

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97

УДК 616.932

Л.В. Миронова, А.С. Пономарева, Е.А. Басов, И.С. Федотова, Ж.Ю. Хунхеева, А.В. Фортунатова,
Н.О. Бочалгин, А.С. Гладких, Л.Я. Урбанович, С.В. Балахонов

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕТЕКЦИИ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ *VIBRIO CHOLERAЕ* В СИСТЕМЕ МОНИТОРИНГА ВИБРИОФЛОРЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск,
Российская Федерация

Цель – оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант *Vibrio cholerae* в пробах из поверхностных водоемов для оптимизации системы микробиологического мониторинга холеры. **Материалы и методы.** Исследование проводилось в рамках мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Иркутска. Дизайн исследования предусматривал: 1) ПЦР-скрининг генетических детерминант *V. cholerae* в обогащенных на питательных средах (1 % пептонная вода) пробах из поверхностных водоемов в период мониторинга (824 пробы); 2) изучение динамики накопления ДНК *V. cholerae* при исследовании в ПЦР проб из поверхностных водоемов в процессе культивирования на средах обогащения (16 проб в динамике); 3) экспериментальное исследование детектируемых концентраций холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов. Проводилась индикация видоспецифических (*hlyA*, *toxR*) и серогруппоспецифических (*wbeT*, *wbfR*) детерминант *V. cholerae* в ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной и электрофоретической детекцией. **Результаты и обсуждение.** На первом этапе установлено, что удельный вес положительных по результатам ПЦР-скрининга проб (33,9 %) превысил процент положительных проб при бактериологическом исследовании (19,3 %) ($t=6,6$; $p<0,01$). При оценке динамики накопления ДНК зарегистрировано снижение порогового цикла (Ct) в 1,2–5,2 раза, свидетельствующее о нарастании концентрации холерного вибриона и доказывающее выявление при ПЦР-скрининге генетических детерминант жизнеспособных форм микроорганизма. Расширенное исследование ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб позволило дополнительно выделить четыре образца культуры *V. cholerae*. Однако в эксперименте с искусственно контаминированными холерным вибрионом образцами воды, в отличие от анализа обогащенных нативных проб, не выявлено различий чувствительности ПЦР-скрининга и бактериологического анализа, что может быть обусловлено особенностями метаболизма и адаптации микроорганизма в разных условиях среды. Результаты комплексного исследования свидетельствуют об эпидемиологической эффективности ПЦР-скрининга, что дает основание рекомендовать его применение в лабораториях федерального, регионального и территориального уровней при мониторинговых исследованиях вибриофлоры проб из объектов окружающей среды после их предварительного обогащения на жидких питательных средах.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, эпидемиологический надзор, мониторинг, поверхностные водоемы, молекулярно-генетический анализ, ПЦР-скрининг.

Корреспондирующий автор: Миронова Лилия Валерьевна, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Для цитирования: Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Федотова И.С., Хунхеева Ж.Ю., Фортунатова А.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Оценка эффективности детекции генетических детерминант *Vibrio cholerae* в системе мониторинга вибриофлоры водных объектов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:89–97. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97.

Поступила 04.09.2020. Принята к публ. 09.11.2020.

L.V. Mironova, A.S. Ponomareva, E.A. Basov, I.S. Fedotova, Zh.Yu. Khunkheeva, A.V. Fortunatova,
N.O. Bochalgin, A.S. Gladkikh, L.Ya. Urbanovich, S.V. Balakhonov

Assessing the Efficiency of Detection of *Vibrio cholerae* Genetic Determinants Through Waterbody Vibrioflora Monitoring System

Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to assess the effectiveness of PCR screening of *Vibrio cholerae* genetic determinants in samples from surface water reservoirs for optimization of the cholera microbiological monitoring system. **Materials and methods.** The study was carried out as a part of the vibrioflora monitoring in surface water bodies in Irkutsk city. The study design included: 1) PCR screening of *V. cholerae* genetic determinants in nutrient-enriched (1 % peptone water) samples from surface water reservoirs during the monitoring period (824 samples); 2) studying of the *V. cholerae* DNA accumulation dynamics applying PCR assay of the samples from surface water reservoirs during cultivation on the enriched media (16 samples in dynamics); 3) experimental study of the detected *V. cholerae* concentrations in samples from surface water reservoirs. Species-specific (*hlyA*, *toxR*) and serogroup-specific (*wbeT*, *wbfR*) *V. cholerae* determinants were indicated in PCR with hybridization-fluorescent and electrophoretic detection. **Results and discussion.** At the first stage it was found that the proportion of the positive samples through PCR screening (33.9 %) exceeded the percentage of the positive samples in bacteriological examination (19.3 %) ($t=6.6$; $p<0,01$). In the assessment of DNA accumulation dynamics, a decrease in the threshold cycle (Ct) by 1.2–5.2 times was recorded, indicating an increase in the *V. cholerae* concentration and proving the detection of genetic determinants of viable forms during PCR screening. An extended study of PCR-positive but bacteriologically negative samples made it possible to additionally isolate 4 *V. cholerae* cultures. However, there were no differences in the sensitivity of PCR screening and bacteriological analysis in the experiment with water samples artificially contaminated with *V. cholerae* unlike the analysis of the enriched native

samples. It can be determined by the metabolism and adaptation peculiarities of the microorganism in different environmental conditions. The results of the integrated study indicate the epidemiological effectiveness of PCR screening which gives grounds to recommend its application in monitoring studies of vibrioflora from environment after preliminary enrichment on liquid nutrient media in the work of federal, territorial, and regional laboratories.

Key words: *Vibrio cholerae*, epidemiological surveillance, monitoring, surface water bodies, molecular-genetic analysis, PCR screening.

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

Corresponding author: Liliya V. Mironova, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Citation: Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Fedotova I.S., Khunkheeva Zh.Yu., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. Assessing the Efficiency of Detection of *Vibrio cholerae* Genetic Determinants Through Waterebody Vibrioflora Monitoring System. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3: 89–97. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-89-97.

Received 04.09.2020. Accepted 09.11.2020.

Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>
Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>
Basov E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8358-2880>
Fedotova I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-0960>
Khunkheeva Zh.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5388-430>

Fortunatova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1167-7864>
Bochalgin N.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3053-6514>
Gladkikh A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Концепция эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации в качестве одной из основных задач микробиологического мониторинга предусматривает своевременное обнаружение возбудителя в клиническом материале при обследовании контингентов риска или в объектах окружающей среды. Актуальность мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды определяется известной способностью холерного вибриона сохраняться и накапливаться в поверхностных водоемах, обуславливая потенциальный риск развития вспышек водного характера при заносе эпидемически опасного варианта *Vibrio cholerae* O1 или O139, что неоднократно подтверждено при расследовании эпидосложнений по холере в РФ на современном этапе седьмой пандемии [1–3]. Кроме того, есть данные о роли в инфекционной патологии человека нетоксигенных *V. cholerae* как O1 серогруппы, так и неO1/O139 серогрупп [4–8], обнаруживаемых в поверхностных водоемах [9].

Действующими нормативно-методическими документами по лабораторной диагностике холеры при мониторинге объектов окружающей среды предусмотрено проведение только бактериологического анализа по стандартной схеме. Однако на современном этапе развития технологий очевидна необходимость оптимизации и повышения эффективности мониторинговых исследований с интеграцией молекулярно-генетических подходов к индикации возбудителя [10–12]. Значимая роль в этом плане отводится быстрым диагностическим тестам, позволяющим получить оперативную информацию о присутствии возбудителя в пробе [13]. Высокая чувствительность, специфичность, скорость и простота выполнения, доступность ПЦР определили ее широкое внедрение в клиническую лабораторную диагностику инфекционных болезней и в систему мониторинга патогенов в объектах окружающей среды. Эффективность применения ПЦР обусловлена в том числе возможностью детекции низких концентраций возбудителя в исследуемом материале и индикации некультивируемых форм микроорганизмов.

Цель – оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант *V. cholerae* в пробах из поверхностных водоемов для оптимизации системы микробиологического мониторинга холеры.

Материалы и методы

Исследование проводилось в рамках многолетнего мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов Иркутска. Дизайн исследования предусматривал три этапа:

- первый – ПЦР-скрининг генетических детерминант холерного вибриона в обогащенных на питательных средах (1 % пептонная вода: первая – 1 пв и вторая – 2 пв) пробах из поверхностных водоемов в течение семи лет в период ежегодного мониторинга (июль–август);

- второй – изучение динамики накопления ДНК *V. cholerae* при исследовании в ПЦР проб из поверхностных водоемов в процессе культивирования на средах обогащения;

- третий – экспериментальное определение детектируемых в ПЦР и при бактериологическом анализе концентраций холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов.

На первом этапе исследования бактериологический анализ проб воды и ила проводился в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». Пробы на 1 пв инкубировались в течение 18 ч с добавлением теллурита калия, на 2 пв – 6 ч без добавления ингибиторов сопутствующей микрофлоры. По окончании указанного времени инкубации объединенные пробы со сред обогащения из каждой стационарной точки исследовались в ПЦР. При подготовке объединенной пробы одной стационарной точки отбирали по 500 мкл с 1 и 2 пв из пробы воды и по 250 мкл с 1 и 2 пв из пробы ила, общий объем пробы – 1500 мкл. Всего за семилетний период проведен анализ 824 объединенных проб.

На втором этапе исследованию в ПЦР подвергались пробы из поверхностных водоемов в процессе обогащения на питательных средах в динамике –

отдельно 1 пв и 2 пв в указанные выше регламентированные нормативно-методическими документами сроки, а также 2 пв с пролонгированной инкубацией (9 ч и 24 ч) и третья пептонная вода (3 пв). Объем пробы с каждой среды обогащения – 1500 мкл.

Экспериментальная оценка чувствительности бактериологического метода и молекулярно-генетического скрининга **на третьем этапе** исследования проводилась с искусственно контаминированными штаммом холерного вибриона (*V. cholerae* O1 El Tor 1-17, генотип *wbeT⁺ hlyA⁺ tcpA⁻ ctxA⁻*) пробами воды, отобранными в одной из стационарных точек поверхностного водоема Иркутска в летний период. С этой целью во флаконы с водой, основным пептоном и теллуридом калия вносились взвесь культуры *V. cholerae* O1 El Tor 1-17 до конечной концентрации 100 мк/мл, 10 мк/мл, 1 мк/мл, 1 мк/10 мл, 1 мк/25 мл, 1 мк/50 мл, 1 мк/100 мл, 1 мк/150 мл, 1 мк/300 мл. Бактериологический анализ проводился в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры», в ПЦР исследовались 1 пв и 2 пв в объеме 1500 мкл каждой среды обогащения.

Подготовка препаратов ДНК. Пробы со сред обогащения центрифугировались при 12000 об/мин 10 мин с последующим ресуспендированием осадка в 100 мкл 0,85 % NaCl. Подготовленные таким образом пробы использовались для экстракции ДНК с применением набора «РИБО-преп».

Постановка ПЦР. Детекция видоспецифических и серогруппоспецифических детерминант *V. cholerae* осуществлялась в ПЦР с применением зарегистрированной тест-системы «АмплиСенс® Vibrio cholerae-FL» с гибридационно-флуоресцентной детекцией (гены *wbeT*, *wbfR*, *hlyA* – ПЦР-смесь-1-FRT *V. cholerae* тип) и/или разработанной в Иркутском научно-исследовательском противочумном институте тест-системы для выявления *V. cholerae* O1 и O139 (*wbO1*, *wbO139*, *toxR*) с электрофоретическим учетом результатов.

Секвенирование фрагментов гена *wbO139* выполнялось с использованием набора ABI Prism Big Dye v.3.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit на ДНК-анализаторе ABI Prism 3500 Genetic Analyzer [14].

Определение таксономической принадлежности выделенных культур проводилось по комплексу стандартных биохимических и серологических тестов, а также масс-спектрометрически.

Результаты и обсуждение

Иркутская область относится к ША типу по эпидемическим проявлениям холеры, соответственно, мониторинг вибриофлоры поверхностных водоемов на территории осуществляется ежегодно в июле – августе. В поверхностных водоемах области в летний период в отдельные годы обнаруживаются нетоксигенные *V. cholerae* O1, O139 серогрупп или *V. cholerae* R-варианта. Так, за период наблюдения с начала 70-х гг. прошлого столетия из объектов окружающей среды Иркутской области (преимущественно Иркутска) изолировано 280 штаммов холерного вибриона O1 серогруппы и R-варианта. Кроме того, ежегодно в определенных участках водоемов, обозначенных как «участки риска», обнаруживаются вибрионы неO1/O139 серогрупп.

В рамках мониторинга объектов окружающей среды Иркутска в течение семи лет осуществлялась оценка эффективности применения ПЦР-скрининга генетических детерминант холерного вибриона в пробах из поверхностных водоемов в ходе бактериологического анализа (первый этап исследования). Учитывая указанные выше данные по обнаружению холерного вибриона на территории, а также необходимость получения при проведении скрининга первичной информации о присутствии вибриона в водоеме, в качестве генетических мишеней выбраны детерминанты O1/O139 серогрупп и видоспецифические гены (*hlyA*, *toxR*).

При анализе результатов первого этапа исследования установлено, что одновременное обнаружение в ПЦР детерминант O1 серогруппы и видоспецифического гена (*hlyA* или *toxR*) наблюдалось в 11 случаях, и лишь в 8 из них эти данные подтверждены бактериологически выделением культуры *V. cholerae* O1 серогруппы. Что касается видоспецифических детерминант, то их детекция в ПЦР в 268 пробах сопровождалась выделением 151 штамма *V. cholerae* nonO1/O139 (табл. 1).

Следует отметить, что выделение культур *V. cholerae* nonO1/O139 при отрицательном результате ПЦР на наличие видоспецифического гена имело место только в двух случаях. При изучении указанных культур *V. cholerae* nonO1/O139 установлено отсутствие амплификации фрагмента видоспецифического гена *hlyA*, что и обусловило отрицательный результат тестирования в ПЦР сред обогащения. Этот факт определяет необходимость разработки и вне-

Таблица 1 / Table 1

Результаты ПЦР-скрининга проб из объектов окружающей среды на этапе бактериологического анализа
Results of environmental sample screening using PCR at the stage of bacteriological analysis

Количество исследованных проб Number of samples examined	Количество положительных в ПЦР проб Number of PCR-positive samples			Количество бактериологически подтвержденных проб Number of bacteriologically confirmed samples		
	<i>wbeT/wbO1</i>	<i>wbfR/wbO139</i>	<i>hlyA/toxR</i>	<i>V. cholerae</i> O1	<i>V. cholerae</i> O139	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
824	11	20	279	8	0	151

дрения тест-систем, позволяющих выявлять универсальные видоспецифические гены-мишени, присутствующие в геноме всех представителей *V. cholerae*.

Интерес представляет обнаружение на протяжении трех лет в пробах воды одной из стационарных точек (р. Ангара, Шишиловская протока) гена, детерминирующего биосинтез O139 антигена, одновременно с геном *toxR*. Однако ни в одном случае этот результат не был подтвержден бактериологически. Для исключения ложноположительных результатов проведено определение нуклеотидной последовательности обнаруженного в ПЦР ампликона *wbO139*. Анализ секвенированных фрагментов гена показал их максимальное сходство (на 94–96 %) с депонированными в GenBank нуклеотидными последовательностями гена, отвечающего за синтез O-антигена, у штаммов холерного вибриона O139 серогруппы – *V. cholerae* O139 серогруппы MO45 (№ AB012956) и *V. cholerae* O139 AI-1837 (№ Y07786). Последовательностей с более высоким уровнем гомологии в международных базах данных не выявлено.

В целом удельный вес положительных по результатам молекулярно-генетического скрининга проб (33,9 %) превысил процент положительных проб при бактериологическом исследовании (19,3 %) ($t=6,6$; $p<0,01$). Высокий процент ПЦР-положительных предварительно обогащенных проб в сравнении с результатами бактериологического исследования может свидетельствовать о присутствии в образцах низких концентраций искомого микроорганизма, находящихся за пределами чувствительности бактериологического метода. Не исключено также наличие в пробах вариантов *V. cholerae* в некультивируемом состоянии или персистирующей форме со сниженной метаболической активностью [15–17], не способных к росту на плотных питательных средах. Так, на примере исследования реверсии некультивируемых форм *Salmonella typhimurium* в вегетативное состояние показано, что рекультивация на жидких питательных средах – достаточно длительный процесс и может занимать до 2–3 сут [18]. Существует вероятность того, что кратковременного пребывания холерного вибриона на среде накопления оказывается недостаточно для восстановления способности форм со сниженной метаболической активностью к росту на плотных питательных средах в условиях лаборатории.

С учетом этого на втором этапе исследования проведена оценка динамики накопления ДНК холерного вибриона на 1 пв и 2 пв (условно обозначенная как стандартная схема), а также возможности обнаружения *V. cholerae* при увеличении срока инкубации на среде обогащения и введения в схему анализа 3 пв для ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб (условно обозначенная как расширенная схема). Исследование проводили в рамках мониторинга поверхностных водоемов Иркутска в начале эпидсезона 2017 г. (июль) в течение трех недель.

В результате все включенные в эксперимент исследуемые по стандартной схеме пробы ($n=16$) оказались ПЦР-положительными, а культуры холерного вибриона неO1/O139 серогрупп выделены только из девяти. В тестирование по расширенной схеме было включено 13 проб, поскольку на третьей неделе эксперимента из нее исключались пробы, в которых *V. cholerae* nonO1/O139 обнаружен по стандартной схеме. С применением расширенной схемы *V. cholerae* nonO1/O139 выделен дополнительно в четырех пробах (табл. 2).

Во всех случаях обнаружения в ПЦР детерминант холерного вибриона зарегистрировано снижение порогового цикла (Ct) в 1,2–5,2 раза в динамике, свидетельствующее о нарастании концентрации холерного вибриона в пробах при инкубации на средах обогащения и доказывающее выявление при ПЦР-скрининге генетических детерминант жизнеспособных форм микроорганизма. Как было отмечено выше, в четырех пробах культура *V. cholerae* nonO1/O139 выделена только при задействовании расширенной схемы – с 3 пв, исследование которой проводилось при установлении факта снижения Ct на 2 пв в сравнении с 1 пв (рис. 1). В одном случае (4т_3 нед) при исследовании пробы по стандартной схеме культура *V. cholerae* nonO1/O139 была выделена только из ила, а по расширенной схеме – из ила и воды.

В трех пробах выявление сигнала в ПЦР и снижение Ct в динамике не сопровождалось выделением культуры ни по стандартной, ни по расширенной схеме (рис. 1). Следует сказать, что все эти пробы демонстрировали отрицательный результат ПЦР при исследовании 1 пв и достаточно поздние циклы с 2 пв после инкубации 6 ч – 30,53; 29,15; 28,1. Тем не менее при исследовании их в динамике прослеживается снижение порогового цикла ПЦР на 2 пв с пролонгированной инкубацией и на 3 пв, что дает основание судить о нарастании концентрации холерного вибриона в пробах. Отсутствие выделения культуры холерного вибриона в этих случаях может быть связано как с низкой его исходной концентрацией в пробе, так и с невозможностью быстрой адаптации микроорганизма к культивированию в лабораторных условиях в начале периода мониторинга. В пользу второго утверждения можно отнести факт обнаружения в более поздние сроки мониторинга (третья неделя эксперимента) культуры *V. cholerae* nonO1/O139 при регистрации в ПЦР порогового цикла на уровне 18,87.

Апробированная расширенная схема исследования для ПЦР-положительных бактериологически отрицательных проб применялась далее при мониторинге поверхностных водоемов в 2017 г. В данный сезон имело место длительное выделение *V. cholerae* O1 серогруппы из одной стационарной точки г. Иркутска – реки Ушаковки (точка № 4). Первые две культуры были выделены 07.08.2017 из стационарной точки при положительном результате ПЦР-

Таблица 2 / Table 2

Результаты ПЦР-скрининга и бактериологического исследования сред накопления в динамике
Results of PCR screening and bacteriological investigation of accumulation media in dynamics

№ точки Point No	ПЦР (Ct) PCR (Ct)		БИ BI	ПЦР (Ct) PCR (Ct)			БИ BI
	1 пв 1 pw*	2 пв_6 ч 2 pw_6 h		2 пв_9 ч 2 pw_9 h	2 пв_24 ч 2 pw_24 h	3 пв 3 pw	
Первая неделя First week							
1	–	29,15	–	20,31	19,21	17,8	–
2	13,41	11,98	–	12,31	7,56	6,04	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
3	8,26	5,11	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	3,57	4,77	4,41	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
4	–	30,53	–	18,51	12,61	18,01	–
5	12,91	10,92	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	5,74	6,43	3,14	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9	11,85	4,69	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	3,38	5,2	3,02	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9a	15,48	6,81	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	8,69	5,83	2,95	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
Вторая неделя Second week							
2	–	28,1	–	нп / ns	22,51	24,53	–
3	11,36	6,72	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	3,77	3,69	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
5	–	11,78	–	нп / ns	6,71	7,16	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
Третья неделя Third week							
1	16,51	10,29	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
2	10,9	4,46	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
3	14,16	9,14	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	нп / ns	нп / ns	нп / ns
4	22,48	18,87	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139	нп / ns	11,87	14,38	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
5	19,99	13,74	–	нп / ns	10,11	9,66	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139
9a	18,77	14,48	–	нп / ns	10,56	11,08	<i>V. cholerae</i> nonO1/O139

Примечание: БИ – бактериологическое исследование; нп – исследование не проводилось.

Note: BI – bacteriological investigation; ns – not studied; * – peptone water (pw).

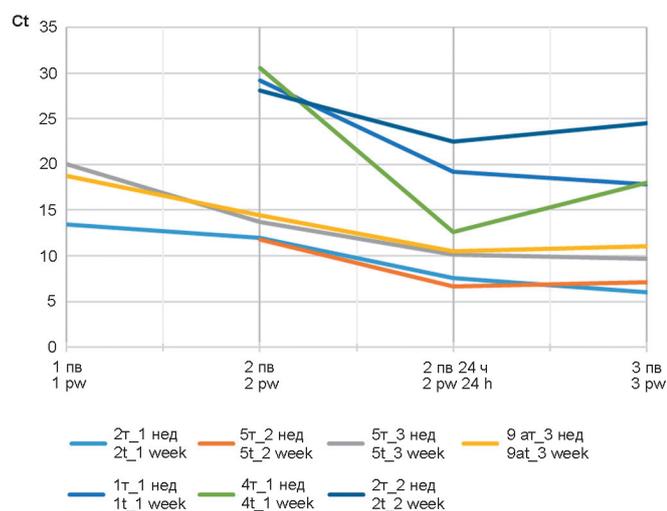


Рис. 1. Динамика изменения Ct в пробах с выделением культуры *V. cholerae* nonO1/O139 с 3 пв (2т_1 нед, 5т_2 нед, 5т_3 нед, 9ат_3 нед) и без выделения *V. cholerae* nonO1/O139 (1т_1 нед, 4т_1 нед, 2т_2 нед)

Fig. 1. Dynamics of Ct variation in samples with *V. cholerae* nonO1/O139 culture isolation from 3 pw (2t_1 week, 5t_2 week, 5t_3 week, 9at_3 week) and without culture isolation (1t_1 week, 4t_1 week, 2t_2 week)

исследования сред обогащения с установленной динамикой нарастания концентрации ДНК в образце из 2 пв по сравнению с 1 пв (рис. 2). Далее при увеличении кратности отбора проб и расширении перечня точек продолжалось выделение культур *V. cholerae* O1 как из стационарной точки, так и из ряда дополнительных. В этот период во всех случаях при получении положительного результата в ПЦР со сред обогащения на наличие детерминант O1 серогруппы и видоспецифического гена изолированы культуры *V. cholerae* O1. Однако позднее в одной из проб (т. 4Г, 18.08) при положительном результате ПЦР с 1 пв и 2 пв колонии, морфологически сходные с холерным вибрионом, не обнаружены. С учетом этого применена расширенная схема – пересев на 3 пв, в высевах из которой обнаружен холерный вибрион O1 серогруппы – *V. cholerae* O1 10-17 (рис. 2).

Полученные результаты оценки эффективности ПЦР-скрининга ставят вопрос о пределе чувствительности молекулярно-генетической детекции детерминант холерного вибриона в обогащенных пробах из поверхностных водоемов и бактериологического метода. С этой целью проведен эксперимент по лабораторному заражению отобранных из поверхностных

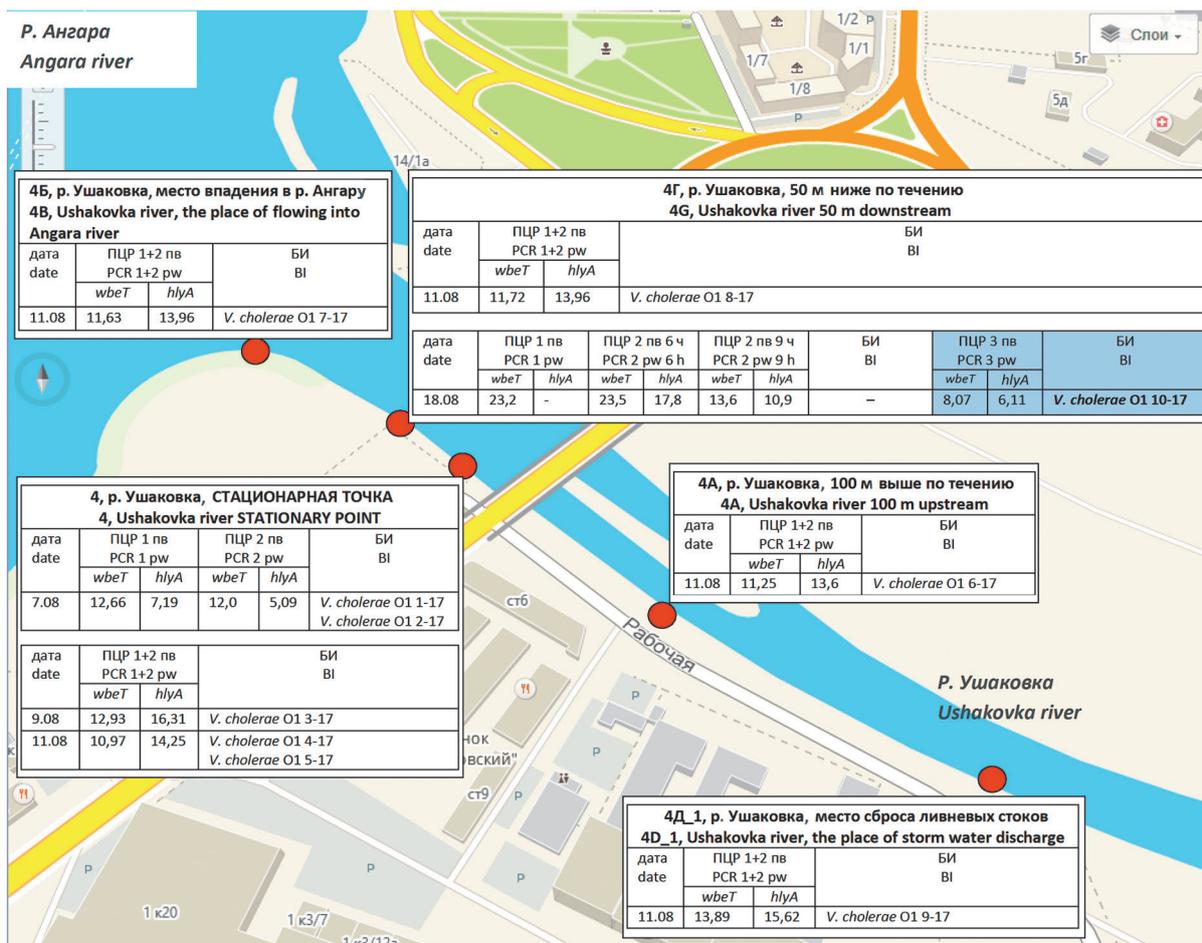


Рис. 2. Схема расположения стационарных и дополнительных точек отбора проб из р. Ушаковки (Иркутск, 2017 г.) и динамика результатов ПЦР в сравнении с бактериологическим анализом:

1 пв – первая среда обогащения (пептонная вода); 2 пв – вторая среда обогащения (пептонная вода); 3 пв – третья среда обогащения (пептонная вода); (1+2) пв – объединенная проба первой и второй сред обогащения; БИ – бактериологическое исследование

Fig. 2. Diagram of stationary and additional sampling points from the Ushakovka river (Irkutsk, 2017) and dynamics of PCR results in comparison with bacteriological analysis:

1 pw – the first enrichment medium (peptone water); 2 pw – the second enrichment medium (peptone water); 3 pw – the third enrichment medium (peptone water); (1+2) pw – combined sample of the first and the second enrichment media; BI – bacteriological investigation

водоемов проб воды взвесью штамма *V. cholerae* O1 El Tor 1-17 в разных концентрациях. В трех сериях эксперимента установлено, что положительный результат ПЦР со сред накопления во всех случаях сопровождался выделением культуры холерного вибриона из контаминированной пробы. При этом вибрион и его генетические детерминанты обнаруживались в разведении до 1 м.к./50 мл пробы во всех сериях эксперимента, в разведении 1 м.к./100 мл – в двух сериях из трех, в остальных разведениях результаты тестирования были отрицательными. Таким образом, при исследовании искусственно контаминированных штаммом *V. cholerae* O1 проб воды не установлено различий чувствительности двух методов обнаружения холерного вибриона.

Расхождение результатов исследования искусственно контаминированных холерным вибрионом проб воды и обогащенных на питательных средах нативных проб из поверхностных водоемов обусловлено, по всей вероятности, особенностями ме-

таболизма и адаптации микроорганизма в разных условиях среды. Следует отметить, что в рамках данного исследования максимальное количество ПЦР-положительных проб с бактериологическим подтверждением приходится на *V. cholerae* nonO1/O139. Вибрионы неO1/O139 серогрупп обнаруживаются ежегодно в участках риска водоемов Иркутска и характеризуются широким генетическим разнообразием, и есть основания полагать, что они относятся к аутохтонной микрофлоре водных объектов. С учетом природно-климатических особенностей территории в качестве одной из стратегий адаптации и сохранения *V. cholerae* nonO1/O139 в межсезонный период может рассматриваться их переход в некультивируемое состояние с последующей поэтапной реверсией в вегетативные формы при оптимальных параметрах среды (повышение температуры, увеличение количества питательных веществ и т.д.). Известно, что возможность реверсии в вегетативную форму и обнаружения микроорганизмов рода *Vibrio* в окру-

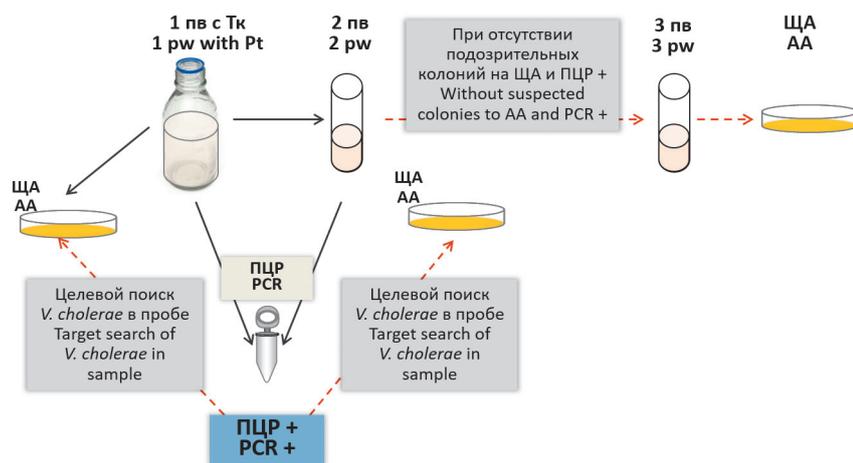


Рис. 3. Схема исследования проб из объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона с включением ПЦР-скрининга:

пв – пептонная вода; ЩА – щелочной агар; Тк – теллурид калия

Fig. 3. Diagram of environmental sample examinations for *V. cholerae* with incorporation of PCR screening:

pw – peptone water; AA – alkaline agar; Pt – potassium tellurite

жающей среде коррелирует с температурой воды, концентрацией биогенных веществ в водоеме, численностью фито- и зоопланктона [17, 19, 20].

В начале летнего сезона, когда не достигнут температурный и субстратный оптимум, вибрионы в водоемах могут существовать в покоящейся или переходной формах, для восстановления способности к росту которых, возможно, требуются более длительные условия культивирования. Кроме того, пребывание в водной окружающей среде и культивирование холерного вибриона в лабораторных условиях связаны с необходимостью утилизации различных субстратов для обеспечения жизнедеятельности микроорганизма, что требует переключения метаболических процессов в клетке. Указанными причинами можно объяснить обнаружение вибрионов в пробах воды при увеличении сроков культивирования и введении дополнительных пассажей на питательных средах.

В целом результаты комплексного исследования дают основание рекомендовать проведение ПЦР-скрининга в лабораториях федерального, регионального, а также территориального (имеющих разрешение на работу с микроорганизмами II группы патогенности) уровней при мониторинговых исследованиях вибриофлоры проб из объектов окружающей среды после их предварительного обогащения на жидких питательных средах. Эпидемиологическая эффективность такого подхода заключается в оперативном получении информации о присутствии в образце детерминант холерного вибриона до выделения культуры, что служит основанием для целенаправленного поиска указанного микроорганизма в пробе и подключения при необходимости расширенной схемы исследования (рис. 3). В установленном очаге холеры результаты ПЦР-скрининга проб из объектов окружающей среды могут служить основанием для проведения противоэпидемических мероприятий. С точки зрения экономической эффективности применение данного подхода может быть направлено на оптимизацию объемов бактериологического исследования за счет исключения из дальнейшего анализа ПЦР-отрицательных проб. Снижения финансовых

затрат можно достигнуть и за счет исследования в ПЦР объединенных проб, отобранных в расположенных на одном водном объекте и территориально связанных стационарных точках, а также за счет смещения акцентов при проведении мониторинговых исследований на участки риска, минимизировав при этом проведение анализа в стационарных точках, где микроорганизмы рода *Vibrio* не обнаруживаются на протяжении длительного времени. Учитывая тот факт, что для первичного заключения о присутствии холерного вибриона в исследуемой пробе достаточно обнаружения его видоспецифических и серогруппоспецифических детерминант, целесообразны разработка и внедрение в практику ПЦР-тест-систем с ограниченным спектром тестируемых генов, что существенно снизит стоимость скринингового исследования.

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

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Маслов Д.В., Вершкова Т.И., Урбанович Л.Я., Алленов А.В., Мурначев Г.П., Гарковенко Л.Е., Воронок В.М. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Владивосток. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 5:26–31.
2. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Папиренко Е.В., Ганин В.С., Бурый В.Л., Морозова И.В., Мартынова Т.М. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль Тор в г. Южно-Сахалинск. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2000; 5:31–5.
3. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Мишанькин Б.Н., Мазрухо Б.Л., Подосинникова Л.С., Кудрякова Т.А., Москвитина Э.А., Водопьянов С.О., Рыжко И.В., Казакова Е.С., Шарова И.Н., Плотникова Е.А., Давыдова Н.А., Абрамова Е.Г., Королев Ю.С., Шестиалтынова И.С., Шарифулина Д.М., Куряева Н.Ю., Юмангулова Е.Ф., Чернышева А.В., Бугоркова Т.В., Русакова Т.Г., Масленикова А.Л., Милова М.В., Захарова Л.И., Билалов Т.Г., Шутько А.Г., Качкина Г.В. Характеристика холерных вибрионов Эль Тор, выделенных в г. Казань в 2001 г. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2002; 2:3–6.
4. Ратникова Л.И., Кузьмина Н.Я. Случай холеры в Челябинске. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2002; 2:53–4.
5. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяничкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *V. cholerae* O1 sтхАВ-тсрА+. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2007; 1:23–9.

6. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.
7. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
8. Монахова Е.В., Архангельская И.В. Холерные вибрионы неO1/неO139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 2:14–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23.
9. 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.
10. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Щербаклова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
11. Шарова И.Н., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Куклев В.Е., Карнаухова И.Г., Щербаклова С.А., Топорков А.В., Чеснокова М.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. Совершенствование и стандартизация лабораторной диагностики особо опасных, «новых» и «возвращающихся» инфекционных болезней. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2013; 2:46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-46-48.
12. Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Мельникова А.А. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2013; 2:4–13.
13. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2020; 38(1):A73–A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
14. Миронова Л.В., Басов Е.А., Афанасьев М.В., Хунхеева Ж.Ю., Миткева С.К., Ганин В.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В. MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ с молекулярно-генетической идентификацией *Vibrio* spp. в системе мониторинга вибриофлоры поверхностных водоемов. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 19(6):27–36. DOI: 10.17816/EID40838.
15. Brenzinger S., van der Aart L.T., van Wezel G.P., Lacroix J.M., Glatter T., Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Front Microbiol.* 2019; 10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793.
16. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
17. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.
18. Романова Ю.М., Алексеева Н.В., Гинцбург А.Л. Некультивируемое состояние у патогенных бактерий на модели *Salmonella typhimurium*: феномен и генетический контроль. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 1997; 4:35–41.
19. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.
20. Меньшикова Е.А., Архангельская И.В., Левченко Д.А., Курбатова Е.М., Кругликов В.Д., Титова С.В. Влияние температурных флуктуаций воды поверхностных водоемов города Ростова-на-Дону на циркуляцию холерных вибрионов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова.* 2018; 14(4):14–20.
21. Papirenko E.V., Ganin V.S., Bury V.L., Morozova I.V., Martynova T.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 2. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Yuzhno-Sakhalinsk]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2000; 5:31–5.
22. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Mishan'kin B.N., Mazrukho B.L., Podosinnikova L.S., Kudryakova T.A., Moskvitina E.A., Vodop'yanov S.O., Ryzhko I.V., Kazakova E.S., Sharova I.N., Plotnikova E.A., Davydova N.A., Abramova E.G., Korolev Yu.S., Shestial'tynova I.S., Sharifulina D.M., Kuryaeva N.Yu., Yumangulova E.F., Chernysheva A.V., Bugorkova T.V., Rusakova T.G., Maslenikova A.L., Milova M.V., Zakharova L.I., Bilalov T.G., Shut'ko A.G., Kachkina G.V. [Characteristics of El Tor cholera vibrios isolated in Kazan in 2001]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2002; 2:3–6.
23. Ratnikova L.I., Kuz'mina N.Ya. [Cholera case in Chelyabinsk]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases].* 2002; 2:53–4.
24. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Monakhova E.V., Vodop'yanov C.O., Telesmanich N.R., Dudina N.A. [Cholera caused by *V. cholerae* O1 ctxAB-tcpA+]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2007; 1:23–9.
25. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.
26. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic non-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
27. Monakhova E.V., Arkhangel'skaya I.V. [Cholera vibrios of nonO1/nonO139 serogroups in etiology of acute intestinal infections: current situation in Russia and around the world]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2016; (2):14–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-2-14-23.
28. Kругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е., Ежова М.И. [Cholera vibrios in the water bodies 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.
29. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Scherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Actual problems of epidemiological control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
30. Шарова И.Н., Казакова Е.С., Портенко С.А., Красовская Т.Ю., Осина Н.А., Куклев В.Е., Карнаухова И.Г., Щербаклова С.А., Топорков А.В., Чеснокова М.В., Куличенко А.Н., Кутырев В.В. [Improvement and standardization of laboratory diagnostics procedures as concerns particularly dangerous, “emerging”, and “re-emerging” infectious diseases]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2013; (2):46–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2013-2-46-48.
31. Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Mel'nikova A.A. [On measures to improve epidemiological surveillance in terms of indication of pathogens of infectious diseases]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Topical Issues].* 2013; 2:4–13.
32. Ramamurthy T., Das B., Chakraborty S., Mukhopadhyay A.K., Sack D.A. Diagnostic techniques for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1/O139. *Vaccine.* 2020; 38(1):A73–A82. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.07.099.
33. Mironova L.V., Basov E.A., Afanas'ev M.V., Khunkheeva Zh.Yu., Mitkeeva S.K., Ganin V.S., Urbanovich L.Ya., Kulikalova E.S., Gol'dapel E.G., Balakhonov S.V. [MALDI-ToF mass spectrometric analysis with molecular-genetic identification of *Vibrio* spp. in the system of monitoring over vibrioflora of surface water bodies]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases].* 2014; 19(6):27–36. DOI: 10.17816/EID40838.
34. Brenzinger S., van der Aart L.T., van Wezel G.P., Lacroix J.M., Glatter T., Briegel A. Structural and proteomic changes in viable but non-culturable *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2019; 10:793. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00793.
35. Jubair M., Morris J.G. Jr., Ali A. Survival of *Vibrio cholerae* in nutrient-poor environments is associated with a novel “persister” phenotype. *PLoS One.* 2012; 7(9):e45187. DOI: 10.1371/journal.pone.0045187.
36. Conner J.G., Teschler J.K., Jones C.J., Yildiz F.H. Staying alive: *Vibrio cholerae*'s cycle of environmental survival, transmission, and dissemination. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0015-2015.

References

1. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Maslov D.V., Vershkova T.I., Urbanovich L.Ya., Allenov A.V., Murnachev G.P., Garkovenko L.E., Voronok V.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 1. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Vladivostok]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology].* 2000; 5:26–31.
2. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P.,

18. Romanova Yu.M., Alekseeva N.V., Gintsburg A.L. [Non-cultivated state in pathogenic bacteria in the *Salmonella typhimurium* model: phenomenon and genetic control]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1997; 4:35–41.

19. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.

20. Men'shikova E.A., Arkhangel'skaya I.V., Levchenko D.A., Kurbatova E.M., Kruglikov V.D., Titova S.V. [Effect of temperature fluctuations in surface water bodies of the Rostov-on-Don city on the circulation of *Vibrio cholerae*]. [*Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov*]. 2018; 14(4):14–20.

Authors:

Mironova L.V., Ponomareva A.S., Basov E.A., Fedotova I.S., Khunkheeva Zh.Yu., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Миронова Л.В., Пономарева А.С., Басов Е.А., Федотова И.С., Хунхеева Ж.Ю., Fortunatova A.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Urbanovich L.Ya., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.