродукты (варено-мороженые креветки, гребешки, крабы и другие), обсемененные парагемолитическим и алгинолитическим вибрионами [27, 71, 73].

Персистенция парагемолитического вибриона преимущественно в соленых водоемах, обсеменение ракообразных и моллюсков, молекулярно-генетические особенности вибриона, социальные факторы определяют разнообразие клинико-эпидемиологических особенностей ПТИ, обусловленных патогеном.

Глобальное изменение климата и, как следствие, повышение температуры воды является важным фактором в распространении паразитического вибриона. Показано, что риск возникновения кишечных инфекций, обусловленных микроорганизмами *Vibrio* spp., и в т.ч. *V. parahaemolyticus*, возрастает при изменении условий существования патогена в окружающей среде, таких как повышение температуры [88, 89, 120, 195]. Оптимальной температурой для роста паразитического вибриона является 37 °С, однако минимальная температура морской воды, ассоциированная со случаями заболевания, составляет 15 °С [201]. При анализе взаимосвязей обусловленных паразитическим вибрионом вспышек в Перу и на Аляске с климатическими факторами установлено влияние феномена Эль-Ниньо на его распространение в поверхностных водах [195]. При этом обсемененность вибрионом морских поверхностных водоемов является одним из условий, на фоне которого регистрируются случаи заболевания ПТИ. Так установлено, что заболеваемость ПТИ на побережье Азовского моря регистрировалась при высокой обсемененности микроорганизмом морской воды и гидробионтов [24]. Согласно данным Тихоокеанского научно-исследовательского рыбохозяйственного центра «ТИНРО-центр», циркуляция галофильных вибрионов сопряжена с высокой антропогенной нагрузкой на водоем [19].

Несмотря на возможность инфицирования паразитическим вибрионом при купании в море, спорадические и групповые случаи ПТИ преимущественно ассоциированы с употреблением в пищу обсемененных *V. parahaemolyticus* морепродуктов. В целях снижения риска возникновения случаев заболевания в США существует система контроля за безопасностью пищевых продуктов, в частности морепродуктов, подразумевающая контроль за патогенными свойствами выделенных из морепродуктов культур и ограничение по количеству КОЕ на массу продукта [252]. Многофакторный анализ рисков возникновения спорадических случаев гастроэнтерита, обусловленных *V. parahaemolyticus*, показал, что на возможность развития инфекции влияют такие факторы как прием антибиотиков в течение 4-х недельного периода, прием пищи вне дома и употребление моллюсков [276]. Также необходимо отметить значимость вибрионосителей в эпидемическом процессе, особенно среди работников, задействованных в рыбопромысловой деятельности, как это было при проявлениях ПТИ в г. Красноводске [24].

Таким образом, анализ ситуации по холере и ОКИ, обусловленным параземолитическим вибрионом, показывает значимость в инфекционной патологии данных патогенов и широкое распространение в поверхностных водоемах как в мировом масштабе, так и в пределах Приморского края.

## **2. ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ И ОСОБЕННОСТИ ОРГАНИЗАЦИИ ГЕНОМОВ РАЗЛИЧНЫХ ГРУПП ПАТОГЕНОВ**

Среди множества факторов, влияющих на развитие и течение инфекционного процесса у восприимчивого организма, одним из значимых являются биологические особенности возбудителя. Холерный и параземолитический вибрионы продуцируют различные факторы патогенности, такие как токсины, адгезины, гемолизины, секретируемые эффекторные белки и ряд других, способствующих прикреплению микроба к эпителиальным клеткам кишечника и оказывающих цитотоксическое и энтеротоксическое воздействие [167, 171, 189, 192, 242].

### **2.1 Факторы патогенности холерного вибриона и особенности геномной организации различных групп патогена**

Ключевым звеном в патогенезе холеры является выработка микроорганизмом холерного токсина, ответственного за развитие основного клинического симптома – профузной диареи [171]. Холерный токсин кодируется *ctxAB* опероном, расположенным в составе мобильного генетического элемента (МГЭ) филаментозного бактериофага СТХφ, имеющего размер 6,9 тыс. п.н. и состоящего из областей – «коровой» и RS2 [223]. Помимо *ctxAB* оперона, «коровая» часть СТХφ содержит структурные гены, такие как *zot* (zonula occludens toxin), *ace* (accessory cholera enterotoxin), ген фактора кишечной колонизации – *cep* (Core-encoded pilus) и *orfU* с неизвестной функцией [127, 262]. В области RS2 было обнаружено три открытые рамки считывания *rstA2*, *rstB2*, *rstR*, ответственных за репликацию, сайт-специфическую интеграцию фага и репрессию транскрипции гена *rstA* соответственно [270].

Однако для развития инфекционного процесса выработки холерного токсина недостаточно, необходимо приращение *V. cholerae* к эпителию тонкого кишечника. Этому способствуют токсин-корегулируемые пили адгезии (TCP, toxin co-regulated

*pilus*), также являющиеся рецептором СТХф фага [167, 256]. Данные пили образуются в результате полимеризации основной субъединицы пилина TspA, кодируемой геном *tspA*, локализованным в составе кластера генов *tspA-F* на «острове патогенности» (*Vibrio cholerae* pathogenicity island) VPI-1 [167, 218, 237].

Помимо «острова патогенности» VPI-I, в геноме холерного вибриона обнаружено наличие второго «острова патогенности», обозначенного как VPI-II [157, 204]. В составе данного острова локализован ген *nanH*, кодирующий один из известных факторов патогенности – нейраминидазу [157]. Этот фермент расщепляет нейраминовые кислоты муцинового слоя кишечника, тем самым способствуя более легкому проникновению вибриона в эпителиальный слой клетки хозяина.

Эпидемическая значимость возбудителя холеры обусловлена наличием вышеуказанных детерминант – генов холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии. Выделенные из поверхностных водоемов изоляты, как правило, характеризуются отсутствием генов *ctxAB*, *tspA*. Однако, в ряде субъектов РФ в водоемах и сточных водах обнаруживаются изоляты холерного вибриона, содержащие из данных генов детерминанты токсин-корегулируемых пилей, в частности ген *tspA* при отсутствии гена *ctxA* [37].

Регуляция продукции факторов патогенности холерного вибриона – холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии находится под контролем ToxR-регуляторной системы [121]. Эта система включает три регуляторных гена – *toxR*, *toxT* и *toxS*. Глобальным геном-регулятором является ген *toxR*, продукт которого регулирует экспрессию свыше 17 генов, включая гены *ctxAB*, *tspA* [121]. Данный продукт является трансмембранным ДНК-связывающим белком с молекулярной массой 32,5 кДа [68, 121, 126], состоящим из N-концевого цитоплазматического ДНК-связывающего домена, центрального трансмембранного и C-концевого периплазматического доменов [116, 226]. Белок ToxR связывается с тандемно повторяющейся последовательностью ДНК в составе *ctxAB* оперона, что приводит к повышению транскрипции оперона и тем самым увеличивается экспрессия холерного токсина более чем в 100 раз [203].

В 2002 г. M. Dziejman с соавт. [124] были выявлены два характерных только для пандемических изолятов холерного вибриона кластера генов, обозначенные как «острова пандемичности» (VSP, *Vibrio Seventh Pandemic*) холерного вибриона (VSP-I и VSP-II). Функциональная нагрузка продуктов, кодируемых входящими в состав



«островов пандемичности» генами, до конца не установлена. Известно, что область VSP-I размером 16 т.п.н. охватывает 11 открытых рамок считывания (ORF, open reading frame) с VC0175 до VC0185, кодирующих преимущественно белки с неизвестной функцией [124, 216]. Область VSP-II имеет размер 26,9 т.п.н. и охватывает 26 ORFs, кодирующих репаративные белки, белки хемотаксиса, бактериофаг-подобные интегразы и белки с неизвестной функцией [204, 216]. Высказано предположение, что повышенные адаптивные характеристики пандемических изолятов холерного вибриона обусловлены присутствием в их геноме данных областей [216].

В процессе жизнедеятельности в организме хозяина холерный вибрион подвержен воздействию различных факторов, таких как желчь, органические кислоты. Желчь способствует ToxR-зависимой экспрессии белка наружной мембраны OmpU [117, 247]. Установлено, что штаммы холерного вибриона, экспрессирующие исключительно OmpU, более устойчивы к желчи, способны колонизировать кишечник и синтезировать больше холерного токсина, чем экспрессирующие исключительно OmpT порин [247]. Кроме того, белок OmpU позиционируется как потенциальный фактор адгезии холерного вибриона к клеткам макроорганизма [251]. Также показана роль белков наружной мембраны в осмоадаптации холерного вибриона при пребывании в окружающей среде [130].

Важное значение в регуляции клеточной популяции путем обмена химическими сигнальными молекулами аутоиндукторами (феномен «quorum sensing») отведено гемагглютининпротеазе, являющейся цинк-зависимой металлопротеазой и обладающей муцинолитической и цитотоксической активностью [246, 288]. При достижении высокой плотности холерного вибриона, через каскад реакций активируется кодирующий фермент гемагглютининпротеазу ген *hapA*, за счет чего происходит открепление клеток холерного вибриона от эпителия кишечника и дальнейшее его распространение [288].

При попадании в изменяющиеся условия окружающей среды холерный вибрион включает различные механизмы для выживания. Одной из стратегий выживания в окружающей среде под воздействием неблагоприятных факторов, в т.ч. и в межэпидемический период, является формирование биопленки на различных биотических и абиотических поверхностях [193, 272, 280]. Установлено, что в процессе биопленкообразования холерным вибрионом существенная роль принадлежит

маннозочувствительным гемагглютинином (MSHA) в составе «острова персистенции» (EPI, environmental persistence island) и экзополисахарида, кодируемому кластером *vps* [101, 193, 272, 280]. Гомология фланкирующих фрагментов локуса MSHA с генами *yhdA* и *mreB* кишечной палочки служит свидетельством возможного приобретения данного локуса путем горизонтального переноса [193].

Маннозочувствительные гемагглютинины представляют собой гибкие пили, состоящие из субъединиц с общей молекулярной массой 17 кДа, и относящиеся к семейству пилей IV типа [162, 193]. Данные пили обнаруживаются на поверхности клеток различных грамотрицательных микроорганизмов и играют роль в колонизации клеток-хозяина, абиотических поверхностей, служат рецепторами для бактериофагов и различных медиаторов [162, 163]. Необходимый для секреции MSHA и сборки его на поверхности клетки локус имеет размер 16,7 т.п.н. и состоит из 16 генов, в том числе из пяти, кодирующих препилин и препилин-подобные белки [193]. Структурно гены MSHA организованы в два оперона, один из которых кодирует секреторные компоненты, а другой – структурные субъединицы. Показано, что способность к синтезу данных пилей выявлена у *V. cholerae* O1 Эль Тор и O139 серогруппы, тогда как *V. cholerae* классического биовара лишены этой способности, несмотря на наличие и экспрессию генов [101].

## **2.2 Факторы патогенности параземолитического вибриона и особенности геномной организации различных групп патогена**

Первыми изученными факторами патогенности параземолитического вибриона являлись прямой термостабильный (TDH) и TDH-связанный (TRH) гемолизины, идентифицированные в 1980-х годах по гемолитической активности на специальной кровяной среде Вагацума (феномен Канагава) [245]. В растворе прямой термостабильный гемолизин существует в виде тетрамера и обладает высокой гемолитической активностью [277]. TDH-связанный (TRH) гемолизин является термолабильным и иммунологически сходен с прямым термостабильным [152]. Эти факторы патогенности кодируются *tdh* и *trh* генами, уровень гомологии нуклеотидной последовательности между которыми составляет около 70 % [170, 192, 213, 214]. При исследовании связи между гемолизом эритроцитов на среде Вагацума и вариацией нуклеотидной последовательности гена *tdh* установлено, что демонстрирующие

типичный фенотип штаммы *V. parahaemolyticus* характеризовались наличием двух копий гена *tdh* (обозначенные как *tdh1* и *tdh2*), тогда как показавшие слабый гемолиз *tdh*<sup>+</sup> штаммы имели только одну его копию [212]. У Канагава-отрицательных *tdh*<sup>+</sup> штаммов парагемолитического вибриона установлено наличие других копий гена *tdh3*, *tdh4*, *tdh5* [212]. При этом уровень экспрессии гена *tdh2* выше, чем остальных генов *tdh*, и именно с ним связана гемолитическая активность у Канагава-положительных штаммов [212]. Регуляция экспрессии этих генов находится под контролем оперона *toxRS*, имеющего функциональную гомологию с таковым холерного вибриона [185]. При этом уникальная нуклеотидная последовательность гена *toxRS* является характерной особенностью группы пандемичных клонов парагемолитического вибриона, отличающейся по семи позициям от последовательностей изолятов О3:К6, выделенных до 1995 г. [199]. На основании обнаруженных замен были предложены различные варианты ПЦР (GS-PCR, PGS-PCR), нацеленные на выявление пандемичных клонов О3:К6, и позиционированные в качестве эффективного инструмента при проведении эпидемиологического анализа в свете глобального распространения этих вариантов вибриона [199, 219]. Кроме этого, в геноме патогенных изолятов *V. parahaemolyticus* выявлена специфическая для данной группы штаммов открытая рамка считывания *orf8* [207, 219]. Клинические штаммы *V. parahaemolyticus* не всегда обладают генами *tdh* и *trh*, и при этом являются патогенными [189, 231]. Исследование трансэпителиальной резистентности и парацеллюлярной проницаемости в культивируемых эпителиальных клетках выявило нарушение эпителиального барьера независимое от выработки токсина, что свидетельствовало о роли других факторов патогенности в механизмах развития инфекционного процесса [189].

Полногеномное секвенирование парагемолитического вибриона позволило выявить у микроорганизма систему секреции III типа (Т3SS1 и Т3SS2), используемую рядом грамотрицательных патогенных бактерий для секреции и транслокации факторов вирулентности в цитозоль эукариотических клеток [222]. Приобретение и наличие данной системы рассматривается отдельными авторами как механизм появления новых вирулентных клонов парагемолитического вибриона и объясняет развитие воспалительного процесса при инфекциях, обусловленных парагемолитическим вибрионом [95]. Патогенные штаммы вибриона преимущественно несут в геноме второй набор генов Т3SS2, локализованный на малой хромосоме в составе «острова

патогенности» и представленный не только детерминантами основных факторов патогенности *tdh* и *trh*, но и детерминантами, ответственными за биосинтез других белков (*VopA*, *VopC*, *VopL* и *VopT*) [156]. Наличие системы секреции III типа T3SS2 не всегда сопряжено с группой пандемичных изолятов парагемолитического вибриона [202].

При дальнейшем биоинформационном анализе геномов *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 и близкородственных микроорганизмов выявлено присутствие в геноме парагемолитического вибриона системы секреции VI типа (T6SS), а также наличие семи геномных «островов патогенности» *V. parahaemolyticus* (VPaI-1 – VPaI-7) [192]. Регуляторные механизмы T6SS до настоящего времени достаточно хорошо не изучены. Предположена ее роль в устойчивости патогена к условиям окружающей среды, ввиду различий в активности генов T6SS1 и T6SS2 в зависимости от температуры и солености внешней среды [188]. G. Chao с соавт. [98] при исследовании 187 штаммов *V. parahaemolyticus*, изолированных из клинического материала и пищевых продуктов, установили, что полный набор генов T6SS характерен для большинства пандемичных вариантов парагемолитического вибриона, а частичный набор – для непатогенных штаммов.

Учитывая особенности генетической организации парагемолитического вибриона, G. Chao с соавт. [99] дифференцировали штаммы на патогенные, непатогенные и пандемичные по наличию тех или иных мишеней. Оценка патогенности изолятов осуществлялась ими по наличию генов *tdh* и *trh*, а принадлежность к пандемическому клону – по присутствию гена *tdh*, отсутствию *trh*, положительной реакции ПЦР на выявление пандемичных маркеров в GS-PCR, PGS-PCR и наличию/отсутствию рамки считывания *orf8*.

Приобретение «островов патогенности» путем горизонтального переноса от микроорганизма-донора к реципиенту рассматривается как возможный механизм эволюции парагемолитического вибриона и формирования пандемичных клонов возбудителя [94, 144]. Особое значение уделяется таким «островам патогенности» как VPaI-1, VPaI-5, VPaI-7.

В отношении наличия «островов патогенности» в геномах *V. parahaemolyticus* показано, что они присутствуют у различных вариантов возбудителя с различной частотой [98, 100, 155]. У пандемичных изолятов парагемолитического вибриона

полный набор генов «островов патогенности» выявлен в отношении VPaI-1, VPaI-2, VPaI-4 [98, 100]. Детерминанты VPaI-3, VPaI-5 присутствовали в большинстве пандемических *V. parahaemolyticus*. Ассоциированные с «островом патогенности» VPaI-6 гены были обнаружены у всех штаммов, независимо от их пандемических характеристик, патогенных и непатогенных свойств [98]. Гены VPaI-7 и T3SS2 были связаны с *tdh*-позитивными штаммами [199].

Изоляты парагемолитического вибриона независимо от происхождения обладают различным набором детерминат патогенности, обуславливающих их значимость в развитии кишечных инфекций и определяющих клиническое течение болезни. При этом важное эпидемиологическое и микробиологическое значение имеет знание популяционной структуры парагемолитического вибриона в водных экосистемах, являющихся для них естественной средой обитания. Как показывают исследования многих авторов, выделенные из поверхностных водоемов *V. parahaemolyticus*, также как и клинические, обладают патогенными свойствами [84, 132, 221]. Так, изолированные в Бангладеш из объектов окружающей среды в период с 2006 г. по 2008 г. штаммы характеризовались в 30,3 % наличием гена *tdh*, кодирующего термостабильный прямой гемолизин. У этих же штаммов были выявлены генетические маркеры пандемичных клонов – *orf8* и специфичная для данной группы последовательность *toxRS* [84]. В геноме большинства изолятов парагемолитического вибриона, обнаруженных на северо-западном побережье США, присутствовал ген *tdh*.

Изолированные из отобранных вдоль грузинского побережья Черного моря проб воды и планктона штаммы *V. parahaemolyticus* характеризовались отсутствием детерминант патогенности парагемолитического вибриона (*tdh*, *trh*, *tlh*) и вариабельностью по результатам *ger*-PCR [221]. Кроме этого, у водных штаммов *V. parahaemolyticus* с генотипом *tdh<sup>-</sup>trh<sup>-</sup>* были обнаружены детерминанты T3SS2 [221].

В отношении парагемолитического вибриона, обсеменяющего обитателей морских водоемов, – ракообразных и моллюсков, – показано, что и они обладают патогенным потенциалом, зависящем во многом от микробного состава экологической ниши. В Китае из 115 выделенных из морепродуктов штаммов *V. parahaemolyticus* у 61 выявлен ген *trh* на фоне отсутствия гена *tdh* [275]. Выделенные на юге Тайваня из рыб штаммы *V. parahaemolyticus* не имели ряда T3SS2-ассоциированных генов (*vopB2*, *vopC*

и *vorT*), в то время как по генам «островов патогенности» VPaI-1 (MTase), VPaI-2 (VP0636), VPaI-3 (VP1073 и VP1077) они проявляли генетическую гетерогенность [260].

Таким образом, геномы холерного и парагемолитического вибрионов характеризуются высокой вариабельностью структуры с наличием детерминант множества факторов патогенности, основными из которых являются холерный токсин, токсин-корегулируемые пили адгезии у холерного вибриона и прямой термостабильный и TDH-связанный гемолизин у парагемолитического. Выделенные от больных с острыми кишечными инфекциями, обусловленными нетоксигенными *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, а также изолированные из объектов окружающей среды вибрионы характеризуются гетерогенностью структуры генома по наличию дополнительных детерминант патогенности.

### **3. МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ ТИПИРОВАНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ХОЛЕРЫ И ПИЩЕВЫХ ТОКСИКОИНФЕКЦИЙ, ОБУСЛОВЛЕННЫХ ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИМ ВИБРИОНОМ**

Разработка и внедрение эффективных методов типирования бактериальных патогенов на внутривидовом уровне является актуальным направлением совершенствования эпидемиологического и микробиологического мониторинга значимых возбудителей инфекционных болезней. В настоящее время известен широкий набор генетических мишеней и основанных на их детекции и анализе методов молекулярно-генетического типирования, успешно используемых в различных областях медицины.

Основанный на анализе количества вариабельных тандемных повторов метод MLVA (multilocus variable tandem repeat analysis) эффективно используется во всем мире для исследования таких микроорганизмов как *Y. pestis*, *B. anthracis*, *M. tuberculosis*, *L. pneumophila*, *P. aeruginosa*, *S. enterica*, *E. coli* и др. [226, 233, 266, 267, 279]. Метод применяется для установления клональности патогенов, в частности, при оперативном эпидемиологическом анализе и в исследовании популяционной структуры. Высокая дискриминирующая способность метода в дополнение к скорости постановки и получения результатов в формате соответствующего набору определенных локусов цифрового паттерна определяет ценность метода при проведении эпидемиологического расследования спорадических и групповых случаев инфекционных болезней [267].

Наряду с MLVA одним из широко применяемых методов генетического типирования микроорганизмов, в частности возбудителей кишечных инфекций, является гель-электрофорез в пульсирующем поле (PFGE, pulse field gel electrophoresis), позиционированный как «золотой стандарт» типирования [259]. Метод основывается на рестрикции геномной ДНК анализируемого изолята эндонуклеазами с последующим разделением в меняющемся направлении электрическом поле фрагментов и их сравнительном анализе. PFGE-типирование обладает высокой дискриминирующей способностью, воспроизводимостью и сопоставимостью с эпидемиологическими данными [259].

Другим эффективным методом молекулярно-генетического типирования возбудителей инфекционных болезней является мультилокусное сиквенс-типирование (MLST, multilocus sequencing typing), основанное на анализе структуры консервативных генов, отвечающих за жизнеобеспечение бактериальной клетки – генов «домашнего хозяйства» [94, 191]. Мультилокусное сиквенс-типирование нашло применение для исследования филогенетического родства различных групп изолятов, клональной структуры, эволюционных преобразований, а также для анализа путей распространения патогенов на глобальном уровне [94, 191]. Традиционно, MLST заключается в определении и сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей небольшого числа генов «домашнего хозяйства». Однако, в последнее время быстро развивающиеся технологии высокопроизводительного секвенирования генома (WGS, whole genome sequencing) дали толчок к развитию MLST на основе WGS (cgMLST – core genome MLST, wgMLST – whole-genome MLST, rMLST – ribosomal MLST) [129, 169, 178, 190, 282]. Эти подходы к типированию являются мощным инструментом для выявления клональных особенностей различных групп микроорганизмов, особенно на внутривидовом уровне [129]. Кроме этого, массив данных полногеномного секвенирования служит основой для *in silico* MLST, которая может использоваться для получения широкого спектра характеристик микроорганизма по локусам генов жизнеобеспечения [169].

Также с внедрением технологий полногеномного секвенирования активное развитие получило основанное на анализе в геноме однонуклеотидных полиморфизмов (SNP, single nucleotide polymorphism) SNP-типирование. В настоящее время WGS и SNP-типирование широко применяется в эпидемиологических и микробиологических

исследованиях для анализа эволюционных преобразований, углубленного изучения структурных особенностей генома микроорганизма, отдельных его локусов, оценки генетического разнообразия популяций и родства исследуемых изолятов [206, 264]. На сегодняшний момент наблюдается увеличение производительности ДНК-анализаторов, совершенствование принципов секвенирования, снижение стоимости исследования. Нельзя не отметить, что существенное влияние на развитие прикладных направлений WGS оказала доступность в сети Интернет инструментов биоинформационного анализа и пополняемых баз данных нуклеотидных последовательностей геномов микроорганизмов, что является, несомненно, важным для качественного анализа и интерпретации результатов секвенирования.

### **3.1 Молекулярно-генетические методы типирования холерного вибриона**

Одним из широко применяемых в настоящее время методов типирования возбудителя холеры является мультилокусный анализ варибельных tandemных повторов. Первые публикации по типированию холерного вибриона с использованием данного метода появились в начале 2000-х годов. В 2001 г. по результатам биоинформационного анализа генома холерного вибриона отечественными учеными было обнаружено семь потенциальных локусов, локализованных на большой (VcC, VcD, VcE, VcF и VcG) и малой (VcA, VcB) хромосомах вибриона с количеством повторов от четырех (локус VcG) до 23 (локус VcA) [3]. По одной из мишеней (локус VcB) была выявлена взаимосвязь его наличия с присутствием в геноме основного фактора патогенности – токсин-корегулируемых пилей адгезии [33]. Данная схема, включающая анализ пяти локусов из семи выявленных, широко используется исследователями для оперативного и ретроспективного эпидемиологического анализа заносных случаев и вспышек холеры, выявления особенностей различных вариантов *V. cholerae*, структуры популяций холерного вибриона в водоемах отдельных регионов [13, 15, 25, 33, 35, 52, 61]. Так, в качестве эффективного инструмента в расследовании вспышек холеры на территории РФ метод MLVA в этом формате использован при анализе эпидемических осложнений в гг. Казань (2001 г.), Каменск-Шахтинский (2005 г.) [34, 56]. В г. Казани возникшая вспышка по результатам MLVA носила клональный характер [34], а о заносном происхождении обусловленной *ctxAB<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>* холерными вибрионами вспышки в г. Каменск-Шахтинский Ростовской области свидетельствовало



формирование обособленного кластера генотипов вспышечных изолятов [56]. Из всех выявленных локусов наибольшим полиморфизмом обладает локус *VсА*, что позволяет рассматривать его в качестве перспективной мишени для типирования возбудителя холеры [5]. При этом использование ограниченного количества геномных мишеней для дискриминации штаммов позиционировано как наиболее надежная стратегия типирования [97]. Эффективность схемы субтипирования *V. cholerae* по ограниченному количеству локусов VNTR продемонстрирована Н. Zhou с соавт. [285] для эпидемиологического анализа, в то время как расширенная схема по шести локусам – для анализа филогенетических взаимосвязей и популяционного разнообразия.

Другая схема MLVA была представлена Y. Danin-Poleg с соавт. [118], которая основывалась на анализе структуры 17 локусов SSR (simple short repeat). По результатам типирования ими были установлены особенности структурной организации VNTR-локусов клинических и водных изолятов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. С учетом имеющихся данных о генетической структуре популяции холерного вибриона на определенной территории возможно и отслеживание популяционных изменений во времени и пространстве, в т.ч. при интродукции новых клонов патогена [118, 138].

J.S. Olsen с соавт. [220] также высоко оценили полезность MLVA-типирования в отношении холерного вибриона и выявили высокий уровень полиморфизма по шести описанным Danin-Poleg локусам переменных tandemных повторов среди тестируемых штаммов O1, O139 и не O1/O139 серогрупп. Однако высокая переменность локусов VNTR отдельными авторами рассматривается как ограничивающий критерий для использования метода в долгосрочных эпидемиологических исследованиях [176]. Для этого, по их мнению, целесообразнее использовать комплексный подход, сочетающий MLVA и SNP-типирование. Закономерности распространения инфекции в отдельных странах на основании такого подхода, в т.ч. и с использованием MLVA, выявлены на территориях Мьянмы, Таиланда, Вьетнама [210, 234, 239]. На территории Гвинеи по результатам сопоставлений MLVA генотипов клинических *V. cholerae*, выделенных в различные периоды вспышки холеры в 2012 г., показана интенсивная диверсификация клонов одного генотипа, коррелирующая с тенденцией распространения холеры в регионе [236]. Минимальными же различиями характеризовались структурные изменения локусов переменных повторов при исследовании штаммов *V. cholerae*, изолированных за одиннадцатилетний период (2002-2012 гг.) в Мозамбике [236].

При исследовании изолированных в пределах семьи и из водоисточников штаммов холерного вибриона методами MLVA и WGS оказалось, что количество различий в пяти локусах MLVA у изолятов холерного вибриона, выделенных в границах одной семьи, было значительно ниже, чем у изолятов из разных домохозяйств [136].

Кроме того, в отношении значимых в настоящее время генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор методом MLVA показана возможность их дифференциации от генетически типичных вариантов вибриона [15, 102].

Несомненную актуальность представляет изучение на генетическом уровне популяций нетоксигенного холерного вибриона, выделяемых из поверхностных водоемов в период эпидблагополучия, позволяющее расширить представления о биологических особенностях микроорганизма в условиях окружающей среды. Так, по результатам ретроспективного MLVA-типирования установлена возможность длительной персистенции холерного вибриона в естественной водной среде, что важно в эпидемиологическом анализе [35, 61]. С использованием метода выявлены закономерности распространения определенных групп штаммов холерного вибриона, начиная с 70-х годов прошлого столетия, в Ростовской области [13, 35]. При этом четкая приуроченность определенного MLVA-генотипа ко времени и месту выделения (водоему) не всегда прослеживается [61]. Так, в Забайкальском крае, начиная с 2005 г., доминируют генотипы изолятов холерного вибриона, впервые выделенные из р. Борзя и оз. Харанор, которые в последующем обнаруживались в разное время в этих же водоемах и реках Ингода, Кенон, Аргунь [61]. Одним из возможных объяснений этому служит постепенное увеличение или уменьшение количества повторяющихся единиц под воздействием факторов окружающей среды, лежащее в основе, так называемой модели поэтапных мутаций (SMM, stepwise mutation model) [173]. Этот факт необходимо принимать во внимание при интерпретации данных молекулярно-генетического типирования в целях анализа взаимосвязей штаммов холерного вибриона. Имеется ряд публикаций, посвященных изучению стабильности MLVA-профилей в геномах различных микроорганизмов [93, 115, 123, 243]. Установлена стабильность количества варьируемых тандемных повторов у выделенных штаммов *M. tuberculosis* от одних и тех же больных с туберкулезом на протяжении длительного периода (6 лет) [243], у изолятов *B. abortus* от вакцинированных животных на протяжении 16 месяцев [123]. Однако в экспериментах *in vitro* под воздействием неблагоприятных факторов

внешней среды показаны изменения аллельного профиля. Так, после облучения, повышения температуры и в условиях дефицита питательных веществ выявлены изменения MLVA-профилей у *E. coli* O157: H7 [115], после понижения температуры – у *S. enterica* серовара *typhimurium* [93].

Другой метод типирования возбудителя холеры – гель электрофорез в пульсирующем поле (PFGE-типирование) – активно применяется с 1995 г. [259]. Метод нашел широкое применение для анализа клональной структуры холерного вибриона, в особенности для выявления взаимосвязей исследуемых изолятов и изучения популяционного разнообразия. Процедура PFGE-типирования *V. cholerae* многоэтапна и стандартизована разработанным CDC протоколом PulseNet. Согласно критериям, предложенным F.C. Tenover с соавт. [259], тесно связанными штаммами могут считаться те, которые отличаются друг от друга по трем фрагментам рестрикции, возможно связанными – по шести. Однако, при интерпретации результатов необходимо учитывать и эпидемиологические данные, такие как продолжительность вспышки, пути передачи инфекции [92]. Для получения расширенных данных о взаимосвязи штаммов холерного вибриона из различных источников и географических мест целесообразно дополнительное использование других методов молекулярно-генетического типирования, например MLVA [257].

При использовании PFGE рядом авторов отмечается кластеризация PFGE-паттернов рестрикции в зависимости от времени и места изоляции штаммов. Так В. Li с соавт. [180] при анализе 381 клинического штамма *V. cholerae* O1, выделенных с 1961 г. по 2013 г. в Гуандуне (Китай), установлена кластеризация *NotI*-паттернов рестрикции по соответствующим вспышкам периодам (1961-1969, 1978-1989, 1990-2000, 2001-2013 гг.). При анализе 146 штаммов холерного вибриона, выделенных с 1975 г. по 1984 г. в Кении, выявлено 14 пульсотипов с группировкой на кластеры с временной привязкой [96]. PFGE-анализ использовался для установления взаимосвязи выделенных в период эпидемических осложнений штаммов *V. cholerae* в Гане, Вьетнаме, Китае [128, 186, 211]. Выделенные в период эпидемии холеры на Гаити *V. cholerae* демонстрируют высокую клональность по данным идентификации (*rstR*, VC2346), секвенирования (*ctxAB*, *tcpA*) отдельных локусов и PFGE на фоне разнообразия пульсотипов [260]. У данных гаитянских штаммов выявлены преобладающие *NotI*- и *SfiI*-паттерны рестрикции, ранее идентифицированные у выделенных от вернувшихся

путешественников из Индии штаммов *V. cholerae*. При анализе штаммов *V. cholerae* Эль Тор, обусловивших осложнения на Дальнем Востоке России (1999 г.), установлена вариабельность изолятов из гг. Владивосток и Южно-Сахалинск [32]. При кластерном анализе изоляты формируют отдельные группы по структуре паттернов рестрикции, с незначительными различиями внутри групп.

Кроме этого, с использованием PFGE-типирования показана взаимосвязь изолятов холерного вибриона, выделенных от больных холерой, контактных и из образцов питьевой воды в Бангладеш, что подчеркивает значимость водного пути передачи возбудителя холеры на эндемичных территориях и необходимость доступа к чистой питьевой воде [230, 232].

В исследовании *V. cholerae* O139 и не O1/O139 серогрупп PFGE-типирование также характеризуется эффективностью [160, 284]. Кроме того, комплексное исследование ругозных и морщинистых вариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор сероварианта Огава, изолированных во время вспышки в штате Хидерабаб в Индии, показало, что по результатам PFGE с использованием *NotI* рестриктазы данные варианты дифференцировались по двум кладам А и В с идентичностью между штаммами в 90 %, свидетельствующей об их клональности [112].

В отличие от выше представленных методов, мультилокусное сиквенс-типирование MLST (multilocus sequencing typing), ввиду анализа консервативных генов «домашнего хозяйства» холерного вибриона, преимущественно применяется для выяснения эволюционных связей патогена, клональной структуры.

В настоящее время существуют различные схемы MLST, одной из наиболее распространенных является предложенная Р. Garg с соавт. [133] схема, включающая анализ генов *dnaE* (альфа субъединица ДНК-полимеразы III), *lap* (лейцин аминопептидаза), *recA* (рекомбиназа А), *pgm* (фосфоглюкозомутаза), *gyrB* (субъединица В ДНК-гиразы), *cat* (каталаза), *chi* (хитиназа), *rstA* и *gmd* (GDP-манноза 4,6-дегидратаза). С применением данной схемы установлена дифференциация выделенных в период эпидемиологического благополучия в Сибири и на Дальнем Востоке нетоксигенных штаммов холерного вибриона на девять сиквенс-типов с кластеризацией по принадлежности к серогруппе [12]. Определено филогенетическое родство пандемичных и предпандемичных штаммов холерного вибриона, выделенных в Египте

(1910 г.), Индонезии (1937 г.), Пакистане (1958 г.), Индии (1963 г.), Туркмении (1972 г.) и России (1970, 1998, 2004, 2005 гг.) [59].

При исследовании выделенных в Мозамбике 40 штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор сероварианта Огава, несущих в геноме характерный для классического биовара СТХ фаг, установлена принадлежность исследуемых штаммов к одному сиквенс-типу [179]. Мозамбикские штаммы были более тесно связаны с *V. cholerae* O1 Эль Тор, нежели с *V. cholerae* классического биовара и O139 серогруппы. Кроме этого, учеными выявлены новые аллели генов *chi*, *recA* у штаммов классического биовара, гена *rstA* – у вибриона классического биовара и O139 серогруппы. Показана высокая дискриминирующая способность MLST по трем генам *gyrB*, *pgm*, *recA* в сравнении с PFGE при типировании 22 штаммов *V. cholerae*, представленных O1, O139 и не O1/O139 серогруппами [174]. Однако в отношении токсигенных штаммов холерного вибриона MLST по дискриминирующей способности уступает PFGE-типированию, что объясняется исследованием структуры консервативных коровых генов в сиквенс-типировании, в то время как PFGE позволяет анализировать весь геном [286].

На основании применения другой схемы MLST по семи генам (*adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *pyrM*, *pyrA*) установлена принадлежность 65 клинических изолятов, выделенных с 2005 по 2014 г. в Китае (провинция Чжэцзян) в большинстве случаев к сиквенс-типу ST75 [188]. Также выявлены сиквенс-типы ST69, 173, 176, 165, 169, 166, 171, 180 и другие, в т.ч. ранее не обнаруживаемые ST258-ST266.

По результатам секвенирования генов «домашнего хозяйства» *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы показана высокая гетерогенность вибрионов, выделенных от больных и из объектов окружающей среды в Бангладеш с 1998 г. по 2001 г. [217], из поверхностных водоемов Китая с 2001 г. по 2010 г. [181].

S. Anandan с соавт. [86] при MLST выделенных в 1994-2005 гг. штаммов холерного вибриона O139 серогруппы установили их принадлежность к сиквенс-типу ST69, выявляемому у изолятов седьмой пандемии.

Наряду с классической схемой MLST по генам «домашнего хозяйства», было разработано мультивирулентное сиквенс-типирование (MVLST, multi-virulence locus sequencing typing), основанное на анализе основных генов патогенности *ctxAB*, *tcpA*, *tcpI* и ассоциированных с патогенностью генов *hlyA*, *toxR*, *rtxA* [258]. Поскольку MVLST позволяет дифференцировать токсигенные и нетоксигенные штаммы, этот подход

позиционирован как наиболее эффективный по сравнению с классической схемой MLST [258].

Определение нуклеотидной последовательности генома возбудителя холеры и SNP-типирование нашли применение для установления путей эволюции холерного вибриона, анализа популяционного разнообразия и филогенетического родства различных групп штаммов, их особенностей [206]. Отечественными учеными полногеномное секвенирование холерного вибриона и сравнительный анализ полученных данных использован при исследовании штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных в период вспышки в г. Мариуполь (2011 г.) [70] и заносных *V. cholerae* O1 Эль Тор в гг. Иркутск (1997 г.) [90], Москва (2010, 2014 гг.) [70, 250]. По результатам сравнительного анализа данных полногеномного секвенирования токсигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных от больных в г. Мариуполь (2011 г.) и из воды Азовского моря в Ростовской области, установлены различия генетической структуры исследуемых изолятов и не подтверждено их филогенетическое родство [175].

На основании анализа данных полногеномного секвенирования выделенных в 1910-2004 гг. из различных источников 23 штаммов *V. cholerae* предположено, что переход от шестой к седьмой пандемии холеры связан со «сдвигом» между принадлежащими к разным филогенетическим линиям патогенными вариантами *V. cholerae* O1, а эволюционные преобразования (в частности, формирование гибридных вариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор) обусловлены "дрейфом" мобильных генетических элементов (МГЭ) посредством горизонтального переноса [114]. Установлено, что глобальное распространение возбудителя холеры текущей VII пандемии носило волнообразный характер как минимум в трех независимых перекрывающихся направлениях с общим предком [205]. Возможные направления интродукции возбудителя холеры по данным полногеномного секвенирования установлены в западную и юго-восточную части Африканского континента, в страны Америки [122, 244, 273]. Так, филогенетический анализ токсигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных во время эпидемии холеры в Республике Гаити и в Доминиканской Республике, показал их родство с южно-азиатскими штаммами VII пандемии холеры [244]. По результатам анализа геномов не подтвержден занос из Африки, как предполагалось ранее, штаммов *V. cholerae*, вызвавших эпидемические

осложнения в Мексике в период с 1991 г. по 2008 г. [103]. Помимо использования WGS в целях анализа глобального распространения возбудителя холеры, метод применим для исследования локальных популяций *V. cholerae*, циркулирующих в определенных регионах [137, 164, 249]. Полногеномное секвенирование позволило идентифицировать два клона *V. cholerae*, выделенные в период вспышки в штате Чандigarх на севере Индии, сходные по структуре с ICEVchHai1 и отличающиеся по составу СТХ фага и острова пандемичности VSP-2 [137]. Нередко полногеномное секвенирование используют в комплексе с другими молекулярно-генетическими методами, что позволяет более полно охарактеризовать исследуемые штаммы и сравнить полученные различными методами данные типирования [134, 136, 220, 235]. Так, анализ результатов полногеномного секвенирования штаммов *V. cholerae*, выделенных в Китае и характеризующихся по MLST сиквенс-типом ST75, позволил выявить дистанцированные филогенетические линии ST75a и ST75b [188]. Актуальным направлением полногеномного секвенирования служит анализ детерминант и механизмов антибиотикорезистентности холерного вибриона [229, 269].

### **3.2 Молекулярно-генетические методы типирования парагемолитического вибриона**

Основные направления использования вышеперечисленных молекулярно-генетических методов в исследовании холерного вибриона применимы и к парагемолитическому вибриону.

Широкое применение в молекулярном типировании *V. parahaemolyticus* также нашел мультилокусный анализ переменных тандемных повторов. Схема типирования вибриона по локусам переменных тандемных повторов была предложена В. Kimura с соавт. [168] и основывается на анализе восьми локусов (VPTR1-VPTR8), расположенных на обеих хромосомах штамма *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633. Авторами была продемонстрирована высокая дискриминирующая способность метода по отдельным локусам при анализе штаммов парагемолитического вибриона, выделенных как из клинического материала в период вспышек гастроэнтерита в Японии с 1996 г. по 2003 г., так и из объектов окружающей среды. В последующем, предложенная В. Kimura с соавторами схема была модифицирована внедрением капиллярного электрофореза для определения размера ампликона и расширением

спектра локусов тандемных повторов [151]. Использование набора из десяти VNTR-локусов позволило среди 81 штамма парагемолитического вибриона выявить 59 групп с высокой дифференциацией штаммов внутри данных групп. Индекс аллельного разнообразия локусов варьировал от 0,534 (VPTR7) до 0,949 (VP2-07), что свидетельствует о высокой дискриминирующей способности метода. Кроме того, MLVA был успешно адаптирован к так называемой технологии высокоразрешающего плавления (HRM, High Resolution Melting), применяемой для выявления геномных вариаций [187]. HRM-MLVA обладает дифференцирующей способностью в отношении изолятов парагемолитического вибриона, входящих в один PFGE-кластер и имеющих одинаковый сиквенс-тип, а сочетание совокупности методов (PFGE, MLST и HRM-MLVA) характеризуется эффективностью для субпопуляционного типирования патогена [187].

Перспективность использования метода в оперативном эпидемиологическом анализе продемонстрирована М. Jiang с соавт. [161] на основании сопоставления результатов генотипирования штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из клинического материала и предполагаемого фактора передачи. Кроме этого, установлена эффективность MLVA в отношении не серотипируемых парагемолитических вибрионов O1:KUT, что позволяет использовать его в эпидемиологическом расследовании спорадических и групповых случаев гастроэнтерита, вызванных данной группой *V. parahaemolyticus* [228].

Также показано, что метод MLVA является полезным инструментом для анализа клональной структуры *V. parahaemolyticus*, выделенных с различных территорий, на глобальном уровне. Было показано, что популяции *V. parahaemolyticus* из Азии, Перу и Чили при исследовании с использованием семи полиморфных локусов дифференцировалась на две генетически отдельные группы [87]. Одна из них была сформирована азиатскими и чилийскими штаммами, другая – чилийскими и перуанскими, что свидетельствует о постепенном распространении азиатских клонов вибриона в Чили с дальнейшим формированием отличающихся клонов, закрепившихся в Перу.

PFGE-типирование в отношении парагемолитического вибриона используется для анализа популяционной структуры микроорганизма, клональности, при отслеживании путей передачи возбудителя ПТИ при проведении эпидемиологического



надзора [119, 165, 194, 253, 271, 274]. Методика постановки PFGE-типирования *V. parahaemolyticus*, также как и *V. cholerae*, стандартизована протоколом PulseNet. Метод обладает высокой дискриминирующей способностью, о чем свидетельствует исследование 34 штаммов в PFGE, на основании которого были определены 31 *SfiI*-, 32 *NotI*-генируемые паттерны рестрикции [165]. Данной группой авторов было предложено использование ускоренной схемы гель-электролиза с применением фермента *NotI* для глубокой дифференциации штаммов, в то время как применение другого фермента – для первичного анализа, ввиду отсутствия возможности идентификации фрагментов рестрикции эндонуклеазой *SfiI*. Для выделенных в пределах одного региона штаммов *V. parahaemolyticus* по данным анализа характерно высокое генетическое разнообразие [253]. Что касается штаммов, выделенных с различных территорий, то J. Martinez-Urtaza с соавт. [194] показана дифференциация на кластеры штаммов в зависимости от места выделения. Рядом авторов установлена эффективность применения метода для выяснения родства штаммов, выделенных от человека и из объектов окружающей среды, включая продукты питания [119].

В отношении применения мультилокусного сиквенс-типирования в исследовании парегемолитического вибриона следует остановиться на основных направлениях использования метода. Согласно международной базе данных PubMLST схема мультилокусного сиквенс-типирования парегемолитического вибриона включает анализ семи мишеней – это гены *recA* (белок RecA), *dnaE* (альфа-субъединица ДНК-полимеразы III), *gyrB* (субъединица В ДНК-гиразы), *dtdS* (треонин-3-дегидрогеназа), *pntA* (альфа-субъединица трансгидрогеназы), *pyrC* (дигидрооротаза) и *tnaA* (триптофаназа) [140]. По результатам MLST штаммов парегемолитического вибриона высказана гипотеза о клональности группы пандемичных вариантов вибриона и их происхождении [99]. Ученые предположили, что первоначальные пандемичные парегемолитические вибрионы O3:K6 серогруппы произошли от непатогенных водных вибрионов в результате рекомбинационных событий путем приобретения генов и «островов патогенности». В свою очередь, рекомбинационные события между интродуцированными пандемичными изолятами и местными непандемичными *V. parahaemolyticus* на отдельных территориях способны привносить высокое генетическое разнообразие в сформировавшуюся популяцию [135]. Так, при MLST выделенных с различных территорий Азии, Европы, Южной Америки, США штаммов

*V. parahaemolyticus* (n=100) идентифицировано 62 сиквенс-типа, 50 из которых были представлены лишь одним штаммом, 12 – от двух до 22 штаммов [139]. На территории Китая популяция парагемолитического вибриона также характеризуется гетерогенностью, заключающейся в формировании 160 сиквенс-типов, независимо распределенных по трем регионам страны [183]. При этом водные штаммы вибриона были более гетерогенными, чем клинические. Выделенные в Шанхае клинические штаммы (n=42) были представлены 20 сиквенс-типами, доля впервые идентифицированных сиквенс-типов составила 80 %, что подтверждает данные о высокой генетической гетерогенности популяции *V. parahaemolyticus* [182]. На глобальном уровне четкой территориальной приуроченности сиквенс-типов штаммов парагемолитического вибриона, изолированных в Азии, Южной Америке и Европе, не выявлено. Наиболее распространенные аллели вибриона обнаруживались на всех континентах [265]. Однако в большинстве случаев в основе клональных комплексов пандемичных вариантов парагемолитического вибриона лежал сиквенс-тип ST3, распространенный среди *V. parahaemolyticus* во всем мире [99, 140, 142, 146, 147, 183, 197]. Кроме вышеуказанного сиквенс-типа, на отдельных территориях выявлены штаммы с ST36, ST8 (Западное и Восточное побережья США, Мэрилэнд, Испания), ST265 (Перу) [135, 144, 147].

Несмотря на генетическое разнообразие *V. parahaemolyticus*, выделенные от больных патогенные изоляты вибриона во многом демонстрируют клональность структуры [99]. Так, при исследовании структуры семи генов жизнеобеспечения *V. parahaemolyticus*, изолированных в Мексике в период 1998-2012 гг., показано высокое генетическое сходство патогенных вибрионов, преимущественно представленных O3:K6 серогруппой с маркером пандемичного клона *orf8*, и вариабельность выделенных на территории непандемичных штаммов [142]. Вызвавшие эпидемические осложнения в Перу в 2009 г. *V. parahaemolyticus* по результатам *in silico* MLST также характеризуются клональностью [141].

По структуре отдельных генов «домашнего хозяйства» показано, что высоким полиморфизмом исследуемых локусов характеризуются гены *recA*, *gyrB*, *dnaE* и *gnd* [108]. D. Nan с соавт. [147] рассматривают высокий уровень нуклеотидного разнообразия в гене *recA* как важный параметр, влияющий на распределение штаммов вибриона при проведении филогенетического анализа. При этом случайные мутации в

генах «домашнего хозяйства», эволюционно не закрепленные, представляют проблему при интерпретации результатов MLST [159, 263].

Поэтому для детального филогенетического анализа целесообразно использование других подходов к молекулярно-генетическому типированию. Более полная информация о штамме содержится в данных секвенирования полного генома [159, 263, 264]. Кластерный анализ результатов сиквенс-типирования и полногеномного секвенирования 43 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в США и Канаде, показал различия в топологии филогенетических деревьев, полученных по данным двух методов с более высокой дискриминирующей способностью WGS [159]. Было установлено, что имеющие сиквенс-тип ST36 девять штаммов идентичны между собой по данным MLST, в то время как на филогенетическом древе по результатам полногеномного секвенирования они отличаются друг от друга, но близкородственные.

Применение WGS другими учеными также позволило дифференцировать штаммы, имеющие один и тот же сиквенс-тип (ST36 и ST3) [159]. Аналогичная ситуация складывается и при использовании опирающегося на данные полногеномного секвенирования cgMLST по анализу 2254 генетических локусов парагемолитического вибриона [139].

Возможность выявления небольших геномных изменений SNP-типированием продемонстрирована N. Petronella с соавт. [224] при исследовании 13 культур возбудителей кишечных инфекций (в т.ч. парагемолитического вибриона) после длительного серийного субкультивирования.

При сравнительном анализе геномов клинических и водных штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в штате Мэрилэнд (США) в 2012-2013 гг. и ранее (1988-2004 гг.), а также из базы GenBank (1988-2010 гг.), установлено генетическое разнообразие штаммов, вызвавших локальные вспышки в регионе, но отличающиеся по структуре генома от штаммов из других мест, нуклеотидные последовательности которых представлены в GenBank [145].

В целом, в настоящее время существует значительное разнообразие молекулярно-генетических методов типирования возбудителей кишечных инфекций, в т.ч. *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, в эпидемиологических и микробиологических исследованиях. Применение различных подходов к типированию должно определяться

исходя из поставленной цели исследования и дополнять данные эпидемиологического анализа.

Таким образом, патогенные для человека микроорганизмы рода *Vibrio*, в частности *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus*, характеризуются сложной организацией геномов, полидетерминантным характером патогенности и способностью к существованию в различных экологических нишах. Следовательно, оценка генетического разнообразия микроорганизмов рода *Vibrio*, разработка и использование методов молекулярно-генетического типирования данных патогенов необходимы для совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и инфекциями, обусловленными параземолитическим вибрионом.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Материал

#### 2.1.1 Информационные данные

Для анализа ситуации по холере в Приморском крае, в т.ч. для оценки риска завоза холеры из зарубежных стран и выявления закономерностей обнаружения холерного вибриона в поверхностных водоемах использованы: отчетные данные Управления Роспотребнадзора по Приморскому краю о международных транспортных связях (2015-2021 гг.), сводные данные по заболеваемости холерой ВОЗ, Референс-центра по мониторингу за холерой на территории РФ (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора), данные справочно-эпидемиологических изданий, результаты микробиологического мониторинга поверхностных водоемов Приморского края, проводимых ФКУЗ «Приморская противочумная станция» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае» (2011-2021 гг.).

Анализ заболеваемости пищевыми токсикоинфекциями (ПТИ), обусловленными параземолитическим вибрионом, в Приморском крае осуществлялся на основании данных государственной статистической отчетности по форме № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (1997-2021 гг.).

Для анализа закономерностей циркуляции параземолитического вибриона в поверхностных водоемах Приморского края были использованы данные мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов.

Ретроспективный анализ фенотипических свойств штаммов холерного вибриона, выделенных из клинического материала и поверхностных водоемов при различных эпидемиологических ситуациях (1976-2017 гг.), проводился на основании журналов изучения культур *V. cholerae*, поступивших на идентификацию.

#### 2.1.2 Бактериальные штаммы

Штаммы *V. cholerae*. В работе использовано 142 штамма *V. cholerae*, выделенных в период с 1976 г. по 2017 г. при различных эпидемиологических ситуациях в Приморском крае (таблица 1). Из этих штаммов 109 – *V. cholerae* Эль Тор О1 серогруппы (17 выделены из клинического материала, 10 – из поверхностных водоемов и сточных вод в период вспышки в г. Владивостоке в 1999 г., 82 – из поверхностных водоемов в период эпидемиологического благополучия с 1976 г. по 2017 г.), 14 –

*V.cholerae* R-варианта и 19 *V.cholerae* не O1/O139 серогруппы, выделенные из поверхностных водоемов с 1976 г. по 2012 г.

Таблица 1 – Перечень исследованных штаммов холерного вибриона

Группы штаммов <i>V. cholerae</i>	Количество штаммов	Эпидобстановка	Вид исследования		
			фенотипические свойства	молекулярно-генетические свойства	MLVA-типирование
<i>V. cholerae</i> Эль Тор	n=27	Эпидосложнение	n=27	n=27	n=27
	n=82	Эпидблагополучие	n=82	n=82	n=82
<i>V. cholerae</i> R-вариант	n=14	Эпидблагополучие	n=14	n=14	n=14
<i>V. cholerae</i> не O1/O139	n=19	Эпидблагополучие	n=19*	n=19	n=19

Примечание: \* - идентификация по результатам MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа и слайд-агглютинации с холерными диагностическими сыворотками

В эксперимент по исследованию стабильности MLVA-генотипа холерного вибриона включено четыре штамма *V. cholerae* O1 серогруппы, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока при разных эпидемиологических ситуациях: эпидемически значимые (генотип  $ctx^+tcpA^+$ ) – *V. cholerae* И-441, И-1300, И-1310, эпидемически незначимые (генотип  $ctx^-tcpA^-$ ) – И-1462.

Штаммы *V. parahaemolyticus*. Всего исследовано 120 штаммов *V. parahaemolyticus* (таблица 2).

Таблица 2 – Перечень исследованных штаммов парагемолитического вибриона

Группы штаммов <i>V. parahaemolyticus</i>	Количество штаммов	Вид исследования			
		фенотипические свойства	молекулярно-генетические свойства**	MLVA-типирование	<i>in silico</i> MLST
клинические штаммы	n=17	n=17	n=17 / 10***	n=17	10
штаммы из поверхностных водоемов	n=103	n=38 n=65*	n=63 / 10***	n=63	10

Примечание: \* - идентификация по результатам MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа, \*\* - ПЦР анализ на наличие гена основного фактора патогенности *tdh*, \*\*\* - из них проанализировано на наличие характерных для пандемических клонов *V. parahaemolyticus* последовательностей *toxRS* и *orf8*, на наличие «островов патогенности» (по результатам полногеномного секвенирования)

В качестве референсных и контрольных штаммов использованы *V. cholerae* O1 Эль Тор М-878, *V. cholerae* O139 И-13, *V. cholerae* O1 Classical 569В, *V. parahaemolyticus* ATCC17802, *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633.

### 2.1.3 Препараты

Питательные среды для культивирования и идентификации холерного и параземолитического вибриона: 1 % пептонная вода без добавления и с добавлением 3 % NaCl, щелочной казеиново-дрожжевой агар, среды Гисса без добавления и с добавлением 3 % NaCl, среда Вагацума.

Выделение бактериальной ДНК для ПЦР анализа осуществлялось с помощью коммерческого набора «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва) согласно инструкции производителя.

Для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) использовался набор реагентов для проведения ПЦР-РВ (Синтол, Москва). Также применялся набор реагентов для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, г. Москва).

Нуклеотидные последовательности праймеров для детекции основных и дополнительных детерминант патогенности, пандемичности и персистенции холерного вибриона *ctxAB*, *tcpA*, *toxR*, *wbO1*, *wbO139*, *hapA*, *rtxA*, *rtxC*, *ompU*, *tnpO183*, *proO490*, *mshA*, *mshQ*, *vpsR* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Праймеры, используемые для детекции специфических фрагментов генов холерного вибриона

Ген	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')	Размер ампликона	Литературный источник
1	2	3	4	5
<i>ctxAB</i>	P1	TGAAATAAAGCAGTCAGGTG	777	[172]
	P3	GGTATTCTGCACACAAATCAG		
<i>tcpA</i>	TcpEa	GAAGAAGTTTGTAAGAAGAACAC	471	[6]
	TcpEb	GAAAGGACCTTCTTTCACGTTG		
<i>toxR</i>	OL1	TCGGATTAGGACACAАСТС	560	[91]
	OL2	CTGCGAGGGGAAGTAAGAC		

## Продолжение таблицы 3

<i>wbO1</i>	O1F	GTTTCACTGAACAGATGG G	192	[153]
	O1R	GGTCATCTGTAAGTACAA C		
<i>wbO139</i>	O139F	AGCCTCTTTATTACGGGTGG	449	
	O139R	GTCAAACCCGATCGTAAAGG		
<i>hapA</i>	hapA1	TCAACTACAACACCGCAGAC	270	[69]
	hapA2	GACGACAATCCCAAGAAGAG		
<i>rtxA</i>	rtxA F	CTGAATATGAGTGGGTGACTTACG	417	[111]
	rtxA R	GTGTATTGTTTCGATATCCGCTACG		
<i>rtxC</i>	rtxC F	CGACGAAGATCATTGACGAC	263	
	rtxC R	CATCGTCGTTATGTGGTTGC		
<i>ompU</i>	omp1	ACGCTGACGGAATCAACCAAAG	869	[248]
	omp2	GCGGAAGTTTGGCTTGAAGTAG		
<i>tnpO183</i>	tnp0183-1	TGCCCCATCCATCCCATA	781	[58]
	tnp0183-2	CAAGAAGCGGAGAGATCGC		
<i>pro0490</i>	pro0490-1	GCTTTATTCCATTGCGCCA	746	[58]
	pro0490-2	TCGCTTGGCTTCAGAGATGA		
<i>mshA</i>	msh39	ATGAAAAGACAAGGTGGTTTCACCC	450	[163]
	msh40	AATTATTGCGCTGGTTTACCACAAGC		
<i>mshQ</i>	mshQ1	ACGCTAGTGGGATTGGGATG	398	[261]
	mshQ2	GCATAAAGTTGTACAGTCCC		
<i>vpsR</i>	vpsR1	GGGGAATCTATGCCTATGAAG	351	[281]
	vpsR2	CGTCTCCACAGTCCCTTCTTG		

Для детекции гена основного фактора патогенности параземолитического вибриона *tdh* использованы праймеры, представленные в таблице 4.

Таблица 4 – Праймеры, используемые для детекции специфического фрагмента гена параземолитического вибриона

Ген	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')	Размер ампликона	Литературный источник
<i>tdh</i>	tdh_F	ССАСТАССАСТСТСАТАТGC	270	[65]
	tdh_R	GGТАСТАААТGGCTGACATC		

Для детекции полиморфных локусов варибельных тандемных повторов холерного и параземолитического вибрионов использованы олигонуклеотидные праймеры, представленные в таблице 5.



Таблица 5 – Праймеры для детекции локусов варибельных тандемных повторов холерного и параземолитического вибрионов

Исследуемый локус	Флуоресцентная метка	Праймер	Последовательность праймера (5'–3')
Для холерного вибриона (Водопьянов С.О. с соавт. [3])			
VcA (VCA0171)	FAM	VcA F	TCTTCTTGCGCTTCTTGACC
		VcA R	TCATCAAGATGCACGACACA
VcB (VCA0283)	R6G	VcB F	GCCTCCTCAGAAGTTGAGAATC
		VcB R	CCGATGAACTCTCTGAACTGG
VcC (VC0147)	TAMRA	VcC F	CGGAAACTGCGTTAACAGAAA
		VcC R	CTTTAAGCGCGCAAAGAAAC
VcD (VC0437)	ROX	VcD F	ATTTAA AAGCCCTGCCGTTTGG
		VcD R	GAACGTAGATCCCAGAAAACAATC
VcG (VC1650)	TAMRA	VcG F	AATTACTGGGTGAACGCTATAACA
		VcG R	CTAACTGAGTGACCGCATTGG
Для параземолитического вибриона (B. Kimura с соавт. [168], E. Harth-Chu с соавт. [151])			
VPTR1	FAM	VPTR1 F	TAACAACGCAAGCTTGCAACG
		VPTR1 R	TAACAACGCAAGCTTGCAACG
VP2-07	FAM	VP2-07 F	TGATTTTGAAGCAGCGAAGA
		VP2-07 R	TGATTTTGAAGCAGCGAAGA
VPTR3	R6G	VPTR3 F	CGCCAGTAATTCTGACTCATGC
		VPTR3 R	CGCCAGTAATTCTGACTCATGC
VPTR4	ROX	VPTR4 F	AAACGTCTCGACATCTGGATCA
		VPTR4 R	AAACGTCTCGACATCTGGATCA
VPTR5	R6G	VPTR5 F	GCTGGATTGCTGCGAGTAAGA
		VPTR5 R	GCTGGATTGCTGCGAGTAAGA
VPTR6	R6G	VPTR6 F	TGTCGATGGTGTTCTGTTCCA
		VPTR6 R	TGTCGATGGTGTTCTGTTCCA
VPTR8	FAM	VPTR8 F	ACATCGGCAATGAGCAGTTG
		VPTR8 R	ACATCGGCAATGAGCAGTTG

Для амплификации отдельных генов и локусов варибельных тандемных повторов холерного и параземолитического вибрионов использован универсальный набор для амплификации ДНК производства ЗАО «Синтол» (г. Москва).

Сравнение фрагмента, содержащего локусы варибельных тандемных повторов, осуществлялось с использованием маркера молекулярного веса GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard в программном приложении GeneMapper 4.0.

Для электрофореза использованы следующие реактивы: агароза («Медиген»), этилендиаминтетрацетат («Медиген»), борная кислота («Helicon»), трис(гидроксиметил)аминометан («Helicon»), бромистый этидий («Sigma»).

Для полногеномного секвенирования *V. parahaemolyticus* выделение ДНК осуществлялось набором «DneasyBlood&TissueKit» (Qiagen). При проведении полногеномного секвенирования использованы наборы реагентов для платформы MiSeq (Illumina) – MiSeq Reagent Kit v3 и DNA Prep Kit, для MinION (Oxford Nanopore Technologies) – проточная ячейка Flow Cell (R9.4.1) и Ligation Sequencing Kit (SQK-LSK109).

## **2.2 Методы исследования**

### **2.2.1 Ретроспективный анализ**

В рамках анализа риска завоза холеры на территорию РФ осуществлена оценка миграционных процессов по отдельным видам транспорта в международных пунктах пропуска через государственную границу на территории Приморского края с определением структуры стран, вовлеченных в миграционный процесс. Анализ проявлений холеры в зарубежных странах осуществлялся по официальным данным ВОЗ, Референс-центра по мониторингу за холерой на территории РФ (ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора), справочно-эпидемиологических изданий.

В отношении парагемолитического вибриона осуществлен ретроспективный анализ заболеваемости пищевыми токсикоинфекциями, обусловленными галофильными вибрионами (1997-2021 гг.), охарактеризована этиологическая структура выявленных случаев заболевания, вызванных галофильными вибрионами, оценены территории, факторы и время риска.

### **2.2.2 Бактериологический метод**

Бактериологическое исследование штаммов холерного и парагемолитического вибрионов осуществлялось в соответствии с МУК 1.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [29], МУК 4.2.1793-03 «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых парагемолитическим и другими патогенными для человека вибрионами» [28].

### **2.2.3 Молекулярно-генетические методы**

Подготовка проб для ПЦР проводилась в соответствии с МУК 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых

кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности» [30].

Выделение бактериальной ДНК для ПЦР анализа осуществлялось с помощью коммерческого набора «Рибо-Преп» согласно инструкции производителя. Контроль выделения ДНК проводился электрофоретически в 0,9 % агарозном геле на 1xTBE-буфере.

Концентрация полученной геномной ДНК устанавливалась спектрофотометрически на приборе NanoVue Spectrophotometer (GE Health Care, США). Рабочая концентрация ДНК 10 нг/мкл использовалась для постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР) и мультилокусного анализа варибельных тандемных повторов (MLVA).

### 2.2.3.1 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

Оценка эпидемической значимости штаммов холерного вибриона осуществлялась двумя способами: с использованием коммерческого набора для выявления ДНК *Vibrio cholerae* и идентификации патогенных штаммов *Vibrio cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» и путем детекции в мультиплексной ПЦР фрагментов генов *ctxAB*, *tcpA* и *toxR* с последующим анализом наработанных фрагментов ДНК в электрофорезе. Для постановки ПЦР с электрофоретическим учетом результатов реакционная смесь содержала: 10xПЦР буфер – 2,5 мкл; 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл; смесь 2,5 mM дНТФ – 2,5 мкл; праймеры на выявление генов *ctxAB*, *tcpA*, *toxR* – по 10 пкмоль; Taq-полимераза – 0,6 Ед./мкл; исследуемая проба ДНК – 10 нг/мкл; деионизованная вода – 15 мкл.

Определение принадлежности штаммов к O1 и O139 серогруппам осуществлялось также двумя способами: с использованием вышеуказанного коммерческого набора «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» и в мультиплексной ПЦР. Реакционная смесь для постановки ПЦР в последнем случае содержала: 10xПЦР буфер – 2,5 мкл; 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл; смесь 2,5 mM дНТФ – 2,5 мкл; праймеры на выявление генов *wbO1*, *wbO139* – по 10 пкмоль; Taq-полимераза – 0,6 Ед./мкл; исследуемая проба ДНК – 10 нг/мкл; деионизованная вода – 15 мкл.

На следующем этапе осуществлялось определение генов, детерминирующих дополнительные факторы патогенности, пандемичности и персистенции. Наличие у

тестируемых штаммов *V. cholerae* генетических элементов *tnpO183*, *proO490*, входящих в состав «островов пандемичности» VSP-1 и VSP-2; генов *mshA*, *mshQ*, *vpsR* локализованных на «острове персистенции» EPI, а также генов *hapA*, *ompU* определялось с помощью ПЦР с одной парой праймеров. Гены *rtxA*, *rtxC*, образующие единый кластер, определены в мультиплексной ПЦР.

Реакционная смесь для выявления вышеуказанных генов содержала 10хПЦР буфер – 2,5 мкл; 25 mM MgCl<sub>2</sub> – 2,5 мкл; смесь 2,5 mM дНТФ – 2,5 мкл; Taq-полимераза – 0,6 Ед./мкл; праймеры к соответствующим генам в концентрации 10 пмоль на реакцию; исследуемая проба ДНК – 10 нг/мкл; деионизованная вода – до 25 мкл. Амплификация участков генов осуществлялась в амплификаторе «Герцик» или в термоциклере С1000 («BioRad», США) по программам, представленным в таблице 6.

Амплификация гена прямого термостабильного гемолизина (*tdh*) *V. parahemolyticus* осуществлялась по программе: стартовая денатурация 94 °С – 3 мин; денатурация 94 °С – 20 сек, отжиг праймеров 55 °С – 20 сек, элонгация 72 °С – 20 сек; заключительная элонгация 72 °С – 3 мин.

Учет результатов амплификации по всем перечисленным генам холерного и параземолитического вибрионов осуществлялся посредством электрофореза в 1,5 % агарозном геле на 1хТВЕ (трис-боратном электрофорезном буфере) в присутствии бромистого этидия с последующим видеодокументированием с использованием компьютерной программы «Gel Imager». Размер амплифицированных фрагментов идентифицировался в сравнении с положительным контролем и с маркером молекулярной массы Gene Ruler 100-1000 п.н. («Fermentas»).

Таблица 6 – Программы амплификации для детекции основных и дополнительных генов патогенности, пандемичности и персистенции холерного вибриона

Ген	Параметры амплификации			
	Стартовая денатурация	Денатурация Отжиг праймеров Элонгация	Количество циклов	Заключительная элонгация
<i>ctxAB</i> , <i>tcpA</i> <i>toxR</i>	94 °С – 2 мин.	94 °С – 45 сек. 57 °С – 45 сек. 72 °С – 55 сек.	35	72 °С – 2 мин.
<i>wbO1</i> , <i>wbO139</i>	–	94 °С – 1 мин. 55 °С – 1 мин. 72 °С – 1 мин.	30	–

## Продолжение таблицы 6

<i>hapA</i>	–	94 °С – 30 сек. 67 °С – 30 сек. 72 °С – 20 сек.	35	–
<i>rtxA, rtxC</i>	94 °С – 2 мин.	94 °С – 30 сек. 55 °С – 30 сек. 72 °С – 40 сек.	35	72 °С – 2 мин.
<i>ompU</i>	94 °С – 5 мин.	94 °С – 1 мин. 65 °С – 1 мин. 72 °С – 2 мин.	32	72 °С – 5 мин.
<i>tnpO183, proO490</i>	95 °С – 5 мин.	95 °С – 30 сек. 60,5 °С – 40 сек. 72 °С – 30 сек.	30	72 °С – 3 мин.
<i>mshA</i>	94 °С – 5 мин.	94 °С – 45 сек. 56 °С – 45 сек. 72 °С – 45 сек.	30	72 °С – 2 мин.
<i>mshQ</i>	–	94 °С – 45 сек. 56,6 °С – 45 сек. 72 °С – 45 сек.	32	–
<i>vpsR</i>	95 °С – 5 мин.	95 °С – 30 сек. 60,5 °С – 40 сек. 72 °С – 30 сек.	30	72 °С – 3 мин.

### 2.2.3.2 Мультилокусный анализ числа переменных tandemных повторов (MLVA)

MLVA-типирование штаммов холерного вибриона проводилось по пяти локусам tandemных повторов VcA, VcB, VcC, VcD, VcG [3]. Анализируемые повторы локализованы на обеих хромосомах холерного вибриона, размер повторов составляет от 6 до 9 п.н. с кратностью от 7 до 23, установленной для референсного штамма *V. cholerae* Эль Тор N16961.

Для типирования штаммов парагемолитического вибриона выбраны локусы Vptr1, Vp02-07, Vptr3, Vptr4, Vptr5, Vptr6, Vptr8, описанные В. Kimura с соавт. [168] и Е. Harth-Chu с соавт. [151]. Анализируемые повторы локализованы на обеих хромосомах *V. parahaemolyticus*, размер их составляет 6 п.н. с кратностью повтора от 3 до 31, установленной в настоящем исследовании посредством секвенирования для контрольного штамма *V. parahaemolyticus* ATCC 17802 (таблица 7).

На первом этапе осуществлялась амплификация локусов, содержащих исследуемые повторы штаммов холерного (VcA, VcB, VcC, VcD, VcG) и парагемолитического (Vptr1, Vp02-07, Vptr3, Vptr4, Vptr5, Vptr6, Vptr8) вибрионов. Для

этого проводилась ПЦР с использованием праймеров (таблица 5), меченных флуоресцентной краской (FAM, R6G, TAMRA или ROX) с дальнейшей детекцией продуктов амплификации в 1,5 % агарозном геле.

Таблица 7 – Количество повторов и размер ампликона по семи локусам варибельных tandemных повторов для маркерного штамма *V. parahaemolyticus* ATCC 17802

Локус	Последовательность повтора	Количество повторов	Размер фрагмента, получаемого при капиллярном электрофорезе	Функции	Хромосома
VPTR1	АТАGAG	31	282	Гипотетический белок	1
VP2-07	AGCAAC	31	280	Гипотетический белок	2
VPTR3	АТСТGT	3	315	Предполагаемая коллагеназа	2
VPTR4	TGTGTC	7	230	Предполагаемый гемолизин	1
VPTR5	СТСААА	7	201	Некодирующий регион	1
VPTR6	GCTCTG	17	310	Консервативный гипотетический белок	1
VPTR8	СТТСТG	8	315	Белок деления клетки	1

Размер полученных ампликонов определялся методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония) с использованием приложения GeneMapper 4.0 путем сравнения с маркером молекулярного веса GeneScan™ 500 LIZ™ Size Standard. Анализ локусов осуществлялся по размеру амплифицированного фрагмента. Основываясь на размерах полученных ампликонов, рассчитано число повторов по специфичным для каждого патогена локусам. Число повторов рассчитывалось по нижеприведенной формуле, исходя из размера амплифицированного фрагмента, размера фланкирующей области повтора и числа нуклеотидов в повторе:

$$R = R_c + (M_x - M_c) / u ,$$

где  $R_c$  – число повторов маркерного контрольного штамма;  $M_x$  – размер ампликона исследуемого штамма;  $M_c$  – размер ампликона маркерного (контрольного штамма);  $u$  – число нуклеотидов в повторе.

### 2.2.3.3 Полногеномное секвенирование и *in silico* мультилокусное сиквенс-типирование (MLST)

Полногеномное секвенирование 20 изолятов *V. parahaemolyticus* осуществлялось на платформах MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore Technologies) в

соответствии со стандартными протоколами. Гибридные сборки полученных данных секвенирования с платформ выполнялись с помощью программы SPAdes v.3.11.1.

Результаты полногеномного секвенирования парагемолитического вибриона использованы как для поиска в исследуемых геномах специфичных для пандемичных вариантов вибриона последовательностей *toxRS* и *orf8*, отдельных детерминант T3SS1 (*vopQ*, *vopS*, *vopR*, *VPA0450*) и T3SS2 (*vopA*, *vopC*, *vopT*, *vopL*) систем секреции, MAM7, «открытых рамок считывания» (ORFs) семи «островов патогенности» *V. parahaemolyticus*, так и для поиска последовательностей генов «домашнего хозяйства» парагемолитического вибриона для проведения мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) *in silico*.

Поиск нуклеотидных последовательностей «открытых рамок считывания» в исследуемых изолятах осуществлялся в отношении только кодирующих фрагментов, определенных у референсного изолята *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 из базы GenBank (рисунок 3).

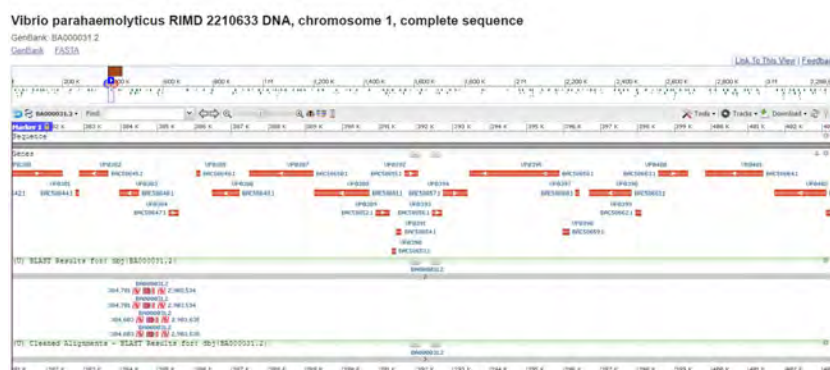


Рисунок 3 – Открытые рамки считывания *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633

Мультилокусное сиквенс-типирование *in silico* проводилось посредством поиска и анализа структуры в геномах исследуемых изолятов *V. parahaemolyticus* генов «домашнего хозяйства» *recA*, *dnaE*, *gyrB*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* и *tnaA*, предложенных N. Gonzalez-Escalona с соавт. [140] в качестве мишеней и представленных в международной базе PubMLST.

### 2.2.4 Экспериментальное исследование стабильности MLVA-генотипа

Экспериментальное исследование заключалось в культивировании холерного вибриона в забуференном физиологическом растворе (дефицит питательных веществ) и в воздействии низких 6 °С (1 серия эксперимента) и комнатных (20-22 °С) температур (2 серия эксперимента).

В первой серии эксперимента контрольные исследования (срезы) проводились на 12, 26, 54 и 82 сутки эксперимента (1-4 срезы). Исследованию также подвергались последние обнаруживаемые на питательных средах вегетативные клетки холерного вибриона. После прекращения роста штаммов в посевах из флаконов с забуференным физиологическим раствором осуществлялось центрифугирование их содержимого (6 тыс. об/мин) в течение 30 мин, осадок ресуспендировался в физиологическом растворе и был использован для выделения ДНК.

Во второй серии эксперимента посевы на плотные питательные среды из флаконов проводились один раз в 5-14 дней в течение первых двух месяцев, следующие семь месяцев – каждые 14-20 дней, далее – один раз в месяц. Контрольные исследования проводились на 12, 26, 54, 82, 110, 177, 237, 362, 518 сутки (1-9 срезы).

Выделенная ДНК штаммов *V. cholerae* по результатам контрольных срезов использовалась для MLVA-типирования.

### 2.3 Статистический и биоинформационный анализы

Статистический анализ результатов исследования осуществлялся посредством вычисления относительных величин, стандартной ошибки относительных показателей, сравнения выборок по методу Стьюдента для качественных выборок, линейного коэффициента корреляции Пирсона  $r_{xy}$  [16, 66].

Биоинформационный анализ результатов MLVA-типирования осуществлялся с применением программного комплекса Bionumerics v 6.01 («Applied Maths», Бельгия).

Дискриминирующая способность метода рассчитывалась по формуле Хантера-Гастона (HGDI):

$$HGDI = 1 - \left[ \frac{1}{N(N-1)} \sum_{j=1}^S n_j(n_j-1) \right],$$

где S – число групп, на которое данный метод разделяет выборку штаммов,  $n_j$  – число штаммов в j-й группе и N – общее число штаммов в выборке.



Для оценки variability локусов variability tandemных повторов использовался индекс аллельного полиморфизма ( $h$ ), который рассчитывается по формуле:

$$h = 1 - \sum x_i^2 [n / (n_i - 1)],$$

где  $x_i$  – частота встречаемости аллеля  $i$  в локусе, и  $n$  – число штаммов, имеющих аллельный вариант  $i$ .

Нуклеотидные последовательности *toxRS* в геномах исследуемых изолятов *V. parahaemolyticus* анализировались в программе Ugene (Unipro, Россия) для выявления специфичных замен, характерных для пандемичных вариантов параземолитического вибриона.

Идентификация аллелей генов «домашнего хозяйства» и определение сиквенс-типа изолятов проводились на основании информации, представленной на сетевом ресурсе PubMLST.org. Построение филогенетического древа по результатам идентифицированных аллелей и сиквенс-типов исследуемых изолятов *V. parahaemolyticus* проводилось в программе Phyloviz 1.1a.

### **ГЛАВА 3. АНАЛИЗ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ И ПИЩЕВЫМ ТОКСИКОИНФЕКЦИЯМ ГАЛОФИЛЬНОЙ ЭТИОЛОГИИ НА ТЕРРИТОРИИ ПРИМОРСКОГО КРАЯ**

#### **3.1 Оценка рисков завоза холеры на территорию Приморского края различными видами транспорта**

Приморский край – субъект Российской Федерации, входящий в состав Дальневосточного федерального округа, расположен в юго-восточной части страны. Площадь Приморского края составляет 164,7 тыс. км<sup>2</sup>, на западе край граничит с КНР, на юго-западе – с КНДР, на севере – с Хабаровским краем, на востоке омывается Японским морем. Административным центром является г. Владивосток, находящийся на полуострове Муравьева-Амурского в заливе Петра Великого.

Последнее эпидемическое осложнение по холере на территории Приморского края в виде острой вспышки зарегистрировано в г. Владивостоке в июле-августе 1999 г. и было ассоциировано с завозом инфекции из КНР, чему способствовала интенсификация миграции граждан КНР и России [54]. До начала вспышки было выявлено три завозных случая холеры в г. Уссурийск водителями, вернувшимися в Приморский край из г. Дунин (КНР) [54].

Факт регистрации завоза холеры, острых вспышек в регионе, нарастание международных торгово-экономических, туристических взаимосвязей с зарубежными странами требуют анализа внешних рисков завоза инфекции на территорию Приморского края на современном этапе.

Как известно, внешние риски развития осложнений эпидемиологического характера, как в целом по стране, так по отдельным субъектам, определяются, прежде всего, вероятностью завоза опасных инфекционных болезней на определенную территорию, что связано с развитием транспортной инфраструктуры и интенсивностью миграционных процессов. Ввиду географического расположения Приморского края, транспортные потоки в регионе имеют определенные особенности. Среди населения края активно развивается так называемый приграничный туризм, осуществляемый преимущественно наземными видами транспорта. Значимую роль в миграционных потоках также занимает авиационное сообщение, особенно со странами Азиатско-Тихоокеанского региона, а международный аэропорт Владивосток им. В. К. Арсеньева является одним из лидирующих по объему пассажиропотоков среди аэропортов

Дальнего Востока [60]. Кроме этого, непосредственный выход к морю способствует развитию на территории края судоходства, посредством которого осуществляется импорт и экспорт больших объемов грузов в зарубежные страны и в обратном направлении, пассажирские перевозки, рыбопромысловая деятельность. Все это способствует увеличению риска развития на территории осложнений эпидемиологической ситуации по болезням, требующим проведения мероприятий по санитарной охране территории.

В настоящее время на территории края действуют 17 пунктов пропуска через государственную границу: один – на воздушном транспорте (Международный аэропорт Владивосток им. В. К. Арсеньева), 8 – на морском (МПП «Владивосток», «Находка», «Восточный», «Зарубино», «Посъет», «Ольга», морские терминалы «Пластун» и «Славянка»), 5 – на автомобильном (АПП «Краскино», «Пограничный», «Полтавка», «Марково», «Турий Рог»), 3 – на железнодорожном (ЖДПП «Пограничный», «Хасан», «Махалино»).

В рамках оценки внешних эпидемиологических рисков завоза возбудителя холеры на территорию РФ через международные пункты пропуска Приморского края проведен анализ миграционных потоков, в т.ч. входящих транспортных средств (ТС) и интенсивности пассажиропотоков за период 2015-2021 гг.

Установлено, что за анализируемый период в Приморский край из-за рубежа прибыло 507 247 транспортных средств, из которых наибольший удельный вес составляет автомобильный транспорт ( $85,5 \pm 0,04$  %), на втором месте – водный ( $8,4 \pm 0,03$  %) и на третьем – воздушный ( $4,2 \pm 0,02$  %) (рисунок 4, таблица 8). Незначительный удельный вес входящих ТС ( $1,9 \pm 0,01$  %) установлен для железнодорожного транспорта.



Рисунок 4 – Удельный вес отдельных видов транспорта в структуре входящих миграционных потоков на территорию Приморского края (2015-2021 гг.)

Количество людей, прибывших за анализируемый семилетний период, превысило 8 млн человек ( $n=8\,319\,326$ ), половина из которых ( $49,8 \pm 0,01 \%$ ) прибыла автомобильным транспортом (рисунок 5).

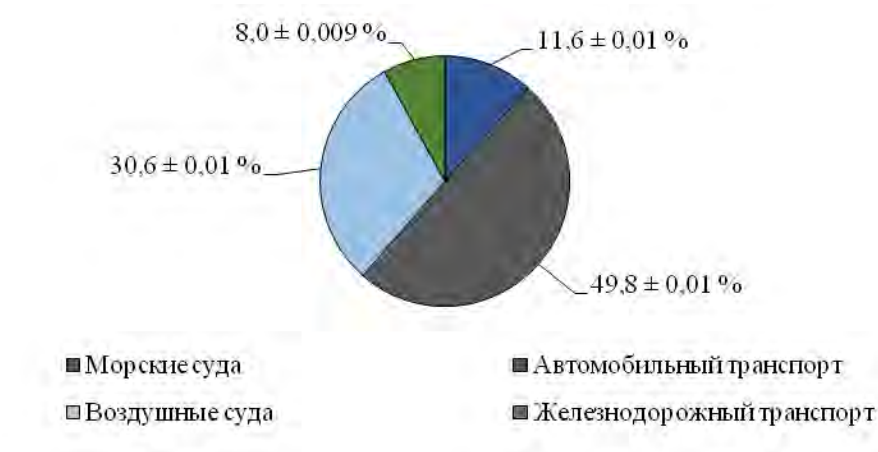


Рисунок 5 – Удельный вес прибывших из-за границы лиц разными видами транспорта на территорию Приморского края (2015-2021 гг.)

Несмотря на больший удельный вес водного транспорта в структуре входящих ТС ( $8,4 \pm 0,03 \%$ ) по сравнению с авиационным, с использованием последнего на территорию Приморского края прибыло в 2,6 раза больше человек, чем водным.

В динамике за анализируемый период наблюдается увеличение числа прибывающих транспортных средств и граждан, въезжающих на территорию края различными видами транспорта в период с 2015-2019 г. Так, в 2015 г. количество при-

Таблица 8 – Динамика прибывших из-за границы транспортных средств и граждан

Вид транспорта	Годы								ИТОГО абс. (% ± m <sub>p</sub> )
		2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	
Автомобильный	ТС (абс.)	58 921	65 583	68 909	78 861	84 223	38 187	39 046	433 730 (85,5±0,04)
	Количество человек (абс.)	552 273	749 333	837 283	854 492	996 448	113 817	41 191	4 144 837 (85,5±0,04)
Воздушный	ТС (абс.)	2 416	2 523	3 524	4 886	6 065	1 229	623	21 266 (4,2±0,02)
	Количество человек (абс.)	248 094	298 359	417 055	605 185	783 827	139 775	53 619	2 545 914 (30,6±0,01)
Морской*	ТС (абс.)	6 114	5 394	6 318	6 197	6 429	6 025	6 095	42 572 (8,4±0,03)
	Количество человек (абс.)	133 063	123 005	155 038	150 103	181 382	111 205	111 725	965 521 (11,6±0,01)
Железнодорожный	ТС (абс.)	450	439	451	449	2 071	3 071	2 748	9 679 (1,9±0,01)
	Количество человек (абс.)	164 272	138 112	107 086	94 096	132 131	20 749	6 608	663 054 (8,0±0,009)
ВСЕГО	ТС (абс.)	67 901	73 939	79 202	90 393	98 788	48 512	48 512	<b>507 247 (100 %)</b>
	Количество человек (абс.)	1 097 702	1 308 809	1 516 462	1 703 876	2 093 788	385 546	213 143	<b>8 319 326 (100 %)</b>

Примечание: \* - данные представлены по морским судам с заходом в иностранные морские порты

бывших в край ТС и лиц составляло 67 901 и 1 097 702, соответственно, то в 2019 г. количество ТС увеличилось в 1,4 раза ( $n=98\,788$ ), а количество прибывших лиц – в 1,9 раз ( $n=2\,093\,788$ ). Резкое снижение пассажиропотока произошло в 2020, 2021 гг., что связано с пандемией COVID-19 и введением ограничительных мероприятий (таблица 8).

### 3.1.1 Анализ миграционной активности, ассоциированной с автомобильным транспортом

Ведущее значение в структуре входящих из-за границы ТС и миграционных потоков в Приморский край, как уже было показано, принадлежит автомобильному транспорту. При анализе направлений миграции установлено, что все ТС прибыли из КНР ( $n=433\,730$ ), а количество лиц, пересекших государственную границу, составило больше 4 млн ( $n=4\,144\,837$ ).

При анализе интенсивности миграционных потоков из КНР показана их неравномерность по отдельным автомобильным пунктам пропуска через государственную границу. Так, максимальное количество лиц из КНР пересекло границу в АПП «Пограничный» ( $51,0 \pm 0,02\%$ ), находящемся в Хасанском районе, минимальное ( $1,6 \pm 0,006\%$ ) – в АПП «Марково» в Лесозаводском районе (рисунок 6).

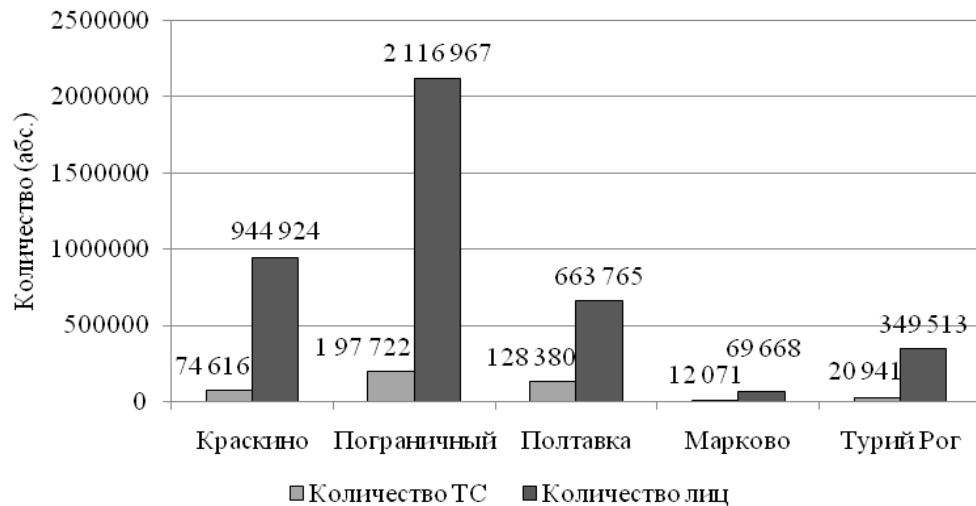


Рисунок 6 – Интенсивность транспортных потоков на территорию Приморского края в автомобильных пунктах пропуска

При поквартальном анализе миграционных потоков в АПП установлена относительно равномерная въездная проходимость ТС на протяжении анализируемого периода (рисунок 7). Однако, анализ пассажиропотоков позволил установить

статистически значимые максимальные уровни въездной активности ( $n=1\,339\,802$ ;  $32,3 \pm 0,02\%$ ) в июле-сентябре (III квартал) ( $t=266$ ,  $p \geq 95,5\%$ ) (рисунок 7).

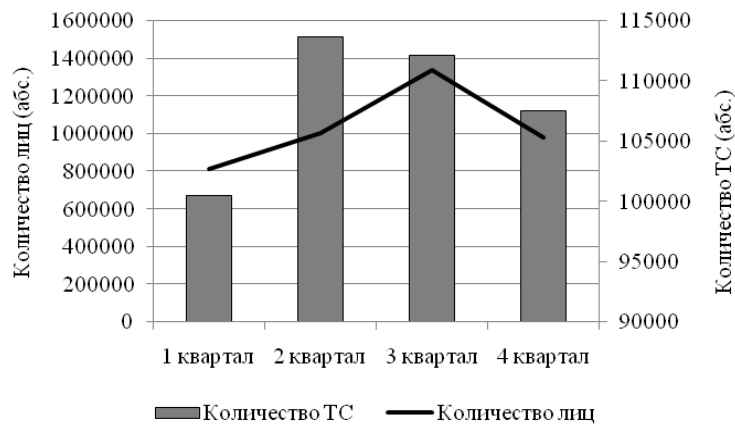
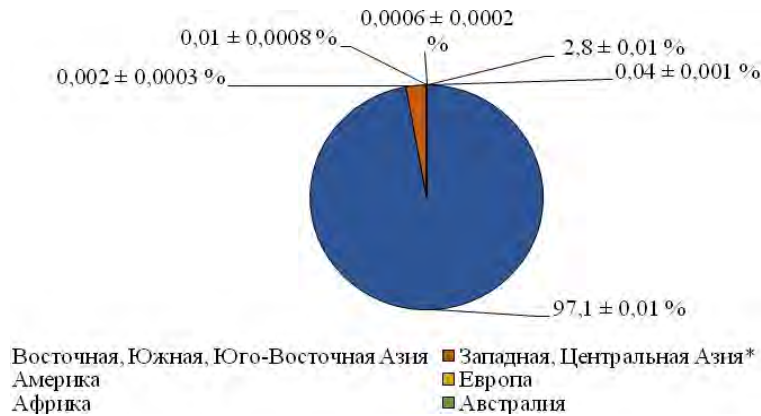


Рисунок 7 – Внутригодовая динамика миграционных потоков по автомобильному виду транспорта

### 3.1.2 Анализ миграционной активности, ассоциированной с авиационным транспортом

Значение авиационного транспорта в распространении инфекционных болезней, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территорий, продиктовано возможностью быстрого перемещения инфицированных лиц на дальние расстояния за относительно небольшой промежуток времени. Так, завозы холеры в РФ в 2010 г. и 2014 г. были ассоциированы с прибытием авиационным транспортом больных из Индии, являющейся эндемичной по холере страной [74].

Анализ авиационных потоков через международный аэропорт «Владивосток» им. В. К. Арсеньева, показал, что за 2015-2021 гг. въездной пассажиропоток на территорию Приморского края составил 2 545 914 человек, с доминирующим азиатским направлением (16 стран Южной, Восточной, Юго-Восточной Азии) (рисунок 8, таблица 9).



Примечание: \* - дополнительно Камбоджа, относящаяся к странам Юго-Восточной Азии

Рисунок 8 – Структура направлений въездного пассажиропотока авиационным транспортом в Приморский край (2015-2021 гг.)

Лидирующие позиции в данном направлении принадлежат Республике Корея ( $52,4 \pm 0,03$  %) и КНР ( $19,0 \pm 0,02$  %) (таблица 9). Согласно данным официального сайта международного аэропорта «Владивосток» по корейскому направлению – это города Сеул/Инчхон, Пусан, по китайскому – Пекин [60].

Таблица 9 – Структура въездного пассажиропотока авиационным транспортом в Приморский край (2015-2021 гг.)

№	Страна	Количество лиц, прибывших на территорию Приморского края воздушным транспортом (абс.)	Удельный вес (от общего количества прибывших граждан данным видом ТС), % ± m <sub>p</sub>
1	Республика Корея	1 333 967	52,4 ± 0,03
2	КНР	483 626	19,0 ± 0,02
3	Япония	202 396	7,9 ± 0,01
4	Таиланд	169 443	6,7 ± 0,01
5	Гонконг	116 646	4,6 ± 0,01
6	Вьетнам	93 330	3,8 ± 0,01
7	КНДР	72 109	2,8 ± 0,01
8	Филиппины	831	0,03 ± 0,001
9	Индия	355	0,01 ± 0,0007
10	Лаос	119	0,005 ± 0,0004
11	Монголия	74	0,003 ± 0,0003
12	Тайвань	58	0,002 ± 0,0003
13	Сингапур	33	0,001 ± 0,0002
14	Мальдивская Республика	25	0,001 ± 0,0002



## Продолжение таблицы 9

15	Малайзия	14	0,0005 ± 0,0001
16	Индонезия	8	0,0003 ± 0,0001
17	Всего из вышеуказанных стран	2 473 034	97,1 ± 0,01
18	Другие страны	72 880	2,9 ± 0,01
19	ВСЕГО	2 545 914	100

Из стран Европы за 2015-2021 гг. прибыло незначительное количество ТС (n=43) и пассажиров (n=390). Въездная миграционная активность в край выявлена из Австрии, Бельгии, Венгрии, Великобритании, Германии, Латвии, Норвегии, Нидерландов, Словакии, Черногории, Франции, Испании, Италии, Чехии и Швейцарии.

В отношении стран Американского континента установлено, что все воздушные суда прибыли из США в течение трехлетнего периода (2016, 2017, 2021 гг.) из семи анализируемых лет.

Анализ внутригодовой динамики въезда воздушных ТС и пассажиропотоков также показал неравномерные уровни активности с минимальными показателями в первом квартале и максимальными – в третьем (рисунок 9).

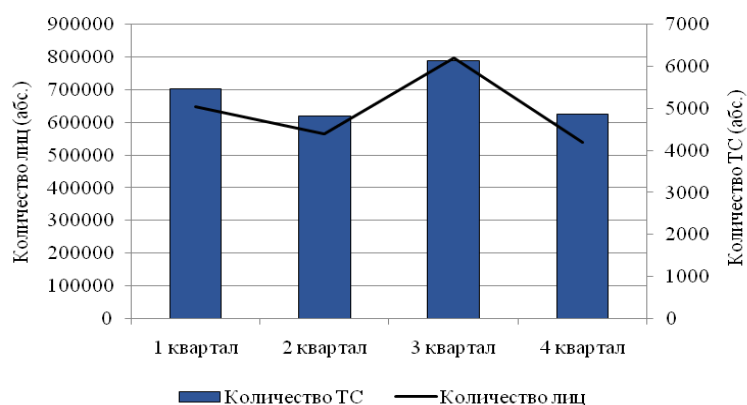


Рисунок 9 – Внутригодовая динамика миграционных потоков по воздушному транспорту

На первый квартал приходится  $25,4 \pm 0,02$  % от всех прибывших данным видом транспорта пассажиров, на второй –  $22,1 \pm 0,02$  %, на третий –  $31,3 \pm 0,03$  % и на четвертый –  $21,2 \pm 0,02$  %. Статистически значимых различий в пассажиропотоке по четырем кварталам не выявлено (3 и 1 квартал  $t=1,81$ ,  $p < 95$  %; 3 и 2 квартал  $t=1,79$ ,  $p < 95$  %; 3 и 4 квартал  $t=1,81$ ,  $p < 95$  %).

### 3.1.3 Анализ миграционной активности, ассоциированной с морским транспортом

О значимости морских судов и балластных вод в интродукции возбудителя холеры на свободные территории свидетельствуют данные по выделению токсигенных *V. cholerae* O1 серогруппы из проб балластных вод на судах, пришвартованных в портах Мексиканского залива в США (1991, 1992 гг.) [200], Бразилии [238].

Кроме того, на территории РФ с 2017 г. вступила в силу Международная конвенция «О контроле судовых балластных вод и осадков и управления ими», подразумевающая проведение микробиологических исследований балластных вод, в т.ч. на наличие возбудителя холеры [7]. Факты выделения *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы из проб водяного балласта судов, прибывших в порты Ростовской области [7], теоретически подтверждают возможность заноса возбудителя холеры в РФ с дальнейшим накоплением в благоприятных условиях поверхностного водоема и реализацию водного пути передачи.

На территории Приморского края находятся одни из крупнейших морских портов страны (МПП «Восточный», «Находка», «Владивосток»), имеющих стратегическое значение в развитии международных отношений с зарубежными странами, в т.ч. Азиатско-Тихоокеанского региона.

В анализ эпидемиологических рисков, связанных с морскими грузо- и пассажироперевозками на территории Приморского края за период с 2015 г. по 2021 г., включены данные только по морским судам, посетившим зарубежные порты.

За семилетний период на территорию Приморского края прибыло 42 572 морских судна из 61 страны Южной, Восточной, Юго-Восточной, Западной Азии, Америки, Африки, Австралии с Океанией. Пассажиропоток составил 965 521 человек со средними годовыми показателями в 137 931 человек (рисунок 10).



Рисунок 10 – Структура направлений въездного пассажиропотока морским транспортом в Приморский край (2015-2021 гг.)

Спектр стран Азии, с которыми установлено морское сообщение, более широкий в отличие от авиасообщения и охватывает 18 стран (за исключением Мальдивской Республики, Монголии, Лаоса), в т.ч. по новому направлению – Шри-Ланка, Восточный Тимор, Бруней, Камбоджа, Бангладеш.

На страны Азии (Республика Корея, Япония, КНР, КНДР, Тайвань, Филиппины, Сингапур, Вьетнам, Гонконг, Таиланд, Индонезия, Индия, Малайзия, Шри-Ланка, Восточный Тимор, Бруней, Камбоджа, Бангладеш) приходится  $94,3 \pm 0,02$  % ( $n=910\ 865$ ) всех лиц, прибывших в Приморский край морским транспортом. Из всех вышеуказанных стран пассажиропоток осуществлялся на протяжении всего анализируемого периода, за исключением Шри-Ланки, Восточного Тимора, Камбоджи, Малайзии, Бангладеш и Брунея. Доминирующее значение в структуре посещаемых морскими судами стран принадлежит Республике Корея ( $42,4 \pm 0,05$  %), Японии ( $25,1 \pm 0,04$  %) и КНР ( $23,4 \pm 0,04$  %) (таблица 10).

Таблица 10 – Структура въездного пассажиропотока морским транспортом в Приморский край (2015-2021 гг.)

№	Страна	Количество лиц, прибывших лиц на территорию Приморского края морским транспортом (абс.)	Удельный вес (от общего количества прибывших граждан данным видом ТС), % ± $m_p$
1	Республика Корея	409 656	$42,4 \pm 0,05$
2	Япония	242 775	$25,1 \pm 0,04$
3	КНР	225 812	$23,4 \pm 0,04$

Продолжение таблицы 10

4	КНДР	13 375	1,4 ± 0,01
5	Тайвань	9 182	1,0 ± 0,001
6	Филиппины	2 556	0,3 ± 0,005
7	Сингапур	2 540	0,3 ± 0,005
8	Вьетнам	2 186	0,2 ± 0,004
9	Гонконг	916	0,1 ± 0,003
10	Таиланд	539	0,6 ± 0,002
11	Индонезия	487	0,05 ± 0,002
12	Индия	416	0,04 ± 0,002
13	Малайзия	281	0,03 ± 0,001
14	Шри-Ланка	48	0,005 ± 0,0007
15	Восточный Тимор	34	0,004 ± 0,0006
16	Бруней	22	0,002 ± 0,0005
17	Камбоджа	20	0,002 ± 0,0005
18	Бангладеш	20	0,002 ± 0,0005
19	Всего из вышеуказанных стран	910 865	94,3 ± 0,02
20	Другие страны	54 656	5,7 ± 0,02
21	ВСЕГО	965 521	100

Анализ судоходства из стран Американского континента в Приморский край показал вовлеченность в процесс большего количества стран. Если по авиационному транспорту основная доля въездного пассажиропотока принадлежит США, то в отношении морского судоходства установлена вовлеченность в миграционный процесс морских судов из 17 стран Северной (США, Канада), Центральной (Белиз, Гватемала, Панама, Мексика, Ямайка, Эквадор, Коста-Рика) и Южной (Аргентина, Перу, Чили, Уругвай, Фолклендские острова, Сальвадор, Венесуэла, Колумбия) Америки с различной интенсивностью судозаходов в порты края. Такой широкий охват стран морским сообщением, возможно, связан с финансовой составляющей в части перевозок больших объемов грузов на дальние расстояния морским транспортом, чем авиационным.

Наибольшее количество судов и лиц прибыло из США (1 084 ТС и 25 291 человек), Канады (364 ТС и 8 095 человек), Мексики (171 ТС и 3 914), Ямайки (232 ТС и 7 270 человек) и Перу (95 ТС и 2 043 человек). Из других стран Американского континента – Аргентины, Эквадора, Гватемалы, Сальвадора, Венесуэлы, Колумбии, – судоходство и миграционная активность ниже.

В числе стран Западной Азии пассажиропоток зарегистрирован с Турцией, Кипром, Катаром, Саудовской Аравией, откуда прибыло в общем четырнадцать ТС и 248 человек.

Из стран Африки транспортные связи установлены с Египтом, ЮАР, Кенией. Въездной поток ТС и лиц в Приморский край осуществлялся в течение четырех лет (Египет, 2018-2021 гг.), двух (ЮАР, 2017-2018 гг.) и трех лет (Кения, 2015-2017 гг.). Наибольшее количество ТС зарегистрировано из ЮАР (12 судов и 171 человек).

Со странами Австралии и Океании наиболее активные транспортные связи установлены с Австралией, Новой Зеландией, Микронезией, Маршалловыми островами, Кирибати. Количество прибывших судов из этих стран составило 89, а количество лиц – 1818.

При анализе внутригодовой динамики посещаемости портов Приморского края морскими судами показано, что периодом с максимальными уровнями заходов ТС и пассажиропотоками являются 2 и 3 кварталы (рисунок 11). На данные периоды приходится  $26,9 \pm 0,2 \%$  и  $25,2 \pm 0,2 \%$  всех прибывших судов.

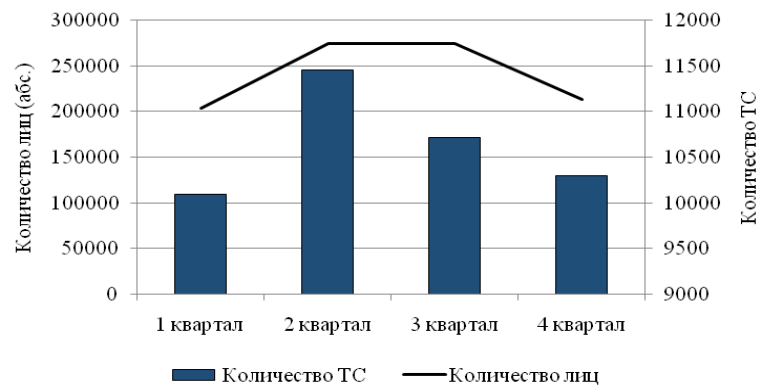


Рисунок 11 – Внутригодовая динамика миграционных потоков по морскому транспорту

Интенсивными транспортными потоками в отношении прибывающих из-за границы морских судов и граждан характеризуются морские порты на территории гг. Владивосток (МПП «Владивосток»), Находка (МПП «Восточный», «Находка») (рисунок 12).

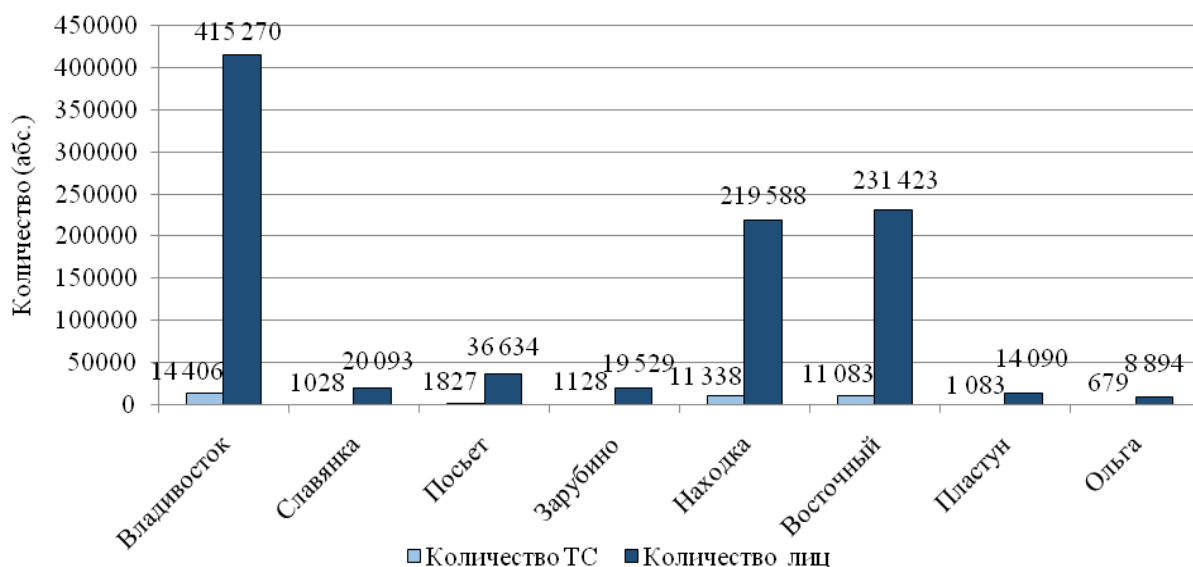


Рисунок 12 – Интенсивность транспортных потоков на территорию Приморского края в морских пунктах пропуска

### 3.1.4 Анализ миграционной активности, ассоциированной с железнодорожным транспортом

Удаленность Приморского края от европейских регионов РФ обуславливает важность железнодорожного транспорта для межрегиональных грузо- и пассажироперевозок, а приграничное расположение края определяет специфику международного железнодорожного сообщения.

В настоящее время на территории Приморского края функционируют железнодорожные пункты пропуска (ЖДПП) «Пограничный», «Махалино», «Хасан» на транспортных линиях Пограничный – Суйфэньхэ (провинция Хэйлунцзян, КНР), Махалино – Хуньчунь (провинция Цзилинь, КНР), Хасан – Раджин (КНДР).

При анализе международных железнодорожных сообщений за период с 2015 г. по 2021 г. установлено, что в Приморский край из КНР и КНДР прибыло 9 679 поездов и 663 054 человека, что составило  $1,9 \pm 0,01$  % от всего числа прибывших транспортных средств и  $8,0 \pm 0,009$  % – от числа прибывших граждан.

Внутригодовой анализ динамики въездного железнодорожного потока показал, что максимальное количество ТС прибыло в первом квартале анализируемого периода ( $28,0 \pm 0,4$  %), при этом разброс в количестве транспортных средств незначителен – от минимального ( $22,9 \pm 0,4$  %) в четвертом квартале до вышеуказанного показателя

( $28,0 \pm 0,4$  %) в первом (рисунок 13). Максимальное количество граждан из-за границы прибыло в третьем квартале ( $35,8 \pm 0,06$  %).

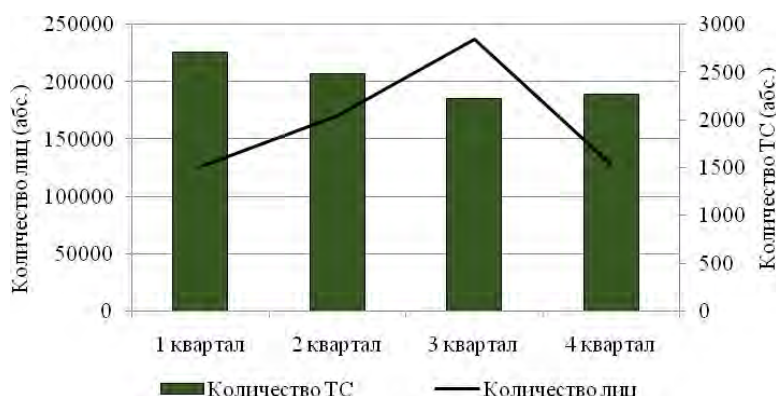


Рисунок 13 – Внутригодовая динамика миграционных потоков по железнодорожному транспорту

Наибольшие показатели удельного веса транспортных средств и прибывших пассажиров установлены из КНР –  $92,2 \pm 0,01$  % и  $97,5 \pm 0,01$  % соответственно (таблица 11). Из КНДР пассажиропоток в Приморский край незначителен: за весь период оттуда прибыло  $7,8 \pm 0,01$  % всех ТС и  $2,5 \pm 0,01$  % граждан (таблица 11).

Таблица 11 – Структура въездного пассажиропотока железнодорожным транспортом в Приморский край (2015-2021 гг.)

№	Страна	Количество лиц, прибывших на территорию Приморского края железнодорожным транспортом (абс.)	Удельный вес (от общего количества прибывших граждан данным видом ТС), % $\pm m_p$
1	КНР	646 524	$97,5 \pm 0,01$
2	КНДР	16 530	$2,5 \pm 0,01$
3	Всего из вышеуказанных стран	663 054	100

### 3.1.5 Анализ рисков завоза холеры на территорию Приморского края всеми видами транспорта

Обобщенный анализ пассажиропотоков на территорию Приморского края всеми видами транспорта показал доминирующее значение азиатского направления в

структуре миграционной активности. Наибольший удельный вес по количеству прибывших из-за рубежа лиц в Приморский край принадлежит КНР ( $66,1 \pm 0,01$  %) (таблица 12), что, несомненно, связано с территориальной близостью и развитием приграничного туризма. Также высокие показатели въездного пассажиропотока установлены с Республикой Корея ( $21,0 \pm 0,01$  %). Миграция по данному направлению осуществляется преимущественно посредством авиасообщения и морских перевозок.

Таблица 12 – Структура суммарного въездного пассажиропотока в Приморский край всеми видами транспорта (2015-2021 гг.)

№	Страна	Количество лиц, прибывших на территорию Приморского края всеми видами транспорта	Удельный вес (от общего количества прибывших граждан всеми видами ТС), % $\pm m_p$
1	КНР	5 500 799	$66,1 \pm 0,01$
2	Республика Корея	1 743 623	$21,0 \pm 0,01$
3	Япония	445 171	$5,4 \pm 0,008$
4	Гонконг	117 562	$1,4 \pm 0,004$
5	Таиланд	169 982	$2,0 \pm 0,005$
6	КНДР	102 014	$1,2 \pm 0,004$
7	Вьетнам	95 516	$1,1 \pm 0,004$
8	Тайвань	9 240	$0,1 \pm 0,001$
9	Филиппины	3 387	$0,04 \pm 0,0007$
10	Сингапур	2 573	$0,03 \pm 0,0006$
11	Всего из вышеуказанных стран	8 189 867	$98,4 \pm 0,004$
12	Другие страны	129 459	$1,6 \pm 0,004$
13	ВСЕГО	8 319 326	100

Согласно имеющимся данным ВОЗ по заболеваемости холерой во время седьмой пандемии на территории Китая за длительный период, включающий и анализируемый временной отрезок 2015-2021 гг., случаи заболевания регистрировались практически ежегодно с 1987 г. с тенденцией к снижению количества больных [215]. Однако, несмотря на это, с учетом высокой интенсивности миграционной активности риск завоза холеры на территорию Приморского края из КНР всеми видами транспорта существует.

Оценка эпидемиологической ситуации по холере в других странах Южной, Восточной, Юго-Восточной Азии, с которыми установлены транспортные связи, показывает неблагополучие по данной инфекции на отдельных территориях. Так, за анализируемый период с 2015 г. по 2021 г. случаи холеры регистрировали в таких



странах, как Республика Корея (12 случаев, из них завозных – 9), Япония (34 случая, из них завозных – 28), Таиланд (210 случаев), Филиппины (7 872 случая), Сингапур (6 случаев, из них завозных – 5) [104-110]. На территории Вьетнама за последние семь лет (с 2012 г.) холера официально не регистрировалась. По данным ВОЗ в КНДР последние осложнения по холере на территории были в 1980 г. (170 случаев) и в 1996 г. (1 случай) [215].

В странах Центральной Азии, в частности в Узбекистане, с которым налажено интенсивное воздушное сообщение, в прошлом крупная вспышка холеры произошла в Хорезмском районе Узбекской ССР в 1965 г. [1]. В настоящее время случаи холеры в стране не регистрируются, однако, стоит принимать во внимание территориальную близость Узбекистана с неблагополучным по холере Афганистаном [11, 62], что может повлиять на эпидемиологическую ситуацию в стране.

В Северной Америке (США, Канада) ситуация по холере нестабильная и обусловлена регулярными завозами. С 2015 г. по 2021 гг. в США зафиксировано 39 случаев холеры, из которых 32 – завозных [104-110]. В Канаде из десяти случаев холеры девять завозные. Нестабильность эпидемиологической ситуации определяется продолжающейся с конца 2010 г. вспышкой холеры в Карибском бассейне (о. Гаити). Согласно официальным данным в 2020, 2021 г. случаев холеры на территории Доминиканской Республики и Республики Гаити не зарегистрировано [109, 110]. В странах Южной Америки, имеющей большее значение для Приморского края в морских перевозках, согласно данным ВОЗ, в последние годы эпидемических осложнений не выявлено, подъем заболеваемости холерой в этих странах отмечался в 90-х годах прошлого столетия [215]. Принимая во внимание длительность морского пути из этих стран в территориальные воды Приморского края, в целом риск завоза инфекции больными лицами минимален, однако, необходимо учитывать значение балластных вод в распространении возбудителя холеры. Также высока вероятность попадания в балластные воды других этиологически значимых в развитии ОКИ вибрионов, в т.ч. галофильных микроорганизмов (*V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*).

Из стран Африки морское сообщение налажено с Египтом, ЮАР, Кенией. При этом в Египте и ЮАР случаи холеры за исследуемый период не зарегистрированы, однако регистрировались случаи заболевания в сопредельных с ними странах – Алжире, Мозамбике, Намибии, Зимбабве [11, 104-110]. В Кении, согласно официальным данным

за семь лет (2014-2020 гг.) ежегодно имели место крупные вспышки холеры с регистрацией до 13 291 случая (2015 г.) [104-110].

Таким образом, проведенный анализ въездной миграции на территории Приморского края позволил выявить основные направления пассажиропотоков различными видами транспорта, их интенсивность. При анализе транспортных потоков на определенной территории стоит принимать во внимание множество факторов, таких как географическое расположение региона, наличие пунктов пропуска через государственную границу, формирование единых торгово-экономических пространств в рамках международных соглашений и проведение крупных торгово-экономических мероприятий в регионе, социальную составляющую и т.д. В структуре миграционной активности в Приморском крае доминирующее значение принадлежит странам Азии, с которыми налажено прямое транспортное сообщение с высокими уровнями интенсивности всеми видами транспорта. Регистрация эпидемических осложнений по холере в отдельных азиатских странах обуславливает внешние риски завоза на территорию края этого возбудителя. Однако, нельзя не принимать во внимание возможность опосредованного завоза инфекции на территорию субъекта через внутренние транспортные потоки.

### **3.2 Анализ закономерностей выявления холерного вибриона в поверхностных водоемах Приморского края**

Одним из рисков распространения возбудителя холеры на неэндемичных территориях в случае его завоза служит существование в регионе условий и факторов, обуславливающих возможность накопления патогена в благоприятных условиях внешней среды с реализацией механизмов и путей передачи возбудителя. В отношении холеры одним из таких факторов является наличие оптимальных условий поверхностных водоемов для персистенции патогена, о чем свидетельствует его длительная циркуляция в определенных участках водоема с благоприятными условиями окружающей среды (рН, уровень инсоляции, органический состав и другие). Так, в период вспышки холеры в Приморском крае в 1999 г. произошло накопление возбудителя в поверхностных водоемах, что привело к инфицированию лиц, использовавших воду водоемов для хозяйственно-бытовых нужд [54].

Для выяснения закономерностей обнаружения холерного вибриона в поверхностных водоемах Приморского края был проведен анализ результатов мониторинга вибриофлоры в период с 2011 г. по 2021 г., осуществляемого учреждениями Роспотребнадзора – ФКУЗ «Приморская противочумная станция» и ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Приморском крае». Территория Приморского края относится ко II типу территорий по проявлениям холеры, мониторинг поверхностных водоемов здесь осуществляется с июня по сентябрь.

В анализ включены данные мониторинга поверхностных водоемов в 166 стационарных точках отбора проб воды, из которых 25 расположены в зонах санитарной охраны, 105 – в зонах рекреации, 19 – в местах сброса сточных вод и 17 – на трансграничных водоемах. Из 17 расположенных на трансграничных водоемах точек пять находятся на р. Раздольная в Надеждинском, Октябрьском районах и Уссурийском городском округе, четыре – на озере Ханка в Ханкайском и Спасском районах, три – на р. Нестеровка в Пограничном районе, по одной – на рр. Туманная в Хасанском районе, Уссури в Пожарском районе, Сунгач в Лесозаводском районе, Комиссаровка в Ханкайском районе и озере в районе заставы п. Марково в Лесозаводском районе.

Всего в ходе мониторинга поверхностных водоемов края с 2011 г. по 2021 г. было отобрано 29 823 пробы воды: 2011 г. – 2 703 пробы, 2012 г. – 2 680 проб, 2013 г. – 2 720 проб, 2014 г. – 2 750 проб, 2015 г. – 2 790 проб, 2016 г. – 2 640 проб, 2017 г. – 2 705 проб, 2018 г. – 2 696 проб, в 2019 г. – 2 620 проб, в 2020 г. – 2 742 пробы, в 2021 г. – 2 777 проб. Кроме этого, в 2018 г. в связи с паводковой ситуацией специалистами ФКУЗ «Приморская противочумная станция» исследованы 23 пробы воды, отобранные в дополнительных пяти точках на очистных сооружениях (1 точка) и на поверхностных водоемах (р. Раковка – 2 точки, р. Раздольная – 2 точки). В 2021 г. исследованы 33 пробы, отобранные в новых двух точках мониторинга вибриофлоры (рр. Волчанка, Нестеровка). Ввиду однократности отбора проб данные по этим дополнительным и новым точкам не включены в исследование.

В результате планового мониторинга вибриофлоры водоемов за анализируемый период в регионе было изолировано 1 693 штамма холерного вибриона, из которых 31 штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор ( $1,8 \pm 0,32$  %), четыре штамма *V. cholerae* R-варианта ( $0,2 \pm 0,11$  %) и 1 658 *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы ( $98,0 \pm 0,34$  %).

Холерные вибрионы Эль Тор обнаруживались в водоемах края в 2011, 2014, 2016, 2017, 2021 гг., в то время как на протяжении всего анализируемого периода в водоемах преимущественно обнаруживались вибрионы не O1/O139 серогрупп (рисунок 14).

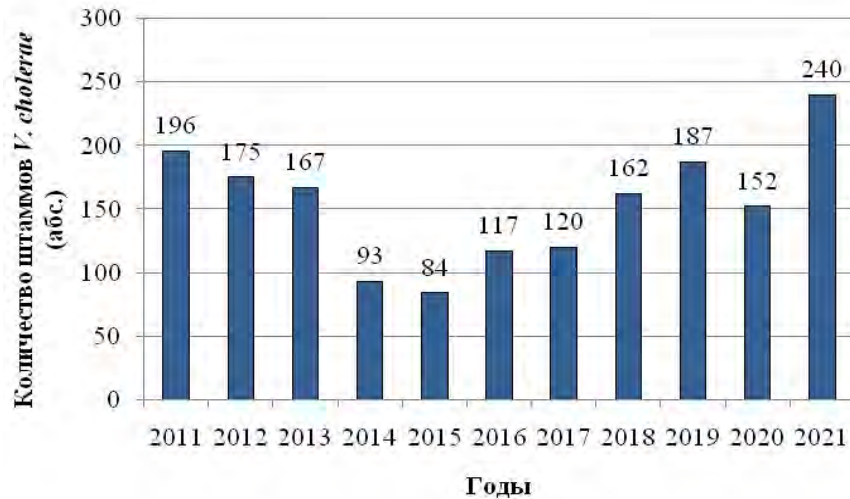


Рисунок 14 – Динамика выделения *V. cholerae* из поверхностных водоемов Приморского края в 2011-2021 гг.

При анализе распространенности холерного вибриона в поверхностных водоемах на административных территориях Приморского края показано, что штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор были изолированы в Уссурийском городском округе из проб р. Комаровка (3 штамма – 2011 г.), в г. Владивостоке из р. Седанка (2 штамма – 2014 г., 21 штамм – 2021 г.), в Октябрьском районе из р. Раздольная (1 штамм – 2014 г.) и в г. Находке из оз. Соленое (1 штамм – 2016 г., 3 штамма – 2017 г.). Из проб воды последнего в 2016 г. также были изолированы четыре штамма холерного вибриона R-варианта (таблица 13).

Таблица 13 – Высеваемость холерного вибриона из поверхностных водоемов Приморского края в 2011-2021 гг.

Территория	Всего проб	Количество штаммов <i>V. cholerae</i> Эль Тор O1 серогруппы	Количество штаммов <i>V. cholerae</i> R-варианта	Количество штаммов <i>V. cholerae</i> не O1/O139 серогруппы	Всего штаммов	Высеваемость (%±m <sub>p</sub> )
Анучинский район	356	0	0	0	0	0
г. Арсеньев	890	0	0	0	0	0
г. Артем	720	0	0	23	23	<b>3,2 ± 0,65</b>
г. Владивосток	6 384	23	0	610	633	<b>9,9 ± 0,37</b>
г. Дальнегорск	502	0	0	0	0	0
г. Дальнереченск	362	0	0	0	0	0
г. Лесозаводск	728	0	0	0	0	0
г. Находка	2 127	4	4	183	191	<b>8,9 ± 0,61</b>
г. Партизанск	732	0	0	0	0	0
Спасский район	895	0	0	8	8	<b>0,9 ± 0,31</b>
Кавалеровский район	121	0	0	0	0	0
Кировский район	549	0	0	0	0	0
Красноармейский район	183	0	0	0	0	0
Михайловский район	534	0	0	12	12	<b>2,2 ± 0,64</b>
Надеждинский район	534	0	0	5	5	<b>0,9 ± 0,41</b>
Октябрьский район	715	1	0	91	92	<b>12,9 ± 1,25</b>
Ольгинский район	186	0	0	0	0	0
Партизанский район	3 013	0	0	159	159	<b>5,6 ± 0,40</b>
Пограничный район	886	0	0	59	59	<b>6,7 ± 0,83</b>
Пожарский район	669	0	0	0	0	0
Уссурийский городской округ	3 528	3	0	331	334	<b>9,5 ± 0,49</b>
Ханкайский район	1 068	0	0	33	33	<b>3,1 ± 0,52</b>
Хасанский район	2 016	0	0	130	130	<b>6,4 ± 0,54</b>
Хорольский район	356	0	0	0	0	0
Черниговский район	519	0	0	0	0	0
Чугуевский район	356	0	0	0	0	0
Шкотовский район	360	0	0	14	14	<b>3,9 ± 1,01</b>
Яковлевский район	534	0	0	0	0	0
Итого	<b>29 823</b>	<b>31</b>	<b>4</b>	<b>1 658</b>	<b>1 693</b>	<b>5,7 ± 0,13</b>

Холерные вибрионы не O1/O139 серогруппы помимо вышеуказанных территорий обнаруживались в водоемах г. Артем, Михайловском, Надеждинском, Партизанском, Пограничном, Спасском, Ханкайском, Хасанском и Шкотовском районах (таблица 13).

Наибольшие показатели высеваемости холерного вибриона из поверхностных водоемов установлены в Октябрьском районе (12,9 ± 1,25 %), г. Владивостоке

( $9,9 \pm 0,37$  %), Уссурийском городском округе ( $9,5 \pm 0,49$  %), г. Находке ( $8,9 \pm 0,61$  %). Из водоемов г. Артем, Спасского, Надеждинского, Ханкайского, Шкотовского районов штаммы *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы были изолированы в пределах одного-пяти сезонов мониторинга и характеризовались незначительным количеством.

При анализе внутригодовой динамики выделения холерного вибриона и высеваемости установлено, что наибольшее количество штаммов *V. cholerae* и максимальные показатели высеваемости приходятся на август: удельный вес выделенных в этот период изолятов холерного вибриона составил  $40,3 \pm 1,19$  % ( $n=683$ ) (рисунок 15) с высеваемостью в  $8,9 \pm 0,32$  % (рисунок 16). В июне изолировано минимальное количество штаммов ( $n=127$ ) с низким уровнем высеваемости ( $1,7 \pm 0,15$  %) по сравнению с другими месяцами мониторинга.

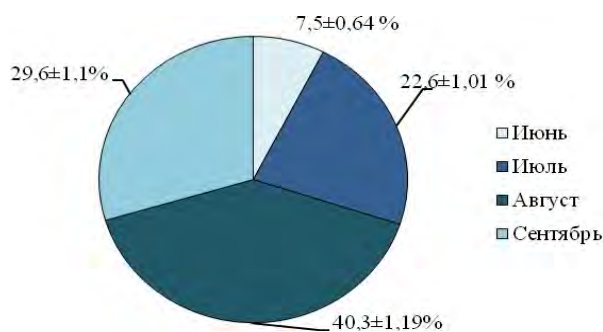


Рисунок 15 – Удельный вес выделенных штаммов *V. cholerae* по месяцам (2011-2021 гг.)

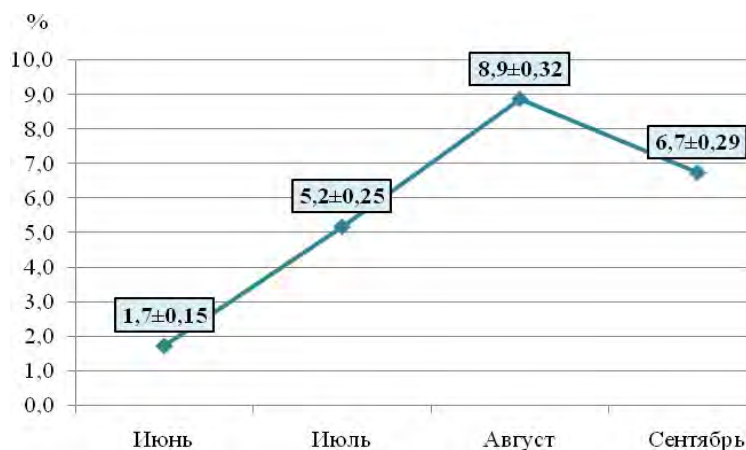


Рисунок 16 – Динамика высеваемости холерного вибриона из проб воды поверхностных водоемов Приморского края (2011-2021 гг.)

При анализе мест изоляции холерных вибрионов, установлено, что наибольшее количество штаммов *V. cholerae* выделено из р. Седанка, находящейся в черте города Владивостока и используемой в рекреационных целях (таблица 14). Из 190 проб воды данного водоема было выделено 78 штаммов холерного вибриона, что обусловило максимальные показатели высеваемости ( $41,1 \pm 3,56$  %). В 2021 г. из р. Седанка, как отмечалось, были выделены холерные вибрионы O1 серогруппы, что, возможно, повлияло на показатель высеваемости микроорганизма, ввиду расширения количества точек отбора проб воды и их кратности. Также высокая высеваемость холерного вибрио-

Таблица 14 – Высеваемость холерного вибриона по стационарным точкам отбора проб воды в Приморском крае (2011-2021 гг.)

<b><i>Стационарные точки. Показатель высеваемости &gt; 30 %</i></b>
р. Седанка, оз. Соленое
<b><i>Стационарные точки. Показатель высеваемости 11-30 %</i></b>
Водохранилище Седанка, р. Лазурная, ручей в п. Горностаи, р. Богатая, ручей 2 в бух. Лазурная, р. Первая, р. Вторая, р. Раковка, р. Комаровка (слияние с р. Раздольная), р. Партизанская (устье), оз. Хасан, р. Литовка (устье) оз. Лебединое (залив Восток), р. Раздольная, р. Каменка (устье), ручей 1 бух. Лазурная, Солдатское озеро, водохранилище р. Богатая, ручей в п. Рыбачий, карьерное озеро кирпичного завода, р. Борисовка (с. Борисовка), р. Черная, бух. Лазурная
<b><i>Стационарные точки. Показатель высеваемости &lt;11 %</i></b>
р. Нестеровка, р. Цукановка, р. Раздольная (в месте впадения р. Славянки), р. Туманная, р. Луговая, р. Репьевка, р. Нестеровка (п. Пограничный), р. Раковка, р. Комаровка, р. Раздольная (ниже выпуска городских сточных вод УГО), Куликовское водохранилище, р. Борисовка, оз. Лебединое (падь Ободная), бух. Экспедиция, бух. Щитовая, Амурский залив (пляж ж/д станции Океанская), р. Гладкая, бух. Литовка, пляж п. Рыбачий, слияние рек Глинки и Хмыловки, Амурский залив (пляж ж/д станции Седанка), р. Астраханка, бух. Муравьиная, р. Шкотовка, Уссурийский залив (ДОЦ «Юнга»), р. Пойма, бух. Нарва, оз. Ливадийское, р. Славянка (с. Ново-Никольск), оз. Ханка, залив Восток (бухта у яхт клуба «Антарес»), бух. Круглая, открытый общепоселковый бассейн, бух. Славянка, искусственный водоем п. Пограничный, р. Комиссаровка, р. Спассовка, Уссурийский залив (ДОЦ «Океан»), бух. Рисовая, Амурский залив (пляж ж/д станции Санаторная), р. Партизанка, озеро в районе с. Васильевка, р. Суходол, р. Пушкаревка, р. Артемовка, Раковское водохранилище, залив Находка (пляж УПТК), бух. Змеинка, Уссурийский залив (база «Садко»), Амурский залив (пляж Спортивной Гавани), слияние рек Бакарасевки и Михайловки, бух. Художников, водозабор п. Хмыловка (п. Врангель), залив Восток (пляж у лесозавода), Амурский залив (пляж у мыса Кунгасный), р. Илистая, водохранилище Давыдовское, водохранилище МУЭП «Природа», бух. Улисс, бух. Тихая, бух. Баклан, р. Объяснения, бух. Тихая лагуна, бух. Рифовая (пляж), р. Спассовка (с. Спасское), залив Восток (пляж «Волна»), бух. Патрокл, бух. Анна, бух. Средняя (пляж), залив Находка (пляж Песчаный), бух. Рифовая (п. Ливадия), р. Раздольная (трасса на п. Славянка), бух. Отрадная, бух. Аякс, бух. Федорова, Амурский залив (Токаревский маяк)

на характерна для озера Соленого в г. Находка ( $36,2 \pm 3,01$  %) и водохранилища Седанка в г. Владивосток ( $29,8 \pm 3,33$  %). Диапазон показателей высеваемости *V. cholerae* по стационарным точкам Приморского края представлен в таблице 14.

Больше половины штаммов холерного вибриона ( $65,7 \pm 1,15$  %) изолировано из проб воды, отобранных в местах рекреационного водопользования (таблица 15). Однако, показатель высеваемости для данного типа стационарных точек ( $5,9 \pm 0,17$  %) не характеризовался максимальными значениями в сравнении с другими (таблица 15). Максимальные же показатели высеваемости холерного вибриона ( $11,2 \pm 1,36$  %) установлены для трансграничных водоемов в местах сброса сточных вод. К данным точкам отнесены три стационарные точки, расположенные на рр. Раздольная (500 м ниже сброса КОС п. Покровка) и Нестеровка (200 м ниже сброса КОС п. Пограничный, сточные воды ж/д микрорайона).

Таблица 15 – Высеваемость холерного вибриона из проб воды поверхностных водоемов в различных типах стационарных точек (2011-2021 гг.)

Тип стационарной точки	Количество проб воды поверхностных водоемов	Количество штаммов	Удельный вес, (% $\pm$ m <sub>p</sub> )	Показатель высеваемости, (% $\pm$ m <sub>p</sub> )
ЗСО*	4 355	226	$13,3 \pm 0,82$	$5,2 \pm 0,33$
ЗР**	18 731	1 112	$65,7 \pm 1,15$	$5,9 \pm 0,17$
ССВ***	3 757	173	$10,2 \pm 0,73$	$4,6 \pm 0,34$
ТГВ_ЗСО	546	22	$1,3 \pm 0,27$	$4,0 \pm 0,84$
ТРВ_ЗР	1 782	88	$5,2 \pm 0,53$	$4,9 \pm 0,51$
ТГВ_ССВ	536	60	$3,6 \pm 0,44$	$11,2 \pm 1,36$
ТГВ****	116	12	$0,7 \pm 0,2$	$10,3 \pm 2,82$
Итого:	29 823	1 693	100	$5,7 \pm 0,13$

Примечание: \* - зона санитарной охраны, \*\* - зона рекреации, \*\*\* - сброс сточных вод, \*\*\*\* - трансграничный водоем

Немного ниже показатель высеваемости установлен для трансграничного водоема р. Туманная в Хасанском районе ( $10,3 \pm 2,82$  %), формирование водостока которой преимущественно происходит на территории КНР. При этом в стационарных точках на трансграничных водоемах в местах сброса сточных вод в сравнении с зоной рекреационного водопользования различия в высеваемости значимы ( $t=3,89$ ,  $p \geq 95,5$  %). В зонах санитарной охраны, рекреационного водопользования, в т.ч. и являющихся



трансграничными, показатель высеваемости холерного вибриона варьировал от  $4,0 \pm 0,84$  до  $5,2 \pm 0,33$  %.

### **3.3 Заболеваемость пищевыми токсикоинфекциями, обусловленными парагемолитическим вибрионом, в Приморском крае**

Значимая роль в этиологии ОКИ среди микроорганизмов рода *Vibrio* кроме возбудителя холеры принадлежит галофильным бактериям *V. parahaemolyticus* и *V. alginolyticus*, являющимся естественными обитателями морей, океанов, а также гидробионтов (рыб, моллюсков, ракообразных и др.). Эпидемические проявления пищевых токсикоинфекций (ПТИ) различной интенсивности, обусловленные галофильными вибрионами, регистрируются во многих странах мира, территориально сопряженных с морским побережьем, где население широко употребляет в пищу морепродукты [120, 148, 196, 208]. Данная проблема особо актуальна в странах Юго-Восточной Азии, где с 1996 г. ежегодно регистрируется значительное количество случаев заболевания, связанных преимущественно с пандемичными клонами *V. parahaemolyticus* [146, 148, 177, 208]. Учитывая географическое положение Приморского края, ПТИ галофильной этиологии приобретают на территории края важное значение. Однако, по заболеваемости ими в регионе в литературе имеются отдельные данные [27, 71, 73], не позволяющие в полной мере оценить ситуацию по вызываемым этим возбудителем токсикоинфекциям.

С целью оценки ситуации в Приморском крае по ПТИ, обусловленным парагемолитическим вибрионом, был проведен ретроспективный анализ заболеваемости ПТИ за период с 1997 г. по 2021 г. Поскольку данная категория ПТИ входит в состав прочих острых кишечных инфекций, также был проведен анализ заболеваемости острыми кишечными инфекциями в Приморском крае для получения данных по их структуре и значимости ПТИ галофильной этиологии в структуре ОКИ.

Установлено, что на территории Приморского края в период с 1997 г. по 2021 г. зарегистрировано 430 757 случаев ОКИ с преобладанием в их структуре группы «прочие кишечные инфекции». На долю этой группы болезней приходилось  $93,3 \pm 0,03$  % ( $n=401\ 781$ ) всех зарегистрированных случаев ОКИ. Необходимо отметить, что в эту группу ОКИ не вошли этиологически расшифрованные сальмонеллезы, вирусный гепатит А, Е, брюшной тиф и паратиф. Из всех

зарегистрированных за анализируемый период случаев прочих ОКИ ( $n=401\ 781$ ) этиологический агент определен в  $26,6 \pm 0,07\ %$  случаях ( $n=106\ 949$ ), в остальных  $73,7 \pm 0,07\ %$  случаях ( $n=294\ 832$ ) установить этиологический агент не удалось (рисунок 17). В структуре расшифрованных случаев прочих ОКИ доминирующее значение принадлежит кишечным инфекциям бактериальной этиологии ( $59,5 \pm 0,15\ %$ ). ОКИ вирусной этиологии выявлено в 1,4 раза меньше, чем бактериальной ( $40,5 \pm 0,15\ %$ ). Стоит отметить, что в динамике за анализируемый период наблюдается увеличение числа расшифрованных случаев ОКИ вирусной этиологии. Так, если в 1997 г. удельный вес таких случаев составлял  $0,9 \pm 0,2\ %$  всех расшифрованных случаев, то в 2021 г. показатель составил  $76,3 \pm 0,7\ %$ .

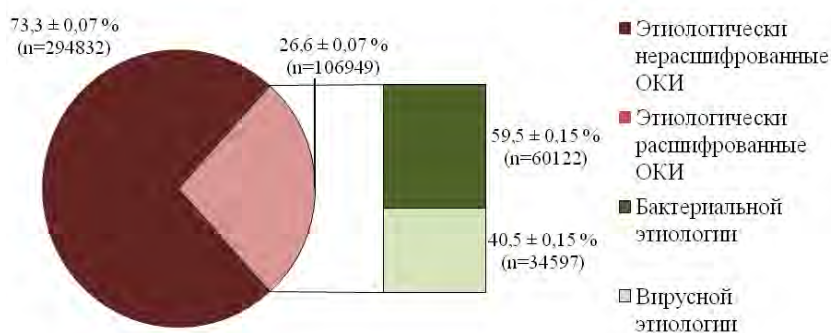


Рисунок 17 – Структура прочих ОКИ, зарегистрированных в Приморском крае за период с 1997 г. по 2021 г.

Среди расшифрованных случаев прочих ОКИ бактериальной этиологии выявлено 415 случаев ПТИ, обусловленных микроорганизмами рода *Vibrio*, их удельный вес в структуре прочих ОКИ составил менее 1 %. В большинстве случаев ( $91,3 \pm 1,38\ %$ ,  $n=379$ ) был поставлен диагноз ОКИ, вызванной *V. parahaemolyticus*, в  $7,2 \pm 1,27\ %$  – *V. alginolyticus* ( $n=30$ ). Кроме этого, было зарегистрировано шесть случаев ОКИ, вызванных другими микроорганизмами рода *Vibrio*, в частности *V. fluvialis*, *V. vulnificus*, *V. furnissii*, *V. hollisae* (2005 г.) и *V. metschnikovii* (2010, 2016 гг.).

Эпидемические проявления ПТИ, вызванных галофильными микроорганизмами, характеризовались как единичными, так и групповыми случаями заболевания и регистрировались на протяжении всего анализируемого периода, за исключением 1999, 2015, 2020 гг. (рисунок 18). Групповые случаи ПТИ в крае зарегистрированы в 1997 г. –

63 случая ( $2,84 \pm 0,35 \text{ ‰}$ ), 2001 г. – 31 ( $1,46 \pm 0,26 \text{ ‰}$ ), 2002 г. – 24 ( $1,16 \pm 0,23 \text{ ‰}$ ), 2005 г. – 37 ( $1,82 \pm 0,29 \text{ ‰}$ ), 2007 г. – 39 ( $1,94 \pm 0,31 \text{ ‰}$ ), 2009 г. – 43 ( $2,23 \pm 0,33 \text{ ‰}$ ), 2012 г. – 54 случая ( $2,76 \pm 0,37 \text{ ‰}$ ). Во всех вышеуказанных случаях установлено превышение в 1,2-3 раза среднемноголетнего показателя заболеваемости ОКИ, вызванных галофильными вибрионами ( $0,92 \text{ ‰}$ ).

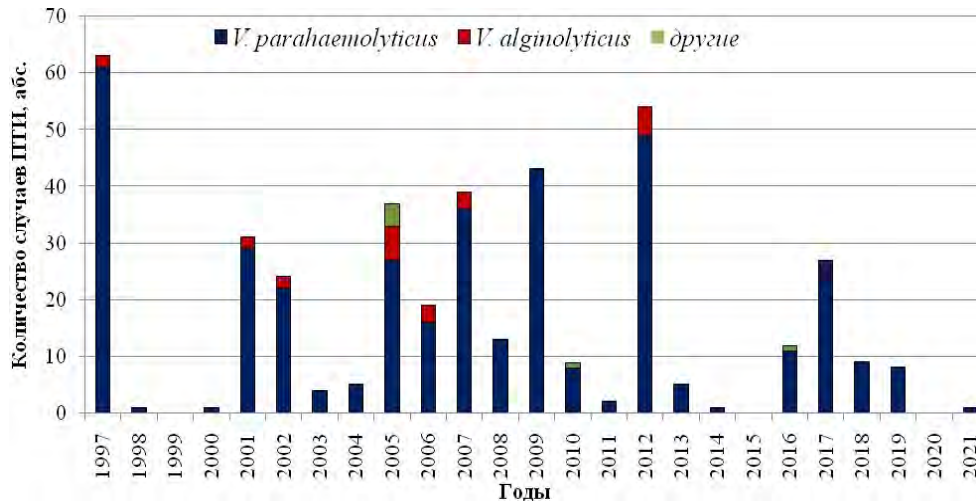


Рисунок 18 – Этиологическая структура ПТИ, вызванных галофильными вибрионами, в Приморском крае (1997-2021 гг.)

В дальнейшем эпидемиологический анализ проводился в отношении пищевых токсикоинфекций, обусловленных парагемолитическим вибрионом, ввиду их этиологической значимости на территории Приморского края.

В многолетней динамике эпидемического процесса ПТИ прослеживается подъем заболеваемости в летне-осенний период, связанный с активизацией механизмов и путей передачи. Наибольший удельный вес ПТИ установлен в августе и составил  $67,8 \pm 2,4 \%$  ( $n=257$ ), в сентябре и июле выявлено  $17,7 \pm 1,9 \%$  ( $n=67$ ) и  $12,1 \pm 1,7 \%$  ( $n=46$ ) всех зарегистрированных случаев, соответственно. Минимальное количество больных приходилось на июнь с удельным весом  $2,2 \pm 0,7 \%$  ( $n=8$ ). Один случай заболевания зарегистрирован в октябре.

Анализ территориальной приуроченности заболеваемости показал, что случаи ПТИ регистрировалась на территориях г. Владивостока и Хасанского района. Так, в г. Владивостоке выявлено наибольшее количество больных – 356 ( $94,0 \pm 1,22 \%$ ), в Хасанском районе – 23 человека ( $6,0 \pm 1,22 \%$ ). Регистрация заболеваемости на данных территориях, возможно, связана с основными местами отдыха населения,

существующей настороженностью в медицинских организациях в отношении вызываемых при употреблении морепродуктов ОКИ и высоким качеством проведения лабораторных исследований.

Установлено, что заболевшие лица относились к различным возрастным группам – от 10 до 70 лет. Наибольшее количество больных зафиксировано в возрасте от 21 до 30 лет ( $80,5 \pm 2,03$  %,  $n=305$ ). В группе от 11-20 лет и 31-40 лет выявлено  $7,9 \pm 1,39$  % и  $6,6 \pm 1,27$  %, соответственно. В остальных группах старше 40 лет (41-50, 51-60, 61-70 лет) удельный вес заболевших характеризовался минимальными показателями от  $1,3 \pm 0,58$  до  $1,8 \pm 0,69$  %.

При анализе факторов передачи установлена значимая роль в развитии ПТИ морепродуктов, что согласуется с данными ряда авторов о высоком риске инфицирования *V. parahaemolyticus* при употреблении сырых морепродуктов [85, 252]. Так в  $90,8 \pm 1,48$  % ( $n=344$ ) всех зарегистрированных случаев ПТИ в Приморском крае основным фактором передачи явились морепродукты (рисунок 19).

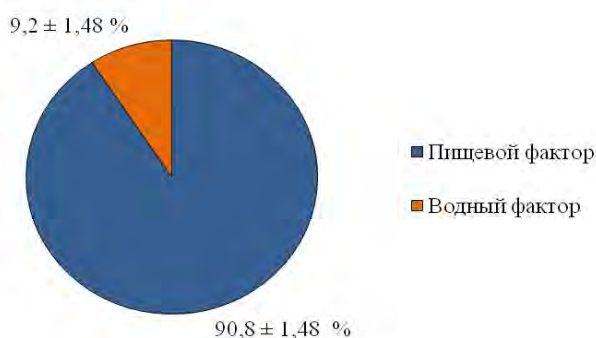


Рисунок 19 – Удельный вес различных факторов передачи, выявленных при ПТИ, обусловленных парагемолитическим вибрионом, на территории Приморского края

Установлено, что в 2007, 2009 гг. заболевания были связаны с употреблением варено-мороженных креветок, реализуемых без соблюдения температурного режима в зонах отдыха населения (22 и 5 случаев, соответственно) [72]. В 2012 г. в Хасанском районе реализуемые частниками крабы и креветки также явились факторами передачи возбудителя. Вместе с тем, необходимо отметить, что парагемолитический вибрион является одним из микробиологических индикаторов безопасности сырья и пищевых продуктов, определенных нормативными документами СанПин 2.3.2.1078-01 и МУ 5780-91.

Свидетельством значения пищевого фактора в инфицировании возбудителем пищевых токсикоинфекций служат данные, полученные Л.Ю. Лаженцевой с соавт. [19], согласно которым показана обсемененность парагемолитическим вибрионом отобранных в местах добычи в заливе Петра Великого проб креветок *Sclerocrangon salebrosa*. Показано также, что парагемолитический вибрион встречается в местах промысла двустворчатого моллюска *Anadara broughtoni*, *Spisula sachalinensis*, обитаемых также в заливе Петра Великого [17, 18]. Наряду с этим, проведенный в данном исследовании анализ путей и факторов передачи инфекции показал, что в  $9,2 \pm 1,52$  % случаях в эпидемиологическом анамнезе больных были установлены факты купания в морской воде (рисунок 19), что требует дальнейшего анализа обсеменности поверхностных водоемов Приморского края *V. parahaemolyticus*.

### **3.4 Анализ закономерностей выявления парагемолитического вибриона в поверхностных водоемах Приморского края**

Как уже было указано, в ходе микробиологического мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Приморского края за период с 2011 г. по 2021 г., было отобрано 29 823 пробы воды со средним ежегодным показателем 2 711 проб. В результате мониторинга были выделены не только штаммы холерного вибриона, но и штаммы парагемолитического вибриона, являющегося естественным обитателем прибрежных преимущественно морских водоемов. Стоит отметить, что наряду с *V. parahaemolyticus* в водоемах региона также обнаруживался другой галофильный микроорганизм – алгинолитический вибрион *V. alginolyticus*. Всего в ходе мониторинга из водоемов региона было изолировано 4 142 штамма галофильных вибрионов, из которых 923 штамма – *V. parahaemolyticus* и 3 219 – *V. alginolyticus*.

При анализе динамики выделения парагемолитического вибриона из объектов окружающей среды установлено, что штаммы *V. parahaemolyticus* были изолированы на протяжении всех лет с максимальным удельным весом в 2013, 2015, 2016 гг. (рисунок 20).

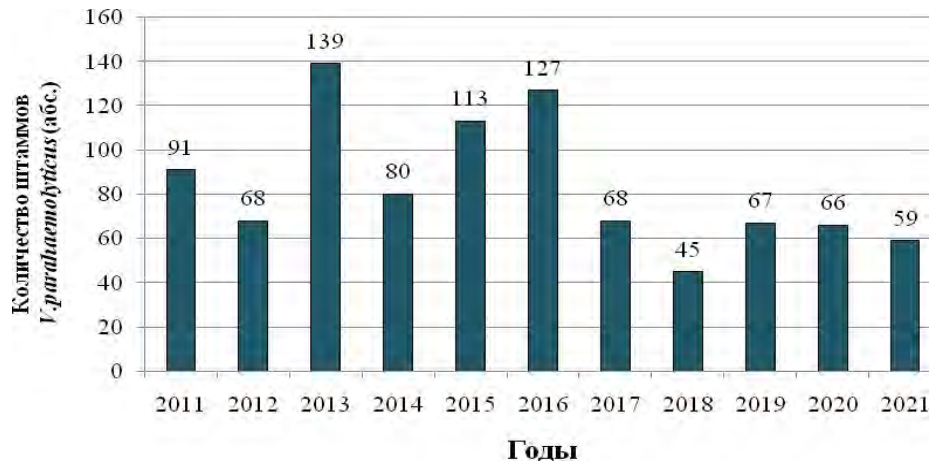


Рисунок 20 – Динамика выделения *V. parahaemolyticus* из поверхностных водоемов Приморского края в период с 2011 г. по 2021 г.

Парагемолитический вибрион на территории Приморского края преимущественно обнаруживался в прибрежных зонах заливов в гг. Владивосток, Находка, Партизанском и Хасанском районах (таблица 16). Установлено, что территорией с высокой высеваемостью *V. parahaemolyticus* из объектов окружающей среды является Партизанский район с показателем высеваемости  $10,1 \pm 0,55$  %. В г. Владивостоке, несмотря на наибольшее количество выделенных штаммов парагемолитического вибриона ( $n=428$ ), этот показатель ниже, чем по Партизанскому району и г. Находке за счет увеличения абсолютного количества исследуемых проб воды. В Хасанском районе, где также регистрируются случаи ПТИ галофильной этиологии, в пробах воды поверхностных водоемов вибрион обнаруживался реже (высеваемость  $0,5 \pm 0,16$  %).

При сравнении общего показателя высеваемости из проб воды холерного и парагемолитического вибрионов, установлено, что этот показатель для парагемолитического вибриона ( $3,1 \pm 0,1$  %) значительно ниже, чем для холерного ( $5,7 \pm 0,13$  %) ( $t=16,25$ ,  $p \geq 95,5$  %).

Таблица 16 – Высеваемость парагемолитического вибриона из поверхностных водоемов Приморского края в 2011-2021 гг.

Территория	Всего проб	Всего штаммов	Высеваемость (%±m <sub>p</sub> )
Анучинский район	356	0	0
г. Арсеньев	890	0	0
г. Артем	720	0	0
г. Владивосток	6 384	428	<b>6,7 ± 0,31</b>
г. Дальнегорск	502	0	0
г. Дальнереченск	362	0	0
г. Лесозаводск	728	0	0
г. Находка	2 127	177	<b>8,3 ± 0,59</b>
г. Партизанск	732	0	0
Спасский район	895	0	0
Кавалеровский район	121	0	0
Кировский район	549	0	0
Красноармейский район	183	0	0
Михайловский район	534	0	0
Надеждинский район	534	0	0
Октябрьский район	715	0	0
Ольгинский район	186	0	0
Партизанский район	3 013	307	<b>10,1 ± 0,55</b>
Пограничный район	886	0	0
Пожарский район	669	0	0
Уссурийский городской округ	3 528	0	0
Ханкайский район	1 068	0	0
Хасанский район	2 016	11	<b>0,5 ± 0,16</b>
Хорольский район	356	0	0
Черниговский район	519	0	0
Чугуевский район	356	0	0
Шкотовский район	360	0	0
Яковлевский район	534	0	0
<b>Итого</b>	<b>29 823</b>	<b>923</b>	<b>3,1 ± 0,1</b>

При анализе внутригодовой динамики выделения парагемолитического вибриона показано, что максимальный пик его высеваемости установлен в сентябре ( $4,6 \pm 0,24$  %) с максимальным удельным весом, в отличие от холерного вибриона для которого максимум высеваемости приходится на август ( $8,9 \pm 0,32$  %) (рисунок 21, 22).

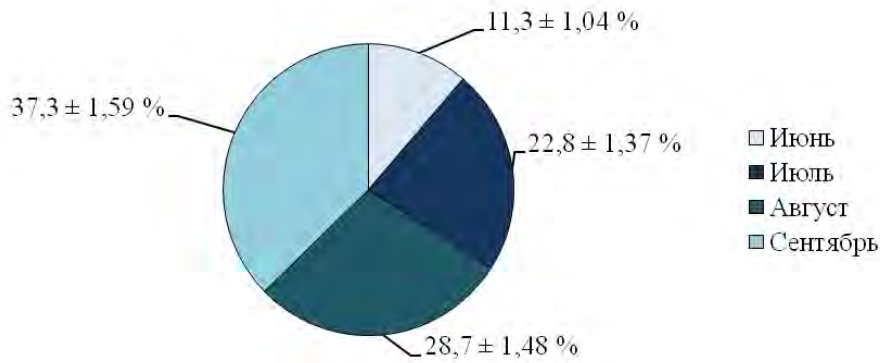


Рисунок 21 – Удельный вес выделенных штаммов *V. parahaemolyticus* по месяцам мониторинга

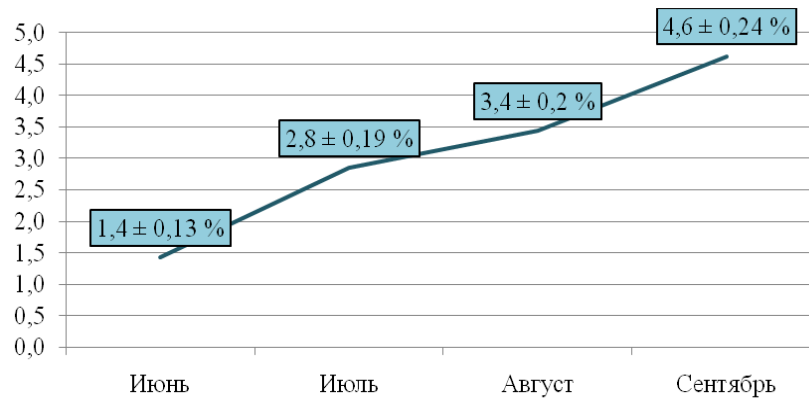


Рисунок 22 – Динамика высеваемости парагемолитического вибриона из поверхностных водоемов Приморского края (2011-2021 гг.)

Максимальные показатели высеваемости парагемолитического вибриона установлены из воды, отобранной в Амурском заливе у железнодорожных станций Санаторная ( $32,1 \pm 3,38$  %) и Седанка ( $30,5 \pm 3,34$  %) (таблица 17). Высокие показатели также установлены в стационарных точках отбора проб воды на рр. Партизанская, Литовка в устьях рек, бухте Литовка в Партизанском районе Приморского края. Для данных водоемов этот показатель составил  $28,1 \pm 2,69$  % (р. Партизанская),  $26,3 \pm 3,36$  % (бухта Литовка) и  $26,2 \pm 3,0$  % (р. Литовка). Объяснением обнаружения галофильного вибриона в речной воде служит способность *V. parahaemolyticus* к росту в диапазоне содержания солей от 3-6 %, поэтому высеваемость из водоемов с невысокой соленостью на границе смешения морской и речной воды вполне закономерна. Однако, в целом, *V. parahaemolyticus* преимущественно обнаруживался в пробах морской воды, отобранной в бухтах и заливах Приморского края. Так, из 8 879 проб морской воды



изолировано 598 штаммов вибриона с показателем высеваемости  $6,7 \pm 0,26$  %, а из 20 944 проб речной воды – 325 изолятов с высеваемостью в  $1,6 \pm 0,08$  %.

Таблица 17 – Высеваемость парагемолитического вибриона по стационарным точкам отбора проб воды в Приморском крае (2011-2021 гг.)

<b>Стационарные точки. Показатель высеваемости &gt; 30 %</b>
Амурский залив (пляж ж/д станции Санаторная), Амурский залив (пляж ж/д станции Седанка)
<b>Стационарные точки. Показатель высеваемости 10-30 %</b>
р. Партизанская (устье), бух. Литовка (пляж пос. Волчанец), р. Литовка (устье), р. Партизанская (протока), Амурский залив (пляж ж/д станции Океанская), р. Богатая, р. Каменка (устье), залив Находка (пляж УПТК), оз. Лебединное, залив Восток (бухта у яхт-клуба «Антарес»), залив Восток (пляж у лесозавода), бух. Федорова (пляж МГУ), залив Находка (пляж «Волна»), Амурский залив (пляж у мыса Кунгасный), р. Объяснения, бух. Лазурная, Амурский залив (пляж у мыса Токаревского), бух. Федорова
<b>Стационарные точки. Показатель высеваемости 0-10 %</b>
Слияние рек Глинка и Хмыловка, бух. Средняя, Амурский залив (пляж Спортивной Гавани), б. Щитовая, пляж п. Рыбачий, оз. Соленое, залив Находка (пляж у угольного комплекса), канал 1 (о. Русский), бух. Рифовая (пляж), бухта в п. Аякс, ручей в п. Горностай, р. Седанка, Уссурийский залив (ДОЦ «Океан»), бух. Козина (пляж Золотари), бух. Подосенова (пляж п. Приисковий), бух. Змеинка (мыс Абросимова), Уссурийский залив (ДОЦ «Юнга»), залив Находка (пляж п. Береговой), бух. Рифовая (пляж п. Ю-Морской), бух. Улисс, Уссурийский залив (база отдыха «Садко»), бух. Экспедиция, бух. Отрадная, бух. Баклан (п. Славянка), бух. Славянка (возле СРЗ), ручей 1 (б. Лазурная), р. Вторая, залив Находка (пляж Песчаный), канал 2 (о. Русский), бух. Рифовая (п. Ливадия), бух. Тихая, р. Лазурная, р. Черная, бух. Анна, бух. Прозрачная, бух. Патрокл, бух. Нарва (п. Безверхово), ручей в п. Рыбачий, р. Первая, оз. Лебединное (падь Ободная)

В  $97,3 \pm 0,53$  % случаях изоляты *V. parahaemolyticus* обнаруживались преимущественно в местах рекреационного водопользования с достоверным превышением показателя высеваемости для данного типа стационарных точек ( $t=6,72$ ,  $p \geq 95,5$  %) (таблица 18). В точках отбора проб, находящихся в зонах санитарной охраны, парагемолитический вибрион не обнаружен. Из воды в местах сброса сточных вод выделено лишь 25 изолятов парагемолитического вибриона.

Таблица 18 – Высеваемость паразитического вибриона из проб воды поверхностных водоемов в зависимости от типа стационарных точек (2011-2021 гг.)

Тип стационарной точки	Количество проб воды поверхностных водоемов	Количество штаммов	Удельный вес, (%±m <sub>p</sub> )	Показатель высеваемости, (%±m <sub>p</sub> )
ЗСО	4 355	0	0	0
ЗР**	18 731	898	97,3 ± 0,53	4,7 ± 0,15
ССВ***	3 757	25	2,7 ± 0,53	0,6 ± 0,13
ТГВ_ЗСО	546	0	0	0
ТГВ_ЗР	1 782	0	0	0
ТГВ_ССВ	536	0	0	0
ТГВ****	116	0	0	0
Всего	29 823	923	100	3,1 ± 0,1

Примечание: \* - зона санитарной охраны, \*\* - сброс сточных вод, \*\*\* - зона рекреации, \*\*\*\* - трансграничный водоем

Таким образом, анализ ситуации по холере в Приморском крае показал, с одной стороны, существование внешних рисков завоза возбудителя на территорию за счет миграционной активности, в т.ч. с неблагополучными по холере странами, а с другой стороны, наличие внутренних предрасполагающих (благоприятные условия поверхностных водоемов) для накопления возбудителя в случае завоза.

Что касается галофилезной инфекции, то в ее развитии имеют значение как внутренние риски, а именно существование благоприятных для персистенции галофильных вибрионов водных объектов и их ежегодное обнаружение в ООС, так и внешние – риск завоза за счет миграционной активности населения, а также заноса балластными водами судов.

## ГЛАВА 4. ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИКРООРГАНИЗМОВ РОДА *VIBRIO*, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМАХ ПРИМОРСКОГО КРАЯ

### 4.1 Фенотипические свойства штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Приморского края

На территории Приморского края, как уже отмечалось в предыдущей главе, в поверхностных водоемах на фоне эпидемиологического благополучия по холере обнаруживаются нетоксигенные холерные вибрионы, в частности O1 серогруппы Эль Тор, R-варианты и вибрионы не O1/O139 серогрупп.

С целью анализа популяций холерного вибриона в поверхностных водоемах Приморского края по комплексу фенотипических свойств, в т.ч. культурально-морфологических, биохимических, серологических, проведено исследование 142 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор, R-варианта, не O1/O139 серогрупп, выделенных с 1976 г. по 2017 г. на территории Приморского края при различных эпидемиологических ситуациях (27 – от людей, из поверхностных водоемов и сточных вод в период вспышки в 1999 г., 115 штаммов – из водоемов края на фоне эпидблагополучия).

По микробиологическим свойствам все штаммы *V. cholerae* независимо от эпидемиологической ситуации и объекта выделения характеризуются типичными для рода *Vibrio* характеристиками – грамтрицательные изогнутые палочки, подвижные, индофенолоксидазоположительны, ферментируют глюкозу в аэробных и анаэробных условиях до кислоты (без газа) на среде Хью-Лейфсона, декарбоксилируют лизин и орнитин и не обладают дигидролазой аргинина.

Из 142 анализируемых штаммов *V. cholerae*  $76,7 \pm 3,5$  % изолятов (n=109) агглютинируются холерной диагностической O1 сывороткой,  $9,8 \pm 2,5$  % – холерной RO-сывороткой (n=14) (таблица 19). Девятнадцать штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы не агглютинировались ни одной из вышеуказанных холерных диагностических сывороток, в том числе холерной O139 сывороткой. Поскольку в настоящей работе в рамках определения фенотипических свойств холерного вибриона первостепенное внимание уделялось выделяемым из водоемов *V. cholerae* O1 и R-вариантам, то дальнейшее исследование штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы не осуществлялось.

Среди исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы  $54,1 \pm 4,7$  % (n=59) относится к сероварианту Инаба,  $45,8 \pm 4,7$  % – к Огава (включая 27 изолятов, выделенных во время вспышки) (таблица 19). Необходимо отметить, что у отдельных выделенных из поверхностных водоемов Приморского края штаммов холерного вибриона отмечается снижение агглютинабельности. Так, реакция агглютинации на уровне  $\frac{1}{2}$  титра O1 сывороткой выявлена у шести *V. cholerae* 1977, 1978 и 1982 гг. изоляции, RO-сывороткой – у трех штаммов *V. cholerae*, выделенных в 2000 г. (таблица 19).

Таблица 19 – Серологические свойства исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, R-варианта, не O1/O139 серогруппы

№	Эпидситуация	Количество штаммов <i>V. cholerae</i>	Агглютинабельность холерными диагностическими сыворотками				
			«O1»	«O139»	«RO»	«Инаба»	«Огава»
1	Эпидемическая вспышка (1999 г.)	n=27	«+» ДТ* (n=27)	0	0	0	«+» ДТ (n=26) + $\frac{1}{2}$ ДТ (n=1)
2	Эпидемиологическое благополучие (1976-2017 гг.)	n=115	«+» ДТ (n=76) «+» $\frac{1}{2}$ ДТ (n=6)	0	«+» ДТ (n=11) «+» $\frac{1}{2}$ ДТ (n=3)	«+» ДТ (n=50) «+» $\frac{1}{2}$ ДТ (n=9)	«+» ДТ (n=19) «+» $\frac{1}{2}$ ДТ (n=4)
3	ВСЕГО	n=142	«+» ДТ (n=103) + $\frac{1}{2}$ ДТ (n=6)	0	«+» ДТ (n=11) + $\frac{1}{2}$ ДТ (n=3)	«+» ДТ (n=49) «+» $\frac{1}{2}$ ДТ (n=10)	«+» ДТ (n=45) + $\frac{1}{2}$ ДТ (n=5)

Примечание: \* - диагностический титр

Определение биохимических свойств исследуемых штаммов холерного вибриона O1 и R-вариантов не выявило отклонений их свойств: все изоляты ферментируют сахарозу, маннозу, маннит и не ферментируют арабинозу и лактозу.

Гемолитической активностью обладают  $77,2 \pm 3,9$  % культур холерного вибриона O1 и R-варианта, отнесенных к периоду эпидблагополучия. Выделенные при эпидосложнении штаммы холерного вибриона охарактеризованы как гемолизотрицательные и являются эпидемически опасными вариантами.

При анализе чувствительности к холерным диагностическим бактериофагам классическому и эльтор установлена неоднородность признака у выделенных в

различные периоды на территории края изолятов. К фагу эльтор чувствительность выявлена у всех штаммов *V. cholerae* O1, выделенных при вспышке от людей и из ООС, в то время как выделенные из поверхностных водоемов в период эпидблагополучия лишь в  $54,1 \pm 4,6$  % случаев оказались чувствительны к нему. Также выявлена лизабельность классическим фагом штаммов вибриона, выделенных из воды при вспышке в г. Владивостоке: из десяти водных штаммов пять лизируются классическим фагом в цельном разведении. При анализе чувствительность к данному фагу *V. cholerae* периода эпидблагополучия обращает на себя внимание, что исследуемые штаммы, выделенные с 1976 г. по 1983 г. характеризуются отсутствием чувствительности, а в последующие годы лизирующиеся классическим фагом в цельном разведении изоляты стали обнаруживаться чаще. Так, из 20 выделенных в 2010-2017 гг. штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор и R-варианта 13 изолятов оказались чувствительны к фагу классическому. Одиннадцать штаммов *V. cholerae* R-варианта характеризовались отсутствием лизабельности как фагом классическим, так и фагом эльтор.

В отношении других биоваропределяющих тестов (образование ацетилметилкарабинола в реакции Фогес-Проскауэра и чувствительность к полимиксину) штаммы холерного вибриона независимо от эпидзначимости в большинстве случаев однородны. Исключение составили четыре штамма холерного вибриона, не образующие ацетилметилкарабинол: *V. cholerae* O1 Инаба (р. Раздольная, 1978 г.), *V. cholerae* O1 Огава (р. Раздольная, 1978 г., оз. Соленое, 2017 г.), *V. cholerae* R-вариант (р. Горностай, 2000 г.) и три штамма *V. cholerae*, чувствительные к полимиксину: *V. cholerae* O1 Инаба (р. Репьевка, 1994, 2008 гг.), *V. cholerae* R-вариант (р. Бакарасевка, 1991 г.). Также однородными штаммы холерного вибриона оказались в реакции гемагглютинации с куриными эритроцитами: для всех исследуемых изолятов тест оказался положительным.

Таким образом, установлено, что выделенные на территории Приморского края штаммы холерного вибриона характеризуются преимущественно типичными фенотипическими свойствами. Результаты анализа эпидемической опасности *V. cholerae* по фенотипическим свойствам соответствуют эпидемиологической ситуации, в период которой они были изолированы. В отдельных случаях преимущественно в ООС в период эпидемиологического благополучия обнаруживаются холерные вибрионы атипичные по таким свойствам, как агглютинабельность

холерными диагностическими сыворотками, чувствительность к фагу классическому и отсутствие лизиса фагом эльтор.

#### 4.2 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *V. cholerae*

По структуре генетических локусов, определяющих патогенный, пандемичный и персистентный потенциал, холерному вибриону присуща высокая вариабельность, являющаяся следствием микроэволюции патогена в изменяющихся условиях существования в различных экологических нишах. Как известно, водная среда и сопутствующая микрофлора играют важную роль в персистенции холерного вибриона, в формировании новых клонов патогена, их распространении с последующим возможным закреплением в благоприятных участках водоема, а также в инфицировании человека при водопользовании. Соответственно, исследование молекулярно-генетических характеристик популяций холерного вибриона в поверхностных водоемах на территории с длительной циркуляцией микроорганизма, к которым относится Приморский край, позволит получить данные об особенностях генотипов в территориальном и временном аспектах, что важно при анализе вновь выявляемых штаммов *V. cholerae* в рамках микробиологического мониторинга.

По результатам проведенного молекулярно-генетического анализа охарактеризованных по комплексу фенотипических признаков 142 штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, R-варианта, *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп, установлено, что выделенные из поверхностных водоемов в период эпидемиологического благополучия 115 штаммов, в отличие от выделенных в период эпидосложнения и взятых в качестве группы сравнения, характеризовались отсутствием основных детерминант патогенности – генов биосинтеза холерного токсина (*ctxA*) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (*tcpA*), что согласуется с результатами бактериологического исследования (таблица 20).

В геномах большинства нетоксигенных штаммов *V. cholerae* установлено наличие видоспецифических генов *hlyA* ( $73,9 \pm 4,09$  %) и *toxR* ( $89,6 \pm 2,84$  %), детерминирующих такие факторы как гемолизин и белок-регулятор ToxR, соответственно (таблица 20).

Таблица 20 – Молекулярно-генетическая характеристика *V. cholerae*, изолированных в Приморском крае с 1976 г. по 2017 г.

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Количество штаммов	Основные детерминанты патогенности		Видоспецифические гены		Серогруппо-специфические	
		<i>ctxA</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxR</i>	<i>hlyA</i>	<i>wbeT/wbeO1</i>	<i>wbfR/wbeO139</i>
<i>V. cholerae</i> O1 серогруппы (эпидосложнение)	27	27* (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	0
<i>V. cholerae</i> (эпидблагополучие), из них:	115	0	0	103 (89,6 ± 2,84 %)	85 (73,9 ± 4,09 %)	82 (100 %)	0
- <i>V. cholerae</i> O1 серогруппы	82	0	0	77 (66,9 ± 4,38 %)	56 (48,7 ± 4,66 %)	82 (100 %)	0
- <i>V. cholerae</i> R-вариант	14	0	0	14 (12,1 ± 3,04 %)	10 (8,7 ± 2,62 %)	0	0
- <i>V. cholerae</i> не O1/O139 серогруппы	19	0	0	12 (10,4 ± 2,84 %)	19 (1,7 ± 1,20 %)	0	0

Примечание: \* - указано количество штаммов *V. cholerae* с наличием анализируемого гена и их удельный вес (%±m<sub>p</sub>)

В отдельных случаях обнаруживаются варианты холерного вибриона, у которых отсутствуют вышеуказанные детерминанты, однако генотипа *hlyA<sup>-</sup>toxR<sup>-</sup>* у исследуемых штаммов не выявлено. Отсутствие гена *hlyA* установлено у 26,1 % штаммов, выделенных в период с 1976 г. по 2014 г. из проб воды различных водоемов (пр. Раздольная, Славянка, Седанка, Нестеровка, Репьевка, Комаровка, Раковка, озеро Лебединое, ручей 2). В отношении гена *toxR* установлено, что среди 12 штаммов *V. cholerae*, у которых данный ген отсутствует, семь – представлены *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы.

Наличие или отсутствие генетических детерминант принадлежности к O1 (*wbeT/wbeO1*) и O139 (*wbfR/wbeO139*) серогруппам *V. cholerae* соответствовало фенотипическому определению указанного признака в реакции агглютинации с соответствующими сыворотками. Так, наличием гена *wbeT/wbeO1* характеризуются 100 % штаммов *V. cholerae*, агглютинирующихся диагностической холерной O1 сывороткой (таблица 20). Четырнадцать изолятов *V. cholerae* R-варианта характеризуются отсутствием локусов биосинтеза O1 антигена *wbeT* и *wbeO1*, как и девятнадцать *V. cholerae* не O1/O139.

При дальнейшем молекулярно-генетическом анализе выделенных из поверхностных водоемов штаммов холерного вибриона установлена их неоднородность по комплексу отдельных дополнительных генов патогенности (*rtxA*, *rtxC*, *hapA*, *ompU*),

пандемичности (*tnpO183*, *proO490*) и персистенции (*mshA*, *mshQ*, *vpsR*) (таблица 21, 22). Если по наличию генов *rtxA* и *rtxC*, входящих в состав цитотоксического кластера MARTX, популяции водных *V. cholerae* практически однородны и характеризуются в  $99,1 \pm 0,88$  % случаях присутствием данных детерминант, то по другим локусам, ассоциированным с патогенностью – гемагглютининпротеазе *hapA* и порину наружной мембраны *ompU* выявлена их вариабельность. Стоит отметить, что гены *rtxA*, *rtxC*, также являющиеся биоварспецифичными, отсутствуют лишь у одного штамма холерного вибриона не O1/O139 серогруппы, что по данным других авторов не редкость для этой группы вибрионов [36].

В отношении гена гемагглютининпротеазы *hapA* установлено, что для большинства ( $91,3 \pm 2,62$  %) изолятов *V. cholerae* O1 Эль Тор, *V. cholerae* R-варианта, *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы (таблица 21) характерно его наличие, в то время как другой ген *ompU* среди исследуемых изолятов холерного вибриона установлен только у  $46,9 \pm 4,65$  % *V. cholerae* с низким удельным весом ( $6,9 \pm 2,36$  %) среди *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы (таблица 21).

Таблица 21 – Молекулярно-генетическая характеристика *V. cholerae*, изолированных в Приморском крае с 1976 г. по 2017 г. по комплексу дополнительных детерминант патогенности

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Количество штаммов	Дополнительные детерминанты патогенности			
		<i>rtxA</i>	<i>rtxC</i>	<i>hapA</i>	<i>ompU</i>
<i>V. cholerae</i> O1 серогруппы (эпидосложнение)	27	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)
<i>V. cholerae</i> (эпидблагополучие), из них:	115	114 ( $99,1 \pm 0,88$ %)	114 ( $99,1 \pm 0,88$ %)	105 ( $91,3 \pm 2,62$ %)	54 ( $46,9 \pm 4,65$ %)
- <i>V. cholerae</i> O1 серогруппы	82	82 ( $71,3 \pm 4,2$ %)	82 ( $71,3 \pm 4,2$ %)	78 ( $67,8 \pm 4,35$ %)	34 ( $29,6 \pm 4,25$ %)
- <i>V. cholerae</i> R-варианта	14	14 ( $12,1 \pm 3,04$ %)	14 ( $12,1 \pm 3,04$ %)	13 ( $11,3 \pm 2,95$ %)	12 ( $10,4 \pm 2,84$ %)
- <i>V. cholerae</i> не O1/O139 серогруппы	19	18 ( $15,7 \pm 3,39$ %)	18 ( $15,7 \pm 3,39$ %)	14 ( $12,1 \pm 3,04$ %)	8 ( $6,9 \pm 2,36$ %)

Примечание: \* - указано количество штаммов *V. cholerae* с наличием анализируемого гена и их удельный вес ( $\% \pm m_p$ )

Интересен факт обнаружения у нетоксигенных *V. cholerae* фрагмента *tnpO183* «острова пандемичности» VSP-I, характерного для эпидемически значимых изолятов. Идентифицированные штаммы с генотипом *tnpO183*<sup>+</sup> были выделены из проб воды



различных водоемов – рр. Репьевка (1994, 2007, 2008 гг.), Раздольная (1979, 2007 гг.), бухта Врангеля (1978 г.), Славянка (1998 г.), второй ручей, впадающий в бухту Лазурная (2006 г.), Седанка (2017 г.). Кроме этого, в одном случае у нетоксигенного изолята *V. cholerae* R-варианта обнаружен ген *proO490* второго «острова пандемичности» VSP-II на фоне отсутствия гена *tnpO183* (таблица 22).

Таблица 22 – Детекция детерминант пандемичности и персистенции в штаммах *V. cholerae*, изолированных в Приморском крае с 1976 г. по 2017 г.

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Количество штаммов	Детерминанты островов пандемичности VSP-I и VSP-II		Детерминанты острова персистенции		
		<i>tnpO183</i>	<i>proO490</i>	<i>mshA</i>	<i>mshQ</i>	<i>vpsR</i>
<i>V. cholerae</i> O1 серогруппы (эпидосложнение)	27	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)	27 (100 %)
<i>V. cholerae</i> (эпидблагополучие), из них:	115	11 (9,6±2,74 %)	1 (0,9±0,88 %)	80 (69,5±4,29 %)	87 (75,6±4,00 %)	115 (100 %)
- <i>V. cholerae</i> O1 серогруппы	82	9 (7,8±2,50 %)	0	72 (62,6±4,51 %)	81 (70,4±4,25 %)	82 (71,3±4,2 %)
- <i>V. cholerae</i> R-вариант	14	1 (0,9±0,88 %)	1 (0,9±0,88 %)	8 (6,9±2,36 %)	4 (3,4±1,68 %)	14 (12,1±3,04 %)
- <i>V. cholerae</i> не O1/O139 серогруппы	19	1 (0,9±0,88 %)	0	0	2 (1,7±1,20 %)	19 (100 %)

Примечание: \* - указано количество штаммов *V. cholerae* с наличием анализируемого гена и их удельный вес (%±m<sub>p</sub>)

Одним из способов выживания холерного вибриона в объектах окружающей среды является формирование биопленок на абиотических и биотических поверхностях, опосредованное комплексом факторов микроорганизма. Один из них – маннозо-чувствительные гемагглютинирующие пили адгезии, продукция которых кодируется кластером генов *msh* в составе «острова персистенции» EPI. В данном исследовании ПЦР тестирование штаммов *V. cholerae* проводилось на наличие генов *mshA* и *mshQ*, ответственных за структуру маннозо-чувствительных пилей адгезии, и гена биосинтеза экзополисахарида *vpsR*. Анализ наличия вышеуказанных детерминант персистенции показал также гетерогенность популяции нетоксигенного холерного вибриона. Установлено, что данные гены обнаружены у всех клинических штаммов токсигенного *V. cholerae* (100 %) и у большинства нетоксигенных водных вибрионов (69,5 ± 4,29 % – *mshA*, 75,6 ± 4,00 % – *mshQ*, 100 % – *vpsR*) (таблица 22). Однако детерминанты *mshA* и

*mshQ* практически отсутствуют у *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы: все штаммы являются *mshA*<sup>-</sup> и в большинстве – *mshQ*<sup>-</sup>.

Кластерный анализ ПЦР-генотипов исследуемых нетоксигенных штаммов холерного вибриона позволил выявить 28 генотипов, определенных как комбинация представленных выше генетических локусов (рисунок 21).

Наиболее представленный по числу штаммов генотип *ctxA*<sup>-</sup>*tcpA*<sup>-</sup>*hlyA*<sup>-</sup>*toxR*<sup>+</sup>*wbeT*<sup>+</sup>*rtxA*<sup>+</sup>*rtxC*<sup>+</sup>*hapA*<sup>+</sup>*ompU**tnpO183*<sup>-</sup>*proO490*<sup>-</sup>*mshA*<sup>+</sup>*mshQ*<sup>+</sup>*vpsR*<sup>+</sup> (обозначен как генотип 11) был определен у 22 исследуемых изолятов *V. cholerae* O1 Эль Тор (19,1 %), изолированных на территории края с 1976 г. по 2014 г. (рисунок 23, таблица 22). Также наиболее встречаемыми генотипами являются 5 и 14, идентифицированные у 20 и 13 штаммов холерного вибриона соответственно, и отличающиеся от генотипа 11 по наличию генов *hlyA* (генотипы 5, генотип 14) и *ompU* (генотип 5).

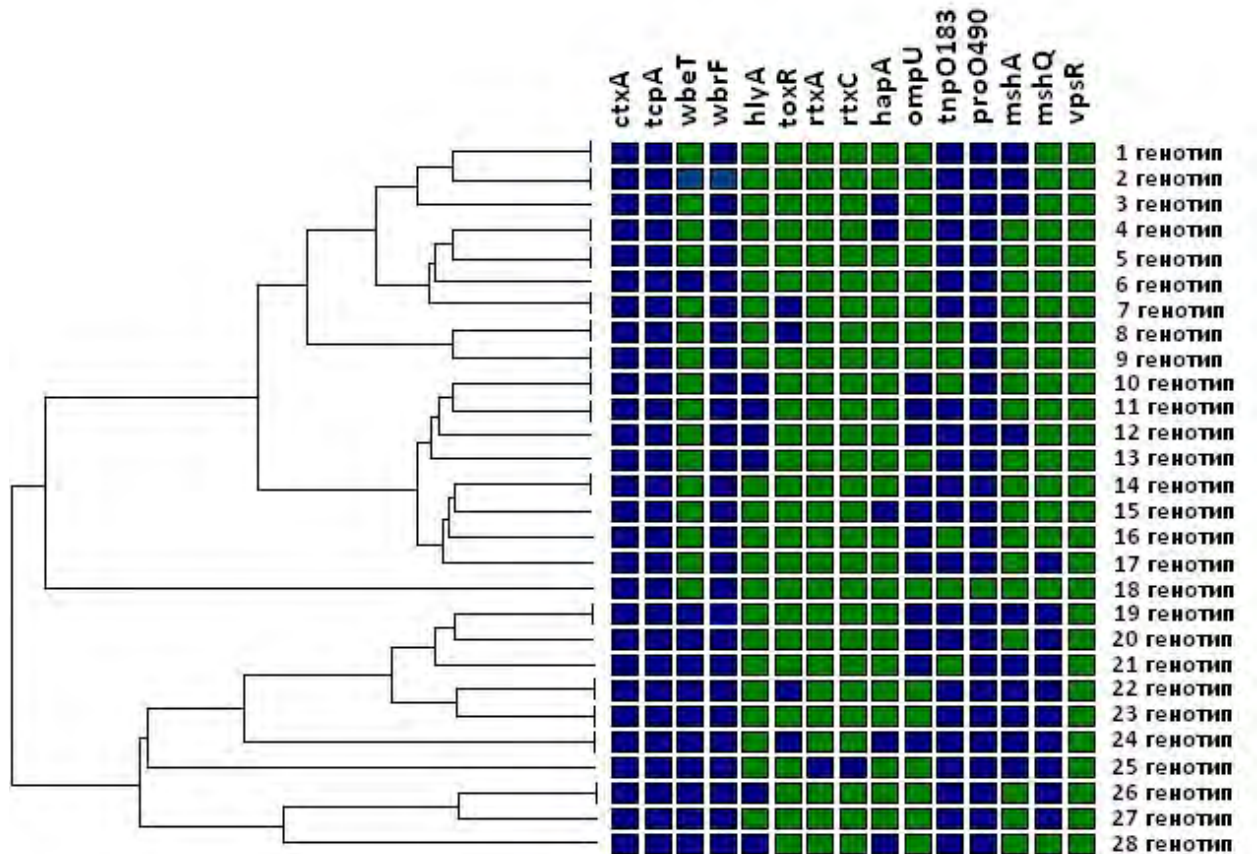


Рисунок 23 – Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа ПЦР-генотипов штаммов *V. cholerae* (алгоритм UPGMA)

Отдельным кластером представлены *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы и *V. cholerae* R-варианта, у которых, как упоминалось выше, отсутствуют гены биосинтеза

O1 антигена. Кроме этого, у данных групп штаммов преимущественно отсутствуют гены персистенции *mshA* и *mshQ* (рисунок 23).

В единичных случаях идентичные генотипы были объединены местом выделения штамма и годом изоляции (таблица 23). В большинстве случаев идентичные генотипы не имели ни территориальной, ни временной приуроченности, что обуславливает целесообразность использования для более точной идентификации геновариантов холерного вибриона других методов анализа, характеризующихся более высокой дискриминирующей способностью (например, MLVA).

Таблица 23 – Территориальное и временное распределение ПЦР генотипов штаммов *V. cholerae*

Гено-тип	Количество штаммов	Год выделения штамма	Территория выделения	Водоем
1	8 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1984, 1990, 2004, 2007, 2008	Уссурийск, Находка, п. Пограничный	рр. Раздольная, Нестеровка, оз. Лебяжье
2	3 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант, не O1/O139)	1995, 2016, 2017	Владивосток, Находка, Уссурийск	рр. Славянка, Горностай, оз. Соленое
3	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2017	Находка	оз. Соленое
4	2 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1978	Уссурийск, Арсеньев	рр. Раздольная, Арсеньевка
5	13 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1978, 1990, 2002, 2004, 2006, 2007, 2011, 2016, 2017	Владивосток, Находка, Уссурийск, п. Пограничный	рр. Раковка, Каменка, Нестеровка, Репьевка, Комаровка, Партизанская, бух. Лазурная, бух. Врагеля, оз. Соленое
6	1 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	2010	Хасанский район	р. Тумаган
7	2 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1978, 2004	Находка, Уссурийск	рр. Раздольная, Каменка
8	3 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1978, 1979, 2006	Владивосток, Находка, п. Покровка	р. Раздольная, ручей 2, бух. Врангеля
9	4 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1994, 2006, 2009	Владивосток, Находка, Уссурийск	рр. Партизанская, Репьевка, ручей 2
10	2 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2007, 2008	Уссурийск	р. Репьевка
11	22 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1976, 1977, 1979, 1981, 1982, 1991, 1993, 1994, 2007, 2008, 2010, 2014	Владивосток, Находка, Уссурийск, п. Пограничный	рр. Раздольная, Репьевка, Славянка, Раковка, Седанка, Комаровка, Борисовка, ручей 2, оз. Лебединое
12	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1995	Уссурийск	р. Раздольная
13	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2014	Владивосток	р. Седанка
14	20 ( <i>V. cholerae</i> O1)	1976, 1977, 1978, 1979, 1999, 2006, 2007, 2008, 2010	Владивосток, Находка, Уссурийск, с. Барановка, п. Рыбачий, п. Ново-Никольск	рр. Раздольная, Репьевка, Славянка, Комаровка, Раковка, Нестеровка, Борисовка, Бакарасевка, ручей 1, ручей бух. Лазурная
15	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2014	п. Покровка	р. Раздольная
16	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2007	Уссурийск	р. Раздольная
17	1 ( <i>V. cholerae</i> O1)	2006	Владивосток	Ручей 2
18	1 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	1998	п. Ново-Никольск	р. Славянка

## Продолжение таблицы 23

19	6 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант, не O1/O139)	2000, 2016, 2017	Владивосток, Находка	р. Богатая, Амурский залив у жд станции Санаторная, оз. Соленое, бух. Отрада
20	1 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	2000	Владивосток	ручей бух. Лазурная
21	1 ( <i>V. cholerae</i> не O1/O139)	2017	Владивосток	р. Седанка
22	2 ( <i>V. cholerae</i> не O1/O139)	2016, 2017	Находка	оз. Соленое
23	7 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант, не O1/O139)	2016, 2017	Владивосток, Находка	р. Лазурная, оз. Соленое, канал 1
24	5 ( <i>V. cholerae</i> не O1/O139)	2016, 2017	Владивосток, Уссурийск	рр. Седанка, Раковка, Первая речка, Амурский залив у жд станции Санаторная
25	1 ( <i>V. cholerae</i> не O1/O139)	2015	Владивосток	р. Лазурная
26	3 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	1991, 1999, 2000	Владивосток, Михайловский район	рр. Бакарасевка, Седанка, р. Горностай
27	1 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	1998	Владивосток	бух. Лазурная
28	1 ( <i>V. cholerae</i> R-вариант)	2010	Хасанский район	р. Тумаган

Таким образом, показана высокая вариабельность циркулирующих в водоемах Приморского края в период эпидемиологического благополучия вариантов холерного вибриона по комплексу молекулярно-генетических признаков. Ввиду отсутствия четких закономерностей распределения ПЦР генотипов в зависимости от места и времени изоляции целесообразно проведение дальнейших молекулярно-генетических исследований для выявления данных закономерностей.

#### 4.3 Фенотипические свойства штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных на территории Приморского края

Как уже было установлено, парегемолитический вибрион является более распространенным микроорганизмом в поверхностных водоемах Приморского края, чем холерный, а случаи ПТИ, обусловленные *V. parahaemolyticus*, на территории региона регистрируются практически ежегодно. Несмотря на это, в настоящее время изучению данного возбудителя, выделяемого как из клинического материала, так и из поверхностных водоемов, уделяется недостаточно внимания.

Исследование фенотипических свойств парегемолитического вибриона по комплексу культурально-морфологических, биохимических свойств проводилось в отношении изолированных в Приморском крае 17 клинических штаммов

парагемолитического вибриона, выделенных с 2012 г. по 2017 г. и 38 водных изолятов вибриона – с 2012 г. по 2014 г. Выделенные в последующем (2015-2017 гг.) из поверхностных водоемов штаммы *V. parahaemolyticus* (n=65) были идентифицированы MALDI-ToF масс-спектрометрическим методом, ввиду достоверности получаемых результатов, определенных ранее при комплексном исследовании парагемолитического вибриона масс-спектрометрическим, бактериологическим, молекулярно-генетическим методами.

Анализ фенотипических свойств клинических и водных изолятов *V. parahaemolyticus* осуществлялся на питательных средах с добавлением 1,5 % NaCl по микробиологическим тестам, определяющим родовую и видовую принадлежность. Патогенные свойства клинических вибрионов определялись на среде Вагацума (феномен Канагава).

В ходе исследования установлено, что штаммы *V. parahaemolyticus* характеризуются преимущественно типичными свойствами рода *Vibrio*. Однако, при анализе декарбоксилазной активности в отношении орнитина, проявляющейся у штаммов парагемолитического вибриона в 100 % случаях в соответствии с МУК «Лабораторная диагностика холеры» [29], у двух водных изолятов *V. parahaemolyticus* ( $5,3 \pm 3,63$  %) выявлено отсутствие такой активности (таблица 24).

Таблица 24 – Результаты исследования фенотипических свойств *V. parahaemolyticus*

№		Количество штаммов	Тесты принадлежности к роду <i>Vibrio</i>			
			Ферментация глюкозы в аэробных/анаэробных условиях	Лизин декарбоксилазная активность	Орнитин декарбоксилазная активность	Аргинин дигидролазная активность
1	Клинические штаммы <i>V. parahaemolyticus</i>	17*	17 (100%)	17 (100 %)	17 (100 %)	0 %
2	Водные штаммы <i>V. parahaemolyticus</i>	38	38 (100%)	38 (100 %)	36 (94,7 ± 3,63 %)	0 %
3	ВСЕГО	55	55 (100%)	55 (100 %)	53 (96,3 ± 2,54 %)	0 %

Примечание: \* - с субкультурой штамма 2-17

При анализе биохимической активности в отношении сахарозы, маннозы, арабинозы, лактозы, инозита, маннита, мальтозы установлено, что 100 % клинических и водных изолятов ферментируют такие сахара, как манноза, манит, и не ферментируют

сахарозу, лактозу, инозит, что является типичным свойством парагемолитического вибриона. Ферментация арабинозы и мальтозы установлена большинством исследованных штаммов –  $90,9 \pm 3,87 \%$  и  $92,7 \pm 3,5 \%$ , соответственно. Не проявляющие активность по данным сахарам штаммы *V. parahaemolyticus* представлены изолятами, выделенными из объектов окружающей среды. Часть исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* характеризуется способностью к индолообразованию ( $30,9 \pm 6,2 \%$ ) и выделению сероводорода ( $14,5 \pm 4,74 \%$ ). В реакции Фогес-Проскауэра все штаммы не образуют ацетилметилкарбинол, что типично для вида *V. parahaemolyticus*.

Наибольшая вариабельность фенотипических свойств парагемолитического вибриона установлена в отношении ростовых свойств на пептонной воде с добавлением различных концентраций NaCl (от 0 % до 10 %). Удельный вес штаммов парагемолитического вибриона, дающих рост на среде без соли –  $32,7 \pm 6,3 \%$ , с 1,5 % NaCl – 100 %, 3 % NaCl – 100 %, 6 % NaCl – 100 %, 8 % NaCl –  $52,7 \pm 6,7 \%$ , 10 % NaCl –  $10,9 \pm 4,2 \%$ . При этом для всех клинических штаммов вибриона было характерно отсутствие роста на пептонной воде без добавления соли и с содержанием 8 % и 10 % соли. Водные изоляты *V. parahaemolyticus* оказались менее чувствительными к отсутствию соли и к повышенному его содержанию:  $32,7 \pm 6,3 \%$  (n=18) водных изолята вибриона способны расти в отсутствие NaCl,  $52,7 \pm 6,7 \%$  (n=29) и  $10,9 \pm 4,2 \%$  (n=6) – при наличии NaCl 8 % и 10 %, соответственно.

Группа клинических штаммов парагемолитического вибриона из семнадцати изолятов (2012, 2013, 2014, 2017 гг.) была также исследована на способность гемолизировать эритроциты человека на среде Вагацума (феномен Канагава), являющейся тестом выявления патогенных свойств микроорганизма. Показано, что тринадцать клинических штаммов (в т.ч. субкультура *V. parahaemolyticus* 2-17) (2012, 2017 гг.) характеризуются наличием зон гемолиза, на основании чего они отнесены к Канагава-позитивным изолятам, которые в большинстве случаев обуславливают развитие острых вспышек пищевых токсикоинфекций. Также одним из фенотипических свойств, рассматриваемых как косвенный признак наличия фактора патогенности (TRH), является уреазная активность. В ходе исследования гидролиза мочевины штаммами парагемолитического вибриона выявлено отсутствие уреазной активности у всех клинических и водных изолятов *V. parahaemolyticus*.

При MALDI-ToF масс-спектрометрическом исследовании *V. parahaemolyticus* установлена сопоставимость результатов идентификации по профилю константных белков с данными бактериологического анализа: значение индекса «score value» определено на уровне достоверной видовой принадлежности с максимальными значениями от 2,305-2,514 (таблица 25).

Таблица 25 – MALDI-ToF масс-спектрометрическая идентификация штаммов *V. parahaemolyticus*

Год выделения	Источник выделения	Количество штаммов	Результат идентификации	Уровень совпадения*
2012	Клинический материал	10	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,42
	ООС	7	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,48
2013	Клинический материал	2	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,475
	ООС	21	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,514
2014	Клинический материал	1	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,322
	ООС	10	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,305
2015	ООС	26	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,364
2016	ООС	22	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,407
2017	Клинический материал	4	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,313
	ООС	17	<i>V. parahaemolyticus</i>	2,356

Примечание: \* - обозначено максимальное значение «score value»

Кроме того, эффективность масс-спектрометрического анализа и его диагностическая ценность показана при сопоставлении с данными секвенирования фрагмента генов 16S *rRNA*, *rpoB* выделенного от больной с диагнозом ПТИ в г. Уссурийске (2014 г.) штамма *V. alginolyticus*, первоначально идентифицированного в клиничко-диагностической лаборатории г. Уссурийска как *V. parahaemolyticus*. По результатам MALDI-ToF масс-спектрометрии данный штамм относился к *V. alginolyticus* и характеризовался значением индекса совпадения «score value» 2,153, что соответствовало достоверной идентификация до рода, вероятной – до вида. Аналогичные данные по таксономической принадлежности штамма получены и при сравнительном анализе секвенированных фрагментов генов 16S *rRNA* и *rpoB* в программе Blastn. При этом по гену 16S *rRNA* установлены уровни гомологии 100 % с *Vibrio* spp. (KR870828.1, KP 4525506.1), по гену *rpoB* 99 % гомологии с таковым геном

*V. alginolyticus* SO160 (HQ534030.1). Дополнительный анализ фенотипических свойств исследуемого штамма по основным дифференцирующим тестам показал четкую принадлежность изолята к виду *V. alginolyticus*: штамм ферментировал сахарозу и не ферментировал арабинозу, образовывал ацетилметилкарабинол в реакции Фогес-Проскауэра, имел характерный для алгинолитического вибриона рост на пластинке агара (феномен роения) и рост в пептонной воде с 8 % и 10 % NaCl.

В целом, по результатам проведенного исследования фенотипических свойств изолированных в Приморском крае штаммов *V. parahaemolyticus* установлена типичность изолятов по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. В ряде случаев, преимущественно среди водных изолятов *V. parahaemolyticus*, выявляются атипичные варианты, фенотипические признаки которых не укладываются в схему основных дифференцирующих признаков микроорганизмов рода *Vibrio*.

#### **4.4 Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *V. parahaemolyticus***

Для детекции детерминант патогенности у штаммов парегемолитического вибриона из поверхностных водоемов Приморского края и от больных с пищевыми токсикоинфекциями был проведен информативный и специфичный для определения патогенных свойств парегемолитического вибриона ПЦР-анализ, направленный на детекцию гена прямого гемолизина *tdh*, рассматриваемого в качестве одной из основных детерминант патогенности *V. parahaemolyticus*.

По результатам анализа 80 штаммов парегемолитического вибриона, выделенных из клинического материала (n=17) и поверхностных водоемов Приморского края (n=63), установлено присутствие гена *tdh* у 13 клинических штаммов *V. parahaemolyticus* (включая субкультуру одного из штаммов), изолированных в 2012 г. (n=10) и 2017 г. (n=3) (рисунок 24). Изолированные в 2013, 2014 гг. при спорадических случаях ПТИ *V. parahaemolyticus* не несут гена прямого гемолизина, как и все изоляты вибриона, выделенные из поверхностных водоемов. При этом, обнаружение данного гена в ПЦР среди клинических *V. parahaemolyticus* коррелирует с определением их патогенных свойств на среде Вагацума ( $r_{xy}=1$ , при  $p > 99,9\%$ ).



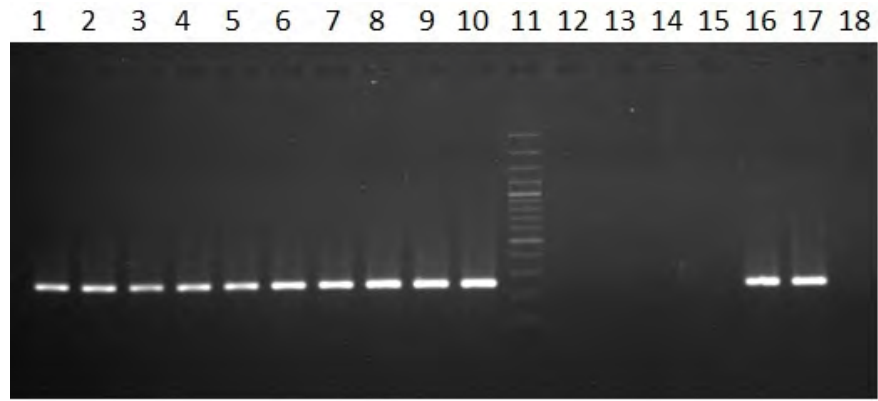


Рисунок 24 – Электорофореграмма продуктов амплификации в ПЦР (детекция гена *tdh*):

1 – *V. parahaemolyticus* 223-12-B; 2 – *V. parahaemolyticus* 226-12-B; 3 – *V. parahaemolyticus* 229-12-B; 4 – *V. parahaemolyticus* 232-12-B; 5 – *V. parahaemolyticus* 235-12-B; 6 – *V. parahaemolyticus* 238-12-B; 7 – *V. parahaemolyticus* 241-12-B; 8 – *V. parahaemolyticus* 244-12-B; 9 – *V. parahaemolyticus* 298-12-B; 10 – *V. parahaemolyticus* 307-12-B; 11 – маркер молекулярного веса GeneRuller 100-3000 п.н.; 12 – *V. parahaemolyticus* 157-13-B; 13 – *V. parahaemolyticus* 160-13-B, 14 – *V. parahaemolyticus* 4-14-B; 15 – *V. parahaemolyticus* 1-17; 16 – *V. parahaemolyticus* 2-17; 17 – *V. parahaemolyticus* 3-17; 18 – контроль отрицательный (дистиллированная вода)

При выборочном анализе геномов 20 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из клинического материала и из поверхностных водоемов, установлено наличие у шести *tdh*<sup>+</sup> штаммов *V. parahaemolyticus* (2012, 2017 гг.) специфичных для пандемичных клонов точек замен в 576, 900, 1196, 1214, 1244, 1463 позициях нуклеотидной последовательности *toxRS*: аденин в 576, 900, 1244 и тимин в 1002, 1196, 1463 (рисунок 25). Выделенные при спорадических случаях заболевания и из поверхностных водоемов края *tdh*<sup>-</sup> штаммы парагемолитического вибриона характеризуются *toxRS/old* последовательностью с гуанином в 576, 900, 1244 позициях, цитозином – в 1002, 1196 и аденином – в 1214, 1463. Кроме этого, у *tdh*<sup>+</sup> штаммов *V. parahaemolyticus* выявлена уникальная рамка считывания *orf8* в составе 237 фага, являющаяся частым маркером пандемичных клонов парагемолитического вибриона.

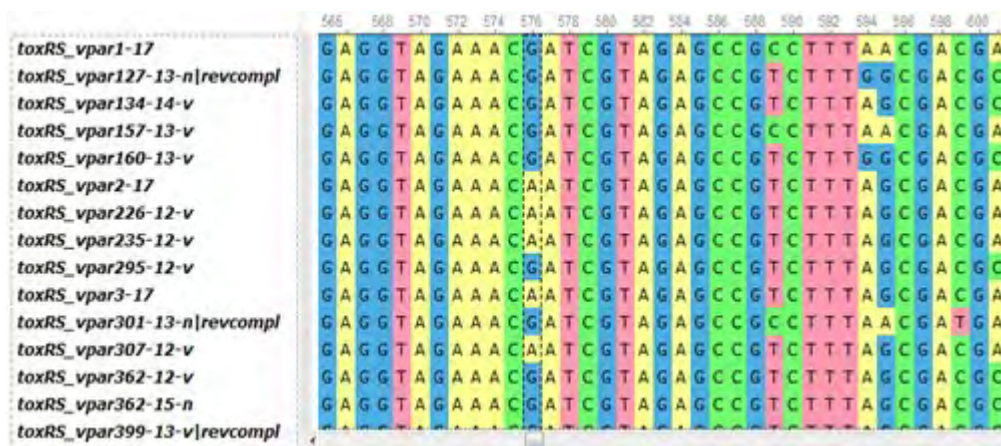


Рисунок 25 – Результаты выравнивания *toxRS* последовательностей исследуемых штаммов параземолитического вибриона в программе Ugene

Ввиду того, что случаи пищевой токсикоинфекции в Приморском крае были вызваны не только *tdh*<sup>+</sup> изолятами *V. parahaemolyticus*, но и не содержащими данный ген, представляется актуальным анализ геномов выделенных изолятов параземолитического вибриона на предмет наличия других детерминант патогенности и «островов патогенности».

Анализ дополнительных детерминант патогенности, входящих в состав систем секреции III типа (Т3SS1 и Т3SS2), в геномах вышеобозначенных 20 изолятов параземолитического вибриона показал их неоднородность по генетическим мишеням, кодирующим эффекторные белки, влияющие на гомеостаз и целостность клеточной стенки. В отношении отдельных детерминант Т3SS1 типа секреции (*vopQ*, *vopS*, *vopR*, *VPA0450*) выявлено их присутствие у всех исследованных вибрионов, независимо от патогенных свойств. Однако, присутствие других детерминант патогенности, таких как *vopA*, *vopC*, *vopT*, *vopL* системы секреции Т3SS2, было выявлено преимущественно у патогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, в одном случае – у штамма *V. parahaemolyticus*, выделенного из поверхностного водоема (таблица 26). Кроме этого у всех изолятов вибриона был выявлен ген мембранного белка МАМ7, способствующий адгезии микроорганизма к клеткам хозяина.

Таблица 26 – Результаты детекции детерминант патогенности в геномах *V. parahaemolyticus*, изолированных в Приморском крае

	Штамм <i>V. parahaemolyticus</i>	MAM7	ТЗSS1				ТЗSS2			
			<i>vopQ</i>	<i>vopS</i>	<i>vopR</i>	<i>VPA 0450</i>	<i>vopC</i>	<i>vopT</i>	<i>vopL</i>	<i>vopA</i>
Клинические штаммы	226-12-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	235-12-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	238-12-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	307-12-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	157-13-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	160-13-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	4-14-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	1-17	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	2-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3-17	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Водные изоляты	315-12-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	362-12-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	295-12-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	127-13-Н	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	301-13-Н	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	356-13-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	360-13-B	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	399-13-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	134-14-B	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	362-15-Н	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Особое значение в патогенезе ПТИ, обусловленной *V. parahaemolyticus*, уделяется «островам патогенности» – группе хромосомных регионов, несущих различные детерминанты патогенности и передающихся посредством горизонтального переноса. В геноме *V. parahaemolyticus* идентифицировано семь таких регионов, размером от 10 тыс. п.н. до 81 тыс. п.н. и обозначенных как VPaI-1 – VPaI-7.

В качестве референсных мишеней для сравнительного анализа взяты нуклеотидные последовательности (открытые рамки считывания, или ORFs), расположенные в составе «островов патогенности» штамма *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633 и являющиеся кодируемыми участками генома.

В результате анализа установлено, что все семь «островов патогенности» со всеми открытыми рамками считывания присутствуют только у патогенных штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от больных в 2012 г. (таблица 27). Изолированные в 2017 г. патогенные изоляты характеризуются наличием шести из семи анализируемых «островов патогенности».

Таблица 27 – Представленность фрагментов «островов патогенности» в геномах штаммов параземолитического вибриона, выделенных в Приморском крае

VPal	ORFs	Штаммы <i>V. parahaemolyticus</i>																			
		226-12-B <i>tdh</i> +	235-12-B <i>tdh</i> +	238-12-B <i>tdh</i> +	307-12-B <i>tdh</i> +	157-13-B <i>tdh</i> -	160-13-B <i>tdh</i> -	4-14-B <i>tdh</i> -	1-17 <i>tdh</i> -	2-17 <i>tdh</i> +	3-17 <i>tdh</i> +	295-12-B <i>tdh</i> -	362-12-B <i>tdh</i> -	315-12-B <i>tdh</i> -	127-13-H <i>tdh</i> -	301-13-H <i>tdh</i> -	356-13-B <i>tdh</i> -	360-13-B <i>tdh</i> -	399-13-B <i>tdh</i> -	134-14-B <i>tdh</i> -	362-15-H <i>tdh</i> -
VPal-1	VP 0380*	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
	VP 0381	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0384	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0389	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0392	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0393	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0394	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0397	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 0399	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
VPal-2	VP 0400	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	VP 0636	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	VP 0638	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	VP 0639	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
	VP 0641	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
VPal-3	VP 0642	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-
	VP 1071	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-
	VP 1072	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1074	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	VP 1075	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	VP 1077	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1080	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1081	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1082	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1083	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1084	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1085	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1086	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1087	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 1088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	VP 1089	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	VP 1091	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP 1092	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
VP 1093	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
VP 1095	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
VPal-4	VP 2131	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2132	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2133	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2134	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2135	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2136	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2137	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2138	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2139	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	VP 2140	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-



Продолжение таблицы 27

VP 1387	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP 1388	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP 1389	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
VP 1390	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
VP 1393	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP 1394	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VP 1395	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VP 1396	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VP 1397	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
VP 1398	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+

Примечание: \* - синим цветом обозначены открытые рамки считывания, кодирующие известные белки

В отличие от патогенных изолятов, непатогенные клинические и водные изоляты *V. parahaemolyticus* вариабельны по структуре отдельных «островов патогенности» (таблица 27).

У всех изолятов этой группы выявлено наличие только одного интактного «острова патогенности» VPaI-6, играющего роль в биопленкообразовании и кодирующего такие ферменты как АТФ-зависимая хеликаза, фосфолипаза, щелочная фосфатаза. Все исследованные штаммы лишены полного VPaI-5 (n=14) и большинство штаммов – VPaI-1 (n=11), VPaI-4 (n=12).

Начальные и концевые фрагменты «острова патогенности» VPaI-1 (VP0380, VP0399, VP0400) выявлены у трех непатогенных изолятов парагемолитического вибриона, в т.ч. у одного клинического, у которого в дополнение к вышеобозначенным рамкам считывания присутствовала рамка считывания VP0397.

В составе VPaI-2 анализировались пять открытых рамок считывания, три из которых кодируют внешний мембранный белок (VP0636), резольвазу (VP0638) и рибонуклеазу (VP0642). Среди непатогенных клинических и водных изолятов установлено, что все пять рамок считывания данного острова присутствуют у трех изолятов, выделенных из поверхностных водоемов г. Владивосток. При этом лишь одна рамка считывания VP0636, кодирующая внешний мембранный белок, присутствовала в геномах всех штаммов независимо от источника выделения и их патогенных свойств.

При анализе «острова патогенности» VPaI-3 у всех непатогенных изолятов установлено присутствие рамок считывания VP1088-1093, кодирующих трансдуктор хемотаксиса (VP1088), трансмембранный белок, влияющий на проницаемость клеточной стенки (VP1091), белок помпы отвода акридина (VP1092) и транскрипционный регулятор (VP1093). Кроме этих рамок считывания у четырех

изолятов *V. parahaemolyticus* выявлено наличие фрагментов VP1071, VP1074, VP1075, кодирующих белки с неизвестной функцией, у одного – только VP1071.

Наиболее представленным по числу открытых рамок считывания «островом патогенности» является VPaI-7, в составе которого расположены основные детерминанты патогенности парегемолитического вибриона. Если патогенные *tdh*<sup>+</sup> парегемолитические вибрионы характеризуются полным составом указанного «острова патогенности», то у непатогенных этот «остров» содержится в усеченном виде за счет делеции отдельных открытых рамок считывания. Количество отсутствующих открытых рамок считывания среди непатогенных клинических и водных изолятов варьирует от двух до семнадцати. Больше всего выпавших фрагментов (17) выявлено у клинического изолята *V. parahaemolyticus*, выделенного в 2014 г., минимальное (2) – также у клинического изолята 2017 г.

Таким образом, установлены особенности организации геномов штаммов *V. parahaemolyticus* разного происхождения.

## ГЛАВА 5. МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПРИМОРСКОМ КРАЕ

### 5.1 MLVA-типирование штаммов холерного вибриона различной эпидемической значимости

Одним из широко применяемых методов молекулярно-генетического типирования бактериальных патогенов, в т.ч. холерного вибриона, является мультилокусный анализ варьибельных тандемных повторов (MLVA), показавший высокую эффективность для типирования возбудителя.

С целью анализа популяций холерного вибриона в поверхностных водоемах Приморского края и оценки возможности использования данного метода в эпидемиологическом анализе исследовано 142 штамма *V. cholerae*, выделенных при различных эпидситуациях и охарактеризованных по фенотипическим свойствам и в ПЦР с присвоением определенного генотипа. В качестве мишеней для MLVA-типирования взяты локусы VcA, VcB, VcC, VcD, VcG, описанные А.С. Водопьяновым с соавт. [3].

Установлено, что наибольшей варьибельностью в данной выборке характеризуется локус VcA, по которому выявлено максимальное количество аллелей – 23 (от 6 до 28 повторов) (таблица 28). Также варьибельным для исследуемых штаммов является локус VcC (с индексом варьибельности 0,869 и наиболее часто встречаемым числом повторов 13) и локус VcG с 13 аллельными вариантами. Варибельность по локусу VcG обусловлена наличием характерных для *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы двух аллелей с 4 и 5 повторами. Кроме этого, уникальные аллели по VcG локусу выявлены у *V. cholerae* R-варианта, для которых характерно большое количество повторов (от 10 до 12) по сравнению с другими группами штаммов *V. cholerae*. Менее варьибельным является локус VcD с индексом варьибельности 0,666.



Таблица 28 – Характеристика исследуемых локусов варибельных тандемных повторов *V. cholerae*

Локус	Количество аллелей	Количество повторов	Количество штаммов, содержащих повторы	Индекс аллельного разнообразия
VcA	23	6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28	1, 32, 6, 3, 7, 4, 2, 8, 7, 10, 12, 12, 6, 3, 6, 8, 2, 4, 2, 2, 2, 1, 2	0,909
VcB	5	14, 15, 23, 24, 25	1, 1, 15, 9, 1	0,551
VcC	11	5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15	3, 9, 8, 8, 33, 17, 16, 11, 22, 12, 3	0,869
VcD	7	1, 3, 4, 5, 6, 7, 12	1, 67, 37, 5, 2, 28, 2	0,666
VcG	13	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12	2, 12, 74, 5, 5, 2, 3, 2, 29, 1, 5, 1, 1	0,672

При кластерном анализе по алгоритму UPGMA полученных MLVA-генотипов 142 штаммов *V. cholerae* идентифицировано два наиболее крупных клональных комплекса с распределением на 89 MLVA-генотипов, из которых 21 кластерный и 68 – уникальных. Индекс Хантра-Гастона, отображающий дискриминирующую способность метода, для исследуемой выборки штаммов составил 0,983.

Первый клональный комплекс сформирован 27 эпидемически опасными штаммами *V. cholerae* Эль Тор (г. Владивосток, 1999 г.) (рисунок 26). В составе данного клонального комплекса выявлено шесть генотипов, в числе которых четыре уникальных, т.е. встречающиеся только у одного штамма исследуемой выборки. Два кластерных генотипа в группе эпидемически опасных штаммов образованы изолятами *V. cholerae* Эль Тор, выделенными из клинического материала и из объектов окружающей среды в период вспышки. Формирование клональных комплексов в зависимости от эпидемической значимости *V. cholerae* обусловлено в первую очередь включением в схему локуса VcB, ассоциированного с токсин-корегулируемыми пилиями адгезии и присутствующим в геноме эпидемически опасных *ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>* штаммов.

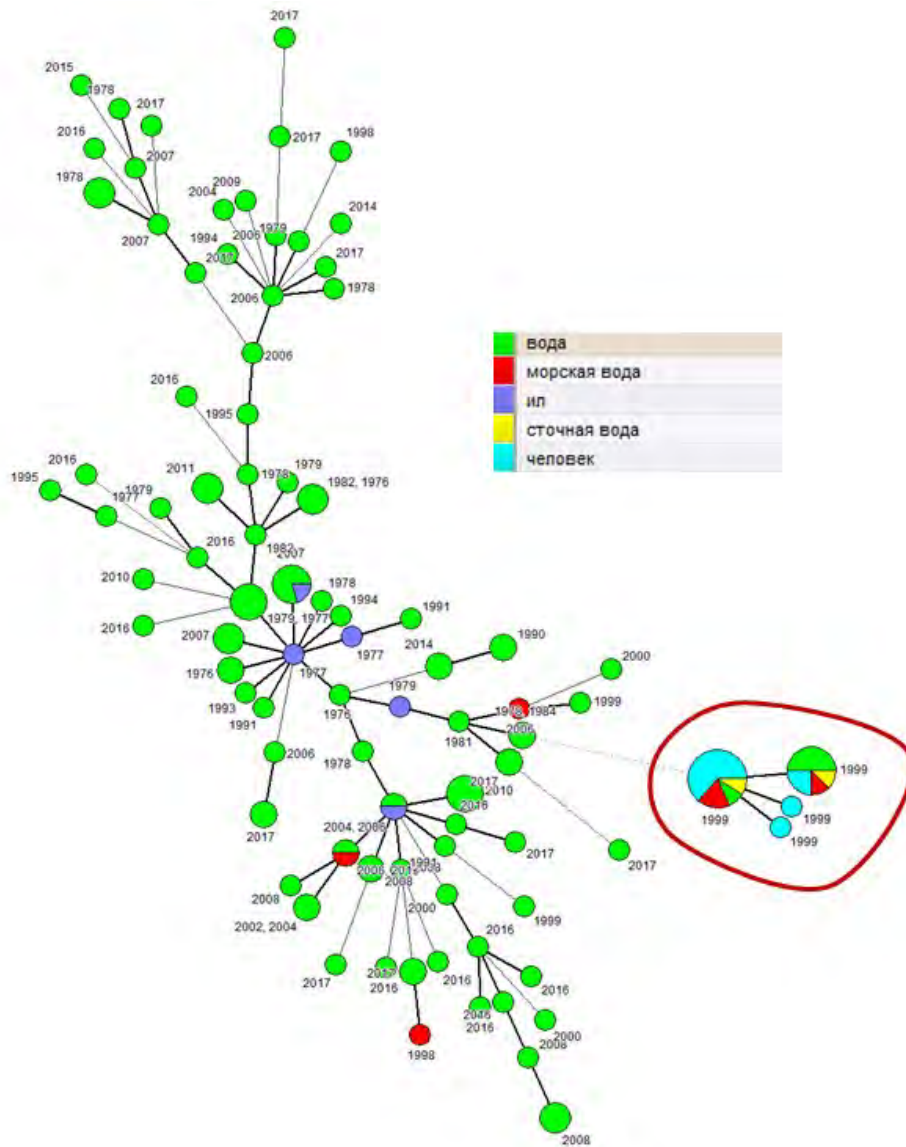


Рисунок 26 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, выделенных на территории Приморского края (алгоритм MST)

Изолированные из объектов окружающей среды Приморского края в период эпидемиологического благополучия *V. cholerae* характеризуются высокой вариабельностью MLVA профилей. Среди данной группы штаммов выявлено 84 MLVA-генотипа, в числе которых 65 уникальных (рисунок 27).



Для большинства штаммов из Приморья, объединенных одним MLVA-генотипом, характерен один и тот же год и источник (водоем) выделения. Так, штаммы холерного вибриона, имеющие идентичный MLVA-профиль, были изолированы в 1976 г. из р. Нестеровка, 2008 г. – рр. Репьевка, Раздольная, 2010 г. – р. Борисовка, 2011 г. – р. Комаровка, 2017 г. – оз. Соленое.

Кроме этого, в один сезон мониторинга имела место изоляция холерных вибрионов с идентичными MLVA-профилями из нескольких гидрологически связанных и несвязанных водоемов. Так, в 2007 г. первые культуры *V. cholerae* Эль Тор О1 серогруппы были изолированы в июле из проб воды, одновременно отобранных из рр. Репьевка, Славянка, и характеризовались идентичными профилями 8\_0\_13\_3\_2 (из р. Репьевка) и сходным однолокусным вариантом 9\_0\_13\_3\_2 (из р. Славянка). В дальнейшем профиль 8\_0\_13\_3\_2 был установлен у штаммов *V. cholerae*, выделенных из р. Славянка, а также из рр. Раздольная и Комаровка, территориально находящихся ниже по течению р. Репьевка, где впервые были выделены штаммы с данным генотипом. Другой MLVA-профиль 9\_0\_13\_3\_2, впервые идентифицированный у штамма холерного вибриона, выделенного из р. Славянка у пос. Ново-Никольск, также был определен у штаммов *V. cholerae* из рр. Репьевка и Раздольная. Однако данные вновь выделенные штаммы характеризовались наличием гена *tnpO183* «острова пандемичности». В последующем штаммы из указанных водоемов выделялись до начала сентября, но характеризовались отсутствием фрагмента «острова пандемичности». Минимальные отличия MLVA-профилей штаммов *V. cholerae*, выделенных в один сезон мониторинга, свидетельствуют о возможных преобразованиях в геноме отдельных клонов *V. cholerae* под влиянием факторов окружающей среды с образованием одно- и двулокусных вариантов вибриона.

Отличающиеся от обозначенных выше профилей с различием по VcA локусу генотипы были идентифицированы у штаммов холерного вибриона, выделенных в 70-х годах прошлого столетия из рр. Нестеровка (1976 г.), Раздольная (1977, 1978 гг.), Славянка (1977 г.), Раковка (1977 г.), Бакарасевка (1977 г.), ручей 2 (1979 г.). Следует отметить, что к этим штаммам холерного вибриона относится первый *V. cholerae* О1 серогруппы, выделенный на территории Приморского края в 1976 г. из р. Нестеровка и имеющий количество повторов по VcA локусу 10 единиц.

В отношении *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп также показана значительная вариабельность MLVA профилей. Число повторов по каждому из анализируемых локусов у *V. cholerae* не O1/O139 является характерным и для *V. cholerae* Эль Тор O1, однако, если брать в целом совокупность всех локусов, то MLVA-профили вибрионов не O1/O139 являются уникальными. Для *V. cholerae* не O1/O139 установлены 17 генотипов, из которых 15 уникальны. Идентичные генотипы выявлены у группы штаммов, выделенных в один сезон из территориально не связанных водоемов (р. Лазурная и Амурский залив у ж/д станции Санаторная, р. Горностаи и р. Богатая). Если по результатам ПЦР тестирования штаммы холерного вибриона не O1/O139 серогрупп по набору взятых в исследование основных и дополнительных генов патогенности, пандемичности и персистенции проявляют идентичность с холерным вибрионом R-варианта, то MLVA-профили их отличаются друг от друга. R-варианты холерного вибриона характеризуются как большим количеством повторов по локусу VcG, так и его отсутствием у отдельных исследуемых штаммов. Однако, вполне вероятно, что у двух данных штаммов холерного вибриона в сайте отжига праймеров по этому локусу имеется мутация, препятствующая амплификации искомого участка с повторами.

Если в целом учитывать результаты ПЦР и MLVA-типирования штаммов *V. cholerae*, стоит отметить высокую вариабельность MLVA-профилей нетоксигенных холерных вибрионов. Так, при MLVA-типировании 22 штаммов *V. cholerae* O1, отнесенных к одному из наиболее часто встречаемому ПЦР-генотипу (№ 11), установлена дифференциация штаммов на 18 MLVA-генотипов, 15 из которых являются уникальными (рисунок 28).

Таким образом, штаммы холерного вибриона, выделенные из поверхностных водоемов Приморского края на фоне эпидемиологического благополучия, обладают высокой вариабельностью генома по наличию и количеству тандемных повторов в отличие от эпидемически опасных штаммов. Гетерогенность популяций может быть обусловлена как возможным воздействием факторов окружающей среды, ведущим к структурным изменениям генома с образованием близкородственных клонов, так и изменчивостью профилей в процессе пассажа и хранения культур на питательных средах.

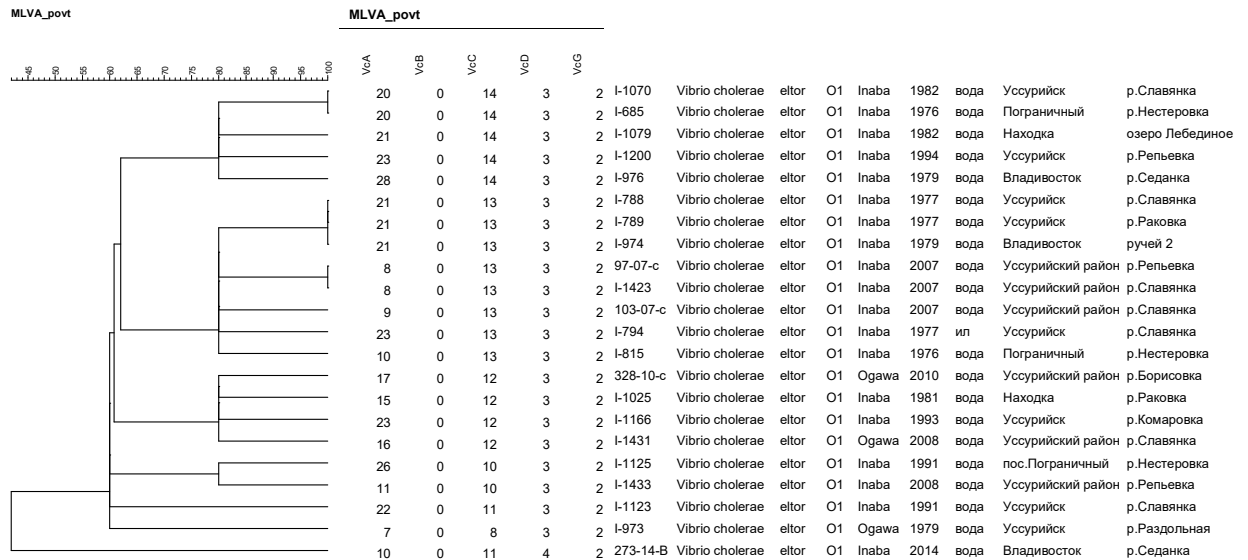


Рисунок 28 – Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа MLVA-генотипов штаммов *V. cholerae*, относящихся к ПЦР-генотипу №11

## 5.2 MLVA-типирование штаммов парагемолитического вибриона, выделенных из различных источников

Анализ локусов варибельных тандемных повторов нашел широкое применение и для типирования парагемолитического вибриона с целью изучения клональной структуры различных вариантов микроорганизма при проведении эпидемиологического расследования и для оценки популяционной структуры циркулирующих в определенных экологических нишах вариантов патогена.

В настоящем исследовании для установления клональной структуры *V. parahaemolyticus*, выделенных из воды поверхностных водоемов и клинического материала от больных с ПТИ на территории Приморского края, в схему MLVA-типирования были включены локусы, описанные В. Kimura с соавт. [168] и Е. Harth-Chu с соавт. [151] (таблица 29). Исследование изолятов парагемолитического вибриона в ПЦР на наличие детерминант патогенности и анализ дополнительных генов патогенности (в том числе в составе «островов патогенности») по результатам полногеномного секвенирования, представленные в разделе 4.4, свидетельствуют о патогенном потенциале отдельных штаммов *V. parahaemolyticus*, вызвавших групповые случаи ПТИ, в то время как выделенные при спорадических случаях и из поверхностных водоемов изоляты демонстрируют отсутствие факторов патогенности и неоднородность по наличию детерминант патогенности.

Таблица 29 – Характеристики исследуемых локусов варибельных tandemных повторов *V. parahaemolyticus*

Локус	Повтор	Количество повторов референсного штамма RIMD 2210633	Количество повторов в геноме типового штамма ATCC 17802*	Хромосома	Индекс Хантера-Гастона**
VPTR1	ATAGAG	28	31	1	0,880
VP2-07	AGCAAC	35	31	2	0,949
VPTR3	ATCTGT	7	3	2	0,749
VPTR4	TGTGTC	8	7	1	0,771
VPTR5	CTCAAA	7	7	1	0,781
VPTR6	GCTCTG	17	17	1	0,741
VPTR8	CTTCTG	7	8	1	0,834

Примечание: \* - количество повторов определено посредством секвенирования локусов контрольного, взятого в качестве маркера при капиллярном электрофорезе, штамма *V. parahaemolyticus* ATCC17802

\*\* - согласно В. Kimura с соавт. [168] и Е. Harth-Chu с соавт. [151]

При MLVA-типировании выборки из 80 штаммов *V. parahaemolyticus*, представленных 17 клиническими (включая одну субкультуру) и 63 изолятами, выделенными из поверхностных водоемов, установлена высокая генетическая гетерогенность изолятов из объектов окружающей среды и относительная консервативность клинических штаммов по анализируемым локусам. Наибольшим полиморфизмом характеризовался локус Vp2-07, для которого выявлено 30 аллелей с максимальным индексом аллельного полиморфизма ( $h$ ) 0,938 (таблица 30). Остальные локусы характеризовались меньшей варибельностью с индексами аллельного полиморфизма 0,905 (для Vptr1), 0,893 (для Vptr6), 0,878 (для Vptr3), 0,846 (для Vptr8), 0,820 (для Vptr5). Индекс Хантера-Гастона для всей выборки штаммов составил 0,988, что свидетельствует о высокой дискриминирующей способности метода.

Таблица 30 – Характеристика исследуемых локусов варибельных tandemных повторов *V. parahaemolyticus*

Локус	Количество аллелей	Количество повторов (количество штаммов с данным количеством повторов)	Индекс аллельного разнообразия
Vptr1	19	0 (4), 1 (2), 2 (7), 3 (3), 4 (2), 5 (5), 6 (3), 7 (6), 8 (18), 9 (1), 10 (3), 11 (7), 12 (5), 13 (2), 14 (3), 15 (2), 18 (3), 19 (3), 24 (1)	0,905
Vp2-07	30	0 (1), 12 (3), 17 (1), 18 (2), 19 (9), 20 (2), 21 (1), 22 (6), 23 (3), 27 (3), 28 (2), 31 (3), 33 (2), 34 (2), 35 (6), 36 (3), 37 (6), 38 (3), 39 (1), 40 (1), 42 (1), 43 (2), 44 (1), 45 (2), 46 (3)	0,938
Vptr3	11	0 (5), 1 (1), 2 (13), 4 (7), 5 (12), 6 (10), 7 (12), 8 (10), 9 (3), 11 (4), 12 (3)	0,878
Vptr4	9	1 (1), 2 (15), 3 (11), 4 (6), 5 (12), 6 (11), 7 (17), 8 (3), 9(4)	0,847
Vptr5	14	0 (2), 1 (1), 2 (22), 3 (5), 4 (3), 5 (1), 6 (17), 7 (17), 8 (3), 9 (4), 10 (2), 11 (1), 12 (1), 13 (1)	0,820
Vptr6	18	0 (1), 4 (2), 5 (3), 7 (5), 8 (2), 9 (4), 11 (18), 12 (5), 13 (9), 14 (3), 15 (10), 16 (1), 17 (1), 18 (3), 19 (6), 20 (1), 22 (5), 25 (1)	0,893
Vptr8	15	0 (2), 2 (2), 4 (2), 5 (2), 6 (7), 7 (25), 8 (11), 9 (6), 10 (8), 11 (1), 12 (5), 14 (5), 16 (1), 17 (2), 18 (1)	0,846

По результатам кластерного анализа 80 исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* дифференцировались на 65 уникальных и пять кластерных MLVA-генотипов (рисунок 29). Выявлено, что клинические *tdh*<sup>+</sup> штаммы парагемолитического вибриона, выделенные в 2012 г., вошли в отдельный кластер, как и патогенные изоляты, изолированные от больных в 2017 г. Большая часть штаммов 2012 г. (семь из десяти) характеризуется идентичным MLVA-профилем, для трех штаммов установлены одно- и двухлокусные варианты, отличающиеся от доминирующего генотипа на один повтор по 1-2 локусам.

Два клинических штамма вибриона, изолированные от больных в г. Владивостоке в 2017 г., имеют идентичный MLVA-профиль (11\_12\_2\_7\_6\_22\_7). При этом от одного больного изолировано две культуры парагемолитического вибриона, первая культура с представленным выше доминирующим генотипом, вторая – с однолокусным изменением основного (11\_12\_2\_7\_6\_18\_7).



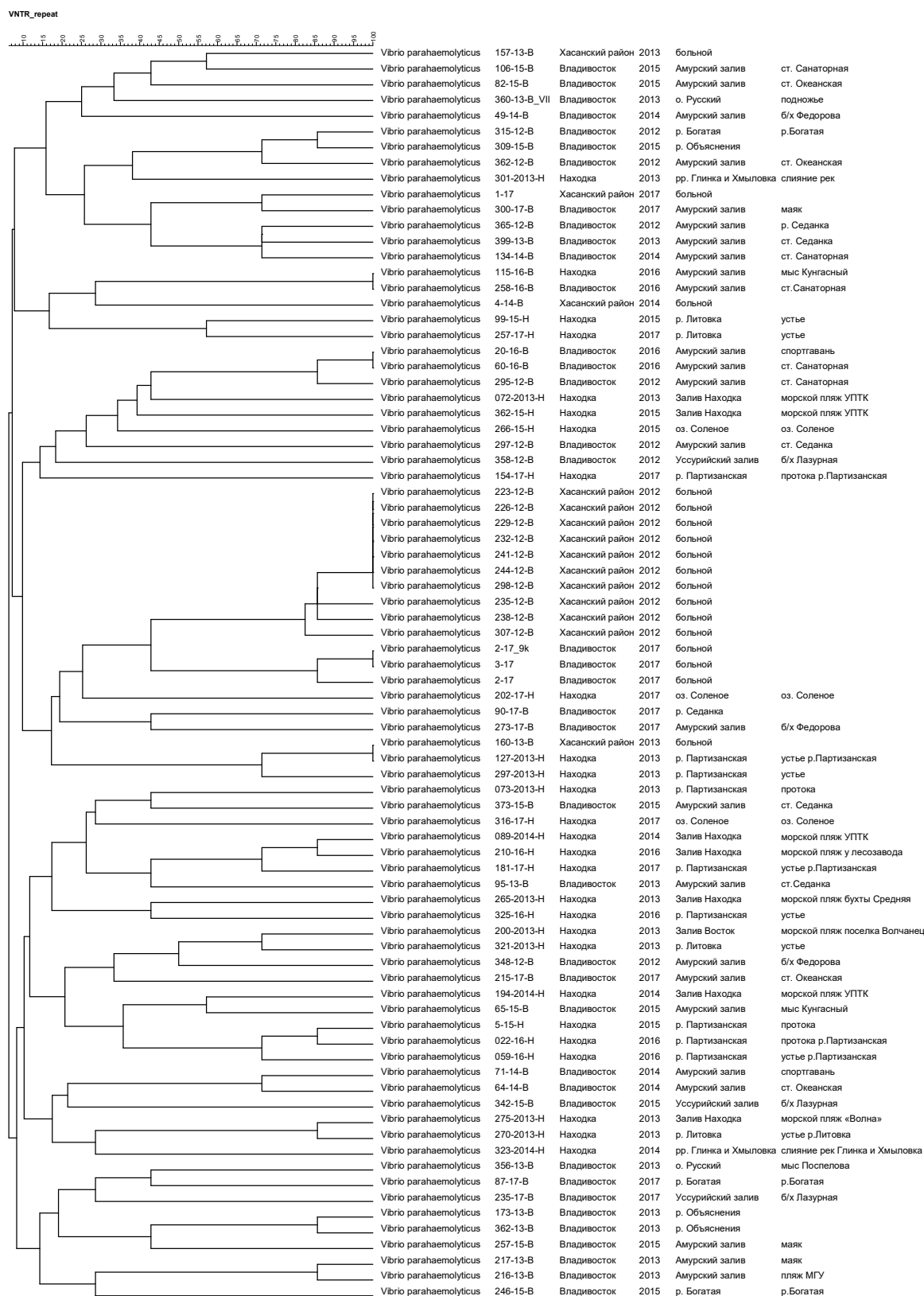


Рисунок 29 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования (с использованием алгоритма UPGMA) штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае

Интересен факт обнаружения идентичного MLVA-генотипа у клинического штамма *V. parahaemolyticus*, изолированного от больного в 2013 г., и изолята, выделенного из воды р. Партизанская в г. Находке.

В отношении вибрионов, изолируемых из объектов окружающей среды, показана генетическая гетерогенность популяций с дифференциацией на 60 уникальных генотипов вне зависимости от территории и времени изоляции микроорганизма (рисунок 27). Полученные результаты MLVA-типирования, свидетельствующие о гетерогенности популяции парегемолитического вибриона по локусам tandemных повторов, согласуются с данными зарубежных авторов, которыми также отмечена высокая вариабельность *V. parahaemolyticus*. Выявление идентичных профилей у не связанных территориально штаммов требует дальнейшего исследования с применением других подходов к молекулярно-генетическому анализу.

### **5.3 Типирование парегемолитического вибриона на основании анализа геномов**

Одним из широко применяемых методов в исследовании филогенетического родства различных групп изолятов парегемолитического вибриона, его клональной структуры, эволюционных преобразований и путей распространения патогена на глобальном уровне является мультилокусное сиквенс-типирование на основании анализа структуры генов «домашнего хозяйства» (MLST) [94, 191].

С целью выявления особенностей структуры генов «домашнего хозяйства» и установления взаимосвязей на глобальном уровне нами проведен *in silico* MLST анализ 20 изолятов *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае, как из клинического материала, так и из поверхностных водоемов.

MLST осуществлялось на основании анализа структуры семи генов «домашнего хозяйства» парегемолитического вибриона – гены *recA* (белок RecA), *dnaE* (альфа-субъединица ДНК-полимеразы III), *gyrB* (субъединица В ДНК-гиразы), *tdtS* (треонин-3-дегидрогеназа), *pntA* (альфа-субъединица трансгидрогеназы), *pyrC* (дигидрооротаза) и *tnaA* (триптофаназа), представленных в международной базе PubMLST [140].

На начальном этапе анализа проведено определение аллельного варианта каждого гена и аллельного профиля отдельного штамма по комплексу семи генов «домашнего хозяйства» с использованием ресурса вышеуказанной базы.

По результатам анализа для пятнадцати исследуемых изолятов *V. parahaemolyticus* определены аллельные профили по всем анализируемым генам (таблица 31), в то время как у пяти изолятов вибриона аллели по генам *pntA* (один клинический изолят) и *recA* (четыре водных изолята) не определились, поэтому из дальнейшего анализа данные штаммы исключены. При этом наблюдаемый высокий уровень полиморфизма в гене *recA* выявлен ранее D. Nan с соавт. [147].

У *V. parahaemolyticus* с идентифицированными аллельными профилями особый интерес представляют патогенные изоляты. Так, установлено, что три изолята парегемолитического вибриона (*tdh+*), послужившие этиологическим агентом ПТИ в 2012 г., характеризуются идентичными аллельными профилями, у четвертого установлено отличие от указанных выше изолятов в гене альфа-субъединицы трансгидрогеназы *pntA* (таблица 31). При этом в MLVA-типировании данные четыре

Таблица 31 – Аллельные профили штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от больных и из поверхностных водоемов в Приморском крае

Штамм	Наличие гена <i>tdh</i>	Тип аллели генов «домашнего хозяйства»						
		<i>recA</i>	<i>dnaE</i>	<i>pyrC</i>	<i>dtdS</i>	<i>gyrB</i>	<i>tnaE</i>	<i>pntA</i>
226-12-B	+	19	3	4	4	225	22	29
235-12-B	+	19	3	4	4	225	22	29
238-12-B	+	19	3	4	4	225	22	нд* (32)
307-12-B	+	19	3	4	4	225	22	29
157-13-B	-	77	277	172	19	392	12	1
160-13-B	-	191	73	202	222	260	26	222
4-14-B	-	19	47	43	287	52	37	26
1-17	-	124	40	62	125	120	24	127
2-17_с/к	+	19	3	4	4	4	22	29
3-17	+	19	3	4	4	4	22	29
295-12-B	-	нд (67)	19	47	13	122	51	50
315-12-B	-	нд (90)	28	7	251	106	26	18
362-12-B	-	220	4	9	38	13	23	18
360-13-B	-	21	28	23	119	17	24	20
356-13-B	-	345	348	37	330	364	132	184
399-13-B	-	25	19	274	302	351	197	157
127-13-H	-	191	73	202	222	260	26	28
301-13-H	-	нд (387)	10	367	76	15	17	4
134-14-B	-	25	19	274	302	351	197	157
362-15-H	-	нд (67)	19	47	13	122	51	50

Примечание: \* - не идентифицированы (в скобках представлена сходная аллель данного гена)

изолята имели отличающиеся друг от друга генотипы. Патогенные штаммы *V. parahaemolyticus* 2017 г. изоляции имеют также идентичные аллельные профили, но отличающиеся по структуре гена *gyrB* от патогенных вибрионов 2012 г. (таблица 31). У непатогенных *V. parahaemolyticus*, выделенных при спорадических случаях ПТИ, установлены уникальные аллельные профили.

Изоляты *V. parahaemolyticus* с идентичным MLVA-генотипом, выделенные от больного и из р. Партизанская, по результатам MLST характеризуются сходными аллельными профилями с отличием по гену *ptnA*.

На следующем этапе исследования определяли сиквенс-тип изолята как комбинацию всех аллелей анализируемых генов. В результате анализа в PubMLST из пятнадцати изолятов с установленными аллельными профилями в десяти случаях сиквенс-типы были идентифицированы, в пяти – не установлены (таблица 32). Из пяти изолятов с неустановленным сиквенс-типом для трех штаммов установлены сходные сиквенс-типы (обозначены в таблице 32 «\*»), отличающиеся по одному-двум генам жизнеобеспечения. Для штаммов № 1-17 и 360-13-В, несмотря на идентифицированные аллельные профили, сиквенс-тип не идентифицирован и при депонировании их в базу PubMLST с высокой долей вероятности им будут присвоены уникальные сиквенс-типы.

Среди пандемических изолятов с генотипом *tdh+* было идентифицировано два сиквенс-типа ST431 (2012 г.) и ST3 (2017 г.), входящих в состав клонального комплекса (СС) 3 (таблица 32). В отношении сиквенс-типа ST3 показано, что он в большинстве случаев лежит в основе клональных комплексов пандемических вариантов парагемолитического вибриона и является наиболее распространенным среди *V. parahaemolyticus* во всем мире [99, 140, 142, 147, 183, 197]. Несмотря на отличительные особенности структуры генов, выделенные от больных патогенные изоляты *V. parahaemolyticus* во многом демонстрируют клональность структуры, что также отмечено отдельными зарубежными авторами [99].

Таблица 32 – Сиквенс-типы исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus*

Штамм	Наличие гена <i>tdh</i>	Сиквенс-тип (ST)	Гены, по которым наблюдается отличие у исследуемых штаммов от ST, отмеченных «*»	Клональный комплекс
226-12-B	+	431	-	3
235-12-B	+	431	-	3
307-12-B	+	431	-	3
157-13-B	-	2345*	<i>recA, tnaA</i>	-
160-13-B	-	533*	<i>pntA</i>	-
4-14-B	-	761*	<i>pntA</i>	-
1-17	-	нд**	-	-
2-17_с/к	+	3	-	3
3-17	+	3	-	3
362-12-B	-	1081	-	-
360-13-B	-	нд**	-	-
356-13-B	-	1674	-	-
399-13-B	-	834	-	-
127-13-Н	-	533	-	-
134-14-B	-	834	-	-

Примечание: \* - сходный сиквенс-тип, \*\* - не идентифицированы

Кроме этого были определены сиквенс-типы изолятов парагемолитического вибриона из окружающей среды, показавшие высокий уровень разнообразия последовательностей. Для водных вибрионов установлены сиквенс-типы ST533, 834, 1081, 1674. При этом один из сиквенс-типов (ST834) выявлен у двух штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из морской воды Амурского залива в стационарных точках – ж/д станции Седанка (№ 399-13-B) и Санаторная (№ 134-14-B).

Столь высокая вариабельность структуры генов «домашнего хозяйства» среди водных изолятов *V. parahaemolyticus* и низкая представленность сиквенс-типов отмечена при MLST-типировании штаммов, выделенных с различных территорий Азии, Европы, Южной Америки, США [140]. На территории Китая популяции парагемолитического вибриона также характеризуются гетерогенностью [183].

Проведенный в рамках данной работы анализ территориальной приуроченности сиквенс-типов в глобальном масштабе позволил установить широкое географическое распределение идентифицированных в данной работе сиквенс-типов парагемолитического вибриона (таблица 33).

Таблица 33 – Территориальная приуроченность сиквенс-типов

Штамм	Наличие гена <i>tdh</i>	Сиквенс-тип (ST)	Территория циркуляции штаммов с обозначенным ST
226-12-B	+	431	Китай, клинический материал
235-12-B	+	431	
307-12-B	+	431	
157-13-B	-	2345*	Китай, объекты окружающей среды
160-13-B	-	533*	Китай, объекты окружающей среды
4-14-B	-	761*	Германия, объекты окружающей среды
2-17	+	3	Индия, Перу, Бангладеш, Китай, США, Япония, Таиланд, Мозамбик, Норвегия, Сингапур, Республика Корея
3-17	+	3	
362-12-B	-	1081	Китай, объекты окружающей среды
356-13-B	-	1674	Китай, клинический материал
399-13-B	-	834	Китай, объекты окружающей среды
127-13-H	-	533	Китай, объекты окружающей среды
134-14-B	-	834	Китай, объекты окружающей среды

Примечание: \* - сходный сиквенс-тип

Определенный у выделенных от больных штаммов *V. parahaemolyticus* в Приморском крае в 2017 г. сиквенс-тип сиквенс-тип ST3 наиболее часто обнаруживается у изолятов *V. parahaemolyticus* от больных во многих странах (Индия, Перу, Бангладеш, Китай, США, Япония, Таиланд, Мозамбик, Норвегия, Сингапур, Республика Корея). Сиквенс-тип ST431, установленный для клинических изолятов 2012 г., выявлен у *V. parahaemolyticus*, обнаруженного в клиническом материале на территории Китая.

При кластерном анализе, проведенном с включенными в выборку изолятами с различных территорий мира, установлено, что штаммы с сиквенс-типами ST3, ST431 принадлежат к одному кластеру, в остова которого расположен ST3 (рисунок 30).

Данный факт свидетельствует о клональности пандемичных изолятов вибриона. Очевидное по результатам анализа территориального распределения сиквенс-типов штаммов парегемолитического вибриона значение имеет гетерогенность популяций вибриона, циркулирующих в странах Азии, в особенности Китая. Выявленные у исследуемых водных изолятов в Приморском крае сиквенс-типы ST533, 834, 1081, 1674 кластеризуются с таковыми сиквенс-типами ST533, 1081 штаммов из Китая или являются сходными с ними (ST 834, 1674) (рисунок 30).

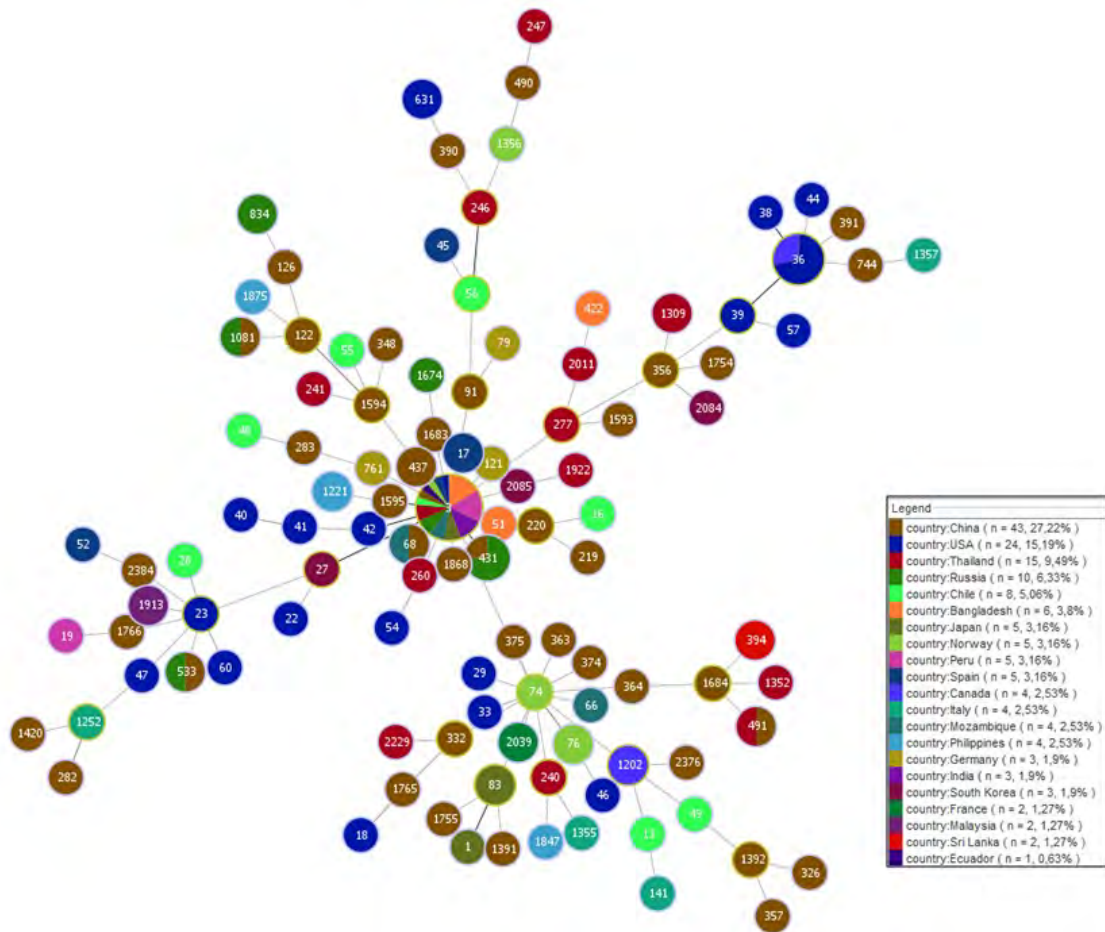


Рисунок 30 – Дендрограмма, построенная в программе Phyloviz 1.1a по результатам идентифицированных сиквенс-типов, определенных в настоящем исследовании, и представленных в базе PubMLST

Таким образом, установлена принадлежность выделенных в Приморском крае патогенных изолятов *V. parahaemolyticus* к ST431 и ST3, отнесенным к глобально распространенному клональному комплексу CC3. Для непатогенных изолятов, выделенных как от больных при единичных случаях заболевания, так и из поверхностных водоемов, установлена высокая вариабельность структуры генома по результатам анализа генов «домашнего хозяйства».

## **ГЛАВА 6. ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МУЛЬТИЛОКУСНОГО АНАЛИЗА ВАРИАБЕЛЬНЫХ ТАНДЕМНЫХ ПОВТОРОВ (MLVA) В ТИПИРОВАНИИ ХОЛЕРНОГО И ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКОГО ВИБРИОНОВ ПРИ ПРОВЕДЕНИИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА**

Молекулярно-генетическое типирование микроорганизмов является основой многих важных аспектов в эпидемиологии и микробиологии, в т.ч. в установлении родства изолятов при проведении оперативного эпидемиологического расследования возникновения групповых и спорадических случаев различных инфекций. Одной из важнейших характеристик любого метода генотипирования является способность присваивать эпидемиологически связанным штаммам одинаковые или сходные генотипы, а эпидемиологически не связанным – разные генотипы [259].

### **6.1 Эффективность MLVA-типирования *V. cholerae***

По результатам MLVA-типирования различных вариантов холерного вибриона (токсигенных/нетоксигенных) установлена кластеризация штаммов в зависимости от эпидемической значимости, в т.ч. и за счет включения в схему типирования ассоциированного с токсин-корегулируемыми пиллями адгезии локуса VcB. В отношении 27 взятых в исследовании эпидемически опасных вариантов *V. cholerae*, выделенных при вспышке в Приморском крае, установлена незначительная вариабельность структуры локусов с доминирующим генотипом 7\_23\_9\_7\_8 и 7\_24\_9\_7\_8, отличающиеся по VcB локусу на один повтор. В двух случаях от больного и контактного лица изолированы штаммы с существенным отличием в локусе VcB (14 и 15 повторов) и идентичными профилями по другим мишеням. При включении в кластерный анализ эпидемически опасных *V. cholerae* O1, выделенных в период вспышки в г. Южно-Сахалинске, показана приуроченность MLVA-профилей к определенной территории (рисунок 31).



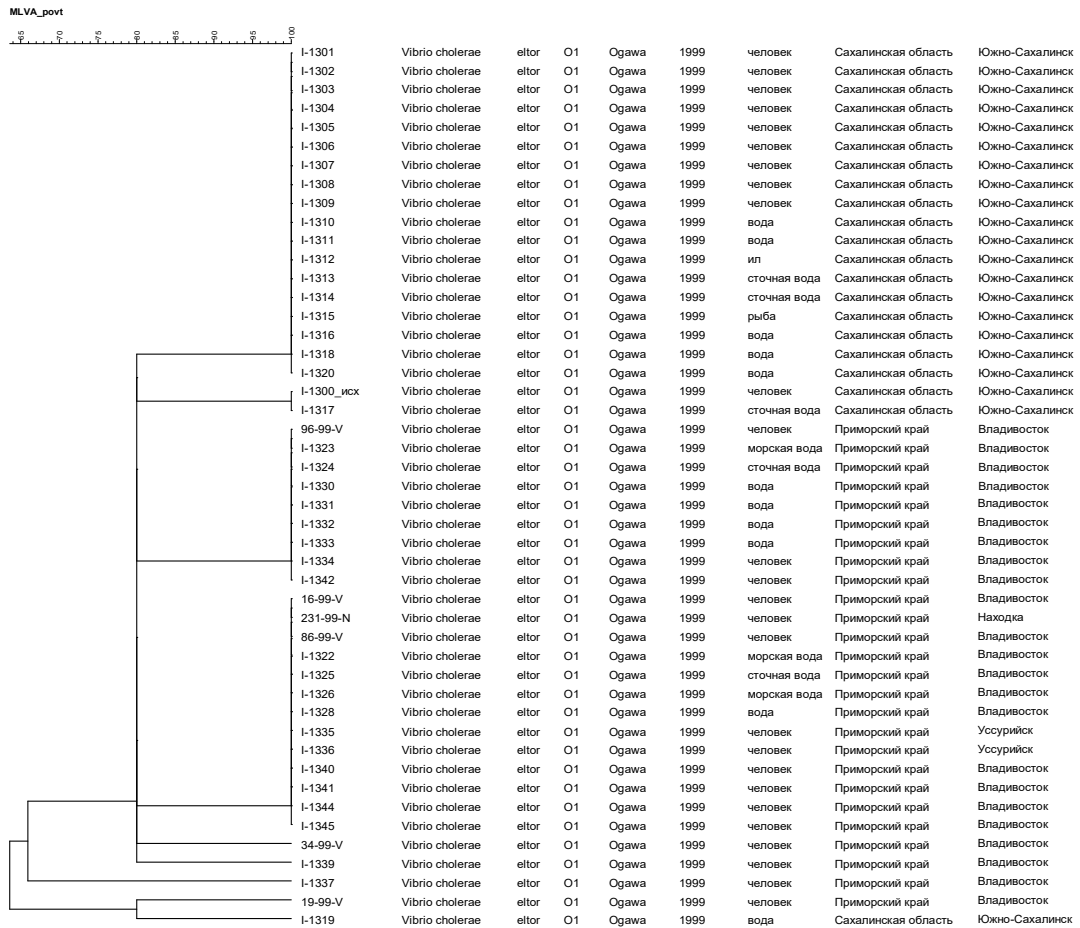


Рисунок 31 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования эпидемически опасных изолятов *V. cholerae* O1 по алгоритму UPGMA

Изоляты холерного вибриона O1 серогруппы, R-варианта, не O1/O139 серогрупп, выделенные в период эпидемиологического благополучия, как отмечалось в главе 5, по результатам кластерного анализа формируют отдельную группу с высокой гетерогенностью профилей и кластеризацией в отдельных случаях в зависимости от территории и времени выделения штамма. Обращает внимание приуроченность случаев выявления идентичных MLVA-профилей ко времени и территории выделения (водоему) у изолятов *V. cholerae*, выделенных в отдельные годы за последние 13 лет (в таблице 34 выделены серым цветом). Такая закономерность выявлена при обнаружении в водоемах и неоднократной высеваемости в отношении вибрионов 2008, 2010, 2011, 2014, 2017 гг. изоляции.

Приуроченность идентичных MLVA-профилей холерного вибриона O1 серогруппы к периоду изоляции выявлена у выделенных в 2017, 2007, 1977, 1976, 1978, 1990 гг. из различных водоемов штаммов (выделено голубым цветом). В 2017 г. из не

связанных территориально водоемов выделены *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы, имеющие идентичный генотип. В ряде же случаев закономерностей пространственной и временной зависимости генотипов вибриона не выявлено, что требует дальнейшего анализа.

Таблица 34 – Территориальная и временная характеристика штаммов *V. cholerae*, характеризующихся идентичными MLVA-профилями

MLVA-профиль (VcA VcB VcC VcD VcG)	Штамм <i>V. cholerae</i>	Территория	Год	Водоем
Идентичный (13_0_11_5_2)	205-17-B	г. Владивосток	2017	р. Горностай
	214-17-B	г. Владивосток		р. Богатая
Идентичный (15_0_13_3_4)	261-17-B	г. Владивосток	2017	р. Лазурная
	291-17-B	г. Владивосток		Амурский залив
Идентичный (8_0_13_3_2)	285-07-с	г. Уссурийск	2007	р. Раздольная
	286-07-с	г. Уссурийск		р. Комаровка
	97-07-с	Уссурийский район		р. Репьевка
	99-07-с	Уссурийский район		р. Репьевка
	I-1423	Уссурийский район		р. Славянка
Идентичный (9_0_13_3_2)	103-07-с	Уссурийский район	2007	р. Славянка
	248-07-с	г. Уссурийск		р. Репьевка
	284-07-с	г. Уссурийск		р. Раздольная
Идентичный (21_0_13_3_2)	I-788	г. Уссурийск	1977	р. Славянка
	I-789	г. Уссурийск		р. Раковка
	I-813	г. Уссурийск		р. Бакарасевка
	I-974	г. Владивосток	1979	Ручей 2
Идентичный (19_0_13_3_2)	I-688	пос. Пограничный	1976	р. Нестеровка
	I-689	с. Барановка		
Идентичный (14_0_14_3_2)	I-1482	г. Уссурийск	2011	р. Комаровка
	I-1483	г. Уссурийск		
	I-1489	г. Уссурийск		
Идентичный (20_0_14_3_2)	I-680	г. Уссурийск	1976	р. Раковка
	I-685	пос. Пограничный		р. Нестеровка
	I-1070	г. Уссурийск	1982	р. Славянка
Идентичный (11_0_10_3_2)	120-08-с	г. Уссурийск	2008	р. Репьевка
	I-1433	Уссурийский район		
Идентичный (16_0_10_3_2)	151-06-B	г. Владивосток	2006	бух. Лазурная
	I-1461	Хасанский район	2010	р. Тумаган
Идентичный (17_0_10_3_2)	185-04-с	г. Уссурийск	2004	р. Раздольная
	150-06-B	г. Владивосток	2006	Ручей 1
Идентичный (20_0_12_3_2)	202-17-Н	г. Находка	2017	Оз. Соленое
	227-17-Н	г. Находка		
Идентичный (17_0_12_3_2)	328-10-с	г. Уссурийск	2010	р. Борисовка
	392-10-с	г. Уссурийск		
	I-1456	г. Уссурийск		
	I-1400	г. Уссурийск		
Идентичный (16_0_9_3_2)	119-02-С	г. Уссурийск	2002	р. Раковка
	I-1367	пос. Пограничный	2004	р. Нестеровка

Продолжение таблицы 34

Идентичный (15_0_9_3_2)	I-887	г. Уссурийск	1978	р. Раздольная
	I-1087	пос. Пограничный	1984	р. Нестеровка
Идентичный (7_0_7_4_1)	I-833	г. Уссурийск	1978	р. Раздольная
	I-889	г. Арсеньев		р. Арсеньевка
	I-912	г. Находка		р. Партизанская
Идентичный (16_0_10_4_1)	255-08-с	г. Уссурийск	2008	р. Раздольная
	270-08-с	г. Уссурийск		р. Раздольная
	I-1449	г. Уссурийск		р. Раздольная
Идентичный (10_0_11_4_2)	273-14-B	г. Владивосток	2014	р. Седанка
	301-14-B	г. Владивосток		
Идентичный (10_0_7_4_2)	I-1099	г. Находка	1990	р. Каменка
	I-1112	г. Находка		Озеро Лебяжье

Установленная высокая вариабельность MLVA-профилей штаммов *V. cholerae* возможно обусловлена изменчивостью структуры локусов вариабельных тандемных повторов как в период пребывания в ООС, так и в процессе хранения и пассажей на питательных средах, что послужило обоснованием для проведения экспериментальных исследований по оценке стабильности MLVA-профилей холерного вибриона.

#### **Стабильность MLVA-профиля *V. cholerae* в условиях дефицита питательных веществ и воздействии низких и комнатных температур**

С эпидемиологической точки зрения существенное изменение количества повторов может повлиять на результаты молекулярно-генетической идентификации штамма, что впоследствии может отразиться на результатах эпидемиологического расследования. Как было показано выше, в пределах одного сезона из водоемов выделяются штаммы холерного вибриона сходные по MLVA-генотипу. Возникает вопрос – можно ли рассматривать такие штаммы как близкородственные одно/двухлокусные варианты, формирующиеся как результат дубликаций/инсерций под влиянием факторов окружающей среды? С учетом этого в данной работе было проведено исследование стабильности MLVA-генотипа холерного вибриона под влиянием дефицита питательных веществ, низкой и оптимальных температур.

Первая серия эксперимента заключалась в культивировании штаммов *V. cholerae* O1 различной эпидемической значимости в условиях 6° С до момента отсутствия роста на пластинках щелочного агара с проведением контрольных срезов, предусматривающих исследование стабильности генетических локусов, в т.ч. MLVA-

профилей. Исходные MLVA-профили штаммов холерного вибриона определены как VcA20VcB25VcC8VcD6VcG7 (*V. cholerae* O1 И-441), VcA7VcB21VcC9VcD7VcG8 (*V. cholerae* O1 И-1300), VcA7VcB21/22VcC9VcD7VcG8 (*V. cholerae* O1 И-1310) и VcA12VcB0VcC14VcD3VcG2 (*V. cholerae* O1 И-1462).

MLVA-типирование штаммов холерного вибриона по результатам четырех срезов показало, что изменения в структуре локусов вариабельных повторов отмечены как у токсигенного (И-441), так и нетоксигенного (И-1462) изолятов (таблица 35).

Таблица 35 – Результаты MLVA-типирования штаммов *V. cholerae* в эксперименте в условиях дефицита питательных веществ и низких температур

		Исходные данные (количество повторов)	1 срез	2 срез	3 срез	4 срез	Последний высев	Центрифугированные образцы
<i>V. cholerae</i> O1 И-441	VcA	20	20	20	20	-	20	20
	VcB	25	26*	25	25	-	25	25
	VcC	8	8	8	8	-	8	8
	VcD	6	6	6	6	-	6	6
	VcG	7	7	7	7	-	7	7
<i>V. cholerae</i> O1 И-1300	VcA	7	7	7	7	-	7	7
	VcB	21	21	21	21	-	21	21
	VcC	9	9	9	9	-	9	9
	VcD	7	7	7	7	-	7	7
	VcG	8	8	8	8	-	8	8
<i>V. cholerae</i> O1 И-1310	VcA	7	7	7	7	-	7	7
	VcB	22/21	22	21	22	-	21	22
	VcC	9	9	9	9	-	9	9
	VcD	7	7	7	7	-	7	7
	VcG	8	8	8	8	-	8	8
<i>V. cholerae</i> O1 И-1462	VcA	12	13*	12	12	12	12	12
	VcB	0	0	0	0	0	0	0
	VcC	14	14	14	14	14	14	14
	VcD	3	3	3	3	3	3	3
	VcG	2	2	2	2	2	2	2

Примечание: \* - желтым цветом выделено количество повторов, отличающихся от исходного MLVA-профиля штаммов *V. cholerae*

В обоих случаях выявлено увеличение повторов на одну единицу при первом высеве, что возможно связано с адаптационными перестройками в геноме микроорганизма в ответ на изменяющиеся условия существования. Изменения у нетоксигенного изолята И-1462 затронули локус VcA, у токсигенного И-441 локус VcB. Дальнейшего закрепления измененного аллельного профиля холерного вибриона не

последовало. По другим исследуемым локусам VcC, VcD, VcG изменений профиля не выявлено (таблица 35).

Необходимо отметить, что измененный профиль штамма *V. cholerae* И-1462, выделенного в Тюменской области из оз. Верхнее Кривое в 2012 г., соответствует профилю четырех штаммов, выделенных позже из того же водоема в тот же сезон (рисунок 32), что свидетельствует о возможности изменения количества повторов *V. cholerae* в условиях пребывания в поверхностных водоемах с последующей изоляцией вибрионов с измененным количеством повторов.

Также выявлены двойные аллели в VcV локусе в геноме исходного токсигенного штамма И-1310, отличающиеся между собой на один повтор (21 и 22 единицы). Возможно, это связано с генетической диссоциацией исходной культуры на два клона с последующим доминированием одного из них. При этом, колонии с вытесненным вариантом (21 повтор) появляются во втором и последнем высеве. Анализ же ДНК вышеуказанного штамма, выделенной из центрифугированного образца, показал наличие 22 повторов в локусе VcV.

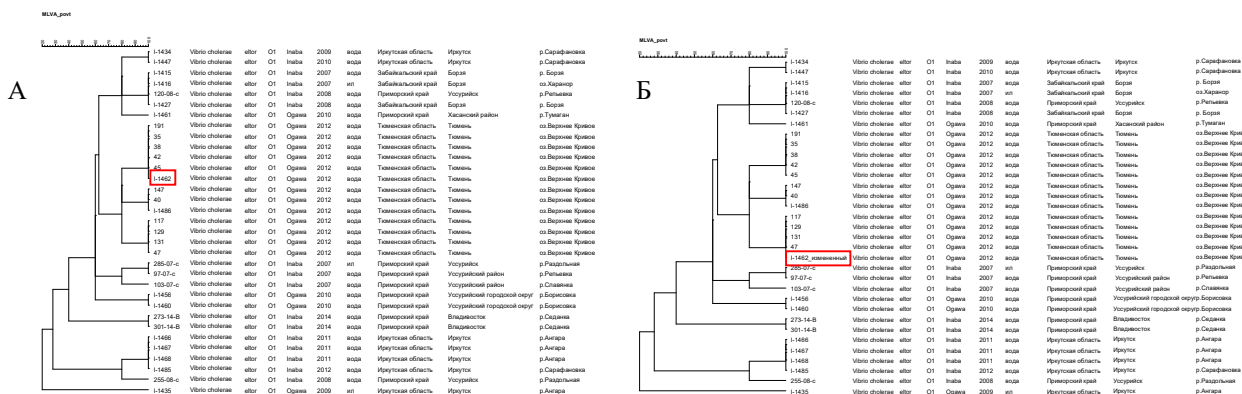


Рисунок 32 – Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа MLVA-генотипа штамма *V. cholerae* O1 Эль Тор И-1462 с исходным (А) и измененным генотипами (Б)

Для подтверждения факта изменения аллельного профиля нами проведено секвенирование генетических мишеней измененных вариантов вибриона Эль Тор, результаты которого совпадают с рассчитанным числом повторов, вычисленного посредством капиллярного электрофореза (рисунок 33).



Продолжение таблицы 36

<i>V. cholerae</i> O1 И-1310	VcA	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	VcB	22/21	22	21	22	22	22	22	22	22	-	-
	VcC	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
	VcD	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7
	VcG	8	8	8	8	8	8	8	8	8	-	-
<i>V. cholerae</i> O1 И-1462	VcA	12	12	12	12	12	12	12	12	12	-	12
	VcB	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	VcC	14	14	14	14	14	14	14	14	14	-	14
	VcD	3	3	3	3	3	3	3	3	3	-	3
	VcG	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-	-

Для оценки влияния увеличения/уменьшения количества повторов в геномах *V. cholerae* на распределение MLVA-профилей измененных субкультур штаммов, изолированных при вспышке в Приморском крае и Сахалинской области, был проведен кластерный анализ генотипов (рисунок 36). Установлено, что существенных изменений кластеризации генотипа исходного штамма *V. cholerae* O1 И-1300 и его субкультуры с увеличенным числом повторов не наблюдалось. Отметим, что ввиду структурных изменений только в количестве повторов по локусу VcB у исследуемых штаммов, подобные изменения генотипа не должны повлиять на дифференциацию эпидемически опасных и неопасных изолятов холерного вибриона.

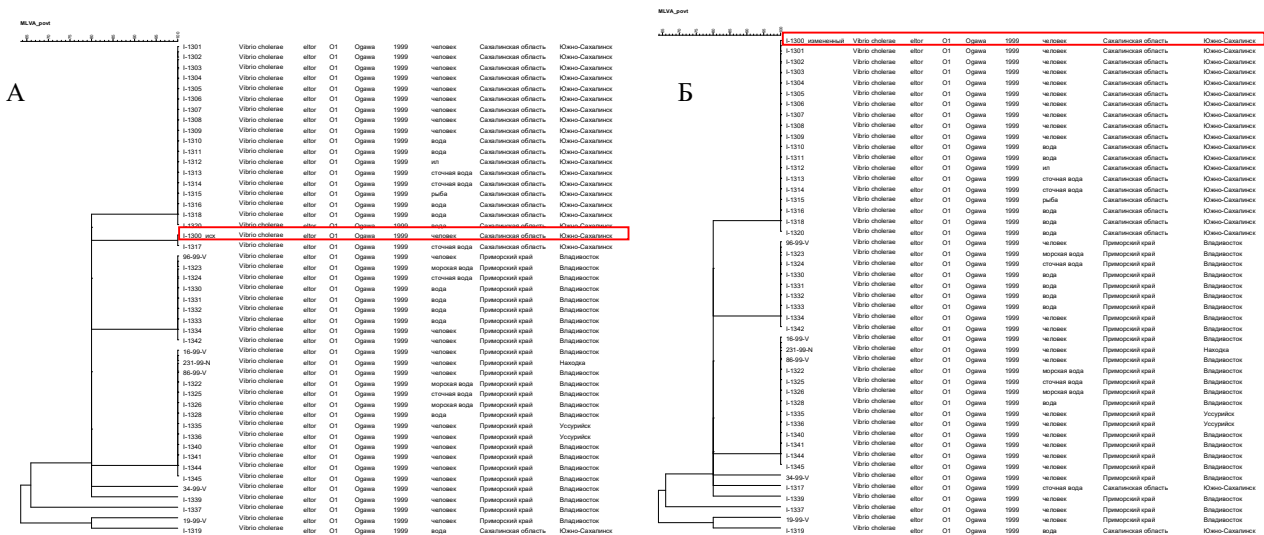


Рисунок 34 – Дендрограмма, построенная по результатам кластерного анализа MLVA-генотипа штамма *V. cholerae* Эль Тор O1 И-1300 с исходным (А) и измененным (Б) генотипами

Таким образом, результаты исследования подтверждают возможность изменения количества тандемных повторов в штаммах холерного вибриона под воздействием окружающей среды. Поэтому для исключения возможности изменения MLVA-профилей в лабораторных условиях, на наш взгляд, целесообразно проведение типирования непосредственно после изоляции культур холерного вибриона. А при проведении молекулярно-эпидемиологического анализа для выяснения источников и путей распространения холерного вибриона необходимо принимать во внимание гидрологические характеристики водоемов, климатические факторы, период изоляции, результаты молекулярно-генетического типирования. Несомненным достоинством метода является его дифференцирующая способность в отношении токсигенных и нетоксигенных изолятов холерного вибриона.

## **6.2 Эффективность MLVA-типирования *V. parahaemolyticus***

На основании полученных нами данных MLVA-типирования параземолитического вибриона показано, что данный метод характеризуется высокой дискриминирующей способностью в отношении *V. parahaemolyticus* (0,988), выделенных из различных источников. Результаты типирования штаммов параземолитического вибриона, представленные в главе 5, позволили установить MLVA-генотипы, характерные для клинических и водных изолятов с высокой вариабельностью структуры исследуемых локусов. Необходимо отметить приуроченность выявленных MLVA-генотипов клинических штаммов *V. parahaemolyticus* к периоду изоляции и сопоставимость результатов генотипирования с эпидемиологическими данными (рисунок 35).

По результатам анализа установлено, что выделенные при групповых и единичных случаях пищевой токсикоинфекции патогенные клинические изоляты *V. parahaemolyticus* формируют кластеры идентичных/сходных (однолокусных) генотипов (2012, 2017 гг.) и уникальные генотипы, характерные для выделенных при спорадических случаях штаммов *V. parahaemolyticus* (рисунок 35).



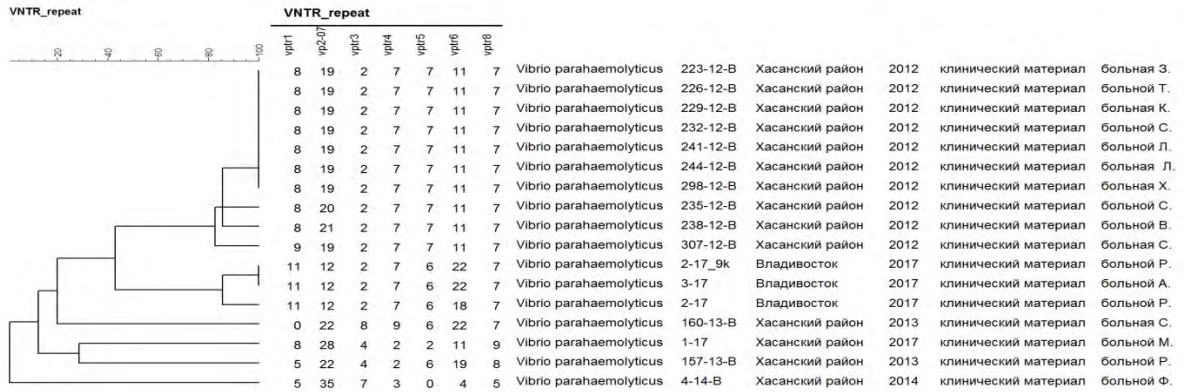


Рисунок 35 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования (с использованием алгоритма UPGMA) клинических штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае

С целью более детального анализа возможности использования MLVA и выявления закономерностей кластеризации генотипов штаммов парагемолитического вибриона было проведено сравнение дифференциации на генотипы при MLVA и MLST. Ввиду того, что в локусах переменных тандемных повторов геномные события, такие как проскальзывание ДНК-полимеразы и рекомбинации, приводящие к изменению размера повторяющегося фрагмента, явления достаточно частые в сравнении с консервативными участками генома, предположительно при сравнении с MLST метод MLVA должен быть более эффективным по дискриминирующей способности в отношении парагемолитического вибриона.

При сравнении результатов MLVA-типирования 20 изолятов парагемолитического вибриона с аллельными профилями по генам «домашнего хозяйства», установлены некоторые закономерности распределения генотипов (таблица 37).

Так, патогенные *tdh*<sup>+</sup> изоляты *V. parahaemolyticus* при MLVA типировании характеризуются сходными (2012 г.) и идентичными (2017 г.) аллельными профилями, при этом по результатам MLST у трех штаммов 2012 г. установлена идентичная структура и у одного – отличие по структуре гена альфа-субъединица трансгидрогеназы *pntA*. Учитывая идентичную геномную организацию «островов патогенности» у выделенных в 2012 г. четырех клинических штаммов вибриона, обнаружение при MLVA-типировании одно- и двухлокусных вариантов доминирующего генотипа можно

рассматривать как моноклональность данной группы вибрионов. Что касается штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от больных в 2017 г., установлена их идентичность по результатам MLVA и MLST. По структуре «островов патогенности» два данных изолята также характеризуются идентичной структурой.

Для нетоксигенных клинических (№№ 157-13-В, 4-14-В, 1-17) и водных изолятов (№№ 360-13-В, 356-13-В, 301-13-Н) вибриона установлено совпадение результатов определения их генотипов различными методами типирования.

Таблица 37 – Сравнение результатов MLVA-генотипов и аллельных профилей по генам «домашнего хозяйства» штаммов парегемолитического вибриона

Штамм	Наличие гена <i>tdh</i>	MLVA	MLST
226-12-В	+	Сходные*	Идентичные
235-12-В	+		
307-12-В	+		
238-12-В	+		
157-13-В	-	Уникальный	Уникальный
160-13-В	-	Идентичные	Сходные**
127-13-Н	-		
4-14-В	-	Уникальный	Уникальный
1-17	-	Уникальный	Уникальный
2-17_с/к	+	Идентичные	Идентичные
3-17	+		
295-12-В	-	Сходные*	Идентичные
362-15-Н	-		
315-12-В	-	Сходные*	Уникальный
362-12-В	-		
360-13-В	-	Уникальный	Уникальный
356-13-В	-	Уникальный	Уникальный
399-13-В	-	Сходные*	Идентичные
134-14-В	-		
301-13-Н	-	Уникальный	Уникальный

Примечание: \* - отличие по в 2-3 локусам, \*\* - отличие по одному гену «домашнего хозяйства»

В отдельных случаях у изолятов парегемолитического вибриона по результатам MLST установлена идентичная структура генов «домашнего хозяйства» (295-12-В и 362-15-Н, 399-13-В и 134-14-В), однако при MLVA-типировании изоляты 399-13-В и 134-14-В отличались по генотипу на одну повторяющую единицу по двум локусам *Vp02-07* и *Vptr3*, изоляты 295-12-В и 362-15-Н – на один-два повтора по локусам *Vptr1* и *Vp02-07*. Стоит также отметить, что при SNP-типировании данные изоляты

характеризовались идентичностью (399-13-B и 134-14-B) или имели сходную структуру (295-12-B и 362-15-H).

Лишь в одном случае изоляты *V. parahaemolyticus* с идентичным MLVA-генотипом, выделенные от больного и из р. Партизанская, по результатам MLST характеризовались сходными аллельными профилями с отличием по гену *ptnA* (таблица 37). Возможно, увеличение числа исследуемых VNTR-локусов повысит согласованность эпидемиологического анализа, проводимого по результатам типирования. Однако, в настоящее время многие исследователи используют сокращенные схемы MLVA-типирования, что позволяет значительно сократить время на анализ и стоимость исследования, при этом сохранив дискриминирующую способность метода.

Таким образом, использование MLVA-типирования парагемолитического вибриона по предложенной схеме, включающей анализ семи локусов переменных tandemных повторов, обеспечивает дифференциацию клинических изолятов с высокой дискриминирующей способностью, согласующуюся с эпидемиологическими данными. Соответственно, метод может быть рекомендован для эпидемиологического расследования вспышек ПТИ, вызванных патогеном, как в рамках оперативного, так и ретроспективного анализа. Для водных *V. parahaemolyticus* ввиду того, что при кластерном анализе MLVA-профилей распределение генотипов не имело приуроченности ни к водоему, ни к периоду изоляции вибриона, применение данного подхода не обладает достаточной информативностью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Холера, несмотря на усиленные меры борьбы с ней, остается социально значимой инфекционной болезнью, имеющей международное значение для общественного здравоохранения. Современный этап продолжающейся седьмой пандемии холеры характеризуется крупными вспышками холеры практически на всех континентах и множеством завозов из неблагополучных по холере стран на свободные территории, чему способствует интенсификация международных сообщений различными видами транспорта и активная миграция населения.

Одним из динамично развивающихся субъектов РФ на сегодняшний момент является Приморский край, значимый в расширении международного сотрудничества, особенно со странами Азиатско-Тихоокеанского региона (АТР).

При анализе миграционной активности в Приморском крае, в частности интенсивности пассажиропотока из зарубежных стран с 2015 г. по 2021 г., установлено доминирующее значение стран Азии в структуре въездной миграции с высокими показателями пассажиропотока из КНР, Республики Корея и Японии. С незначительными показателями интенсивности сообщение осуществлялось с такими странами Азии как Таиланд, КНДР, Вьетнам. Что касается роли различных видов транспорта, то основное значение имеет автомобильный транспорт, а географическая близость региона с КНР обуславливает развитие приграничного туризма в регионе.

Таким образом, риск завоза холеры из стран Азии на территорию региона существует всеми видами транспорта. Следует отметить высокую долю не верифицированных случаев водянистой диареи в странах Центральной, Юго-Восточной Азии и Африки. Согласно докладу секретариата ВОЗ EB128/13 по ориентировочным данным остаются не учтенными ежегодно 500-700 тыс. случаев диареи [80].

Если обстановка по холере в Приморском крае во многом продиктована вероятностью завоза инфекции, то в отношении пищевых токсикоинфекций, вызванных другим патогенным вибрионом – *V. parahaemolyticus*, ситуация несколько иная. Случаи заболевания ПТИ, обусловленными парегемолитическим вибрионом, в Приморском крае с 1997 г. по 2021 г. регистрировались практически ежегодно. В динамике эпидемического процесса ПТИ прослеживается подъем заболеваемости в летне-осенний период, связанный с активизацией механизмов и путей передачи вибриона. Наибольший удельный вес ПТИ установлен в августе –  $67,8 \pm 2,4$  % от общего числа выявленных

случаев. При анализе факторов передачи значимая роль принадлежит морепродуктам, что согласуется с данными ряда авторов о высоком риске инфицирования *V. parahaemolyticus* при употреблении сырых морепродуктов [85].

При этом, как в отношении холерного вибриона, так и в отношении парагемолитического вибриона, особое значение в распространении патогенов придается поверхностным водоемам. Наличие оптимальных условий в поверхностных водоемах для персистенции холерного вибриона является одним из рисков распространения возбудителя холеры на территории субъекта в случае завоза. Так, в период вспышки в Приморском крае в 1999 г. произошло накопление возбудителя холеры в водных объектах, что привело к инфицированию лиц, использовавших воду в хозяйственно-бытовых целях, что подтверждает роль водоемов в распространении холеры.

Для выяснения закономерностей циркуляции холерного и парагемолитического вибрионов в поверхностных водоемах Приморского края был проведен анализ результатов мониторинга вибриофлоры водоемов Приморского края в период с 2011 г. по 2021 г.

Результаты микробиологического мониторинга свидетельствуют о широком распространении холерного и парагемолитического вибрионов в поверхностных водоемах. За анализируемый период штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор были изолированы в гг. Владивостоке, Находке, Уссурийском городском округе, в Октябрьском районе. Кроме этого, имело место неоднократное выделение холерного вибриона R-варианта. Если выявление *V. cholerae* O1 Эль Тор носило спорадический характер, то холерные вибрионы не O1/O139 серогрупп ежегодно обнаруживались в водоемах г. Артем, Михайловском, Надеждинском, Партизанском, Пограничном, Спасском, Ханкайском, Хасанском и Шкотовском районах, дополнительно к вышеобозначенным районам.

Наибольшие показатели высеваемости холерного вибриона из поверхностных водоемов установлены в Октябрьском районе ( $12,9 \pm 1,25$  %), г. Владивостоке ( $9,9 \pm 0,37$  %), Уссурийском городском округе ( $9,5 \pm 0,49$  %), г. Находке ( $8,9 \pm 0,61$  %). Из водоемов г. Артем, Надеждинского и Шкотовского районов штаммы *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп были изолированы в течение одного-двух сезонов мониторинга.

Преимущественное выделение штаммов холерного вибриона ( $65,7 \pm 1,15$  %) из проб воды, отобранных в местах рекреационного водопользования, свидетельствуют о значении мест рекреации, как потенциальных «участков риска», в которых возможно накопление возбудителя холеры в случае завоза. Однако, необходимо отметить, несмотря на наибольший удельный вес штаммов, выделенных из мест рекреации, максимальная высеваемость *V. cholerae* приходится на трансграничные водоемы в местах сброса сточных вод ( $11,2 \pm 1,36$  %) (р. Раздольная, п. Покровка; р. Нестеровка, п. Пограничный).

При анализе результатов микробиологического мониторинга в отношении парагемолитического вибриона выявлены другие закономерности. Административные территории с многолетней высеваемостью вибриона из поверхностных водоемов привязаны к морскому побережью. Территориями с ежегодным выделением из поверхностных водоемов парагемолитического вибриона являются гг. Владивосток, Находка, Партизанский и Хасанский районы. Установлены высокие показатели высеваемости *V. parahaemolyticus* из объектов окружающей среды в Партизанском районе ( $10,1 \pm 0,55$  %). На данной территории водоемами с самыми высокими показателями высеваемости парагемолитического вибриона являются бухта Литовка и реки Партизанская и Литовка, отбор проб воды в стационарных точках которых производится в эстуариях, где происходит смешение речной и морской вод. При этом отмечено, что гидрохимический состав в эстуарных водах преимущественно характеризуется высоким количеством органических веществ, щелочным показателем рН и зависит напрямую от антропогенной деятельности (сброс сточных вод, функционирование промышленных комбинатов, птице- и животноводческая деятельность в акваториях рек выше по течению и т.д.) [73, 82, 278].

При анализе внутригодовой динамики выделения парагемолитического вибриона показано, что максимальный пик его высеваемости в сентябре ( $4,6 \pm 0,24$  %), в отличие от холерного вибриона для которого максимум высеваемости приходится на август ( $8,9 \pm 0,32$  %).

В муниципальных образованиях, на территории которых выделены изоляты *V. parahaemolyticus*, микроорганизмы обнаруживались в  $97,3 \pm 0,53$  % случаях в местах рекреационного водопользования.

С целью анализа популяций холерного и парагемолитического вибрионов в поверхностных водоемах Приморского края по комплексу фенотипических свойств нами было проведено исследование выделенных при различных эпидситуациях с 1976 г. по 2017 г. 142 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор, R-варианта, не O1/O139 серогрупп и выделенных от больных и из поверхностных водоемов в период с 2012 г. по 2017 г. штаммов *V. parahaemolyticus*. Для штаммов холерного вибриона в большинстве случаев установлена типичность изолятов по комплексу фенотипических свойств, соответствующих эпидситуации. В отдельных случаях обнаруживались штаммы *V. cholerae* атипичные по таким свойствам, как агглютинабельность холерными диагностическими сыворотками, лизабельность фагом классическим и отсутствие лизиса фагом эльтор, характерные преимущественно для водных изолятов *V. cholerae* периода эпидемиологического благополучия.

По результатам проведенного исследования фенотипических свойств штаммов *V. parahaemolyticus* также установлена типичность изолятов по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам. В ряде случаев, преимущественно, среди водных изолятов *V. parahaemolyticus*, выявляются атипичные штаммы. Так, у отдельных изолятов *V. parahaemolyticus*, выделенных из поверхностных водоемов, отмечается устойчивость к повышенному содержанию солей, что может рассматриваться как адаптационный механизм вибриона к условиям существования в соленых водах. Учитывая тот факт, что фенотипические признаки парагемолитического вибриона не всегда укладываются в схему основных дифференцирующих признаков различных микроорганизмов рода *Vibrio*, необходимо применение дополнительных методов индикации и идентификации данных патогенов.

Особое значение в настоящее время уделяется разработке и внедрению эффективных методов молекулярно-генетического типирования бактериальных патогенов на внутривидовом уровне, особенно в свете увеличивающегося числа атипичных по фенотипическим признакам культур патогенов. Существует множество генетических мишеней и основанных на их анализе методов типирования, успешно используемых в различных областях медицины.

Как известно, по структуре генетических локусов, определяющих патогенный, пандемичный и персистентный потенциал, холерному вибриону присуща высокая

вариабельность, являющаяся следствием приспособления к изменяющимся условиям существования в различных экологических нишах.

По результатам ПЦР-генотипирования 142 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор, R-варианта, не O1/O139 серогрупп показана высокая гетерогенность популяций холерного вибриона, циркулирующих в водоемах Приморского края в период эпидемиологического благополучия, по комплексу молекулярно-генетических признаков. Кластерный анализ ПЦР-генотипов исследуемых нетоксигенных штаммов холерного вибриона позволил выявить 28 генотипов, наиболее представленным из которых является генотип  $ctxA-tcpA^{-}hlyA^{-}toxR^{+}wbeT^{+}rtxA^{+}rtxC^{+}hapA^{+}ompUtnpO183^{-}proO490^{-}mshA^{+}mshQ^{+}vpsR^{+}$ , определенный у 22 исследуемых изолятов *V. cholerae* O1 Эль Тор (19,1 %), изолированных на территории края с 1976 г. по 2014 г.

Исследование изолятов *V. parahaemolyticus* на наличие основных и дополнительных детерминат патогенности (в том числе в составе «островов патогенности») по результатам ПЦР и полногеномного секвенирования, свидетельствует о патогенном потенциале отдельных штаммов *V. parahaemolyticus*, вызвавших групповые случаи ПТИ, в то время как выделенные при спорадических случаях и из поверхностных водоемов изоляты демонстрируют отсутствие факторов патогенности и неоднородность по наличию генетических детерминант патогенности.

Вместе с тем, для более углубленной оценки структуры популяций целесообразным представляется использование других методов молекулярного типирования. Одним из широко применяемых методов молекулярно-генетического типирования бактериальных патогенов, в т.ч. холерного и параземолитического вибрионов, является мультилокусный анализ вариабельных тандемных повторов, показавший по литературным данным высокую эффективность для типирования данных патогенов [3, 13, 15, 25, 33, 35, 52, 61, 151, 168, 220].

В результате MLVA-типирования установлена высокая вариабельность генома по наличию и количеству тандемных повторов штаммов холерного вибриона, выделенных из поверхностных водоемов Приморского края на фоне эпидемиологического благополучия, в отличие от эпидемически опасных вариантов. Такая гетерогенность популяции обусловлена как возможным воздействием факторов окружающей среды, ведущим к структурным изменениям генома с образованием близкородственных клонов, так и изменением профилей в процессе хранения культур на питательных



средах. Вместе с тем, выявленные значительные различия MLVA-профилей отдельных штаммов холерного вибриона в разные годы может быть свидетельством попадания в водоемы новых клонов. Возможна кратковременная или длительная циркуляция характеризующихся идентичным MLVA-профилем *V. cholerae* в поверхностных водоемах. Так, при мониторинге поверхностных водоемов на наличие возбудителя холеры г. Ростова-на-Дону с 2008-2012 гг. был выделен ряд штаммов с идентичным MLVA-профилем, но в разные годы [13]. Также выявлено, что идентичные профили были идентифицированы у штаммов *V. cholerae*, выделенных из поверхностных водоемов в различных стационарных точках отбора в период одного эпидемического сезона, что, по мнению исследователей, свидетельствует о возможном их селективном распространении [13]. Возможность длительной циркуляции клонов холерного вибриона в определенных экологических нишах, в т.ч. с незначительными изменениями MLVA-профиля, показана при исследовании штаммов *V. cholerae*, выделенных из водоемов Забайкальского края [61]. По результатам настоящего исследования на территории Приморского края с 2011 г. выявляются штаммы холерного вибриона с идентичным профилем, выделенные из одного водоема в один сезон мониторинга. Данный факт, несомненно, требует динамического слежения за такими водными объектами и дальнейшего исследования методом MLVA культур *V. cholerae* O1 серогруппы в случае бактериологического выделения. Проведенные исследования стабильности MLVA-генотипа штаммов холерного вибриона, пребывающих в условиях метаболического стресса и воздействии низких и комнатных температур, указывают на возможность трансформации генома, поэтому для исключения изменения MLVA-профилей в лабораторных условиях целесообразно проведение типирования непосредственно после изоляции культур холерного вибриона. Кроме этого, при интерпретации полученных результатов MLVA-типирования, необходимо принимать ряд таких факторов как данные анализа штаммов, выделенных из водоема ранее, тип стационарных точек, гидрологические особенности водного объекта и т.д.

Высокая гетерогенность популяций по результатам MLVA выявлена и в отношении парагемолитического вибриона, выделенного из поверхностных водоемов. При исследовании клинических изолятов парагемолитического вибриона, обусловивших групповые случаи ПТИ в 2012 г. и 2017 г., установлена принадлежность к одному кластеру с формированием однолокусных вариантов штаммов 2012 г. и

идентичность штаммов 2017 г., что свидетельствует о клональном характере групповых случаев ПТИ. На основании этого мультилокусный анализ переменных тандемных повторов перспективен, в первую очередь, для оперативного эпидемиологического анализа при расследовании групповых и спорадических случаев ПТИ. При этом сравнительный анализ результатов MLVA с данными, полученными другим методом – мультилокусным сиквенс-типированием показал, в целом, сопоставимость результатов. Однако необходимо учитывать возможность изменения MLVA-профиля и у парагемолитического вибриона под воздействием условий окружающей среды, которое было показано в эксперименте для возбудителя холеры. Высокая переменность структуры генома парагемолитического вибриона и низкая клональность изолятов без четкой географической приуроченности генотипов продемонстрирована О.С. Чемисовой с соавт. [81] при исследовании патогена INDEL-типированием, включающей анализ вставок и делеций нескольких нуклеотидов.

В целом, MLVA холерного и парагемолитического вибрионов по результатам проведенных нами исследований является эффективным инструментом для оперативного определения клональной структуры при групповых случаях вызванных данными патогенами заболеваний, при исследовании выделенных из поверхностных водоемов штаммов *V. cholerae*, проводимого в рамках эпидемиологического расследования обнаружения холерного вибриона. Оперативность получения результата, простота процедуры на фоне высокой дискриминирующей способности являются несомненными положительными качествами метода, который можно использовать на базе действующих центров индикации и секвенирования.

По структуре генов «домашнего хозяйства» *V. parahaemolyticus* установлена принадлежность патогенных изолятов (2012 г. и 2017 г.), выделенных в Приморском крае, к сиквенс-типам ST431 (2012 г.) и ST3 (2017 г.), отнесенным к клональному комплексу CC3. Обширная географическая представленность сиквенс-типов *V. parahaemolyticus*, входящих в данный клональный комплекс, свидетельствует о моноклональном происхождении пандемических вариантов, обусловивших развитие кишечных инфекций во всем мире. Что касается непатогенных изолятов, выделенных в Приморском крае как от больных при единичных случаях ПТИ, так и из поверхностных водоемов, для них установлена высокая переменность в структуре генома по результатам анализа генов «домашнего хозяйства». При этом идентифицированные

сиквенс-типы у штаммов парагемолитического вибриона в ряде случаев сходны по структуре генов со штаммами, выделенными из окружающей среды на территории Китая. В данном ключе, нельзя исключить роль балластных вод морских судов в перемещении различных вариантов парагемолитического вибриона на другие территории, что, несомненно, вносит разнообразие в существующие популяции патогена.

## ВЫВОДЫ

1. Потенциальный риск завоза холеры на территорию Приморского края определяется высоким показателем въездного пассажиропотока из эндемичных и неблагополучных по холере стран. В динамике установлено снижение интенсивности миграционных потоков в период пандемии COVID-19 с сохранением структуры доминирующих направлений. Регистрация случаев ПТИ, обусловленных *V. parahaemolyticus*, в Приморском крае свидетельствует о значимости микроорганизма в региональной инфекционной патологии.

2. Среди микроорганизмов *Vibrio* spp. в поверхностных водоемах Приморского края преимущественно обнаруживаются *V. cholerae* не O1/O139 серогрупп и паратегмолитические вибрионы, реже – нетоксигенные *V. cholerae* O1 и R-варианты. Наибольшая высеваемость изолятов холерного и паратегмолитического вибрионов приходится на трансграничные водоемы в местах сброса сточных вод (высеваемость  $11,2 \pm 1,36$ ;  $t=3,89$ ,  $p \geq 95,5$  %) и водоемы, используемые в целях рекреационного водопользования (высеваемость  $4,7 \pm 0,15$ ;  $t=6,72$ ,  $p \geq 95,5$  %).

3. Холерные и паратегмолитические вибрионы, циркулирующие в поверхностных водоемах Приморского края, фенотипически и генетически гетерогенны, в отличие от клинических, и характеризуются отсутствием основных детерминант патогенности – холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии (у холерного вибриона), прямого термостабильного гемолизина (у паратегмолитического вибриона).

4. При молекулярно-генетическом типировании обнаруживаемых в поверхностных водоемах Приморского края на фоне эпидемиологического благополучия *V. cholerae* идентифицировано 84 MLVA-генотипа, в т.ч. 65 уникальных, что свидетельствует о высокой гетерогенности водных популяций *V. cholerae*. Прослеживается связь генотипа с периодом выделения штамма и, в отдельных случаях, с определенным водоемом. Токсигенные изоляты в период вспышек преимущественно клональны, в ряде случаев установлено формирование субклональных вариантов, не выходящее за рамки адаптационной изменчивости.

5. Изолированные из поверхностных водоемов и при спорадических случаях ПТИ непатогенные *V. parahaemolyticus* демонстрируют гетерогенность MLVA-профилей без территориальной и временной приуроченности. Патогенные варианты

парагемолитического вибриона имеют идентичные или сходные MLVA-профили с привязкой к определенным эпидемическим осложнениям и принадлежат к глобально распространенным сиквенс-типам ST431 и ST3, что свидетельствует об их клональном происхождении.

6. На основании ретроспективного и оперативного анализа MLVA-генотипов клинических/водных изолятов холерного и парагемолитического вибрионов доказана высокая дискриминирующая способность метода и перспективность его применения в рамках оперативного молекулярно-эпидемиологического анализа при обнаружении *V. cholerae* и в расследовании эпидемических осложнений, обусловленных *V. parahaemolyticus*.

**ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ**

**АПП** – автомобильный пункт пропуска

**ВОЗ** – Всемирная организация здравоохранения (World Health Organization)

**ДНК** – дезоксирибонуклеиновая кислота

**ЖДПП** – железнодорожный пункт пропуска

**КНДР** – Коре́йская Народно-Демократи́ческая Респу́блика

**КНР** – Кита́йская Наро́дная Респу́блика

**КОЕ** – колониобразующие единицы

**РФ** – Росси́йская Федера́ция

**мкл** – микролитр

**МПП** – морской пункт пропуска

**ОКИ** – острые кишечные инфекции

**ООС** – объекты окружающей среды

**ПТИ** – пищевая токсикоинфекция

**п.н.** – пар нуклеотидов

**ПЦР** – полимеразная цепная реакция

**с/к** – субкультура

**СП** – санитарные правила

**ТС** – транспортное средство

**ЮАР** – Южно-Африканская Республика

**CDC** – Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for disease control and prevention)

**MLST** – мультилокусное сиквенс-типирование (Multilocus sequence typing)

**MLVA** – мультилокусный анализ переменных tandemных повторов (Multiple Locus Variable-Number Tandem Repeats Analysis)

**ORF** – открытая рамка считывания (Open reading frame)

**SNP** – однонуклеотидный полиморфизм (Single-Nucleotide Polymorphism)

**ST** – сиквенс-тип (Sequence type)

**UPGMA** – попарное невзвешенное кластирование с арифметическим усреднением (Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages)

**WGS** – полногеномное секвенирование (Whole genome sequencing)

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамов, А.К. Холера в СССР в период седьмой пандемии / А.К. Адамов, Ю.М. Ломов, В.В. Малеев, А.С. Марамович, Г.М. Мединский, М.И. Наркевич, Л.С. Подосинникова, В.И. Покровский, В.С. Уралева; Под ред. В.И. Покровского. – М.: Медицина, 2000. – 472 с.
2. Безсмертный, В.Е. Холерные вибрионы, выделенные в России в 2002 году / В.Е. Безсмертный, С.М. Иванова, Г.В. Титов, Б.Л. Мазрухо, Л.М. Смоликова, Л.С. Подосинникова // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону. – 2003. – Вып. 16 – С. 97-101.
3. Водопьянов, А.С. Вариабельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae* / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, М.Б. Мишанькин, И.Ю. Сучков, Б.Н. Мишанькин // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 85-88.
4. Водопьянов, А.С. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования / А.С. Водопьянов, Р.В. Писанов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии – 2021. – Т. 97 – № 6 – С. 587-593.
5. Водопьянов, С.О. Вариабельный тандемный повтор VcA of *Vibrio cholerae* / С. О. Водопьянов, И.П. Олейников, Е.К. Гончаров, О.В. Дуванова, М.В. Мишанькин, И.Ю. Сучков, А.С. Водопьянов, М.В. Шишияну, Е.В. Щербакова, И.В. Корниенко, В.Н. Мишанькин // Молекулярная биология – 2002. – Т.36 – № 6 – С. 1074-1-1079.
6. Водопьянов, С.О. Ген *tcpA* и эпидемиологическая значимость холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды / С.О. Водопьянов, М.Б. Мишанькин, И.П. Олейников, И.Я. Черепахина, О.В. Дуванова, Б.Н. Мишанькин // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону. – 1999. – Вып.12 – С. 50-55.
7. Водяницкая, С.Ю. О результатах мониторинговых исследований балластных вод и данных идентификации штаммов вибрионов, выделенных в ходе исследований судов в российских портах в 2018 году / С.Ю. Водяницкая, О.В. Сергиенко, Н.Г. Иванова, В.В. Балахнова, И.В. Архангельская, М.В. Ренгач, Н.Б.

Непомнящая, С.В. Воловикова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии – 2020. – Т. 97 – № 1 – С. 55-61.

8. Воронок, В.М. Анализ групповой и вспышечной заболеваемости в Приморском крае / В.М. Воронок // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 3 (66) – 2016. – С.78-84. doi:10.18411/hmes.d-2016-117

9. Гальцева, Г.В. Вибриофлора водных объектов рекреационных зон черноморского побережья и ее роль в патологии человека / Г.В. Гальцева, А.М. Зайденов, Р.А. Брудный и др. // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 1994. – № 6. – С. 48-50.

10. Гидрометеорология и экология Дальнего Востока // Тематический вып. ДВНИГМИ №4. Владивосток: Дальнаука, 2003. 219 с.: ил.

11. ГИС. Внешний эпидемиологический риск – заболеваемость [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://gis.antiplague.ru/epid1.php>

12. Гольдапель, Э.Г. Аллельный полиморфизм генов «домашнего хозяйства» нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока / Э.Г. Гольдапель, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2013. – № 6 (94). – С. 132-135.

13. Ежова, М.И. Холерные вибрионы O1 серогруппы, выделенные из водных объектов Ростова-на-Дону в ходе мониторинга в 2008-2012. / М.И. Ежова, В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.С. Шестиалтынова, И.П. Олейников, Н.Б. Непомнящая, О.А. Подойницына // Проблемы особо опасных инфекций – 2013. – № 4 – С. 56-59.

14. Колпаков, Н.В. Антропогенное загрязнение эстуариев Южного Приморья: Обзор / Н. В. Колпаков // Известия Тинро – 2016. – Т. 187 – С. 3-18.

15. Кульшань, Т.А. Молекулярное типирование методом MLVA типичных и генетически измененных природных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эльтор / Т.А. Кульшань, Я.М. Краснов, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций – 2012. – № 4 – С. 39-43.

16. Кучеренко, В.З. Применение методов статистического анализа / В.З. Кучеренко, М.В. Авксентьева, В.М. Алексеева, А.П. Голубева, О.А. Манерова, Г.С. Шестаков, Л.Ф. Ведмеденко, Г.К. Краева, М.А. Кубраков, В.Г. Петухов, Н.М. Шустикова, Н.В. Эккерт, Н.А. Касимовская, М.С. Микерова, О.Г. Мхитаров, Ю.С.



Суханова; под ред. В.З. Кучеренко. – 4-е изд, перераб. и доп. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. – 256 с.

17. Лаженцева, Л.Ю. Микробиологическая оценка анадары (*Anadara broughtoni*) зал. Петра Великого / Л. Ю. Лаженцева, Л. В. Шульгина, А. С. Гришин, Г. И. Загородная, С. В. Явнов // Известия ТИНРО – 2004. – Т. 138 – С. 389-396.

18. Лаженцева, Л.Ю. Оценка по микробиологическим показателям дальневосточного двустворчатого моллюска *Spisula Sachalinensis* / Л. Ю. Лаженцева, Л. В. Шульгина, Е. В. Лихачева // Известия высших учебных заведений. Пищевая технология – 2008. – № 4 – С. 20-22.

19. Лаженцева, Л.Ю. Распространенность галофильных вибрионов в морских промысловых объектах и продуктах из них. Обзор // Л.Ю. Лаженцева. Исследования водных биологических ресурсов Камчатки и северо-западной части Тихого океана. – 2012. – № 26 – С.33-51.

20. Левченко, Д.А. Атипичность штаммов *Vibrio cholerae* O1 по признаку агглютинабельности / Д.А. Левченко, И.В. Архангельская, В.Д. Кругликов, О.А. Подойницына // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии – 2020. –Т. 97 – № 5 – С. 482-491.[doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-10](https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-5-10)

21. Либинзон, А. Е. Галофильные вибрионы, выделенные из Азовского моря / А.Е. Либинзон, А.И. Демина, Г.И. Кулов, И.С. Шестиалтынова, Г.В. Манукьян // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 1977. – № 6. – С. 77-79.

22. Либинзон, А. Е. О выделении парегемолитических вибрионов от людей с острыми желудочно-кишечными заболеваниями / А.Е. Либинзон, Г.Д. Лебедев, И.В. Павлова, А.Ф. Нагорная, Н.В. Краснова, Е.Ф. Кутишевская, Г.М. Сухнова, З.И. Ус, А.И. Демина, Е.И. Сергеева, Р.Б. Кривцова // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 1975. – № 9. – С. 25-29.

23. Либинзон, А. Е. Парагемолитические вибрионы и родственные галофильные микроорганизмы Черного моря / А.Е. Либинзон, И.В. Домарадский, З.И. Ус, А. И. Демина, А.Ф. Нагорная, Г.М. Сухнова, Р.Б. Кривцова // Журн. микробиол. – 1974. – № 5. – С. 80-84.

24. Либинзон, А. Е. Этиологическая структура пищевых токсикоинфекций, вызванных морскими галофильными вибрионами / А.Е. Либинзон, З.И. Ус, А.Ф. Нагорная, Г.В. Гальцева, В.А. Шиколов, Ю.А. Рябченко, А.Г. Лобода, Г.Л. Карбышев,

Н.В. Гордиенко // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 1994. – № 6. – С. 20-21.

25. Мазрухо, А.Б. Результаты мониторинга за холерными вибрионами в акватории Таганрогского залива Азовского моря в 2011-2012 гг. Эпидемиология и инфекционные болезни / 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.

26. Марамович, А.С. Роль и назначение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры / А.С. Марамович, Л.Я. Урбанович, Е.С. Куликалова, Т.Т. Шкаруба // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2009. – № 2. – С. 21- 26.

27. Маслов, Д.В. Вспышка галлофилеза среди населения города Владивостока Приморского края. Здоровье населения и среда обитания.– 1997. – №12 (57) – С. 17-18.

28. Методические указания «Лабораторная диагностика заболеваний, вызываемых паразитическими и другими патогенными для человека вибрионами»: МУК 4.2.1793–03 (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 02.11.2003). – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2003. – 39 с.

29. Методические указания «Лабораторная диагностика холеры»: МУК 4.2.2218–07 (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 31.05.2007). – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2007. – 87 с.

30. Методические указания «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности»: МУ 1.3.2569-09 (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 22.12.2009). – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2009. – 51 с.

31. Минин, Г.Д. О завозном случае холеры в Белорецке Республики Башкортостан / Г. Д. Минин, Л. И. Коробов, А. И. Кологоров, Н. А. Осина, З. Ф. Сакаев, Р. Г. Галлямов, Л. К. Галлямова, Н. К. Кузьминых, М. Ю. Ежова, С. А. Ширлина, А. Г.

Степаненко, Н. С. Сулейманов, А. М. Сыса, С. Г. Киреев, З. В. Малыхина, А. В. Топорков, Е. В. Рожкова // Проблемы особо опасных инфекций – 2005. – № 1 – С. 23-25.

32. Миронова, Л.В. Ретроспективный макрорестрикционный анализ штаммов *Vibrio cholerae eltor*, изолированных при эпидемических осложнениях на Дальнем Востоке России / Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, Е.А. Басов, Л.Я. Урбанович, С.В. Балахонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 2. – С. 29-36.

33. Мишанькин, Б.Н. Вариабельные тандемные нуклеотидные повторы (VNTR-анализ) у *Vibrio cholerae* O139, выделенных от людей и из воды поверхностных водоемов России / Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов, С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, Е.К. Гончаров, О.В. Дуванова, М.В. Шишияну // Журн. микробиол. – 2004. – № 1 – С. 29-34.

34. Мишанькин, Б.Н. Мультилокусное VNTR-генотипирование культур холерных вибрионов, выделенных в г. Казань во время вспышки холеры летом 2001 г. / Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов, С.О. Водопьянов, Л.В. Романова, И.Я. Черепяхина, И.Ю. Сучков, О.В. Дуванова, М.В. Шишияну // Журн. микробиол. – 2003. – №6 – С. 11-15.

35. Мишанькин, Б.Н. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры / Б.Н. Мишанькин, А.С. Водопьянов, Ю.М. Ломов, Л.В. Романова, С.О. Водопьянов, И.Ю. Сучков, М.Б. Мишанькин, И.Я. Черепяхина, О.В. Дуванова, М.В. Шишияну // Молекул. генетика, микробиология и вирусология – 2004. – № 4 – С. 28-33.

36. Монахова, Е.В. Структура и изменчивость генов факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп / Е.В. Монахова, Е.П. Омельчук, И.В. Архангельская, Р.В. Писанов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону. – 2017. – Вып. 30 – С. 150-155.

37. Москвитина, Э.А. Прогноз по холере на 2019 г. на основании анализа эпидемиологической обстановки в мире, СНГ и России в 2009-2018 гг. / Э.А. Москвитина, Е.Г. Янович, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, М.П. Куриленко, Н.Л. Пичурина, А.С. Водопьянов, Д.А. Левченко, С.М. Иванова, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – №1 – С. 64-73.

38. Москвитина, Э.А. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне / Э. А. Москвитина, А. Б. Мазрухо, О. Л. Адаменко, В. Д. Кругликов // Проблемы особо опасных инфекций – 2012. – № 1 – С. 11-16.

39. Москвитина, Э.А. Эпидемиологические особенности холеры на современном этапе седьмой пандемии / Э.А. Москвитина, А.Б. Мазрухо, О.А. Арешина, О. Л. Адаменко, А.А. Назаретян, Г.Б. Анисимова // Эпидемиология и инфекционные болезни – 2014. – Т. 9 – № 4 – С. 44-49.

40. Мурначев, Г.П. Становление торгового пути на Дальнем Востоке России и его роль в заносе и распространении холеры / Г. П. Мурначев, А. С. Марамович // Проблемы особо опасных инфекций – 2005. – № 89 – С. 25-29.

41. Мурначев, Г.П. Холера в Приморье: Эколого-эпидемиологические аспекты / Г.П. Мурначев, А.С. Марамович, Д.В. Маслов, А.В. Алленов – Владивосток, 2009. – 279 с.

42. Носков, А.К. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год / А.К. Носков, В.Д. Кругликов, А.А. Лопатин, О.С. Чемисова, Д.А. Левченко, С.М. Иванова, Е.В. Монахова, И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Е. Гаевская, О.А. Подойницына, М.И. Ежова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии – 2021. – Т. 98 – № 2 – С. 163-175. doi.org/10.36233/0372-9311-56

43. О состоянии и использовании водных ресурсов Российской Федерации в 2018 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2019. – С. 289. Режим доступа: [http://fcpvkh.ru/wp-content/uploads/2019/12/2019\\_gosdoklad\\_voda2018\\_new\\_09122019.pdf](http://fcpvkh.ru/wp-content/uploads/2019/12/2019_gosdoklad_voda2018_new_09122019.pdf)

44. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2012 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2013. – С. 1-240. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/306/-/asset\\_publisher/XbM9/content/](http://25.rospotrebnadzor.ru/306/-/asset_publisher/XbM9/content/)

45. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2013 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2014. – С. 1-268. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=9ea39a4d-50ba-42e4-bd2a-14c42c81a60c&groupId=10156](http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=9ea39a4d-50ba-42e4-bd2a-14c42c81a60c&groupId=10156)

46. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2014 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2015. – С. 1-273. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=b28f9503-1731-4c50-86a2-b99e9f7dbf99&groupId=10156](http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=b28f9503-1731-4c50-86a2-b99e9f7dbf99&groupId=10156)
47. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2015 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2016. – С. 1-308. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/306/-/asset\\_publisher/XbM9/content/](http://25.rospotrebnadzor.ru/306/-/asset_publisher/XbM9/content/)
48. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2016 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2017. – С. 1-285. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=499405fe-0f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156](http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=499405fe-0f7d-4955-b259-44e2b377dd4d&groupId=10156)
49. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Приморском крае в 2018 году [Электронный ресурс]. – Государственный доклад. – 2019. – С. 1-343. Режим доступа: [http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document\\_library/get\\_file?uuid=66d89a32-b813-45f4-926a-0224e04a5f4a&groupId=10156](http://25.rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=66d89a32-b813-45f4-926a-0224e04a5f4a&groupId=10156)
50. Огородникова, А.А. Эколого-экономическая оценка воздействия береговых источников загрязнения на природную среду и биоресурсы залива Петра Великого : моногр. – Владивосток : ТИПРО-центр, 2001. – С. 194.
51. Онищенко, Г.Г. Мероприятия по локализации и ликвидации вспышки в Республике Татарстан / Г. Г. Онищенко, В. В. Морозов, В. А. Трифонов, Н. Х. Фатхуллина, В. В. Гасилин, Н. В. Пигалова // Казанский медицинский журнал – 2002. – Т. 83 – № 5 – С. 390-393.
52. Онищенко, Г.Г. Характеристика культур холерных вибрионов O1, изолированных из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2002 г. / Г.Г. Онищенко, Ю.М. Ломов, Б.Л. Мазрухо, Б.Н. Мишанькин, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов // Журн. микробиол. – 2004. – № 2. – С. 3-7.
53. Онищенко, Г.Г. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее / Г.Г. Онищенко, Е.Н. Беляев, Э.А. Москвитина, В.И. Резайкин, Ю.М. Ломов, Г.М. Мединский. Под

общей редакцией заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук, профессора Мединского Г.М. – Ростов-на-Дону, 1995. – 120 с.

54. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль-Тор в г. Владивосток / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский, Д.В. Маслов, Т.И. Вершкова, Л.Я. Урбанович, А.В. Алленов, Г.П. Мурначев, Л.Е. Гарковенко, В.М. Воронок // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С. 26-31.

55. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль-Тор в г. Южно-Сахалинск / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский, Е.В. Папиренко, В.С. Ганин, В.Л. Бурый, И.В. Морозова, Т.М. Мартынова // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С. 31-35.

56. Онищенко, Г.Г. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 стхАВ<sup>-</sup> тсрА<sup>+</sup> / Г.Г. Онищенко, Ю.М. Ломов, Э.А. Москвитина, Л.С. Подосинникова, С.Ю. Водяницкая, В.И. Прометной, Е.В. Монахова, С.О. Водопьянов, Н.Р. Телесманич, Н.А. Дудина // Журн. микробиол. – 2007. – № 1 – С. 23-29.

57. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, О.Л. Адаменко, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов // Вестник РАМН – 2015. – Т.70 – №2 – С. 249-256.

58. Осин, А.А. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры / А.В. Осин, К.С. Нефедов, Г.А. Ерошенко, Н.И. Смирнова // Генетика. – 2005. – № 1, Т. 41. – № 1 – С. 53-62.

59. Осин, А.В. Разработка алгоритма MLST-типирования пандемических и предпандемических штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / А.В. Осин, Я.М. Краснов, Н.П. Гусева, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций – 2011. – Вып. 107. – С. 58-61.

60. Официальный сайт Международного аэропорта г. Владивосток им. В.К. Арсеньева [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.vvo.aero/>

61. Пономарева, А.С. MLVA-типирование штаммов *Vibrio cholerae* El Tor, выделенных на территории Забайкальского края в период седьмой пандемии / А.С. Пономарева, Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, А.Б. Мошкин, С.В. Балахонов //

Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2017. – Т.16 – № 3 – С. 50-57.

62. Распространение в мире инфекционных болезней, значимых для обеспечения эпидемиологического благополучия. Восточно-средиземноморский регион [Электронный ресурс]. – 2020. – С.238. Режим доступа: [http://www.microbe.ru/files/Reference\\_book\\_Vol1.pdf](http://www.microbe.ru/files/Reference_book_Vol1.pdf).

63. Распространение в мире инфекционных болезней, значимых для обеспечения эпидемиологического благополучия. Европейский регион [Электронный ресурс]. – 2022. – С.452. Режим доступа: [http://www.microbe.ru/files/Reference\\_book\\_Vol2.pdf](http://www.microbe.ru/files/Reference_book_Vol2.pdf)

64. Распространение в мире инфекционных болезней, значимых для обеспечения эпидемиологического благополучия. Американский регион [Электронный ресурс]. – 2022. – С.529. Режим доступа: [http://www.microbe.ru/files/Reference\\_book\\_Vol3.pdf](http://www.microbe.ru/files/Reference_book_Vol3.pdf)

65. Рыковская, О. А. Разработка комплексного метода оценки вирулентности параземолитических вибрионов / О.А. Рыковская, О.А. Шалу, Е.В. Монахова, Л.М. Смоликова, О.С. Чемисова, Е.Н. Голенищева, Е.М. Санамянц, Г.В. Гальцева, А.В. Алленов, Г.П. Мурначев, Т.В. Хоменко // Клин. лаб. диагностика. – 2013. – № 2. – С. 38-41.

66. Савилов, Е.Д. Эпидемиологический анализ: Методы статистической обработки материала / Е.Д. Савилов, В.А. Астафьев, С.Н. Жданова, Е.А. Заруднев. – Новосибирск: Наука-Центр, 2011. – 156 с.

67. Санитарно-эпидемиологические правила и нормы «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней»: СанПиН 3.3686-21 (утв. Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации 28.01.2021). – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. – 1092 с.

68. Смирнова, Н.И. Генетический контроль патогенности *Vibrio cholerae*: умеренный нитевидный фаг СТХ, кодирующий холерный токсин и «остров патогенности» / Н.И. Смирнова // Молекул. генетика. – 1999. – № 4. – С. 3-11.

69. Смирнова, Н.И. Изучение распространенности основных генов вирулентности среди различных штаммов *Vibrio cholerae El-Tor* для определения их эпидемической значимости. / Н.И. Смирнова, В.В. Кутырев, О.А. Кириллина, Н.Б.

Челдышова // Молекул. генетика, микробиология и вирусология – 2001. – № 3. – С. 23-28.

70. Смирнова, Н.И. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью / Н.И. Смирнова, Т.А. Кульшань, Е.Ю. Баранихина, Я.М. Краснов, Д.А. Агафонов, В.В. Кутырев // Генетика. – 2016. – Т. 52 – № 9 – С. 1029-1041.

71. Смоликова, Л.В. Галофильные вибрионы, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции в г. Владивостоке / Л.В. Смоликова, Ю.М. Ломов Ю.М., Т.В. Хоменко и др. // Журн. микробиол. – 1998. – № 6. – С. 3 – 7.

72. Тарасенко, Т.Т. Заболеваемость прочими кишечными инфекциями в Приморском крае / Т.Т. Тарасенко, Е.В. Косенок, В.А. Кривоногова, Ф.Н. Шевердина // Здоровье. Медицинская экология. Наука – 2016. – Т. 3 – № 66 – С.127–134.

73. Тарасенко, Т.Т. Пищевые токсикоинфекции, вызываемые галофильными вибрионами, в г. Владивосток: эпидемиологическая характеристика / Т.Т. Тарасенко, Г.А. Грушина, В.М. Воронок, Т.В. Хоменко // Микробиология, эпидемиология и иммунология. – 1999. – № 2 (1) – С. 36-39.

74. Титова, С.В. Ситуация по холере в мире в 2018 году, прогноз на 2019 год научное обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, О.С. Чемисова, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Е.В. Монахова, Д.А. Левченко, Н.Е. Гаевская, Н.Л. Пичурина // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону. – 2019. – Вып. 32 – С. 12-21.

75. Титова, С.В. Современные подходы к мониторингу / С.В. Титова, Э.А. Москвитина, Р.В. Писанов, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону. – 2015. – Вып. 28 – С. 10-17.

76. Тищенко, П.Я. Гидрохимические исследования эстуария река Раздольная – Амурский залив / под ред. Л.М. Грамм-Осипов. Владивосток: Дальнаука, 2005. – С. 53-88.

77. Тищенко, П.Я. Гидрохимия эстуария реки Туманной (Японское море) / П.



Я. Тищенко, П.Ю. Семкин, Г.Ю. Павлова, П.П. Тищенко, В.Б. Лобанов, А.А. Марьяш, Т.А. Михайлик, С.Г. Сагалаев, А.Ф. Сергеев, Е.Ю. Тибенко, Н.Д. Ходоренко, Р.В. Чичкин, М.Г. Швецова, Е.М. Шкирникова // *Океанол.* – 2018. – Т. 58, № 2. – С. 192–204.

78. Топорков, В.П. Ретроспективный анализ заносных случаев холеры в г. Белорецк Республики Башкортостан в 2008 году. / В. П. Топорков, А. И. Кологоров, Н. А. Осина, Т. В. Бугоркова, С. А. Щербакова, С. А. Портенко, Н. А. Кучимова, О. М. Мавлютов, Л. А. Фарвазова, Р. Г. Галлямов, И. А. Иванова, Л. И. Коробов, А. М. Сыса, Ю. А. Короткова // *Проблемы особо опасных инфекций* – 2009. – № 3 – С. 31-33.

79. Урбанович, Л.Я. Современные представления об эпидемиологии, клинико-лабораторной диагностике и дифференцированном объеме противохолерных мероприятий / *Материалы семинара по сан. охране территории РФ от завоза и распространения железнодорожным транспортом особо опасных инфекционных болезней.* – Иркутск. –2006. – С.57-77.

80. Холера: механизм борьбы и профилактики [Электронный ресурс]. – Пересмотренный проект резолюции, предложенный Бангладеш. – 2011. – С. 1-4. Режим доступа: [https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf\\_files/EB128/B128\\_13Add1Rev1-ru.pdf](https://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/EB128/B128_13Add1Rev1-ru.pdf)

81. Чемисова, О.С. Молекулярное типирование штаммов *V. parahaemolyticus* на основе INDEL-маркеров / О.С. Чемисова, А.С. Водопьянов, О.А. Рыковская, С.О. Водопьянов, Е.Н. Голенищева // *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучения.* – 2018. – Т.7, №3. – С. 26-30. doi: 10.24411/2305-3496-2018-13004

82. Шулькин, В.М. Поступление загрязняющих веществ в залив Петра Великого и оценка их вклада в создание экологических проблем / В.М. Шулькин, Г.И. Семькина // *Современное экологическое состояние залива Петра Великого Японского моря* – Владивосток: Издат. дом ДВФУ, 2012. – С. 252-287.

83. Янович, Е.Г. Эпидемиологические риски: значение при районировании административных территорий и в активизации эпидемического процесса при инфекционных болезнях / Е.Г. Янович, Э.А. Москвитина // *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* – 2019. – Т. 18 – № 6 – С. 81-89. doi.org/10.31631/2073-3046-2019-18-6-81-89

84. Akther, F. Major tdh+ *Vibrio parahaemolyticus* serotype changes temporally in the Bay of Bengal estuary of Bangladesh / F. Akther, S. B. Neogi, W. B. Chowdhury, A. Sadique, A. Islam, M. Z. Akhter, F. T. Johura, M. Ohnishi, H. Watanabe, Y. Boucher, M.

Alam // Infect. Genet. Evol. – 2016. – Vol. 41 – P. 153-159.

85. Altekruise, S.F. *Vibrio gastroenteritis* in the US Gulf of Mexico region: The role of raw oysters / S. F. Altekruise, R. D. Bishop, L. M. Baldy, S. G. Thompson, S. A. Wilson, B. J. Ray, P. M. Griffin // Epidemiol. Infect. – 2000. – Vol. 124 – № 3 – P. 489-495.

86. Anandan, S. Prevailing clone (ST69) of *Vibrio cholerae* O139 in India over 10 years / S. Anandan, N. K. Devanga Ragupathi, D. P. Muthuirulandi Sethuvel, S. Thangamani, B. Veeraraghavan // Gut Pathog. – 2017. – Vol. 9 – № 1 – P. 1-7.

87. Ansede-Bermejo, J. Origins and colonization history of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* in South America / J. Ansede-Bermejo, R. G. Gavilan, J. Trinanes, R. T. Espejo, J. Martinez-Urtaza // Mol. Ecol. – 2010. – Vol. 19 – № 18 – P. 3924-3937.

88. Baker-Austin, C. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming / C. Baker-Austin, J. A. Trinanes, N. G. H. Taylor, R. Hartnell, A. Siitonen, J. Martinez-Urtaza // Nat. Clim. Chang. – 2013. – Vol. 3 – № 1 – P. 73-77.

89. Baker-Austin, C. Environmental occurrence and clinical impact of *Vibrio vulnificus* and *Vibrio parahaemolyticus*: A European perspective / C. Baker-Austin, L. Stockley, R. Rangdale, J. Martinez-Urtaza // Environ. Microbiol. Rep. – 2010. – Vol. 2 – № 1 – P. 7-18.

90. Balakhonov, S. V. Whole-genome sequencing of a *Vibrio cholerae* El Tor strain isolated in the imported cholera focus in Siberia / S. V. Balakhonov, L. V. Mironova, E. A. Basov, A. S. Gladkikh, M. V. Afanasev, V. S. Ganin, L. Y. Urbanovich, E. A. Sidorova // Genome Announc. – 2015. – Vol. 3 – № 2 – P. e01550-14.

91. Baptista, M.A.S. The Amazonia Variant of *Vibrio cholerae*: Molecular Identification and Study of Virulence Genes / M. A. S. Baptista, J. R. C. Andrade, A. C. P. Vicente, C. A. Salles, A. Coelho // Mem. Inst. Oswaldo Cruz. – 1998. – Vol. 93 – № 5 – P. 601-607.

92. Barrett, T.J. Interpretation of pulsed-field gel electrophoresis patterns in foodborne disease investigations and surveillance / T. J. Barrett, P. Gerner-Smidt, B. Swaminathan // Foodborne Pathog. Dis. – 2006. – Vol. 3 – № 1 – P. 20-31.

93. Barua, H. In vitro and in vivo investigation on genomic stability of *Salmonella enterica* Typhimurium DT41 obtained from broiler breeders in Denmark / H. Barua, I. L. Lindblom, M. Bisgaard, J. P. Christensen, R. H. Olsen, H. Christensen // Vet. Microbiol. – 2013. – Vol. 166 – № 3-4 – P. 607-616.

94. Belen, A. Multilocus Sequence Typing / A. Belén, I. Pavón, M. C. J. Maiden // *Methods Mol. Biol.* – 2009. – № 551 – P. 129-140.
95. Boyd, E. F. Molecular analysis of the emergence of pandemic *Vibrio parahaemolyticus* / A.L. Cohen, L.M. Naughton, D.W. Ussery, T.T. Binnewies, O. C. Stine, M. A Parent // *BMC Genomics.* – 2008. – Vol. 8. – P. 110.
96. Bundi, M. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017 / M. Bundi, M. M. Shah, E. Odoyo, C. Kathiiko, E. Wandera, G. Miring'u, S. Guyo, D. Langat, K. Morita, Y. Ichinose // *Microbiol. Immunol.* – 2019. – Vol. 63 – № 9 – P. 350-358.
97. Call, D.R. Impact of compounding error on strategies for subtyping pathogenic bacteria / D. R. Call, L. Orfe, M. A. Davis, S. Lafrentz, M. S. Kang // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2008. – Vol. 5 – № 4 – P. 505-516.
98. Chao, G. Distribution of Genes Encoding Four Pathogenicity Islands (VPaIs), T6SS, Biofilm, and Type I Pilus in Food and Clinical Strains of *Vibrio parahaemolyticus* in China / G. Chao, X. Jiao, X. Zhou, F. Wang, Zh. Yang, J. Huang, Zh. Pan, L. Zhou, X. Qian // *Foodborne Pathogenes and disease.* – 2010. – Vol. 7 - №7 – P. 649-658.
99. Chao, G. Origin of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pandemic clone / G. Chao, F. Wang, X. Zhou, X. Jiao, J. Huang, Z. Pan, L. Zhou, X. Qian // *Int. J. Food Microbiol.* – 2011. – Vol. 145 – № 2-3 – P. 459-463.
100. Chao, G. Systematic functional pandemic strain-specific genes, three genomic islands, two T3SSs in foodborne, and clinical *Vibrio parahaemolyticus* Isolates in China / G. Chao, X. Jiao, X. Zhou, Z. Yang, Z. Pan, J. Huang, L. Zhou, X. Qian // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2009. – Vol. 6 – № 6 – P. 689-698.
101. Chiavelli, D.A. The Mannose-Sensitive Hemagglutinin of *Vibrio cholerae* Promotes Adherence to Zooplankton / D. A. Chiavelli, J. W. Marsh, R. K. Taylor // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2001. – Vol. 67 – № 7 – P. 3220-3225.
102. Choi, S.Y. Multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring classical toxin B / S. Y. Choi, J. H. Lee, Y. S. Jeon, H. R. Lee, E. J. Kim, M. Ansaruzzaman, N. A. Bhuiyan, H. P. Endtz, S. K. Niyogi, B. L. Sarkar, G. B. Nair, B. M. Nguyen, N. T. Hien, C. Czerkinsky, J. D. Clemens, J. Chun, D. W. Kim // *J. Med. Microbiol.* – 2010. – Vol. 59 – № 7 – P. 763-769.
103. Choi, S.Y. Phylogenetic diversity of *Vibrio cholerae* associated with endemic

cholera in Mexico from 1991 to 2008 / S. Y. Choi, S. M. Rashed, N. A. Hasan, M. Alam, T. Islam, A. Sadique, F. T. Johura, M. Eppinger, J. Ravel, A. Huq, A. Cravioto, R. R. Colwell // MBio – 2016. – Vol. 7 – № 2 – P. e02160-15.

104. Cholera, 2015. Wkly Epidemiol Rec. 2016; 91 (38): 433-440.

105. Cholera, 2016. Wkly Epidemiol Rec. 2017; 92 (36): 521-536.

106. Cholera, 2017. Wkly Epidemiol Rec. 2018; 93 (38): 489-500.

107. Cholera, 2018. Wkly Epidemiol Rec. 2019; 94 (48): 561-580.

108. Cholera, 2019. Wkly Epidemiol Rec. 2020; 95 (37): 441-448.

109. Cholera, 2020. Wkly Epidemiol Rec. 2021; 96 (37): 445-460.

110. Cholera, 2021. Wkly Epidemiol Rec. 2022; 97 (37): 453-464.

111. Chow, K.H. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR / K. H. Chow, T. K. Ng, K. Y. Yuen, W. C. Yam // J. Clin. Microbiol. – 2001. – Vol. 39 – № 7 – P. 2594-2597.

112. Chowdhury, G. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India / G. Chowdhury, R. K. Bhadra, S. Bag, G. P. Pazhani, B. Das, P. Basu, K. Nagamani, R. K. Nandy, A. K. Mukhopadhyay, T. Ramamurthy // J. Med. Microbiol. – 2016. – Vol. 65 – № 10 – P. 1130-1136.

113. Chowdhury, N.R. Assessment of Evolution of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* by Multilocus Sequence Typing / N. R. Chowdhury, O. C. Stine, J. G. Morris, G. B. Nair // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42 – № 3 – P. 1280-1282.

114. Chun, J. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae* / J. Chun, C.J. Grim, N.A. Hasan, J.H. Lee, S.Y. Choi, B.J. Haley, E. Taviani, Y.S. Jeon, D.W. Kim, J.H. Lee, T.S. Brettin, D.C. Bruce, J.F. Challacombe, J.C. Detter, C.S. Han, A.C. Munk, O. Chertkov, L. Meincke, E. Saunders, R.A. Walters, A. Huq, G.B. Nair, R.R. Colwell // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009 – Vol. 106 – № 36 – P. 15442-7.

115. Cooley, M.B. Effects of environmental stress on stability of tandem repeats in *Escherichia coli* O157:H7 / M. B. Cooley, D. Carychao, K. Nguyen, L. Whitehand, R. Mandrell // Appl. Environ. Microbiol. – 2010. – Vol. 76 – № 10 – P. 3398-3400.

116. Crawford J.A. Membrane localization of the ToxR winged-helix domain is required for TcpP-mediated virulence gene activation in *Vibrio cholerae* / J.A. Crawford, E.S. Krukonis, V.J. DiRita // Mol. Microbiol. – 2003. – Vol. 47 – № 5 – P. 1459-1473.

117. Crawford, J.A. Analysis of ToxR-dependent transcription activation of ompU, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae* / J. A. Crawford, J. B. Kaper, V. J. DiRita // Mol. Microbiol. – 1998. – Vol. 29 – № 1 – P. 235-246.

118. Danin-Poleg, Y. *Vibrio cholerae* strain typing and phylogeny study based on simple sequence repeats / Y. Danin-Poleg, L. A. Cohen, H. Gancz, Y. Y. Broza, H. Goldshmidt, E. Malul, L. Valinsky, L. Lerner, M. Broza, Y. Kashi // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45 – № 3 – P. 736-746.

119. Deng, Z.A. Application of pulse-field gel electrophoresis analysis in source-tracking of food-borne disease caused by *Vibrio parahaemolyticus* / Z. A. Deng, X. Q. Li, Y. S. Hu, J. H. Liu, X. Q. Zhang, Y. W. Lin, Z. Y. Mo // Zhonghua yu fang yixue za zhi – 2008. – Vol. 42 – № 1 – P. 36-38.

120. DePaola, A. Seasonal abundance of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Alabama oysters / A. DePaola, J. L. Nordstrom, J. C. Bowers, J. G. Wells, D. W. Cook // Appl. Environ. Microbiol. – 2003. – Vol. 69 – № 3 – P. 1521-1526.

121. DiRita, V.J. Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae* / V. J. DiRita, C. Parsot, G. Jander, J. J. Mekalanos // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1991. – Vol. 88 – № 12 – P. 5403-5407.

122. Domman, D. Integrated view of *Vibrio cholerae* in the Americas / D. Domman, M. Quilici, M. J. Dorman, E. Njamkepo, A. Mutreja, A. E. Mather, G. Delgado, R. Morales-espinosa, P. A. D. Grimont, M. L. Lizárraga-partida, C. Bouchier, D. M. Aanensen, P. Kuri-morales, C. L. Tarr, G. Dougan, J. Parkhill, J. Campos, A. Cravioto, F. X. Weill, N. R. Thomson // Science (80-. ). – 2017. – Vol. 358 – № 6364 – P. 789-793.

123. Dorneles, E.M.S. Genetic stability of *Brucella abortus* isolates from an outbreak by multiple-locus variable-number tandem repeat analysis (MLVA16) / E. M. S. Dorneles, J. A. Santana, T. M. Alves, R. B. Pauletti, J. P. D. S. Mol, M. B. Heinemann, A. P. Lage // BMC Microbiol. – 2014. – Vol. 14 – № 1 – P. 1-8.

124. Dziejman, M. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. / M. Dziejman, E. Balon, D. Boyd, C. M. Fraser, J. F. Heidelberg, J. J. Mekalanos // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2002. – Vol. 99 – № 3 – P. 1556-1561.

125. Elliott, M. Challenging paradigms in estuarine ecology and management / M. Elliott, A. K. Whitfield // Estuar. Coast. Shelf Sci. – 2011. – Vol. 94 – № 4 – P. 306-314.

126. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. / S. M. Faruque, M. J. Albert, J. J. Mekalanos // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 1998. – Vol. 62 – № 4 – P. 1301-1314.
127. Fasano, A. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions / A. Fasano, B. Baudry, D. W. Pumphlin, S. S. Wasserman, B. D. Tall, J. M. Ketley, J. B. Kaper // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1991. – Vol. 88 – № 12 – P. 5242-5246.
128. Feglo, P.K. Characterization of highly virulent multidrug resistant *Vibrio cholerae* isolated from a large cholera outbreak in Ghana / P. K. Feglo, M. Sewurah // *BMC Res. Notes* – 2018. – Vol. 11 – № 1 – P. 45.
129. Feijao, P. MentaLiST - A fast MLST caller for large MLST schemes / P. Feijao, H. T. Yao, D. Fornika, J. Gardy, W. Hsiao, C. Chauve, L. Chindelevitch // *Microb. genomics* – 2018. – Vol. 4 – № 2 – P. 1-8.
130. Fu, X. Transcript changes in *Vibrio cholerae* in response to salt stress / X. Fu, W. Liang, P. Du, M. Yan, B. Kan // *Gut Pathogens.* – 2014. – Vol. 6. – P. 1-6.
131. Fujino, T. On the bacteriological examination of Shirasu food poisoning / T. Fujino, Y. Okuno, D. Nakada, A. Aoyama, K. Fukai, T. Mukai, T. Ueho // *Med. J. Osaka Univ.* – 1953. – Vol. 4 – № 2/3 – P. 299-304.
132. Fukushima, H. Distribution of thermostable direct hemolysin (TDH)- and TDH-related hemolysin (TRH)-producing *Vibrio parahaemolyticus* in coastal Shimane Prefecture and TDH and TRH *V. parahaemolyticus* contamination of retail shellfish / H. Fukushima // *Kansenshogakuzasshi* – 2007. – Vol. 81 – № 2 – P. 138-148.
133. Garg, P. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: Mutation, lateral gene transfer, and founder flush / P. Garg, A. Aydanian, D. Smith, J. G. Morris, G. B. Nair, O. C. Stine // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003. – Vol. 9 – № 7 – P. 810-814.
134. Garrine, M. Minimal genetic change in *Vibrio cholerae* in Mozambique over time: Multilocus variable number tandem repeat analysis and whole genome sequencing / M. Garrine, I. Mandomando, D. Vubil, T. Nhampossa, S. Acacio, S. Li, J. N. Paulson, M. Almeida, D. Domman, N. R. Thomson, P. Alonso, O. C. Stine // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2017. – Vol. 11 – № 6 – P. 1-15.
135. Gavilan, R.G. Molecular Epidemiology and Genetic Variation of Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in Peru / R. G. Gavilan, M. L. Zamudio, J. Martinez-Urtaza //

PLoS Negl Trop Dis – 2013. – Vol. 7 – № 5 – P. e2210.

136. George, C.M. Genetic relatedness of *Vibrio cholerae* isolates within and between households during outbreaks in Dhaka, Bangladesh / C. M. George, M. Rashid, M. Almeida, K. M. Saif-Ur-Rahman, S. Monira, M. S. I. Bhuyian, K. Hasan, T. T. Mahmud, S. Li, J. Brubaker, J. Perin, Z. Rahman, M. Mustafiz, D. A. Sack, R. B. Sack, M. Alam, O. C. Stine // BMC Genomics – 2017. – Vol. 18 – № 1 – P. 903.

137. Ghany, M. A. E. The Population Structure of *Vibrio cholerae* from the Chandigarh Region of Northern India / M. A. E. Ghany, J. Chander, A. Mutreja, M. Rashid, G. A. Hill-Cawthorne, S. Ali, R. Naeem, N. R. Thomson, G. Dougan, A. Pain // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2014. – Vol. 8 – № 7. – P. e2981.

138. Ghosh, R. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats / R. Ghosh, G. B. Nair, L. Tang, J. G. Morris, N. C. Sharma, M. Ballal, P. Garg, T. Ramamurthy, O. C. Stine // FEMS Microbiol. Lett. – 2008. – Vol. 288 – № 2 – P. 196–201.

139. Gonzalez-Escalona, N. Defining a core genome multilocus sequence typing scheme for the global epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* / N. Gonzalez-Escalona, K. A. Jolley, E. Reed, J. Martinez-Urtaza // J. Clin. Microbiol. – 2017. – Vol. 55 – № 6 – P. 1682–1697.

140. Gonzalez-Escalona, N. Determination of molecular phylogenetics of *Vibrio parahaemolyticus* strains by multilocus sequence typing / N. González-Escalona, J. Martinez-Urtaza, J. Romero, R. T. Espejo, L.-A. Jaykus, A. DePaola // J. Bacteriol. – 2008. – Vol. 190 – № 8 – P. 2831–2840.

141. Gonzalez-Escalona, N. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* sequence type 120, Peru, 2009 / N. Gonzalez-Escalona, R. G. Gavilan, M. Toro, M. L. Zamudio, J. Martinez-Urtaza // Emerg. Infect. Dis. – 2016. – Vol. 22 – № 7 – P. 1235–1237.

142. Guerrero, A. Genetic analysis of *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 strains that have been isolated in Mexico since 1998 / A. Guerrero, M. L. Lizarraga-Partida, B. G. G. Rodriguez, A. F. Licea-Navarro, V. J. Revilla-Castellanos, I. Wong-Chang, R. Gonzalez-Sanchez // PLoS One – 2017. – Vol. 12 – № 1 – P. 1–13.

143. Guo, S. Monitoring the results of foodborne diseases in sentinel hospitals in wenzhou city, China from 2014 to 2015 / S. Guo, D. Lin, L. L. Wang, H. Hu // Iran. J. Public Health – 2018. – Vol. 47 – № 5 – P. 674–681.

144. Haendiges, J. A nonautochthonous U.S. strain of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from Chesapeake Bay oysters caused the outbreak in Maryland in 2010 / J. Haendiges, J. Jones, R. A. Myers, C. S. Mitchell, E. Butler, M. Toro, N. Gonzalez-Escalona // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2016. – Vol. 82 – № 11 – P. 3208-3216.
145. Haendiges, J. Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* clinical strains from Maryland (2012-2013) and comparisons to a locally and globally diverse *V. parahaemolyticus* strains by whole-genome sequence analysis / J. Haendiges, R. Timme, M. W. Allard, R. A. Myers, E. W. Brown, N. Gonzalez-Escalona // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6 – P. 1-11.
146. Han, C. Sero-prevalence and genetic diversity of pandemic *V. parahaemolyticus* strains occurring at a global scale / C. Han, H. Tang, C. Ren, X. Zhu, D. Han // *Front. Microbiol.* – 2016. – Vol. 7 – № APR – P. 1-10.
147. Han, D. Population structure of clinical *Vibrio parahaemolyticus* from 17 coastal countries, determined through multilocus sequence analysis / D. Han, H. Tang, J. Lu, G. Wang, L. Zhou, L. Min, C. Han // *PLoS One* – 2014. – Vol. 9 – № 9 – P. e107371.
148. Han, F. Detection of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish growing along the South Yellow sea and the East China sea / F. Han, R. R. Gu, X. S. Shen, Y. G. Chen, L. L. Tian, W. F. Zhou, Y. Q. Cai // *J. Food Prot.* – 2017. – Vol. 80 – № 11 – P. 1882-1889.
149. Han, H. Genome plasticity of *Vibrio parahaemolyticus*: microevolution of the “pandemic group” / H. Han, H. C. Wong, B. Kan, Z. Guo, X. Zeng, S. Yin, X. Liu, R. Yang, D. Zhou // *BMC Genomics* – 2008. – Vol. 9 – P. 1-12.
150. Harth, E. Epidemiology of *Vibrio parahaemolyticus* outbreaks, Southern Chile / E. Harth, L. Matsuda, C. Hernandez, M. L. Rioseco, J. Romero, N. Gonzalez-Escalona, J. Martínez-Urtaza, R. T. Espejo // *Emerg. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 15 – № 2 – P. 163-168.
151. Harth-Chu, E. Multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for clonal identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by using capillary electrophoresis / E. Harth-Chu, R. T. Espejo, R. Christen, C. A. Guzman, M. G. Hofle // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2009. – Vol. 75 – № 12 – P. 4079-4088.
152. Honda, T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin / T. Honda, Y. Ni, T. Miwatani // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56 – № 4 – P. 961-965.



153. Hoshino, K. Development and evaluation of a multiplex PCR assay for rapid detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 and O139 / K. Hoshino, S. Yamasaki, A. K. Mukhopadhyay, S. Chakraborty, A. Basu, S. K. Bhattacharya, G. B. Nair, T. Shimada, Y. Takeda // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 1998. – Vol. 20 – № 3 – P. 201-207.
154. Huehn, S. Pathogenic *Vibrios* in environmental, seafood and clinical sources in Germany / S. Huehn, C. Eichhorn, S. Urmersbach, J. Breidenbach, S. Bechlars, N. Bier, T. Alter, E. Bartelt, C. Frank, B. Oberheitmann, F. Gunzer, N. Brennholt, S. Boer, B. Appel, R. Dieckmann, E. Strauch // *Int. J. Med. Microbiol.* – 2014. – Vol. 304 – № 7 – P. 843-850.
155. Hurley, C.C. Four genomic islands that mark post-1995 pandemic *Vibrio parahaemolyticus* isolates / C. C. Hurley, A. M. Quirke, F. J. Reen, E. F. Boyd // *BMC Genomics* – 2006. – Vol. 7 – P. 1-19.
156. Izutsu, K. Comparative genomic analysis using microarray demonstrates a strong correlation between the presence of the 80-kilobase pathogenicity island and pathogenicity in kanagawa phenomenon-positive *Vibrio parahaemolyticus* strains / K. Izutsu, K. Kurokawa, K. Tashiro, S. Kuhara, T. Hayashi, T. Honda, T. Iida // *Infect. Immun.* – 2008. – Vol. 76 – № 3 – P. 1016-1023.
157. Jermyn, W.S. Characterization of novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates / W.S. Jermyn, E.F. Boyd // *Microbiology.* – 2002. – Vol. 148 – № 11 – P. 3681-3693.
158. Jermyn, W.S. Molecular evolution of *Vibrio* pathogenicity island-2 (VPI-2): Mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates / W. S. Jermyn, E. F. Boyd // *Microbiology* – 2005. – Vol. 151 – № 1 – P. 311-322.
159. Jesser, K.J. Clustering of *Vibrio parahaemolyticus* isolates using MLST and whole-genome phylogenetics and protein motif fingerprinting / K. J. Jesser, W. Valdivia-Granda, J. L. Jones, R. T. Noble // *Front Public Heal.* – 2019. – Vol. 7 – P. 1-12.
160. Jiang, F. Virulence-associated genes and molecular characteristics of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* isolated from hepatitis B cirrhosis patients in China / F. Jiang, R. R. Bi, L. H. Deng, H. Q. Kang, B. Gu, P. Ma // *Int. J. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 74 – P. 117-122.
161. Jiang, M. Feasibility of using multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis for epidemiology study of *Vibrio parahaemolyticus* infections / M. Jiang, J. Zhang, Y. Li, X. Shi, Y. Qiu, Y. Lin, Q. Chen, Y. Jiang, Q. Hu // *Foodborne Pathog. Dis.* – 2016. – Vol.

13 – № 10 – P. 575-581.

162. Jonson, G. Identification of a mannose-binding pilus on *Vibrio cholerae* El Tor / G. Jonson, J. Holmgren, A. M. Svennerholm // *Microb. Pathog.* – 1991. – Vol. 11 – № 6 – P. 433-441.

163. Jouravleva, E.A. The *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin is the receptor for a filamentous bacteriophage from *V. cholerae* O139 / E. A. Jouravleva, G. A. McDonald, J. W. Marsh, R. K. Taylor, M. Boesman-Finkelstein, R. A. Finkelstein // *Infect. Immun.* – 1998. – Vol. 66 – № 6 – P. 2535-2539.

164. Kahler, A.M. Environmental surveillance for toxigenic *Vibrio cholerae* in surface waters of Haiti / A. M. Kahler, B. J. Haley, A. Chen, B. J. Mull, C. L. Tarr, M. Turnsek, L. S. Katz, M. S. Humphrys, G. Derado, N. Freeman, J. Boncy, R. R. Colwell, A. Huq, V. R. Hill // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2015. – Vol. 92 – № 1 – P. 118-125.

165. Kam M.K. Evaluation and validation of a PulseNet standardized pulsed-field gel electrophoresis protocol for subtyping *Vibrio parahaemolyticus*: An International Multicenter Collaborative study / M.K. Kam, C.K.Y. Luey, M.D. Parsons, K.L.F. Cooper, G.B. Nair, M. Alam, M. Atiqul Islam, D.T.L. Cheung, Y.W. Chu, T. Ramamurthy, G.P. Pazhani, S.K. Bhattacharya, H. Watanabe, J. Terajima, E. Arakawa, O.A. Ratchtrachenchai, S. Huttayananont, E.M. Ribot, P. Gerner-Smidt, B. Swaminathan // *J. Clin. Microbiol.* – 2008. – T. 46 – № 8 – P. 2766-2773.

166. Kaper, J.B. Cholera / J. B. Kaper, J. G. Morris, M. M. Levine // *Clin. Microbiol. Rev.* – 1995. – Vol. 8 – № 1 – P. 48-86.

167. Karaolis, D.K.R. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria / D. K. R. Karaolis, S. Somara, D. R. Maneval, J. A. Johnson, J. B. Kaper // *Nature* – 1999. – Vol. 399 – № 6734 – P. 375-379.

168. Kimura, B. Multiple-locus variable-number of tandem-repeats analysis distinguishes *Vibrio parahaemolyticus* pandemic O3:K6 strains / B. Kimura, Y. Sekine, H. Takahashi, Y. Tanaka, H. Obata, A. Kai, S. Morozumi, T. Fujii // *J. Microbiol. Methods* – 2008. – Vol. 72 – № 3 – P. 313-320.

169. Kimura, B. Will the emergence of core genome MLST end the role of in silico MLST? / B. Kimura // *Food Microbiol.* – 2017. – Vol. 75 – P. 28-36.

170. Kishishita, M. Sequence Variation in the Thermostable Direct Hemolysin-Related Hemolysin (trh) Gene of *Vibrio parahaemolyticus* / M. Kishishita, N. Matsuoka, K.

Kumagai, S. Yamasaki, Y. Takeda, M. Nishibuchi // Appl. Environ. Microbiol. – 1992. – Vol. 58 – № 8 – P. 2449-2457.

171. Klose, K.E. Regulation of virulence in *Vibrio cholerae* / K. E. Klose // Int J Med Microbiol. – 2001. – Vol. 291 – № 2 – P. 81-8. doi: 10.1078/1438-4221-00104.

172. Koch, W.H. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods / W. H. Koch, W. L. Payne, B. A. Wentz, T. A. Cebula // Appl. Environ. Microbiol. – 1993. – Vol. 59 – № 2 – P. 556-560. doi: 10.1128/aem.59.2.556-560.1993

173. Kosman, E. Dissimilarity of individual microsatellite profiles under different mutation models: Empirical approach / E. Kosman, J. Jokela // Ecol. Evol. – 2019. – Vol. 9 – P. 4038-4054.

174. Kotetishvili, M. Multilocus sequence typing has better discriminatory ability for typing *Vibrio cholerae* than does pulsed-field gel electrophoresis and provides a measure of phylogenetic relatedness / M. Kotetishvili, O. C. Stine, Y. Chen, A. Kreger, A. Sulakvelidze, Sh. Sozhamannan, J. G. Morris Jr. // J Clin Microbiol. – 2003. – Vol. 41 – № 5 – P. 2191-6.

175. Kuleshov, K.V. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011 / K. V. Kuleshov, A. Kostikova, S. V. Pisarenko, D. A. Kovalev, S. N. Tikhonov, I. V. Savelieva, V. N. Saveliev, O. V. Vasilieva, L. S. Zinich, N. N. Pidchenko, A. N. Kulichenko, G. A. Shipulin // Infect Genet Evol. – 2016. – № 44 – P. 471-478.

176. Lam, C. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae* / C. Lam, S. Octavia, P.R. Reeves, R. Lan // BMC Microbiol. – 2012. – Vol. 12 – № 82.

177. Laohaprertthisan, V. Prevalence and serodiversity of the pandemic clone among the clinical strains *Vibrio parahaemolyticus* isolated in southern Thailand / V. Laohaprertthisan, A. Chowdhury, U. Kongmuang, S. Kalnauwakul, M. Ishibashi, C. Matsumoto, M. Nishibuchi // Epidemiol. Infect. – 2003. – Vol. 130 – № 3 – 395-406.

178. Larsen, M. V. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria / M. V. Larsen, S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R. L. Marvig, L. Jelsbak, T. Sicheritz-Ponten, D. W. Ussery, F. M. Aarestrup, O. Lund // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50 – № 4 – P. 1355-1361.

179. Lee, J.H. Mozambique Cholera Vaccine Demonstration Project Coordination

Group. Multilocus sequence typing MLST analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage / J.H. Lee, K.H. Han, S.Y. Choi, M. E. S. Lucas, C. Mondlane, M. Ansaruzzaman, G. B. Nair, D. A. Sack, L. von Seidlein, J. D. Clemens, M. Song, J. Chun // *J. Med. Microbiol.* – 2006. – Vol. 55 – № 2. – P. 165-170.

180. Li, B. Distribution and molecular characteristics of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates recovered in Guangdong Province, China, 1961-2013. / B. Li, R. Chen, D. Wang, H. Tan, B. Ke, D. He, C. Ke, Y. Zhang // *Infect. Genet. Evol.* – 2016. – Vol. 37 – P. 70-76.

181. Li, F. Distribution of virulence-associated genes and genetic relationships in non-O1/O139 *Vibrio cholerae* aquatic isolates from China / F. Li, P. Du, B. Li, C. Ke, A. Chen, J. Chen, H. Zhou, J. Li, G. Morris, B. Kan, D. Wang // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2014. – Vol. 80 – № 16 – P. 4987-4992.

182. Li, H. A comprehensive epidemiological research for clinical *Vibrio parahaemolyticus* in Shanghai / H. Li, R. Tang, Y. Lou, Z. Cui, W. Chen, Q. Hong, Z. Zhang, P.K. Malakar, Y. Pan, Y. Zhao // *Front. Microbiol.* – 2017. – Vol. 8 – P. 1-10.

183. Li, P. Genetic and population analyses of *Vibrio parahaemolyticus* isolates from three major coastal regions in China / P. Li, W. Xin, L. Kang, Z. Chen, C. Guo, S. Gao, H. Yang, B. Ji, Y. Yan, H. Wang, D. Zhou, W. Yang, J. Wang // *Futur. Microbiol.* – 2018. – Vol. 13 – № 11 – P. 1261-1269.

184. Li, Y. *Vibrio parahaemolyticus*, southern coastal region of China, 2007-2012 / Y. Li, X. Xie, X. Shi, Y. Lin, Y. Qiu, J. Mou, Q. Chen, Y. Lu, L. Zhou, M. Jiang, H. Sun, H. Ma, J. Cheng, Q. Hu // *Emerg. Infect. Dis.* – 2014. – Vol. 20 – № 4 – P. 685-688.

185. Lin, Z. *Vibrio parahaemolyticus* has a homolog of the *Vibrio cholerae* toxRS operon that mediates environmentally induced regulation of the thermostable direct hemolysin gene / Z. Lin, K. Kumagai, K. Baba, J.J. Mekalanos, M. Nishibuchi // *J. Bacteriol.* – 1993. – Vol. 175 – № 12 – C.3844-3855.

186. Lu, H. Characterization of *Vibrio cholerae* isolates from 1976 to 2013 in Shandong Province, China / H. Lu, Y. Yuan, N. Sun, Z. Bi, B. Guan, K. Shao, T. Wang, Z. Bi // *Braz. J. Microbiol.* – 2017. – Vol. 48 – № 1 – P. 173-179.

187. Ludeke, C.H.M. Examination of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* isolates by multi-locus sequence typing (MLST) and multiple-locus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) / C. H. M. Ludeke, N. Gonzalez-Escalona, M. Fischer, J. L. Jones // *Front. Microbiol.* – 2015. – Vol. 6 – P. 1-10.

188. Luo, Y. US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China / Y. Luo, S. Octavia, D. Jin, J. Ye, Z. Miao, T. Jiang, S. Xia, R. Lan // *J. Infect.* – 2016. – Vol. 72 – № 5 – P. 564-572.

189. Lynch, T. *Vibrio parahaemolyticus* disruption of epithelial cell tight junctions occurs independently of toxin production / T. Lynch, S. Livingstone, E. Buenaventura, E. Lutter, J. Fedwick, A. G. Buret, D. Graham, R. DeVinney // *Infect Immun.* – 2005. – Vol. 73 – №3 – P. 1275-83.

190. Maiden, M.C. MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics / M. C. Maiden, M. J. Jansen van Rensburg, J. E. Bray, S. G. Earle, S. A. Ford, K. A. Jolley, N. D. McCarthy // *Nat Rev Microbiol.* – 2013. – Vol. 11 – № 10 – P. 728-736.

191. Maiden, M.C.J. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms / M. C. J. Maiden, J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, B. G. Spratt // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1998. – Vol. 95 – № 6 – P. 3140-3145.

192. Makino, K. Genome sequence of *Vibrio parahaemolyticus*: A pathogenic mechanism distinct from that of *V. cholerae* / K. Makino, K. Oshima, K. Kurokawa, K. Yokoyama, T. Uda, K. Tagomori, Y. Iijima, M. Najima, M. Nakano, A. Yamashita, Y. Kubota, S. Kimura, T. Yasunaga, T. Honda, H. Shinagawa, M. Hattori, T. Iida // *Lancet* – 2003. – Vol. 361 – № 9359 – P. 743-749.

193. Marsh, J.W. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus / J. W. Marsh, R. K. Taylor // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181 – № 4 – P. 1110-1117.

194. Martinez-Urtaza, J. Characterization of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* isolates from clinical sources in Spain and comparison with Asian and North American pandemic isolates / J. Martinez-Urtaza, A. Lozano-Leon, A. DePaola, M. Ishibashi, K. Shimada, M. Nishibuchi, E. Liebana // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42 – № 10 – P. 4672-4678.

195. Martinez-Urtaza, J. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses / J. Martinez-Urtaza, J. C. Bowers, J. Trinanes, A. DePaola // *Food Res. Int.* – 2010. – Vol. 43 – № 7 – P. 1780-1790.

196. Martinez-Urtaza, J. Epidemic dynamics of *Vibrio parahaemolyticus* illness in a

hotspot of disease emergence, Galicia, Spain / J. Martinez-Urtaza, J. Trinanes, M. Abanto, A. Lozano-Leon, J. Llovo-Taboada, M. Garcia-Campello, A. Pousa, A. Powell, C. Baker-Austin, N. Gonzalez-Escalona // *Emerg. Infect. Dis.* – 2018. – Vol. 24 – № 5 – P. 852-859.

197. Martinez-Urtaza, J. Genomic variation and evolution of *Vibrio parahaemolyticus* ST36 over the course of a transcontinental epidemic expansion / J. Martinez-Urtaza, R. Van Aerle, M. Abanto, J. Haendiges, R. A. Myers, J. Trinanes, C. Baker-Austin, N. Gonzalez-Escalona // *MBio* – 2017. – Vol. 8 – № 6 – P. 1-17.

198. Martinez-Urtaza, J. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe / J. Martinez-Urtaza, L. Simental, D. Velasco, A. DePaola, M. Ishibashi, Y. Nakaguchi, M. Nishibuchi, D. Carrera-Flores, C. Rey-Alvarez, A. Pousa // *Emerging Infectious Diseases.* – 2005. – Vol.11 – № 8 – P. 1319-1320

199. Matsumoto, C. Pandemic spread of an O3:K6 clone of *Vibrio parahaemolyticus* and emergence of related strains evidenced by arbitrarily primed PCR and toxRS sequence analyses / C. Matsumoto, J. Okuda, M. Ishibashi, M. Iwanaga, P. Garg, T. Rammamurthy, H. C. Wong, A. Depaola, Y. B. Kim, M. J. Albert, M. Nishibuchi // *J. Clin. Microbiol.* – 2000. – Vol. 38 – № 2 – P. 578-585.

200. McCarthy, S.A. International dissemination of epidemic *Vibrio cholerae* by cargo ship ballast and other nonpotable waters / S. A. McCarthy, F. M. Khambaty // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1994. – Vol. 60 – № 7 – P. 2597-2601.

201. McLaughlin, J.B. Outbreak of *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis associated with Alaskan oysters. / J. B. McLaughlin, A. DePaola, C. A. Bopp, K. A. Martinek, N. P. Napolilli, C. G. Allison, S. L. Murray, E. C. Thompson, M. M. Bird, J. P. Middaugh // *N Engl J Med* – 2005. – Vol. 353 – № 14 – P. 1463-1470.

202. Meador, C.E. Virulence gene- and pandemic group-specific marker profiling of clinical *Vibrio parahaemolyticus* isolates / C. E. Meador, M. M. Parsons, C. A. Bopp, P. Gerner-Smidt, J. A. Painter, G. J. Vora // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – Vol. 45 – № 4 – P. 1133-1139.

203. Miller, V.L. Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by *toxR* / V.L. Miller, J.J. Mekalanos // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1984. – Vol.81 – P. 3471-3475.

204. Murphy, R.A. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates / R. A. Murphy, E. F. Boyd // *J. Bacteriol.* –

2008. – Vol. 190 – № 2 – P. 636–647.

205. Mutreja, A. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic / A. Mutreja, D. W. Kim, N. Thomson, T. R. Connor, J. Hee, M. Lebens, S. K. Niyogi, E. J. Kim, T. Ramamurthy, J. Chun, J. Parkhill, G. Dougan // *Nature* – 2013. – Vol. 477 – № 7365 – P. 462-465.

206. Mutreja, A. Molecular epidemiology and intercontinental spread of cholera / A. Mutreja, G. Dougan // *Vaccine* – 2020. – Vol. 38 – № Suppl 1 – P. 46-51.

207. Myers, M.L. PCR detection of a newly emerged pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6 pathogen in pure cultures and seeded waters from the Gulf of Mexico / M. L. Myers, G. Panicker, A. K. Bej // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2003. – Vol. 69 – № 4 – P. 2194-2200.

208. Nair, G.B. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants / G. B. Nair, T. Ramamurthy, S. K. Bhattacharya, B. Dutta, Y. Takeda, D. A. Sack // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2007. – Vol. 20 – № 1 – P. 39-48.

209. Nair, G.B. New Variants of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotype from Hospitalized Patients with Acute Diarrhea in Bangladesh New Variants of *Vibrio cholerae* O1 Biotype El Tor with Attributes of the Classical Biotype from Hospita / G. B. Nair, S. M. Faruque, N. A. Bhuiyan, M. Kamruzzaman, A. K. Siddique, D. A. Sack // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40 – № 9 – P. 3296-3299.

210. Nguyen, D.T. Molecular epidemiology of *vibrio cholerae* o1 in northern Vietnam (2007-2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis / D. T. Nguyen, T. C. Ngo, T. H. Le, H. T. Nguyen, M. Morita, E. Arakawa, M. Ohnishi, B. M. Nguyen, H. Izumiya // *J. Med. Microbiol.* – 2016. – Vol. 65 – № 9 – P. 1007-1012.

211. Nguyen, V.H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor from southern Vietnam in 2010 was molecularly distinct from that present from 1999 to 2004 / V. H. Nguyen, H. T. Pham, T. T. Diep, C. D. H. Phan, T. Q. Nguyen, N. T. N. Nguyen, T. C. Ngo, T. V. Nguyen, Q. K. Do, H. C. Phan, B. M. Nguyen, M. Ehara, M. Ohnishi, T. Yamashiro, L. T. P. Nguyen, H. Izumiya // *Epidemiol. Infect.* – 2016. – Vol. 144 – № 6 – P. 1241-1247.

212. Nishibuchi, M. Duplication and variation of the thermostable direct haemolysin (tdh) gene in *Vibrio parahaemolyticus* / M. Nishibuchi, J. B. Kaper // *Mol. Microbiol.* – 1990. – Vol. 4 – № 1 – P. 87-99.

213. Nishibuchi, M. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene

of *Vibrio parahaemolyticus* / M. Nishibuchi, J. B. Kaper // J. Bacteriol. – 1985. – Vol. 162 – № 2 – P. 558-564.

214. Nishibuchi, M. Thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*: A virulence gene acquired by a marine bacterium / M. Nishibuchi, J. B. Kaper // Infect. Immun. – 1995. – Vol. 63 – № 6 – P. 2093-2099.

215. Number of reported cases. Data of country [Электронный ресурс]. Режим доступа: [apps.who.int/gho/data/node.main.175?lang=en](https://apps.who.int/gho/data/node.main.175?lang=en)

216. O'Shea, Y.A. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus* / Y. A. O'Shea, S. Finnan, F. J. Reen, J. P. Morrissey, F. O'Gara, E. F. Boyd // Microbiology – 2004. – Vol. 150 – № 12 – P. 4053-4063.

217. Octavia, S. Population Structure and Evolution of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* by Multilocus Sequence Typing / S. Octavia, A. Salim, J. Kurniawan, C. Lam, Q. Leung, S. Ahsan, P. R. Reeves, G. B. Nair, R. Lan // PLoS One – 2013. – Vol. 8 – № 6.

218. Ogierman, M.A. Genetic organization and sequence of the promoter-distal region of the *tcp* gene cluster of *Vibrio cholerae* / M. A. Ogierman, S. Zabihi, L. Mourtziros, P. A. Manning // Gene – 1993. – Vol. 126 – № 1 – P. 51-60.

219. Okura, M. Genotypic analyses of *Vibrio parahaemolyticus* and development of a pandemic group-specific multiplex PCR assay / M. Okura, R. Osawa, A. Iguchi, E. Arakawa, J. Terajima, H. Watanabe // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41 – № 10 – P. 4676-4682.

220. Olsen, J.S. Evaluation of a highly discriminating multiplex multi-locus variable-number of tandem-repeats (MLVA) analysis for *Vibrio cholerae* / J. S. Olsen, T. Aarskaug, G. Skogan, E. M. Fykse, A. B. Ellingsen, J. M. Blatny // J. Microbiol. Methods. – 2009. – Vol. 78 – № 3 – P. 271-285.

221. Paranjpye, R. Genetic diversity of clinical and environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains from the Pacific northwest / R. Paranjpye, O. S. Hamel, A. Stojanovski, M. Liermann // Appl. Environ. Microbiol. – 2012. – Vol. 78 – № 24 – P. 8631-8638.

222. Park, K.S. Functional characterization of two type III secretion systems of *Vibrio parahaemolyticus* / K. S. Park, T. Ono, M. Rokuda, M. H. Jang, K. Okada, T. Iida, T. Honda // Infect. Immun. – 2004. – Vol. 72 – № 11 – P. 6659-6665.

223. Pearson, G.D. CTX genetic element encodes a site-specific recombination



system and an intestinal colonization factor. / G. D. Pearson, a Woods, S. L. Chiang, J. J. Mekalanos // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. – 1993. – Vol. 90 – № 8 – P. 3750-3754.

224. Petronella, N. Changes Detected in the Genome Sequences of monocytogenes, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Salmonella enterica* After Serial Subculturing / N. Petronella, P. Kundra, O. Auclair, K. Hébert, M. Rao, K. Kingsley, K. De Bruyne, S. Banerjee, A. Gill, F. Pagotto, S. Tamber, J. Ronholm // Can J Microbiol. – Vol. 65 – № 11 – P. 842-850.

225. Petronella, N. The mechanisms that regulate *Vibrio parahaemolyticus* virulence gene expression differ between pathotypes / N. Petronella, J. Ronholm // Microb. genomics – 2018. – Vol. 4 – № 6 – P. 0-9.

226. Pfay, J.D. Mutations in *toxR* and *toxS* that Separate Transcriptional Activation from DNA Binding at the Cholera Toxin Gene Promoter // J.D. Pfay, R.K. Taylor // J. Bacteriol. – 1998. – Vol.180 – № 17 – P. 4724-4733

227. Pourcel, C. Tandem repeats analysis for the high resolution phylogenetic analysis of *Yersinia pestis* / C. Pourcel, F. André-Mazeaud, H. Neubauer, F. Ramisse, G. Vergnaud // BMC Microbiol. – 2004. – Vol. 4 – P. 1-9.

228. Preeprem, S. Multiplex Multilocus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for Typing of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O1:KUT Isolates / S. Preeprem, K. Singkhamanan, M. Nishibuchi, V. Vuddhakul, P. Mittraparp-Arthorn // Foodborne Pathog. Dis. – 2019. – Vol. 16 – № 2 – P.104-113.

229. Punina, N. V. Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections / N. V. Punina, N. M. Makridakis, M. A. Remnev, A. F. Topunov // Hum. Genomics – 2015. – Vol. 9 – № 19 – P. 1-20.

230. Rafique, R. Transmission of infectious *Vibrio cholerae* through drinking water among the household contacts of cholera patients (CHoBI7 Trial) / R. Rafique, M. ur Rashid, S. Monira, Z. Rahman, M. T. Mahmud, M. Mustafiz, K. M. Saif-Ur-Rahman, F. T. Johura, S. Islam, T. Parvin, M. S. I. Bhuyian, M. B. Sharif, S. R. Rahman, D. A. Sack, R. B. Sack, C. M. George, M. Alam // Front. Microbiol. – 2016. – Vol. 7 – P. 1-10.

231. Raghunath, P. Roles of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH-related hemolysin (TRH) in *Vibrio parahaemolyticus* / P. Raghunath // Front. Microbiol. – 2014. – Vol. 5 – eCollection 2014.

232. Rahman, Z. *Vibrio cholerae* Transmits Through Water Among the Household Contacts of Cholera Patients in Cholera Endemic Coastal Villages of Bangladesh, 2015–2016

(CHoBI7 Trial) / Z. Rahman, M. A. Rahman, M. Rashid, S. Monira, F.-T. Johura, M. Mustafiz, S. I. Bhuyian, F. Zohura, T. Parvin, K. Hasan, K. M. Saif-Ur-Rahman, N. N. Islam, D. A. Sack, C. M. George, M. Alam // *Front. Public Heal.* – 2018. – Vol. 6 – P. 1-9.

233. Ramazanzadeh, R. Variable number of tandem repeats (VNTR) and its application in bacterial epidemiology / R. Ramazanzadeh, R. McNerney // *Pakistan J. Biol. Sci.* – 2007. – Vol. 10 – № 16 – P. 2612-2621.

234. Ranjbar, R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* isolates from 2012 to 2013 cholera outbreaks in Iran / R. Ranjbar, J. Sadeghy, M. Shokri Moghadam, B. Bakhshi // *Microb. Pathog.* – 2016. – Vol. 97 – P. 84-88.

235. Rashid, M. Comparison of inferred relatedness based on multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 / M. Rashid, M. Almeida, A. S. Azman, B. R. Lindsay, D. A. Sack, R. R. Colwell, A. Huq, J. Glenn Morris, M. Alam, O. Colin Stine // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2016. – Vol. 363 – № 12 – P. 1-6.

236. Rebaudet, S. Deciphering the Origin of the 2012 Cholera Epidemic in Guinea by Integrating Epidemiological and Molecular Analyses / S. Rebaudet, M. A. Mengel, L. Koivogui, S. Moore, A. Mutreja, Y. Kande, O. Yattara, V. Sarr Keita, B. M. Njanpop-Lafourcade, P. E. Fournier, E. Garnotel, S. Keita, R. Piarroux // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2014. – Vol. 8 – № 6 – P. e2898.

237. Rhine, J.A. TcpA pilin sequences and colonization requirements for O1 and O139 *Vibrio cholerae* // J.A. Rhine, R.K. Taylor // *Mol. Microbiol.* – 1994. – Vol.13 – № 6 – P. 1013-1020.

238. Rivera, I.N.G. Free-living and plankton-associated vibrios: Assessment in ballast water, Harbor areas, and coastal ecosystems in Brazil / I. N. G. Rivera, K. M. C. Souza, C. P. Souza, R. M. Lopes // *Front. Microbiol.* – 2012. – Vol. 3 – № JAN – P. 1-8.

239. Roobthaisong, A. Molecular epidemiology of cholera outbreaks during the rainy season in Mandalay, Myanmar / A. Roobthaisong, K. Okada, N. Htun, W. W. Aung, W. Wongboot, W. Kamjumhol, A. A. Han, Y. Yi, S. Hamada // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2017. – Vol. 97 – № 5 – P. 1323-1328.

240. Ryan, E.T. Haiti in the context of the current global cholera pandemic / E. T. Ryan // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17 – № 11 – P. 2175-2176.

241. Safa, A. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. / A. Safa, G. B. Nair, R. Y. C. Kong // *Trends Microbiol.* – 2010. – Vol. 18 – № 1 – 46-54.

242. Salomon, D. *Vibrio parahaemolyticus* Type VI Secretion System 1 Is Activated in Marine Conditions to Target Bacteria, and Is Differentially Regulated from System 2 / D. Salomon, H. Gonzalez, B. L. Updegraff, K. Orth // PLoS One – 2013. – Vol. 8 – № 4.
243. Savine, E. Stability of variable-number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units from 12 loci in serial isolates of *Mycobacterium tuberculosis* / E. Savine, R. M. Warren, G. D. Van der Spuy, N. Beyers, P. D. Van Helden, C. Loch, P. Supply // J. Clin. Microbiol. – 2002. – Vol. 40 – № 12 – P. 4561-4566.
244. Sealfon, R. High depth, whole-genome sequencing of cholera isolates from Haiti and the Dominican Republic / R. Sealfon, S. Gire, C. Ellis, S. Calderwood, F. Qadri, L. Hensley, M. Kellis, E. T. Ryan, R. C. LaRocque, J. B. Harris, P. C. Sabeti // BMC Genomics – 2012. – Vol. 13 – № 468 – P. 1–11.
245. Shinoda, S. Sixty years from the discovery of *Vibrio parahaemolyticus* and some recollections / S. Shinoda // Biocontrol Sci – 2011. – Vol. 16 – P. 129-137.
246. Silva, A.J. Haemagglutinin/protease expression and mucin gel penetration in El Tor biotype *Vibrio cholerae* / A. J. Silva, K. Pham, J. A. Benitez // Microbiology – 2003. – Vol. 149 – № 7 – P. 1883–1891.
247. Simonet, V.C. The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmPT have distinct channel properties / V. C. Simonet, A. Baslé, K. E. Klose, A. H. Delcour // J. Biol. Chem. – 2003. – Vol. 278 – № 19 – P. 17539-17545.
248. Singh, D. V Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates / D. V Singh, M. H. Matte, G. R. Matte, S. Jiang, F. Sabeena, B. N. Shukla, S. C. Sanyal, A. Huq, R. R. Colwell // Appl Env. Microbiol. – 2001. – Vol. 67 – № 2 – P. 910-921.
249. Siriphap, A. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand / A. Siriphap, P. Leekitcharoenphon, R. S. Kaas, C. Theethakaew, F. M. Aarestrup, O. Sutheinkul, R. S. Hendriksen // PLoS One – 2017. – Vol. 12 – № 1 – P. e0169324.
250. Smirnova, N.I. Draft Whole-Genome Sequence of a New Variant of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Strain Isolated from a Cholera Patient in Russia / N.I. Smirnova, A.V. Cherkasov, Ya.M. Krasnov, D.A. Agafonov, V.V. Kutyrev // Genome Announc. – 2014. – Vol. 2 – № 3 – P. e00432-14.
251. Sperandio, V. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor

of *Vibrio cholerae* / V. Sperandio, J. A. Giron, W. D. Silveira, J. B. Kaper // *Infect. Immun.* – 1995. – Vol. 63 – № 11 – P. 4433-4438.

252. State of maine department of marine resources [Электронный ресурс]. Режим доступа: <http://www.maine.gov/dmr/shellfish-sanitation-managment/programs/certification.html>.

253. Suffredini, E. Pulsed-field gel electrophoresis and pcr characterization of environmental *Vibrio parahaemolyticus* strains of different origins / E. Suffredini, C. Lopez-Joven, L. Maddalena, L. Croci, A. Roque // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – Vol. 77 – № 17 – P. 6301-6304.

254. Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1998–2008. [Электронный ресурс]. Режим доступа: [https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6202a1.htm?s\\_cid=ss6202a1\\_w](https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/ss6202a1.htm?s_cid=ss6202a1_w)

255. Talkington, D. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011 // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. – Vol. 17. – № 11. – P. 2122–2129.

256. Taylor, R.K. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin / R. K. Taylor, V. L. Miller, D. B. Furlong, J. J. Mekalanos // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1987. – Vol. 84 – № 9 – P. 2833-2837.

257. Teh, C.S. Multiple-locus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* in comparison with pulsed field gel electrophoresis and virulotyping / C.S. Teh, K.H. Chua, K.L. Thong // *J. Biomed. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 2010. – P. 1-7.

258. Teh, C.S.J. Genetic variation analysis of *Vibrio cholerae* using multilocus sequencing typing and multi-virulence locus sequencing typing / C. S. J. Teh, K. H. Chua, K. L. Thong // *Infect. Genet. Evol.* – 2011. – Vol. 11 – № 5 – P. 1121-1128.

259. Tenover, F.C. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed- field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing / F. C. Tenover, R. D. Arbeit, R. V. Goering, P. A. Mickelsen, B. E. Murray, D. H. Persing, B. Swaminathan // *J. Clin. Microbiol.* – 1995. – Vol. 33 – № 9 – P. 2233-2239.

260. Tey, Y.H. Genetic variation in *Vibrio parahaemolyticus* isolated from the aquacultural environments / Y. H. Tey, K. J. Jong, S. Y. Fen, H. C. Wong // *Lett. Appl. Microbiol.* – 2015. – Vol. 60 – № 4 – P. 321-327.

261. Toma, C. Minor pilin subunits are conserved in *Vibrio cholerae* type IV pili / C. Toma, H. Kuroki, N. Nakasone, M. Ehara, M. Iwanaga // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* –

2002. – Vol. 33 – № 1 – P. 35-40.

262. Trucksis, M. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. / M. Trucksis, J. E. Galen, J. Michalski, A. Fasano, J. B. Kaper // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 1993. – Vol. 90 – № 11 – P. 5267-71.

263. Tsang, A.K.L. Failure of phylogeny inferred from multilocus sequence typing to represent bacterial phylogeny / A. K. L. Tsang, H. H. Lee, S. M. Yiu, S. K. P. Lau, P. C. Y. Woo // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7 – № 1 – P. 1-12.

264. Turner, J.W. Genomic evidence of adaptive evolution in emergent *Vibrio parahaemolyticus* ecotypes / J. W. Turner, C. T. Berthiaume, R. Morales, E. V. Armbrust, M. S. Strom // *Elementa* – 2016. – Vol. 2016 – P. 1-11.

265. Urmersbach, S. Population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* originating from different geographical regions demonstrates a high genetic diversity / S. Urmersbach, T. Alter, M. S. G. Koralage, L. Sperling, G. Gerdts, U. Messelhauser, S. Huehn // *BMC Microbiol.* – 2014. – Vol. 14 – № 59 – P. 1-14.

266. Van Belkum, A. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology / A. Van Belkum, M. Struelens, A. de Visser, H. Verbrugh, M. Tibayrenc // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2001. – Vol.14 - № 3 – P. 547-60.

267. Van Belkum, A. Tracing isolates of bacterial species by multilocus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) / A. Van Belkum // *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* – 2007. – Vol. 49 – № 1 – P. 22-27.

268. Velazquez-Roman, J. Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3: K6 on the American continent / J. Velazquez-Roman, N. Leon-Sicairos, L. de J. Hernandez-Diaz, A. Canizalez-Roman // *Front. Cell. Infect. Microbiol.* – 2014. – Vol. 3 – P. 1-14.

269. Verma, J. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae* / J. Verma, S. Bag, B. Saha, P. Kumar, T. S. Ghosh, M. Dayal, T. Senapati, S. Mehra, P. Dey, A. Desigamani, D. Kumar, P. Rana, B. Kumar, T. K. Maiti, N. C. Sharma, R. K. Bhadra, A. Mutreja, G. B. Nair, T. Ramamurthy, B. Das // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2019. – Vol. 116 – № 13 – P. 6226-6231.

270. Waldor, M.K. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2 / M. K. Waldor, E. J. Rubin, G. D. Pearson, H. Kimsey, J. J. Mekalanos // *Mol. Microbiol.* – 1997. – Vol. 24 – № 5 – P. 917-926.

271. Wang, Y.W. Evaluation of restriction enzymes for standardizing pulsed-field gel

electrophoresis protocol for rapid subtyping of *Vibrio parahaemolyticus* / Y. W. Wang, L. L. Chern, P. D. Cam, C. S. Chiou // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2008. – Vol. 61 – № 3 – P. 251-255.

272. Watnick, P.I. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor / P. I. Watnick, K. J. Fullner, R. Kolter // *J. Bacteriol.* – 1999. – Vol. 181 – № 11 – P. 3606-3609.

273. Weill, F. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa / F. Weill, D. Domman, E. Njamkepo, C. Tarr, J. Rauzier, N. Fawal, K. H. Keddy, H. Salje, S. Moore, A. K. Mukhopadhyay, R. Bercion, F. J. Luquero, J. Koeck, J. Fournier, G. Dougan // *Science* – 2017. – Vol. 358 – P. 785-789.

274. Wong, H.C. Subspecies typing of *Vibrio parahaemolyticus* by pulsed-field gel electrophoresis / H. C. Wong, K. T. Lu, T. M. Pan, C. L. Lee, D. Y. C. Shih // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – T. 34 – № 6 – P. 1535-1539.

275. Xie, T. Prevalence and population analysis of *Vibrio parahaemolyticus* in aquatic products from South China markets / T. Xie, Q. Wu, X. Xu, J. Zhang, W. Guo // *FEMS Microbiol. Lett.* – 2015. – Vol. 362 – № 22.

276. Yan, W.X. Risk factors for sporadic *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in east China: A matched case-control study / W. X. Yan, Y. Dai, Y. J. Zhou, H. Liu, S. G. Duan, H. H. Han, Y. Chen // *Epidemiol. Infect.* – 2015. – Vol. 143 – № 5 – P.1020-1028.

277. Yanagihara, I. Structure and functional characterization of *Vibrio parahaemolyticus* thermostable direct hemolysin / I. Yanagihara, K. Nakahira, T. Yamane, S. Kaieda, K. Mayanagi, D. Hamada, T. Fukui, K. Ohnishi, S. Kajiyama, T. Shimizu, M. Sato, T. Ikegami, M. Ikeguchi, T. Honda, H. Hashimoto // *J. Biol. Chem.* – 2010. – Vol. 285 – № 21 – P. 16267-16274.

278. Yang, F. Molecular and conventional analysis of acute diarrheal isolates identifies epidemiological trends, antibiotic resistance and virulence profiles of common enteropathogens in Shanghai / F. Yang, Y. Jiang, L. Yang, J. Qin, M. Guo, Y. Lu, H. Chen, Y. Zhuang, J. Zhang, H. Zhang, Z. Dai, M. Li, C. Yang, M. Chen, Y. Zhang, H. Zhao // *Front. Microbiol.* – 2018. – Vol. 9 – P. 1-9.

279. Yazdankhah, S.P. Variable Number Tandem Repeat Typing of Bacteria / S. P. Yazdankhah, B.-A. Lindstedt – 2007. – T. 396 – № 1 – 395–405c.169. Zhang J. Refinement of whole-genome multilocus sequence typing analysis by addressing gene paralogy / J. Zhang, J.

Halkilahti, M. L. Hänninen, M. Rossi // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53 – № 5 – P. 1765–1767.

280. Yildiz, F.H. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation / F.H. Yildiz, G.K. Schoolnik // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1999. – Vol. 96 – № 7 – P.4028-4033.

281. Yildiz, F.H. VpsR, a member of the response regulators of the two-component regulatory systems, is required for expression of vps biosynthesis genes and EPSETr-associated phenotypes in *Vibrio cholerae* O1 El tor / F. H. Yildiz, N. A. Dolganov, G. K. Schoolnik // J. Bacteriol. – 2001. – Vol. 183 – № 5 – P. 1716-1726.

282. Zhang, J. Refinement of Whole-Genome Multilocus Sequence Typing Analysis by Addressing Gene Paralogy / J. Zhang, J. Halkilahti, M.-L. Hanninen, M. Rossi // Journal of clinical microbiology – 2015. – Vol. 53 - № 5 – P. 1765-1767.

283. Zhang, L. Virulence determinants for *Vibrio parahaemolyticus* infection / L. Zhang, K. Orth // Curr. Opin. Microbiol. – 2013. – Vol. 16 – № 1 – P. 70-77.

284. Zhang, P. A molecular surveillance reveals the prevalence of *Vibrio cholerae* O139 isolates in China from 1993 to 2012 / P. Zhang, H. Zhou, B. Diao, F. Li, P. Du, J. Li, B. Kan, J. G. Morris, D. Wang // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52 – № 4 – P. 1146-1152.

285. Zhou, H. A three-loci variable number of tandem repeats analysis for molecular subtyping of *Vibrio cholerae* O1 and O139 / H. Zhou, Z. Cui, B. Diao, C. Zhang, B. Pang, L. Zhang, B. Kan // Foodborne Pathog. Dis. – 2013. – Vol. 10 – № 8 – P. 723-730.

286. Zhou, H. Population structural analysis of O1 El Tor *Vibrio cholerae* isolated in China among the seventh cholera pandemic on the basis of multilocus sequence typing and virulence gene profiles / H. Zhou, X. Zhao, R. Wu, Zh. Cui, B.Diao, J. Li , D. Wang, B. Kan, W. Liang // Infect. Genet. Evol. – 2014. – Vol. 22. – P. 72-80.

287. Zhou, M. Combination of Multilocus Sequence Typing and GS-PCR Reveals an Association of Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* Clone with Clinical and Seafood Isolates / M. Zhou, W. Chen, C. Shi, H. Wang, X. Shi // J. Food Sci. – 2018. – Vol. 83 – № 10 – P.2536-2543.

288. Zhu, J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae* / J. Zhu, M. B. Miller, R. E. Vance, M. Dziejman, B. L. Bassler, J. J. Mekalanos // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2002. – Vol. 99 – № 5 – P. 3129-3134.