

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

УДК 616.932(470)

Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, Н.Е. Гаевская, А.С. Водошнянов, Н.Б. Непомнящая

**ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ***ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация*

**Цель.** Анализ фенотипической характеристики и выявление особенностей генотипической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, имеющих различное происхождение и изолированных на территории России. **Материалы и методы.** Использована выборка из 548 нетоксигенных штаммов, полученная с помощью авторской пополняемой ГИС «Холера 1989–2014». ПЦР-генотипирование проводили в соответствии со «Способом идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант». Кластерный анализ проводили с использованием метода UPGMA. Построение дендрограммы осуществляли с помощью программы MEGA 5. **Результаты и обсуждение.** Показана типичность штаммов *V. cholerae* по культурально-морфологическим, серологическим и биохимическим свойствам. Выявлена изменчивость изучаемых штаммов по признаку фаголизабельности. Определены уникальные фаготипы, ранее не встречавшиеся на территории России. Популяция нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы была генетически однородной в отличие от изолятов *V. cholerae* O1 El Tor и имела идентичные ПЦР-генотипы. Показана универсальность метода ПЦР-генотипирования по 14 генам-мишеням, позволяющего дифференцировать изученные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, а также выявлять различия среди штаммов O139, выделенных в различных географических регионах страны.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, фено- и генотип, нетоксигенные штаммы, объекты окружающей среды.

*Корреспондирующий автор:* Левченко Дарья Александровна, e-mail: levchenko\_da@antiplague.ru.

*Для цитирования:* Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водошнянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 3:89–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

*Поступила 20.11.19. Отправлена на доработку 27.01.20. Принята к публ. 25.03.20.*

**D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, N.E. Gaevskaya, A.S. Vodop'yanov, N.B. Nepomnyashchaya**  
**Pheno- and Genotypical Features of Non-Toxigenic Strains of Cholera Vibrios of Different Origins, Isolated in the Territory of Russia**

*Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation*

**Abstract. Aim.** Analysis of the phenotypic characteristics and identification of peculiarities of the genotypic organization in non-toxigenic strains of cholera vibrios having different origin, isolated in Russia. **Materials and methods.** A sample of 548 non-toxigenic strains obtained using the author's updated GIS "Cholera 1989–2014" was used. PCR genotyping was carried out in accordance with the patented "Method for the identification of non-toxigenic strains of cholera vibrio O1 serogroup using PCR to isolate genetic determinants." Cluster analysis was performed applying the UPGMA method. The dendrogram was constructed using MEGA 5 software package. **Results and discussion.** Representative cultural-morphological, serological and biochemical properties of *V. cholerae* strains have been specified. The variability of the studied strains on the basis of phagolizability has been revealed. Unique phage-types not previously encountered in Russia have been identified. The population of non-toxigenic strains of cholera vibrio O139 serogroup is genetically homogeneous in contrast to *V. cholerae* O1 El Tor isolates and has identical PCR genotypes. The universality of the PCR genotyping by 14 target genes has been shown to differentiate the studied strains of *V. cholerae* O1 and O139, as well as to identify disparities among O139 strains isolated in different geographical regions of the country.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, pheno- and genotype, non-toxigenic strains, environmental objects.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Dar'ya A. Levchenko, e-mail: levchenko\_da@antiplague.ru.

*Citation:* Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. Pheno- and Genotypical Features of Non-Toxigenic Strains of Cholera Vibrios of Different Origins, Isolated in the Territory of Russia. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 3:89–96 (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96

*Received 20.11.19. Revised 27.01.20. Accepted 25.03.20.*

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5073-2918>

Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4749-3837>

Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8884-9681>

Nepomnyashchaya N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0868-6791>

Территория Российской Федерации (РФ) не является эндемичной по холере. В ряде субъектов с

водными экосистемами, такими как реки Волга, Обь, Амур, Дон, Нева, Таганрогский залив и др., обнару-

живались единичные токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 (заносы) и периодически регистрировалось выделение нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139, а также отмечалось их переживание на протяжении летнего периода, что указывает на необходимость выявления потенциальных и реальных рисков контаминации холерными вибрионами данных серогрупп водных объектов окружающей среды (ООС) [1]. В связи с этим прогноз по холере на 2020 г. для России определяют как неблагоприятный, что обусловлено потенциальными рисками завоза болезни, связанными с посещением стран, неблагополучных по холере [2].

Установлено, что штаммы *V. cholerae*, выделяемые из ООС в РФ, могут рассматриваться как резервуар генов факторов патогенности [3]. Отмечено появление в окружающей среде клонов, не имеющих полного кластера коровой области СТХф, но содержащих остров патогенности VPI-1. Считается, что штаммы, имеющие ген *tcpA*, могут явиться этиологическим фактором спорадических случаев или вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ). Так, в различных регионах РФ зарегистрированы случаи выделения нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor от людей, в том числе содержащих ген токсин-регулируемых пилей (ТСП), обеспечивающих колонизацию тонкого кишечника [4, 5].

Помимо токсинов, холерные вибрионы продуцируют множество других факторов, связанных с патогенностью или персистенцией вне организма хозяина. Это, прежде всего, пили адгезии и ферменты патогенности, такие, например, как нейраминидаза и ген (*nanH*), который находится в центральной части острова патогенности VPI-2 [6, 16].

В конце прошлого и в нынешнем веке на территориях различных субъектов России установлены случаи контаминации нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O139 поверхностных водоемов, используемых в качестве источников водоснабжения и водопользования. Штаммы холерных вибрионов O139 серогруппы разного происхождения отличались по своим генетическим свойствам. Изоляты, полученные от больных, характеризовались полным набором генов патогенности (*ctxAB*, *zot*, *ace*, *tcpA*, *toxT* и *toxR*), в то же время штаммы, выделенные из ООС, не имели генов токсигенности, но содержали регуляторный ген (*toxR*) и ген гемагглютинин-протеазы *hap* [7].

Одной из задач эпидемиологического анализа является выявление генетических связей между штаммами *V. cholerae* со сходными фенотипическими свойствами, имеющими различное происхождение, методом молекулярного типирования, который позволит в кратчайшие сроки выявить различия сравниваемых штаммов холерных вибрионов.

**Цель** исследования состояла в изучении фенотипической характеристики и выявлении особенностей генотипической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, имеющих различ-

ное происхождение, изолированных на территории России.

## Материалы и методы

Для осуществления сравнительного анализа использовали выборку из 548 нетоксигенных штаммов, из которых 538 штаммов *V. cholerae* O1 и O139 выделены из ООС, а 10 культур холерных вибрионов O1 изолированы от людей. Комплексная информация о фено- и генотипической организации водных штаммов (с привязкой к территории) получена с помощью авторской пополняемой ГИС «Холера 1989–2014». При отборе клинических штаммов использовались первичные документы (паспорта штаммов). Идентификацию микроорганизмов осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». ПЦР-генотипирование проводили в соответствии со «Способом идентификации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы с помощью ПЦР для выделения генетических детерминант» (Патент на изобретение № 2665542). Кластерный анализ, отражающий филогенетические связи штаммов по распределению ПЦР-генотипов, проводили с использованием метода UPGMA. Построение дендрограммы осуществляли с помощью программы MEGA 5 [8, 9].

## Результаты и обсуждение

В результате проведенного исследования установлено, что культуры *V. cholerae* O1 в основном являлись типичными по культурально-морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам. К серовару Ogawa принадлежали 272 штамма (51,7 %), к серовару Inaba – 243 штамма (46,2 %), к серовару Nikojima – 2 штамма (0,4 %), а к R-варианту относились 9 штаммов (1,7 %). У 22 штаммов *V. cholerae* (4,1 %) выявлена принадлежность к O139 серогруппе. К биовару El Tor отнесены 526 (96,0 %) штаммов по ряду тестов, а именно: по возможности образовывать ацетилметилкарбинол в реакции Фогеса – Проскауэра, а также по определению биовароспецифичных маркеров методом ПЦР (*ctxB*, *rtxC*, *cas3*).

В последние годы регистрируется высокая устойчивость выделяемых штаммов холерных вибрионов к холерному диагностическому бактериофагу эльтор. Атипичность по признаку фаголизальности определена у 455 штаммов (83,0 %). В ряде публикаций показано, что вероятными причинами изменения фагочувствительности холерных вибрионов к диагностическим бактериофагам являются генетические изменения штаммов *V. cholerae* El Tor [10–12].

По результатам фаготипирования штаммов холерных вибрионов установлены 14 различных фаготипов. В ходе проведенного анализа удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 82 (15,0 %) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor. При анализе

82 штаммов с установленным фаготипом выявлено, что наибольшее количество культур принадлежало к фаготипу 13 (28 штаммов – 34,6 %). Так, фаготип 13 встречался на территориях Ростовской области (2002, 2007, 2011 гг.), Республики Калмыкия (2003, 2011, 2012, 2013, 2015 гг.), Хабаровского края (2013 г.), Ленинградской (2002 г.) и Новгородской (2002 г.) областей. Наряду с этим выявлены уникальные фаготипы, ранее не встречавшиеся на территории России: фаготип 7 (Приморский край, 2017 г.), фаготип 8 (Хабаровский край, 2016 г.), фаготип 14 (Ростовская область, 2007 г.), фаготип 18 (Забайкальский край, 2018 г.) и фаготип 20 (Кировская область, 2018 г.).

Дальнейший этап работы заключался в анализе результатов ПЦР-генотипирования нетоксигенных штаммов холерных вибрионов (по 14 генам-мишеням). В результате определены кластеры/генотипы исследуемых штаммов. При исследовании 548 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* выявлено 105 генотипов, объединенных в 13 кластеров (таблица).

Особый интерес представляли нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*<sup>+</sup>. В ряде публикаций установлена филогенетическая связь между штаммами *V. cholerae ctxA-tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA-tcpA*<sup>-</sup> на основе SNP-типирования [13, 14]. Однако в исследованиях Н.И. Смирновой и соавт. показано, что нетоксигенные штаммы *ctxA-tcpA*<sup>+</sup>*VSP*<sup>-</sup> и *ctxA-tcpA*<sup>-</sup>*VSP*<sup>-</sup> относятся к двум филогенетически обособленным группам [15].

По результатам данного исследования выявлено, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae ctxA-tcpA*<sup>+</sup> об-

разовали две количественно схожие группы. Первая группа, состоящая из 37 изолятов (54,4 %), включала 20 генотипов, объединенных в шесть кластеров (D, E, F, G, H и I), и была представлена только штаммами *V. cholerae* O1 с генетической характеристикой *ctxA-tcpA*<sup>+</sup>. Изоляты этой группы характеризовались различным набором генов, причем у шести штаммов (8,8 %) выявлен редко встречающийся ген термостабильного токсина (*stn/sto*). Особенностью данной группы явилось наличие генов системы секреции шестого типа T6SS (*acd-vgrG1*, *pbd-vgrG3*, *vasK*) у 95,0 %, а также генов *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*) у 43,2 % штаммов холерных вибрионов. Вторую группу составил 31 штамм (45,6 %), все штаммы данной группы состояли из семи генотипов (два кластера – А и С) и входили в общие кластеры с культурами *ctxA-tcpA*<sup>-</sup>. Наибольший интерес вызвали штаммы *V. cholerae* O1, образовавшие кластер С (27 штаммов). Отличительной чертой изолятов данного кластера явилась их гетерогенность. Однако у всех штаммов холерных вибрионов выявлен структурный ген системы секреции шестого типа T6SS (*vasK*); у 77,8 % (21 штамм) обнаружен ген маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*); у 29,6 % (восемь штаммов) присутствовали гены кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*). У этих штаммов не выявлены гены *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*), ген *rstA* (RS1-элемента), а также ген термостабильного токсина (*stn/sto*). Остальные гены представлены различным сочетанием (рис. 1).

Генотипическая характеристика штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации  
Genotypic characteristics of *V. cholerae* strains isolated in the territory of the Russian Federation

Кластер Cluster	RS1, RS2	VPI-1	VPI-2			MARTX		T6SS			T3SS		<i>mshA</i>	<i>stn/sto</i>	Кол-во штаммов Number of strains
Ген Gene	<i>rstA</i>	<i>tcpAelt</i>	<i>int</i>	<i>nanH</i>	<i>vce</i>	<i>rtxC</i>	<i>acd-rtxA</i>	<i>acd-vgrG1</i>	<i>pbd-vgrG3</i>	<i>vasK</i>	<i>vcsN2</i>	<i>vspD</i>			
ПЦР-кластер (генотип) PCR cluster (genotype)															
A (A1-A41)	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	-	-	+/-	+/-	193
B (B1-B7)	-	-	+/-	+/-	-	+/-	+/-	-	-	+/-	+/-	-	+	-	128
C (C1-C9)	-	+/-	+	+	+/-	+	+/-	+/-	-	+	+/-	+/-	+/-	-	40
D (D1)	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	1
E (E1-E7)	+/-	+	+	+	+/-	+/-	+	+	+	+	-	-	+/-	-	20
F (F1-F3)	-	+	+/-	+/-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+/-	3
G (G1)	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1
H (H1-H6)	+/-	+	+	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+/-	10
I (I1-I2)	-	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	2
J (J1)	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	1
K (K1-K15)	+/-	-	+/-	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	90
L (L1-L11)	-	-	+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+/-	+/-	58
M (M1)	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	1
Итого: Total:															548

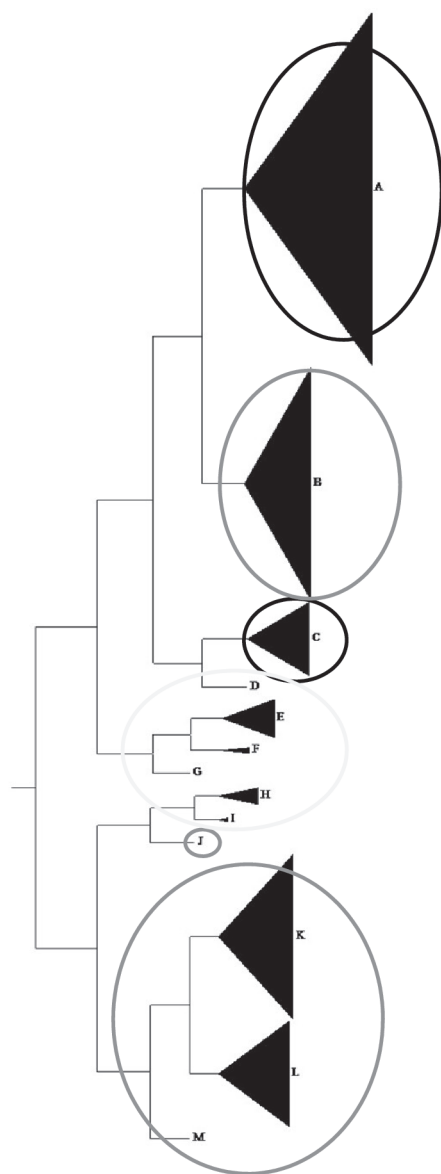


Рис. 1. Дендрограмма ПЦР-генотипов штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС и от людей на территории России:

серым цветом выделены нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA tcpA*<sup>+</sup>; черным цветом – нетоксигенные штаммы с генетической характеристикой как *ctxA tcpA*<sup>+</sup>, так и *ctxA tcpA*<sup>-</sup>; темно-серым цветом – штаммы с генетической характеристикой *ctxA tcpA*<sup>-</sup>

Fig. 1. Dendrogram of PCR genotypes of cholera vibrio strains isolated from environmental objects and from people in Russia:

the first group of strains is highlighted in gray (non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA tcpA*<sup>+</sup>). Black color indicates the second group of non-toxicogenic strains of cholera vibrios with a genetic characteristic of both, *ctxA tcpA*<sup>+</sup> and *ctxA tcpA*<sup>-</sup>. Dark gray color indicates strains with the genetic characteristic *ctxA tcpA*<sup>-</sup>

Исходя из полученных результатов, можно предположить, что выявленные штаммы холерных вибрионов O1 серогруппы с генетической характеристикой *ctxA tcpA*<sup>+</sup> и *ctxA tcpA*<sup>-</sup> на различных территориях РФ, по всей видимости, способны к сохранению в водной среде в течение продолжительного времени и, возможно, имеют заносное происхождение.

К числу факторов патогенности холерных вибрионов относят нейраминидазу, которая может

играть определенную роль в развитии легкой формы инфекции или кратковременного носительства [6]. Так, при отсутствии заболеваемости холерой отмечается разнообразие структуры генома по наличию гена *nanH* среди холерных вибрионов, выделенных из ООС. *NanH*-положительными оказались 77,5 % (417 из 548) исследуемых штаммов. Важно отметить, что, по данным полногеномного секвенирования, нуклеотидная последовательность этого гена у многих нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, выделенных из ООС на территории в России, изменена [15].

Присутствие генов фермента нейраминидазы в геноме штаммов холерных вибрионов разного происхождения, возможно, связано с тем, что продукт этого гена необходим вибриону не только во время инфекционного процесса, но и при адаптации микроорганизма к условиям среды обитания. При этом способность части вибрионов из поверхностных водоемов продуцировать нейраминидазу, возможно, дает им определенные преимущества в процессе выживания в стрессовых условиях водной среды [6, 14–17].

На рис. 2 показано, что среди нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор самым распространенным оказался кластер К (90 штаммов – 16,4 %), генотипы (15) которого выявлены на территории 29 субъектов всех федеральных округов. Остальные кластеры состояли из различного количества генотипов. Так, кластер А включал 41 генотип (193 штаммов – 35,2 %), L – 11 генотипов (58 штаммов – 10,6 %), С – 9 генотипов (40 штаммов – 7,3 %), В – 7 генотипов (128 штаммов – 23,4 %), Е – 7 генотипов (21 штамм – 3,8 %), Н – 6 генотипов (девять штаммов – 1,6 %), F – 3 генотипа (три штамма – 0,5 %), I – 2 генотипа (два штамма – 0,4 %), D, G, J и М – по одному генотипу (по одному штамму – 0,2 %).

Обращает на себя внимание широкое распространение в ООС в России генотипа К6, включающего 29 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 Эль Тор и представленного следующим набором генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS); гены кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Данный генотип обнаружен в поверхностных водоемах 22 административных территорий России семи ФО: Южный, Крымский, Северо-Западный, Центральный, Приволжский, Сибирский и Северо-Кавказский. По данным литературы, кластер MARTX тесно связан с СТХ-профагом, а ген *rtxA* присутствует в геноме большинства нетоксигенных штаммов Эль Тор, обычно в этих штаммах определяется и *rtxC*. В ряде публикаций [18, 19] показано участие маннозочувствительных пилей в формировании биопленок на абиотических и биотических поверхностях, что способствует длительному



Федеральный округ Federal District	Регион Region	Генотипы Genotypes																			
Южный федеральный округ Southern Federal District	Ростовская область Rostov Region	A2	A7	A23	A24	A28	B2	C3	C8	C9	E2	E4	E6	E7	H1	H2	H6	K2			
		K5	K9	K10	K11	L2	L7	J1	M1	G1	F3										
	Республика Калмыкия Republic of Kalmykia	A2	A4	A5	A6	A8	A10	A13	A14	A15	A16	A17	A18	A19	A20	A21	A22	A27	A34		
		A35	A38	A39	A40	A41	B2	B7	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C9	D1	E1	E5		
		E6	H2	H3	H4	H5	K1	K4	K5	K11	K12	L4	L5	L6	L7	L9	L10	I1	I2		
	Астраханская область Astrakhan Region	A3	A36	B1																	
Волгоградская область Volgograd Region	K6																				
Краснодарский край Krasnodar Region	A6	A7	A25	A26	A29	A35	B1	K6	K14	L2											
Крымский федеральный округ Crimean Federal District	Республика Крым Republic of Crimea	K3	K6	L3																	
Северо-Западный федеральный округ Northwestern Federal District	Республика Коми Komi Republic	F1																			
	Архангельская область Arkhangelsk Region	K6																			
	Калининградская область Kaliningrad Region	L5																			
	Ленинградская область Leningrad Region	A32	K6	L7																	
	Новгородская область Novgorod Region	K6																			
	Псковская область Pskov Region	K6																			
Дальневосточный федеральный округ Far Eastern Federal District	Приморский край Primorsky Region	A3	A11	K2	K8	L8															
	Амурская область Amur Region	A30																			
	Республика Саха Saha Republic	A37																			
	Хабаровский край Khabarovsk Region	B5	E3	L1	L2	L3	F2														
Уральский федеральный округ Ural Federal District	Свердловская область Sverdlovsk Region	B2	B3	K15	L3																
	Челябинская область Chelyabinsk Region	A1	A36	A6	K11																
	Тюменская область Tyumen Region	B6	C7																		
Центральный федеральный округ Central Federal District	Московская область Moscow Region	A2	A9	C7	K6																
	Рязанская область Ryazan Region	K6																			
	Воронежская область Voronezh Region	K13																			
	Ярославская область Yaroslavl Region	K6																			
	Тульская область Tula Region	K7																			
Приволжский федеральный округ Volga Federal District	Республика Татарстан Republic of Tatarstan	A3																			
	Кировская область Kirov Region	C7	K6																		
	Пермская область Perm Region	A31	K6																		
	Саратовская область Saratov Region	K6																			
	Нижегородская область Nizhny Novgorod Region	K6																			
	Пензенская область Penza Region	K6																			
Сибирский федеральный округ Siberian Federal District	Иркутская область Irkutsk Region	A2	A12	A28	A33	A36	C7	K6	K11												
	Кемеровская область Kemerovo Region	A2	K6																		
	Новосибирская область Novosibirsk Region	A2	K6																		
	Забайкальский край Transbaikal Region	A3	A40	K2	K6	K11	L8														
	Республика Бурятия The Republic of Buryatia	A40	L11																		
	Красноярский край Krasnoyarsk Region	K6																			
	Алтайский край Altai Region	K6																			
Северо-Кавказский федеральный округ North Caucasian Federal District	Ставропольский край Stavropol Region	A3	K6																		

Рис. 2. Распределение ПЦР-генотипов нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС и от людей на территории России

Fig. 2. Distribution of PCR genotypes of non-toxigenic strains of cholera vibrios isolated from environmental objects and from people in Russia

сохранению вибрионов в водоемах. Исходя из приведенных данных, выявлено, что штаммы с таким генотипом наиболее устойчивы к действию факторов окружающей среды и способны к переживанию на протяжении летнего периода или ряда лет.

На следующем этапе работы проведен сравнительный генотипический анализ клинических нетоксигенных штаммов холерных вибрионов и «водных» штаммов. Установлено, что нетоксигенные изоляты *V. cholerae* O1, выделенные от больных в разные годы, относились к различным генотипам. Так, штаммы холерных вибрионов, выделенные от больных в 1999 г. (два изолята – Астраханская область) и 2000 г. (два изолята – Краснодарский край), относились к генотипу B1, как и штаммы, обнаруженные в 2015 г. в Краснодарском крае, р. Агура. Отличительной особенностью таких штаммов явилось наличие генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC* – активатора MARTX и активного домена MARTX (*acd-rtxA*); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Стоит отметить, что нетоксигенный изолят, выделенный от больного в Республике Калмыкия в 2002 г., имел одинаковый генотип K1 со штаммом, обнаруженным в р. Элистинке в 2018 г., и был представлен генами *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX), а также генами кластера системы секреции третьего типа T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Нетоксигенная культура холерного вибриона, изолированная от больного в 1999 г. в Хабаровском крае, имела уникальный генотип, ранее не встречавшийся на территории России, заключавшийся в наличии генов *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX); *nanH* (ген нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *vasK* (структурный ген кластера системы секреции шестого типа T6SS) и маннозочувствительных пилей адгезии (*mshA*). Исключение составили штаммы холерных вибрионов, обнаруженные в водоеме Ветровский карьер в 2005 г. во время эпидосложнений в г. Каменске-Шахтинском, вызванных нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor *ctxA*-*tcpA*<sup>+</sup>, и принадлежащие к одному генотипу H1, представленному следующим набором генов: *int*, *nanH* (гены сайта интеграции и нейраминидазы острова патогенности VPI-2); *rtxC*, *acd-rtxA* (MARTX); *acd-vgrG1*, *pbd-vgrG3*, *vasK* (гены кластера системы секреции шестого типа T6SS); *vcsN2*, *vspD* (гены кластера системы секреции третьего типа T3SS) и *mshA* (гены маннозочувствительных пилей адгезии). Интересен тот факт, что на протяжении последних семи лет (2012–2018 гг.) на территории России нетоксигенных холерных вибрионов O1 серогруппы от людей выделено не было.

Что касается нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы, выделенных из ООС, то они оказались генетически однородными, в сравнении с *V. cholerae* O1, и вошли в общий кластер А со штаммами O1 серогруппы. Большинство

штаммов (99,8 %) образовало отдельный генотип A2, который представлен следующим набором генов факторов патогенности/персистенции: *int*, *nanH*, *vce* (гены острова патогенности VPI-2); *vasK* *pbd-vgrG3* (транслокон и эффектор T6SS) и *rtxC*. У этих штаммов не выявлены гены *tcpA*, *stn/sto*, *mshA*, а также гены T3SS (*vcsN2*, *vspD*) и MARTX (*acd-rtxA*). Гены, кодирующие активный домен ключевого эффектора T6SS (*acd-vgrG1*), в 95,5 % случаев также не обнаружены. Такой генотип выявлен на территориях шести субъектов РФ трех ФО, а именно: Южного, Сибирского и Центрального. Стоит отметить, что исключение составил один штамм *V. cholerae* O139 (0,2 %), изолированный на территории Уральского ФО (Челябинская область) и имеющий уникальный генотип. Отличительной чертой вышеуказанного штамма явилось наличие в составе генома последовательности *acd-vgrG1*.

Таким образом, с помощью пополняемой ГИС дана расширенная характеристика по фено- и генотипическим признакам штаммов холерных вибрионов, как вновь выделенных на территории России, так и обнаруженных ранее. Проведенный ретроспективный анализ микробиологических свойств штаммов *V. cholerae* показал их типичность по культурально-морфологическим, серологическим и биохимическим свойствам. Установлено, что нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 Эль Тор характеризовались устойчивостью по признаку фаголизабельности к холерному диагностическому фагу эльтор. Таким образом, сравнительный фенотипический анализ выявил изменчивость изучаемых штаммов по признаку фаголизабельности. Определены уникальные фаготипы (7, 8, 14, 18, 20), ранее не встречавшиеся на территории России. При проведении сравнительного анализа клинических нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с «водными» выявлено, что единичные нетоксигенные изоляты *V. cholerae* O1, выделенные от больных в разные годы, относились к различным генотипам, что указывает на их заносное происхождение. Популяция нетоксигенных штаммов холерных вибрионов O139 серогруппы являлась генетически однородной в отличие от изолятов *V. cholerae* O1 El Tor и имела идентичные ПЦР-генотипы. В целом распределение ветвей дендрограммы штаммов *V. cholerae* O139 отличалось от такового штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы. Установлено, что использование метода ПЦР-генотипирования по 14 генам-мишеням позволяет дифференцировать изученные штаммы *V. cholerae* O1 и O139, а также выявить различия среди штаммов O139, выделенных в различных географических регионах страны. Полученные данные свидетельствуют об актуальности проведения дальнейших исследований, направленных на изучение генетической организации нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с последующим поиском новых генетических маркеров для дифференциации клинических и водных штаммов.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

# Список литературы

1. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е., Ежова М.И. Холерные вибрионы в водоемах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.
2. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков, А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47.
3. Титова С.В., Монахова Е.В., Архангельская И.В., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности. *Здоровье населения и среда обитания*. 2016; 5:45–7.
4. Титова С.В., Монахова Е.В. О потенциальной опасности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, содержащих гены токсин-корегулируемых пилей адгезии. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; 5:65–72.
5. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA*<sup>+</sup>*tcpA*<sup>+</sup>, выделенных из водных объектов РФ, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 9:32–5.
6. Монахова Е.В. Стратегия вирулентности холерных вибрионов и пути ее реализации (обзор). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2013; 4:60–8.
7. Осин А.В., Ерошенко Г.А., Коннов Н.П., Кузнецов О.С., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O139 серогруппы, выделенных из внешней среды. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2000; 80:93–100.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
9. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. ПЦР-генотипирование нетоксигенных штаммов холерных вибрионов как один из подходов их актуализации в плане эпиднадзора за холерой. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2018; 2:28–35.
10. Гаевская Н.Е., Мakedonova Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 12(61):849–52. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852.
11. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8(4):466–72. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
12. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
13. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kermanov A.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Shipulin G.A. Draft genome sequences of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains 2011 EL-301 and P-18785, isolated in Russia. *Genome announce*. 2013; 1(4):e00659-13. DOI: 10.1128/genomeA.00659-13.
14. Миронова Л.В., Балахонov С.В., Хунхеева Ж.Ю., Пономарева А.С., Басов Е.А., Гладких А.С., Боцалгин Н.О., Урбанович Л.Я. Актуальные вопросы совершенствования эпидемиологического надзора за холерой: эпидемиологические и молекулярно-генетические закономерности обнаружения холерного вибриона в объектах окружающей среды. *Инфекция и иммунитет*. 2017; 5:371.
15. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Шелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенные на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 2:76–86. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
16. Gerny W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148:3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
17. Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Черепашкина И.Я., Буракова О.С. Фенотипический и генотипический анализ токсинопродукции типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов в стрессовых условиях окружающей

среды. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26439> (дата обращения 03.11.2019).

18. Watnick P.I., Fullner K.J., Kolter R.A. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181:3606–9. DOI: 10.1128/JB.181.11.3606-3609.1999

19. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):719–27. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001.

# References

1. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., Moskvitina E.A., Arkhangelskaya I.V., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I. [Vibrio cholerae in the waters of the Russian Federation]. *Gigiena i Sanitariya [Hygiene and Sanitation]*. 2019; 98 (4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.
2. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kurilenko M.I., Kruglikov V.D., Titova S.V., Levchenko D.A., Vodop'yanov A.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Mishan'kin B.M., Krivenko A.S., Anisimova G.B., Noskov A.K. [Cholera: Monitoring of Epidemiological Situation around the World and in Russia (2010–2019). Forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47
3. Titova S.V., Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V., Pisanov R.V., Nepomnyashchaya N.B. [Natural populations of Vibrio cholerae as a reservoir of virulence-associated genes]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2016; 5:45–7.
4. Titova S.V., Monakhova E.V. [Potential danger of nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains containing genes for toxin-coregulated adhesion pili]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2016; 5:65–72.
5. Zubkova D.A., Kruglikov V.D., Arkhangelskaja I.V., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Vodopyanov S.O. [Genetic features of strains *V. cholerae* O1 CTXA-TCPA+, isolated from water bodies of the Russian Federation, described using a new geoinformation systems]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; 9:32–4.
6. Monakhova E.V. Cholera vibrio virulence strategy and ways of its realization (scientific review). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2013; (4):60–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-4-60-68.
7. Osin A.V., Eroshenko G.A., Konnov N.P., Kuznetsov O.S., Smirnova N.I. [Phenotypic and genetic analysis of *Vibrio cholerae* strains of O139 serogroup, isolated from environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2000; 80:93–100.
8. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 2011; 28:2731–9. DOI: 10.1093/molbev/msr121.
9. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. [PCR genotyping of non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains as one of approaches to their actualization in terms of epidemiological surveillance of cholera]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2018; 2:28–35.
10. Gaevskaya N.E., Makedonova L.D. [The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Russian Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 12(61):849–52. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-849-852.
11. Tock M.R., Dryden D.T. The biology of restriction and anti-restriction. *Curr. Opin. Microbiol.* 2005; 8(4):466–72. DOI: 10.1016/j.mib.2005.06.003.
12. Labrie S.J., Samson J., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.
13. Kuleshov K.V., Vodop'yanov S.O., Markelov M.L., Dedkov V.G., Kermanov A.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Mazrukho A.B., Shipulin G.A. Draft genome sequences of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains 2011 EL-301 and P-18785, isolated in Russia. *Genome announce*. 2013; 1(4):e00659-13. DOI: 10.1128/genomeA.00659-13.
14. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Khunkheeva Zh.Yu., Ponomareva A.S., Basov E.A., Gladkikh A.S., Bochalgin N.O., Urbanovich L.Ya. [Relevant issues of improvement of epidemiological surveillance over cholera: epidemiological and molecular-genetic regularities of cholera vibrio detection in environmental objects]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2017; 5:371.

15. Smirnova N.I., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Yu., Agafonov D.A., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., Kutyrev V.V. [Genomic diversity of nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in the territory of Russia and neighboring states]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2018; 2:76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
16. Germyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002; 148:3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.
17. Sizova Ya.V., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S., Cherepakina I.Ya., Burlakova O.S. [Phenotypic and genotypic analysis of toxin production of typical and atypical strains of *Vibrio cholerae* in stress environmental conditions]. *Sovremennye Problemy Nauki i Obrazovaniya [Modern Problems of Science and Education]*. 2017; 3. URL: <http://www.science-education.ru/article/view?id=26439>.
18. Watnick P.I., Fullner K.J., Kolter R.A. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by *Vibrio cholerae* El Tor. *J. Bacteriol.* 1999; 181:3606–9. DOI: 10.1128/JB.181.11.3606-3609.1999.
19. Chiavelli D.A., Marsh J.W., Taylor R.K. The mannose-sensitive hemagglutinin of *Vibrio cholerae* promotes adherence to zooplankton. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7):719–27. DOI: 10.1128/AEM.67.7.3220-3225.2001.

**Authors:**

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Vodopyanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: [plague@aaanet.ru](mailto:plague@aaanet.ru).

**Об авторах:**

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: [plague@aaanet.ru](mailto:plague@aaanet.ru).