

*На правах рукописи*

**ХУНХЕЕВА ЖАННА ЮРЬЕВНА**

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

**1.5.11 – микробиология**

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

**Иркутск – 2023**

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении 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

**Научный руководитель:** **Миронова Лилия Валерьевна**  
доктор медицинских наук

**Официальные оппоненты:** **Водопьянов Сергей Олегович**, доктор медицинских наук, главный научный сотрудник отдела микробиологии холеры и других острых кишечных инфекций, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Ростов-на-Дону

**Маркова Юлия Александровна**, доктор биологических наук, заведующая лабораторией растительно-микробных взаимодействий, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский институт физиологии и биохимии растений Сибирского отделения Российской академии наук» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Иркутск

**Ведущая организация:** Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Санкт-Петербург

Защита диссертации состоится « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании совета 64.1.006.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения науки «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
доктор медицинских наук

Бугоркова Светлана Александровна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность исследования и степень разработанности

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 [Kapier J.V. et al., 1995; Faruque S.M. et al., 1998; Safa A. et al., 2010].

Торгово-экономические, туристические взаимосвязи России с эндемичными и неблагополучными по холере странами определяют возможность завоза холеры 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 крупные узлы международного транспортного сообщения, в т. ч. с неблагополучными по холере странами. Наличие разветвленной гидрологической сети на территории края, представленной крупными реками с многочисленными мелководными заводями, 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, Туманная, Уссури, 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. [Маслов Д.В. и др., 1997; Воронок В.М., 2016]. 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 [Nair G.B. et al., 2007; Velazquez-Roman J. et al., 2014; Laohapretthisan V. et al., 2003].

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 их количеству в определенном локусе [Yazdankhah S.P. et al., 2007; Van Belkum A. et al., 2001, 2007; Ramazanzadeh R. et al., 2007; Pourcel C. et al., 2004]. 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 полногеномного секвенирования (WGS) дала импульс к развитию мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) на основе WGS [Zhang J. et al., 2015; Maiden M.C. et al., 2013; Feijao P. et al., 2018; Larsen M.V. et al., 2012; Kimura B. et al., 2017].

**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 вибриона 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 по основным и дополнительным генам патогенности, пандемичности и персистенции. Выделенные из поверхностных водоемов штаммы *V. cholerae* O1, R-варианты, не O1/O139 серогруппы характеризуются отсутствием основных генов патогенности на фоне наличия 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 ССЗ, широко распространенному во всем 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 методические рекомендации «VNTR-типирование штаммов *Vibrio parahaemolyticus*» (протокол решения Ученого Совета № 5 от 06.06.2019 г.).

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 *V. cholerae* и *V. parahaemolyticus* 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 патогенов используются при чтении лекций на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

### **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.

### **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. «островов 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 межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых «Человек: здоровье и экология» (г. Иркутск, 2013 г.), IV региональной научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы инфекционной патологии на Дальнем Востоке Российской Федерации» (г. Хабаровск, 2015 г.), международной конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества (ШОС) в противодействии угрозе инфекционных болезней» (г. Сочи, 2015 г.), на заседаниях Проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» (48.04) (г. Ростов-на-Дону, 2014–2020 гг.), XIII всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (г. Москва, 2016 г.), IX всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика 2017» (г. Москва, 2017 г.), X всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Иркутск, 2017 г.), межрегиональной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Диагностика, профилактика и эпидемиологический надзор за природно-очаговыми инфекционными болезнями» (г. Иркутск, 2018 г.), межгосударственной научно-практической конференции «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ, в том числе на территории трансграничных природных очагов чумы» (г. Саратов, 2018 г.), научно-практической конференции «Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за особо опасными и природно-очаговыми инфекционными болезнями» (г. Иркутск, 2019 г.), XII всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (г. Ростов-на-Дону, 2020 г.), XV межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней» (г. Иркутск, 2021 г.).

Работа выполнялась в рамках тем научно-исследовательских работ «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 науки и высшего образования 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.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Материал и методы исследования

Для оценки ситуации по холере и пищевым токсикоинфекциям, вызванным параземолитическим вибрионом, на территории Приморского края использованы: отчетные данные территориального Управления Роспотребнадзора о международных транспортных связях (2015–2021 гг.), сводные данные по заболеваемости холерой ВОЗ, Референс-центра по мониторингу за холерой на территории РФ, данные справочно-эпидемиологических изданий, результаты микробиологического мониторинга поверхностных водоемов Приморского края (2011–2021 гг.), государственная статистическая отчетность по форме № 2 «Сведения об инфекционных и паразитарных заболеваниях» (1997–2021 гг.).

Всего в работе использовано 142 штамма *V. cholerae*, выделенных в период с 1976 по 2017 гг. при различных эпидситуациях в Приморском крае, и 120 штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных из клинического материала и из поверхностных водоемов.

Детекция основных и дополнительных генетических детерминант патогенности, персистенции, пандемичности, а также видо-, серогруппо- и биовароспецифических генов холерного вибриона осуществлялась в ПЦР в режиме реального времени и с электрофоретическим учетом результатов. У штаммов параземолитического вибриона в ПЦР осуществлялась детекция гена прямого термостабильного гемолизина *tdh*.

MLVA-типирование штаммов *V. cholerae* проводилось по пяти локусам переменных tandemных повторов (VcA, VcB, VcC, VcD, VcG), *V. parahaemolyticus* – по семи локусам (Vptr1, Vp02-07, Vptr3, Vptr4, Vptr5, Vptr6, Vptr8). Размер полученных ампликонов определялся методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer с использованием приложения GeneMapper 4.0.

Полногеномное секвенирование 20 изолятов *V. parahaemolyticus* осуществлялось на платформах MiSeq (Illumina) и MinION (Oxford Nanopore Technologies) в соответствии со стандартными протоколами. Геномы анализировались на наличие и выявление структурных особенностей *toxRS* последовательности, детерминант системы секреции III типа (T3SS1 и T3SS2), открытых рамок считывания в составе «островов патогенности».

Мультилокусное сиквенс-типирование *in silico* изолятов *V. parahaemolyticus* проводилось посредством поиска и анализа структуры в геномах генов «домашнего хозяйства» *recA*, *dnaE*, *gyrB*, *dtdS*, *pntA*, *pyrC* и *tnaA*. Идентификация аллелей генов и определение сиквенс-типа изолятов проводились на платформе PubMLST.org. Построение филогенетического древа по результатам идентифицированных аллелей и сиквенс-типов исследуемых изолятов проводилось в программе PhyloViz 1.1a.

Для оценки стабильности MLVA-профиля холерного вибриона проведены экспериментальные исследования, заключающиеся в культивировании штаммов вибриона в забуференном физиологическом растворе (дефицит питательных веществ) и воздействии низких 6 °С (1 серия эксперимента) и комнатных (20–22 °С) температур (2 серия эксперимента) с последующим проведением контрольных срезов и MLVA-типирования.

Статистический анализ результатов исследования осуществлялся посредством вычисления относительных величин, стандартной ошибки относительных показателей, критерия Стьюдента для качественных выборок, линейного коэффициента корреляции Пирсона  $r_{xy}$  (Савилов Е.Д. и др., 2011; Кучеренко В.З. и др., 2011).

Биоинформационный анализ результатов MLVA-типирования осуществлялся с применением программного комплекса Bionumerics v. 6.01. Дискриминирующая



способность метода рассчитывалась по формуле Хантера – Гастона (*HGDI*). Для оценки вариабельности локусов вариабельных тандемных повторов использован индекс аллельного полиморфизма (*h*).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 1. Анализ ситуации по холере и пищевым токсикоинфекциям галофильной этиологии на территории Приморского края

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

В настоящее время на территории Приморского края действуют 17 пунктов пропуска через государственную границу (один – на воздушном транспорте, 8 – на морском, 5 – на автомобильном, 3 – на железнодорожном).

За период 2015–2021 гг. в Приморский край из-за рубежа прибыло 507 247 транспортных средств (ТС), из которых наибольший удельный вес составляет автомобильный транспорт ( $85,5 \pm 0,04\%$ ) (рисунок 1). Количество людей, прибывших за семилетний период, превысило 8 млн человек ( $n = 8\,319\,326$ ) (рисунок 1).

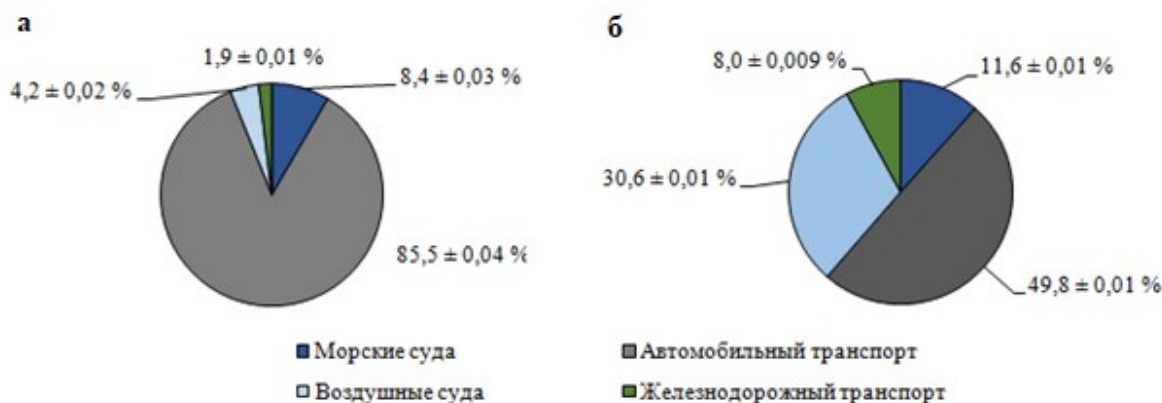


Рисунок 1 – Удельный вес отдельных видов транспорта (а) и прибывших лиц данным типом ТС (б) в структуре входящих миграционных потоков на территорию Приморского края (2015–2021 гг.)

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 ( $66,1 \pm 0,01\%$ , автомобильный транспорт) и Республике Корея ( $21,0 \pm 0,01\%$ , воздушный и морской транспорт) (таблица 1).

Согласно имеющимся данным ВОЗ по заболеваемости холерой во время седьмой пандемии на территории КНР случаи заболевания регистрировались практически ежегодно с 1987 г. с тенденцией к снижению количества больных [WHO].

Оценка ситуации по холере в других вовлеченных в миграционный процесс странах Азии показывает неблагоприятное по данной инфекции на отдельных территориях. Так, за анализируемый период с 2015 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) [WER, 2016–2022]. На территории Вьетнама за последние семь лет (с 2012 г.) холера официально не регистрировалась. По данным ВОЗ в КНДР последние осложнения по холере были в 1980 г. (170 случаев) и в 1996 г. (1 случай).

Таблица 1 – 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), % ± m <sub>p</sub>
1	КНР	5 500 799	66,1 ± 0,01
2	Республика Корея	1 743 623	21,0 ± 0,01
3	Япония	445 171	5,4 ± 0,008
4	Гонконг	117 562	1,4 ± 0,004
5	Таиланд	169 982	2,0 ± 0,005
6	КНДР	102 014	1,2 ± 0,004
7	Вьетнам	95 516	1,1 ± 0,004
8	Тайвань	9 240	0,1 ± 0,001
9	Филиппины	3 387	0,04 ± 0,0007
10	Сингапур	2 573	0,03 ± 0,0006
11	Всего из вышеуказанных стран	8 189 867	98,4 ± 0,004
12	Другие страны	129 459	1,6 ± 0,004
13	ВСЕГО	8 319 326	100

В странах Центральной Азии, в частности в Узбекистане, с которым налажено авиасообщение, в настоящее время случаи холеры в стране не регистрируются. Однако, стоит принимать во внимание территориальную близость Узбекистана с неблагополучным по холере Афганистаном, что может повлиять на эпидемиологическую ситуацию в стране [WER, 2016–2018, 2020, 2022].

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

В рамках микробиологического мониторинга поверхностных водоемов на наличие возбудителя холеры в Приморском крае с 2011 г. по 2021 г. было отобрано 29823 пробы воды с изоляцией 1693 штаммов холерного вибриона: 31 штамм *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, четыре штамма *V. cholerae* R-варианта и 1658 штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы.

Холерные вибрионы Эль Тор обнаруживались в водоемах края в 2011, 2014, 2016, 2017, 2021 гг., в то время как на протяжении всего анализируемого периода выделялись вибрионы не O1/O139 серогрупп. Штаммы *V. cholerae* O1 были изолированы в Уссурийском городском округе из проб р. Комаровка, в г. Владивостоке из р. Седанка, в Октябрьском районе из р. Раздольная и в г. Находке из оз. Соленое. Из проб воды последнего в 2016 г. также было изолировано четыре штамма холерного вибриона R-варианта. Холерные вибрионы не O1/O139 серогруппы помимо вышеуказанных территорий обнаруживались в водоемах г. Артем, Михайловском, Надеждинском, Партизанском, Пограничном, Спасском, Ханкайском, Хасанском и Шкотовском районах. Наибольшие показатели высеваемости холерного вибриона из поверхностных водоемов установлены в Октябрьском районе (12,9 ± 1,25 %), г. Владивостоке (9,9 ± 0,37 %), Уссурийском городском округе (9,5 ± 0,49 %), г. Находке (8,9 ± 0,61 %). Пик высеваемости холерного вибриона отмечен в августе: удельный вес выделенных в этот период изолятов составил 40,3 ± 1,19 % ( $n = 683$ ) с высеваемостью 8,9 ± 0,32 %.

К водоемам с максимальной высеваемостью из проб воды холерного вибриона относятся р. Седанка, впадающая в Амурский залив, озеро Соленое в г. Находка

и водохранилище Седанка в г. Владивосток. Больше половины штаммов холерного вибриона ( $65,7 \pm 1,15 \%$ ) изолировано из проб воды, отобранных в местах рекреационного водопользования. Однако максимальные показатели высеваемости холерного вибриона установлены для трансграничных водоемов в местах сброса сточных вод ( $11,2 \pm 1,36 \%$ ).

### **Заболеваемость пищевыми токсикоинфекциями, обусловленными параземолитическим вибрионом, в Приморском крае**

С 1997 г. по 2021 г. в Приморском крае выявлено 415 случаев ПТИ, обусловленных микроорганизмами рода *Vibrio* (рисунок 2). 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* ( $n = 30$ ).

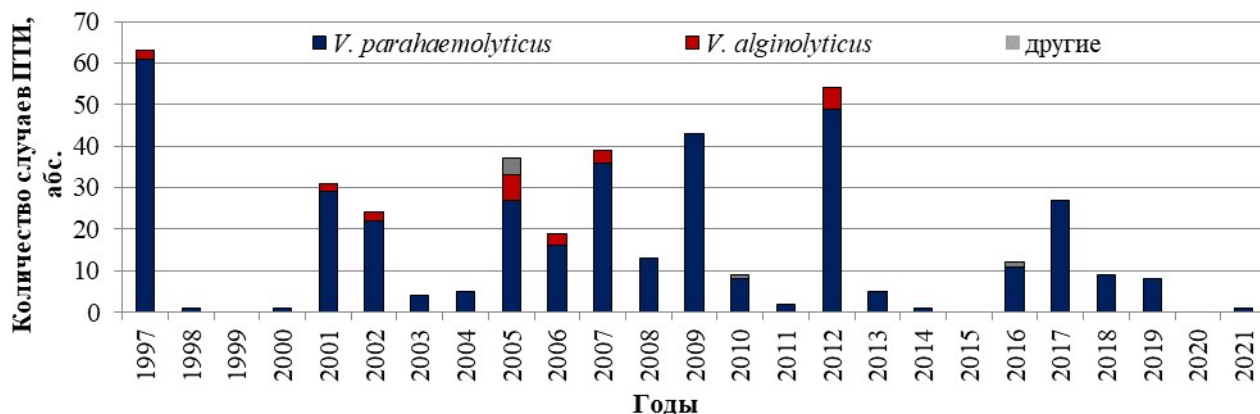


Рисунок 2 – Динамика и этиологическая структура ПТИ, вызванных галофильными вибрионами, в Приморском крае (1997–2021 гг.)

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 2). Групповые случаи ПТИ в крае зарегистрированы в 1997 г. – 63 случая, 2001 г. – 31, 2002 г. – 24, 2005 г. – 37, 2007 г. – 39, 2009 г. – 43, 2012 г. – 54.

Во внутригодовой динамике эпидемического процесса ПТИ, вызванных параземолитическим вибрионом, прослеживается подъем заболеваемости в летне-осенний период. Наибольший удельный вес ПТИ установлен в августе и составил  $67,8 \pm 2,4 \%$ , в сентябре и июле выявлено  $17,7 \pm 1,9 \%$  и  $12,1 \pm 1,7 \%$  всех зарегистрированных случаев, соответственно.

Случаи ПТИ регистрировались в г. Владивостоке ( $n = 356$ ;  $94,0 \pm 1,22 \%$ ) и Хасанском районе ( $n = 23$ ;  $6,0 \pm 1,22 \%$ ), возраст заболевших лиц составлял от 10 до 70 лет. Наибольшее количество больных – в возрастной группе от 21 до 30 лет. Основным фактором передачи в  $90,8 \pm 1,48 \%$  случаев были морепродукты.

### **Анализ закономерностей выявления параземолитического вибриона поверхностных водоемах Приморского края**

Наряду с холерным вибрионом из поверхностных водоемов Приморского края выделялся и параземолитический вибрион. За период с 2015 г. по 2021 г. всего изолировано 923 штамма *V. parahaemolyticus*. Возбудитель преимущественно обнаруживался в прибрежных зонах заливов в гг. Владивосток, Находка, Партизанском и Хасанском районах. 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 *V. parahaemolyticus* ( $n = 428$ ), этот

показатель ниже, чем по Партизанскому району и г. Находке. В Хасанском районе, где также регистрируются случаи ПТИ галофильной этиологии, в пробах воды поверхностных водоемов вибрион обнаруживался реже. В отличие от холерного вибриона максимальные показатели высеваемости микроорганизма установлены в сентябре ( $4,6 \pm 0,24$  %). К основным местам обнаружения *V. parahaemolyticus* отнесены водоемы, используемые для рекреационного водопользования.

## **2. Фенотипические и молекулярно-генетические свойства микроорганизмов рода *Vibrio*, обнаруживаемых в поверхностных водоемах Приморского края**

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

По микробиологическим свойствам все штаммы *V. cholerae* независимо от эпидемиологической ситуации и объекта выделения характеризуются типичными для рода *Vibrio* характеристиками.

Изучение серологических свойств показало, что из числа 142 анализируемых штаммов холерного вибриона 109 изолятов агглютинируются холерной диагностической O1 сывороткой, 14 – холерной RO-сывороткой. Девятнадцать штаммов *V. cholerae* не O1/O139 серогруппы не агглютинировались ни одной из диагностических сывороток. По результатам агглютинации с серовариантоспецифическими сыворотками 59 изолятов *V. cholerae* относятся к сероварианту Инаба, 50 – к Огава (включая 27 выделенных во время вспышки изолятов). Снижение агглютинабельности отмечается у отдельных выделенных из поверхностных водоемов Приморского края штаммов холерного вибриона.

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 в период вспышки штаммы холерного вибриона охарактеризованы как гемолизотрицательные и являются эпидемически опасным вариантом холерного вибриона.

При анализе чувствительности к холерным диагностическим бактериофагам классическому и эльтор установлена неоднородность 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. При анализе чувствительности *V. cholerae* периода эпидблагополучия к фагу классическому 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.

Таким образом, выделенные на территории Приморского края штаммы холерного вибриона характеризуются, в целом, типичными фенотипическими свойствами.

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.

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

По результатам проведенного молекулярно-генетического анализа 142 штаммов *V. cholerae* установлено, что выделенные из поверхностных водоемов в благополучный по холере период 115 штаммов, в отличие от выделенных в период вспышки и взятых в качестве группы сравнения, характеризовались отсутствием генов биосинтеза холерного токсина (*ctxA*) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (*tcpA*) и отнесены к эпидемически не опасным, что согласуется с результатами бактериологического исследования. Наличие или отсутствие генетических детерминант принадлежности к O1 (*wbeT/wbeO1*) и O139 (*wbfR/wbeO139*) серогруппам соответствовало фенотипическому определению указанного признака в реакции агглютинации с соответствующими сыворотками.

Если по наличию генов *rtxA* и *rtxC*, входящих в состав цитотоксического кластера MARTX, популяция водных *V. cholerae* практически однородна и характеризуется в  $99,1 \pm 0,88$  % случаев присутствием данных детерминант, то по другим локусам, ассоциированным с патогенностью – гемагглютининпротеазе *hapA* и порину наружной мембраны *ompU* выявлена их вариабельность. Интересен факт обнаружения у нетоксигенных *V. cholerae* фрагмента *tnpO183* «острова пандемичности» VSP-I, характерного для эпидемически значимых изолятов. Идентифицированные штаммы с данным генотипом *tnpO183*<sup>+</sup> были выделены из проб воды различных водоемов в различные периоды времени. Кроме этого, в одном случае у изолята *V. cholerae* R-варианта обнаружен ген *proO490* второго «острова пандемичности» VSP-II на фоне отсутствия гена *tnpO183*.

Гены «острова персистенции» обнаружены у всех клинических штаммов токсигенного *V. cholerae* и у большинства нетоксигенных водных вибрионов ( $69,5 \pm 4,29$  % – *mshA*,  $75,6 \pm 4,00$  % – *mshQ*, 100 % – *vpsR*). 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 анализируемых генетических локусов. Приуроченность ПЦР-генотипов не носила четкой территориальной и временной приуроченности. 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*<sup>+</sup>*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, изолированных на территории края с 1976 г. по 2014 г. Отдельным комплексом представлены ПЦР-генотипы холерных вибрионов не O1/O139 серогруппы и R-варианта, у которых отсутствуют гены биосинтеза O1 антигена. Кроме этого, у данной группы штаммов преимущественно отсутствуют гены персистенции *mshA* и *mshQ*.

Таким образом, показана высокая вариабельность циркулирующих в водоемах Приморского края в период эпидемиологического благополучия вариантов холерного вибриона по комплексу молекулярно-генетических признаков.

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

Исследование фенотипических свойств параземолитического 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 65 штаммов *V. parahaemolyticus* были идентифицированы MALDI-ToF масс-спектрометрическим методом.

В ходе исследования установлено, что штаммы *V. parahaemolyticus* характеризуются преимущественно типичными свойствами рода *Vibrio*. При анализе биохимической активности в отношении сахарозы, маннозы, арабинозы, лактозы, инозита, маннита, мальтозы установлено, что 100 % 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. Незначительная часть исследуемых штаммов характеризуется способностью к индолообразованию и выделению сероводорода. В реакции Фогес – Проскауэра 100 % штаммов не образуют ацетилметилкарабинол, что типично для вида *V. parahaemolyticus*.

При этом для всех клинических штаммов вибриона было характерно отсутствие роста на пептонной воде без добавления соли и с содержанием соли 8 % и 10 %. Водные изоляты *V. parahaemolyticus* оказались менее чувствительными к отсутствию соли и к повышенному его содержанию.

Тринадцать клинических штаммов (в т. ч. субкультура парагемолитического вибриона 2-17) (2012, 2017 гг.) из семнадцати характеризуются наличием зон гемолиза на среде Вагацума и отнесены к Канагава-позитивным изолятам, которые в большинстве случаев обуславливают развитие острых вспышек пищевых токсикоинфекций.

При MALDI-ToF масс-спектрометрическом исследовании *V. parahaemolyticus* установлена сопоставимость результатов идентификации по профилю константных белков с данными бактериологического анализа.

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

По результатам генотипирования 80 штаммов парагемолитического вибриона, выделенных из клинического материала и поверхностных водоемов Приморского края, установлено присутствие гена *tdh* у 13 клинических штаммов *V. parahaemolyticus* (включая субкультуру одного из штаммов), изолированных в 2012 ( $n = 10$ ) и 2017 гг. ( $n = 3$ ) (рисунок 3). 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 ( $r_{xy} = 1,0$ ,  $p > 99,9$  %).

При выборочном анализе геномов 20 штаммов *V. parahaemolyticus* установлено наличие у шести *tdh*<sup>+</sup> штаммов *V. parahaemolyticus* (2012, 2017 гг.) специфичных для пандемичных клонов точек замен в нуклеотидной последовательности *toxRS*: аденин в 576, 900, 1244 позициях и тимин в 1002, 1196, 1463 (рисунок 3).

Выделенные при спорадических случаях заболевания и из поверхностных водоемов края *tdh*<sup>-</sup> штаммы парагемолитического вибриона характеризуются *toxRS/old* последовательностью. 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.

Анализ дополнительных детерминант патогенности, входящих в состав систем секреции III типа (T3SS1 и T3SS2), в геномах вышеобозначенных 20 изолятов *V. parahaemolyticus* показал их неоднородность по генетическим мишеням, кодирующим

эффektorные белки, влияющие на гомеостаз и целостность клеточной стенки. Детерминанты T3SS1 типа секреции (*vopQ*, *vopS*, *vopR*, *VPA0450*) выявлены у всех исследованных вибрионов, независимо от патогенных свойств. Однако присутствие других детерминант патогенности, таких как *vopA*, *vopC*, *vopT*, *vopL* системы секреции T3SS2, было выявлено преимущественно у патогенных изолятов *V. parahaemolyticus*, в одном случае – у штамма *V. parahaemolyticus*, выделенного из поверхностного водоема.

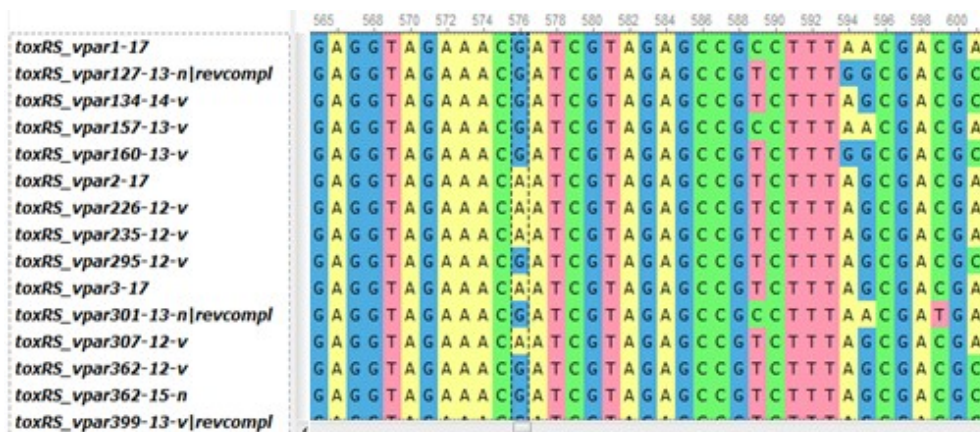


Рисунок 3 – Результаты выравнивания *toxRS* последовательностей исследуемых штаммов параземолитического вибриона в программе Ugene

При исследовании «островов патогенности» установлено присутствие всех семи «островов патогенности» со всеми открытыми рамками считывания у патогенных штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от больных в 2012 г. Изолированные в 2017 г. патогенные изоляты характеризуются наличием шести из семи анализируемых «островов патогенности». В отличие от патогенных изолятов, непатогенные клинические и водные изоляты *V. parahaemolyticus* вариабельны по структуре отдельных «островов патогенности».

### 3. Молекулярное типирование холерного и параземолитического вибрионов, выделенных в Приморском крае

#### MLVA-типирование штаммов холерного вибриона различной эпидемиологической значимости

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.

При кластерном анализе по алгоритму UPGMA полученных MLVA-генотипов 142 штаммов *V. cholerae* идентифицировано два наиболее крупных клональных комплекса (рисунок 4) с распределением на 89 MLVA-генотипов, из которых 21 кластерный и 68 – уникальных. Индекс Хантера – Гастона, отображающий дискриминирующую способность метода, для исследуемой выборки штаммов составил 0,983.

Первый клональный комплекс сформирован 27 эпидемиологически опасными штаммами *V. cholerae* Эль Тор (г. Владивосток, 1999 г.). В составе данного клонального комплекса выявлено шесть генотипов, в числе которых четыре уникальных. Формирование клональных комплексов в зависимости от эпидемиологической значимости обусловлено, в первую очередь, включением в схему локуса VcB, ассоциированного с токсин-регулируемыми пилиями адгезии.

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. Из данной группы для большинства штаммов, 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.

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.

Если в целом учитывать результаты ПЦР и MLVA-типирования штаммов холерного вибриона, 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.

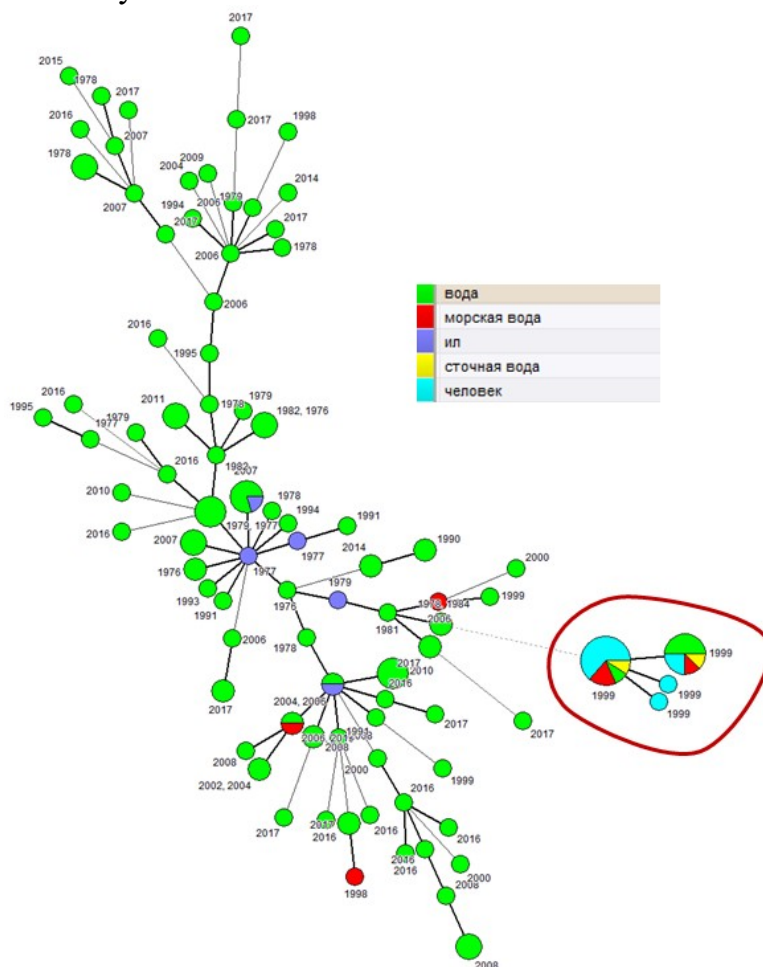


Рисунок 4 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования штаммов холерного вибриона разной эпидемической значимости, выделенных на территории Приморского края (алгоритм MST)



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

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

При MLVA-типировании выборки из 80 штаммов *V. parahaemolyticus*, представленных 17 клиническими (включая одну субкультуру) и 63 водными, установлена высокая генетическая гетерогенность изолятов из объектов внешней 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. Остальные локусы характеризовались меньшей вариабельностью 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.

По результатам кластерного анализа 80 исследуемых штаммов *V. parahaemolyticus* дифференцировались на 65 уникальных и 5 кластерных MLVA-генотипов. Клинические  $tdh^+$  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 идентичные MLVA-профили (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).

В отношении изолированных из водоемов вибрионов показана генетическая гетерогенность популяций с дифференциацией на 60 уникальных генотипов вне зависимости от территории и времени изоляции микроорганизма. Полученные результаты MLVA-типирования, свидетельствующие о гетерогенности популяции парагемолитического вибриона по локусам tandemных повторов, согласуются с данными зарубежных авторов. Выявление идентичных профилей у не связанных территориально штаммов требует дальнейшего исследования с применением других подходов к молекулярно-генетическому анализу.

### **Типирование парагемолитического вибриона на основании анализа геномов**

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.

По результатам анализа для пятнадцати исследуемых изолятов определены аллельные профили по всем анализируемым генам, 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 (таблица 2).

Таблица 2 – Аллельные профили и сиквенс-типы штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных от больных и из поверхностных водоемов в Приморском крае

Штамм	Наличие гена <i>tdh</i>	Тип аллели генов «домашнего хозяйства»							Сиквенс-тип
		<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	431
235-12-B	+	19	3	4	4	225	22	29	431
238-12-B	+	19	3	4	4	225	22	нд* (32)	–
307-12-B	+	19	3	4	4	225	22	29	431
157-13-B	–	77	277	172	19	392	12	1	2345**
160-13-B	–	191	73	202	222	260	26	222	533**
4-14-B	–	19	47	43	287	52	37	26	761**
1-17	–	124	40	62	125	120	24	127	нд*
2-17 с/к	+	19	3	4	4	4	22	29	3
3-17	+	19	3	4	4	4	22	29	3
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	1081
360-13-B	–	21	28	23	119	17	24	20	нд*
356-13-B	–	345	348	37	330	364	132	184	1674
399-13-B	–	25	19	274	302	351	197	157	834
127-13-H	–	191	73	202	222	260	26	28	533
301-13-H	–	нд* (387)	10	367	76	15	17	4	–
134-14-B	–	25	19	274	302	351	197	157	834
362-15-H	–	нд* (67)	19	47	13	122	51	50	–

Примечание: \* – не идентифицированы (в скобках представлена сходная аллель данного гена); \*\* – сходный сиквенс-тип

У *V. parahaemolyticus* с идентифицированными аллельными профилями особый интерес представляют патогенные изоляты. Так, установлено, что три изолята параземолитического 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*. При этом в MLVA-типировании данные четыре изолята имели отличные друг от друга генотипы. Патогенные штаммы *V. parahaemolyticus* 2017 г. изоляции имеют также идентичные аллельные профили, но отличающиеся по структуре гена *gyrB* от других патогенных вибрионов 2012 г. 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 *pntA*.

В результате определения сиквенс-типа на портале PubMLST из пятнадцати изолятов с установленными аллельными профилями в десяти случаях сиквенс-типы были идентифицированы, в пяти – не установлены.

Среди пандемических изолятов с генотипом *tdh*+ было идентифицировано два сиквенс-типа ST431 (у штаммов 2012 г.) и ST3 (у штаммов 2017 г.), который в большинстве случаев лежит в основе клональных комплексов пандемических вариантов и является наиболее распространенным среди *V. parahaemolyticus* во всем мире. У вибрионов, выделенных из поверхностных водоемов края определены сиквенс-типы ST533, 834, 1081, 1674.

#### **4. Оценка эффективности использования метода мультилокусного анализа переменных тандемных повторов (MLVA) в типировании холерного и парагемолитического вибрионов при проведении микробиологического мониторинга**

Одной из важнейших характеристик любого метода генотипирования является способность присваивать эпидемиологически связанным штаммам одинаковые или сходные генотипы, а эпидемиологически не связанным – разные генотипы [Tenover F.C. et al., 1995].

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

По результатам MLVA-типирования различных вариантов холерного вибриона (токсигенных/нетоксигенных) установлена кластеризация штаммов *V. cholerae* в зависимости от эпидемической значимости, в т. ч. и за счет включения в схему типирования локуса VcB. В отношении 27 взятых в исследовании эпидемически опасных вариантов *V. cholerae*, выделенных при вспышке в Приморском крае, установлена незначительная переменность структуры локусов с доминирующим генотипом 7\_23\_9\_7\_8 и 7\_24\_9\_7\_8. 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.

Изоляты холерного вибриона O1 серогруппы, R-варианта, не O1/O139 серогрупп, выделенные в период эпидблагополучия, по результатам кластерного анализа формируют отдельный клональный комплекс с высокой гетерогенностью их профилей с кластеризацией в отдельных случаях в зависимости от территории и времени выделения штамма. Установлена приуроченность случаев выявления идентичных MLVA-профилей ко времени и территории выделения (водоему) у изолятов *V. cholerae*, выделенных в отдельные годы за последние 13 лет. 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. В ряде же случаев закономерностей пространственной и временной зависимости генотипов вибриона не выявлено, что требует дальнейшего анализа.

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

В результате первой серии эксперимента в условиях дефицита питательных веществ и низкой температуры показаны изменения в структуре локусов переменных повторов (увеличение количества повторов) у токсигенного (в локусе VcB) и нетоксигенного (в локусе VcA) изолятов при первом срезе, что возможно связано с адаптационными перестройками в геноме микроорганизма в ответ на изменяющиеся условия существования. Дальнейшего закрепления измененного аллельного профиля холерного вибриона не последовало. По другим исследуемым локусам VcC, VcD, VcG изменений профиля не выявлено. При этом, измененный профиль штамма нетоксигенного *V. cholerae*, который был изолирован в Тюменской области изоз. Верхнее Кривое в 2012 г., соответствует профилю четырех штаммов, выделенных позже из того же водоема в тот же сезон, что свидетельствует о возможности изменения количества повторов *V. cholerae* в условиях циркуляции в поверхностных водоемах с последующей изоляцией вибрионов с измененным количеством повторов.

Исследование штаммов *V. cholerae*, культивируемых в условиях дефицита питательных веществ и комнатной температуры (20–22 °С), выявило изменения

в количестве повторов у четырех субкультур токсигенного холерного вибриона. В двух случаях изменения затронули локус VcB (1 и 6 срезы), по одному – в локусах VcD и VcG (1 срез). При этом одновременного изменения количества повторов по различным локусам у исследуемых субкультур *V. cholerae* не выявлено.

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. Установлено, что существенных изменений кластеризации генотипа исходного штамма *V. cholerae* O1 и его субкультуры с увеличенным числом повторов не наблюдалось.

Таким образом, результаты исследования подтверждают возможность изменения количества tandemных повторов в штаммах холерного вибриона под воздействием условий окружающей среды.

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

С целью более детального анализа возможности использования MLVA и выявления закономерностей кластеризации генотипов штаммов *V. parahaemolyticus* различными методами было проведено сравнение дифференциации на генотипы при MLVA, MLST и установлены некоторые закономерности распределения генотипов. Так, патогенные *tdh*<sup>+</sup> изоляты *V. parahaemolyticus* при MLVA-типировании характеризуются сходными (2012 г.) и идентичными (2017 г.) аллельными профилями (рисунок 5), при этом по результатам MLST у трех штаммов 2012 г. установлена идентичная структура и у одного – отличие по структуре гена альфа-субъединицы трансгидрогеназы *pntA*.

Учитывая идентичную геномную организацию «островов патогенности» у выделенных в 2012 г. четырех клинических штаммов вибриона, дифференциация их методом MLVA на сходные генотипы свидетельствует о дискриминирующей способности метода, при этом выявление сходных между собой MLVA-генотипов с формированием однолокусных 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.

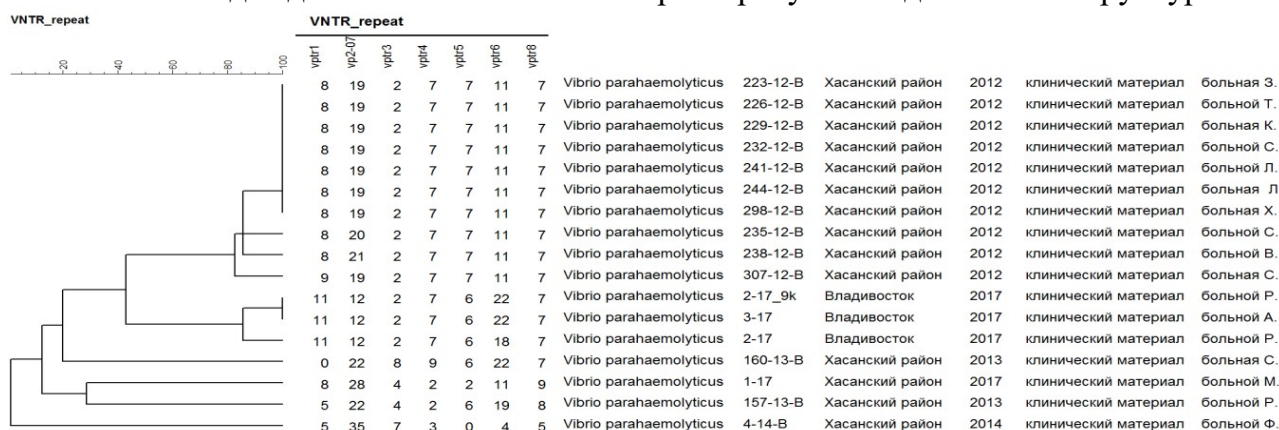


Рисунок 5 – Дендрограмма, построенная по результатам MLVA-типирования (с использованием алгоритма UPGMA) клинических штаммов *V. parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае

Для трех нетоксигенных клинических и трех водных изолятов вибриона установлено совпадение результатов определения их генотипов различными методами типирования. В отдельных случаях у изолятов *V. parahaemolyticus* по результатам

MLST установлена идентичная структура генов «домашнего хозяйства», однако при MLVA-типировании изоляты характеризовались сходными генотипами.

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*. Возможно, увеличение числа исследуемых VNTR-локусов повысит согласованность эпидемиологического анализа, проводимого по результатам типирования.

Таким образом, использование MLVA-типирования парагемолитического вибриона обеспечивает дифференциацию клинических изолятов с высокой дискриминирующей способностью, согласующуюся с эпидемиологическими данными. Метод может быть рекомендован для эпидемиологического расследования вспышек ПТИ, вызванных патогеном, как в рамках оперативного, так и ретроспективного анализа.

## 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 парагемолитические вибрионы, реже – нетоксигенные *V. cholerae* O1 и R-варианты. Наибольшая высеваемость изолятов холерного и парагемолитического 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 парагемолитические 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 парагемолитического 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*.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Хунхеева, Ж.Ю. MLVA-типирование в анализе структуры популяции штаммов *V. cholerae*, циркулирующих на территории Приморского края в период эпидемиологического благополучия / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, А.С. Пономарева, Л.Я. Урбанович, Т.В. Хоменко, А.С. Ким, В.П. Борзов, А.В. Алленов, С.В. Балахонов // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН – 2014. – № 1 (95). – С. 84–89. (из «Перечня ВАК...»)

2. Миронова, Л.В. Анализ стабильности генотипа *Vibrio cholerae* в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ / Л.В. Миронова, Ж.Ю. Хунхеева, Е.А. Басов, А.С. Пономарева, С.К. Миткеева, С.В. Балахонов // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып. 3. – С. 52–56. (из «Перечня ВАК...»)

3. Хунхеева, Ж.Ю. Эпидемиологические особенности острых кишечных инфекций, обусловленных галофильными вибрионами в Приморском крае / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, А.В. Фортунатова, А.В. Алленов, В.П. Борзов, Т.В. Хоменко, Н.С. Солодкая, Е.И. Аббасова, Т.Т. Тарасенко, Е.В. Косенок, С.В. Балахонов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2019. – № 24 (3). – С. 100–107. (из «перечня ВАК...»)

4. Миронова, Л.В. Генетическое разнообразие *Vibrio cholerae* O1 El Tor при эпидемических осложнениях в Сибирском и Дальневосточном регионах / Л.В. Миронова, А.С. Пономарева, Ж.Ю. Хунхеева, А.С. Гладких, С.В. Балахонов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2019. – № 37 (4). – С. 165–172. (из «перечня ВАК...»)

5. Хунхеева, Ж.Ю. Анализ внешних рисков завоза холеры на территорию Приморского края различными видами транспорта / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, В.А. Селезнев, М.А. Чеботарь, А.И. Коваленко, И.В. Кузнецова, С.В. Балахонов // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2021. – Т. 20, № 5. – С. 61–68 (из «Перечня ВАК...»)

6. Mironova, L.V. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East / L.V. Mironova, A.S. Gladkikh, A.S. Ponomareva, S.I. Feranchuk, N.O. Bochalgin, E.A. Basov, Zh.Yu. Khunkheeva, S.V. Balakhonov // Infection, Genetics and Evolution. – 2018. – Vol. 60. – P. 80–88.

7. Хунхеева, Ж.Ю. MLVA-типирование штаммов *V. parahaemolyticus*, изолированных на территории Приморского края / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, Т.В. Хоменко, А.С. Ким, В.П. Борзов, А.В. Алленов, С.В. Балахонов // Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник материалов пробл. комис. Координац. науч. совета по сан.-эпидемиол. охране территории РФ. – Ростов-на-Дону, 2014. – Вып. 27 – С. 82–87.

8. Хунхеева, Ж.Ю. Применение мультилокусного VNTR-анализа при молекулярно-генетическом типировании штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных из объектов окружающей среды / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов // Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической

медицины: Материалы VI Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и спец-в Роспотребнадзора. – Ставрополь, 2014. – С. 63–64.

9. **Хунхеева, Ж.Ю.** VNTR-типирование штаммов *V. cholerae eltor*, изолированных на Дальнем Востоке России в период седьмой пандемии / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, А.С. Пономарева, М.В. Афанасьев, А.В. Алленов, В.П. Борзов, В.Н. Краснощеков, А.Г. Ковальский, Т.В. Громова, С.В. Балахонов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. – № 27 – С. 63–66.

10. Миронова, Л.В. Молекулярно-эпидемиологический анализ ситуации по холере на Дальнем Востоке России в период седьмой пандемии / Л.В. Миронова, **Ж.Ю. Хунхеева**, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, Э.Г. Гольдапель, Л.Я. Урбанович, В.Н. Краснощеков, В.П. Борзов, А.В. Алленов, Т.В. Громова, А.Г. Ковальский, С.В. Балахонов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2015. – № 27 – С. 57–62.

11. Миронова, Л.В. Применение молекулярных технологий в системе эпидемиологического надзора за холерой в Сибири и на Дальнем Востоке / Л.В. Миронова, **Ж.Ю. Хунхеева**, Е.А. Басов, Э.Г. Гольдапель, А.С. Пономарева, С.К. Миткеева, М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов // Материалы международной научно-практической конференции: Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней. – Сочи, 2015. – С. 280–284.

12. **Хунхеева, Ж.Ю.** Роль галофильных вибрионов в структуре острых кишечных инфекций на территории Приморского края / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, В.М. Воронок, Т.Т. Тарасенко, Е.В. Косенок, А.В. Алленов, Т.В. Хоменко, Н.С. Солодка, С.В. Балахонов // 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. 95–98.

13. **Хунхеева, Ж.Ю.** Современные подходы к молекулярному типированию *Vibrio parahaemolyticus* / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, А.В. Фортунатова, Е.А. Басов, Н.О. Бочалгин, А.С. Пономарева, А.С. Гладких, И.С. Федотова, С.В. Балахонов // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2019. – № 37. – С. 100–102.

14. **Хунхеева, Ж.Ю.** Анализ структуры «островов патогенности» клинических штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, Н.О. Бочалгин, С.В. Балахонов // Молекулярная диагностика и биобезопасность-2020: Сборник материалов науч.-практ. конф. с международным участием. – Москва, 2020. – С. 185.

15. **Хунхеева, Ж.Ю.** Анализ внешних рисков завоза холеры на территорию Приморского края различными видами транспорта / Ж.Ю. Хунхеева, Л.В. Миронова, В.А. Селезнев, М.А. Чеботарь, С.В. Балахонов // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены: Материалы XII Всеросс. науч.-практ. конф. молодых ученых и спец-в Роспотребнадзора. – Ростов-на-Дону, 2020. – С. 97–99.

16. **Хунхеева, Ж.Ю.** Мультилокусное сиквенс-типирование *in silico* штаммов *Vibrio parahaemolyticus*, выделенных в Приморском крае / Ж.Ю. Хунхеева, Н.О. Бочалгин, Л.В. Миронова // Актуальные вопросы обеспечения эпидемиологического благополучия в трансграничных природных очагах чумы и других опасных инфекционных болезней: Материалы XV Межгосударственной науч.-практ. конф. – Иркутск, 2021. – С. 238–240.

---

Отпечатано с готового оригинал-макета.

Бумага офсетная. Формат 60×84<sup>1/16</sup>. Гарнитура Таймс. Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз. Зак. № 035-22.

РИО ИНЦХТ (Иркутск, ул. Борцов Революции, 1. Тел. 29-03-37. E-mail: arleon58@gmail.com)

---