



**С.О. Водопьянов, М.В. Полеева, Н.Р. Телесманич,
А.С. Водопьянов, В.В. Агафонова**

РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ КУЛЬТУР *VIBRIO CHOLERAЕ NON O1/NON O139*, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ, НА ТЕРРИТОРИИ РЕСПУБЛИКИ УЗБЕКИСТАН С 1987 ПО 1990 ГГ., С ПОМОЩЬЮ ГИС «ХОЛЕРА-ШТАММЫ-VNTR»

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,
лаборатория экологии холеры с ЦПВ
Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru*

Цель: сравнительное изучение VNTR-генотипов различных по токсигенности штаммов *V. cholerae non O1/non O139*, выделенных от людей на территории республики Узбекистан с 1987 по 1990 гг.

Материалы и методы: в работе изучены ctx AB+ и ctx AB- штаммы вибрионов не O1/не O139, выделенные от людей на территории республики Узбекистан.

Результаты: показано, что ctx AB+ штаммы вибрионов не O1/не O139 потомки одного клона. Анализ характера дендрограммы показывает, что эпидпроцесс на территории республики Узбекистан, вызванный *V. cholerae non O1/non O139*, устойчиво протекал длительное время, поскольку между токсигенными штаммами отмечена значительная генетическая дистанция. Полученные результаты свидетельствуют о независимом характере происхождения токсигенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139. Не обнаружено взаимосвязи между VNTR-генотипом и серогруппой.

Заключение: методы VNTR-типирования и серотипирования являются взаимодополняющими и должны быть использованы в комплексе при проведении эпиднадзора за холерой.

Ключевые слова: холерные вибрионы не O1/не O139 серологических групп, VNTR-анализ, локус, генотип.

**S.O. Vodopjanov, M.V. Poleeva, N.R. Telesmanich,
A.S. Vodopjanov, V.V. Agafonova**

RETROSPECTIVE ANALYSIS OF CULTURES *VIBRIO CHOLERAЕ NON-O1, NON-O139*, SECURED FROM PEOPLE, OF REPUBLIC UZBEKISTAN WITH 1987 FOR 1990, BY VNTR-ANALYSIS

*Control plague Research Institute
117 Gorky st., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru*

Materials and methods: in work are studied ctx AB + and ctx AB - strains *Vibrio cholerae non-O1, non-O139*, isolated from people of republic Uzbekistan.

Results: it is shown, that ctx AB + strains *Vibrio cholerae non-O1, non-O139* descendants of one clone. Character analysis dendrogramme shows, that epidemiological process in republic Uzbekistan, *V. cholerae non-O1, non-O139*, steadily proceeded long time as between toxigenic strains the considerable genetical distance is noted. The received results testify to independent character of a parentage toxigenic strains *Vibrio cholerae non-O1, non-O139*. It is not revealed interrelations between a VNTR-genotype and serogrupe.

Summary: VNTR-identification and serotyping methods are complementary and should be used in a complex at carrying out epidemiological process behind a cholera.

Keywords: *Vibrio cholerae non-O1, non-O139*, VNTR-analysis, locus, genotype.



Введение

Появление нового варианта возбудителя холеры – *Vibrio cholerae* O139 – склонного к эпидемическому распространению, открыло новую страницу в истории изучения холерных вибрионов не O1 серологической группы со времён их обнаружения и привлекло внимание к проблеме дальнейшего исследования данной группы микроорганизмов, а также показало существование реальной угрозы образования новых вирулентных для человека холерных вибрионов не O1 серогруппы [1].

Теоретически можно допустить наличие двух возможных путей образования вирулентных вибрионов не O1 серогруппы: из вирулентного вибриона O1 серогруппы за счёт переноса в него генов биосинтеза соответствующего O-антигена (как в случае вибрионов O139 серогруппы, выделенных в 1992-1993 гг. в Юго-Восточной Азии) или из вирулентных вибрионов не O1 серогруппы, обитающих во внешней среде и содержащих неполный набор генов вирулентности за счёт переноса полного набора соответствующих генов [1,2].

В 1987-1990 гг. в Узбекистане регистрировали большое количество случаев возникновения кишечных инфекций у людей, этиологическим агентом которых были холерные

вибрионы не O1/не O139. Большой интерес представляет изучение штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных от людей и имеющих ген холерного токсина – ctx AB.

Наличие локусов варибельных тандемных повторов было положено в основу схемы мультилокусного VNTR-типирования холерного вибриона. Система ГИС «Холера-штаммы-VNTR» была ранее апробирована на модели коллекций штаммов вибрионов O1 и O139, выделенных из различных источников в межэпидемические периоды и в процессе эпидемиологических осложнений [3,4,5].

Закономерно возникает вопрос о возможности использования VNTR-анализа для установления возможности происхождения токсигенных вариантов холерных вибрионов не O1/не O139 путём переноса им кассеты генов ctx AB.

Цель работы: сравнительное изучение VNTR-генотипов токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных от людей на территории республики Узбекистан с 1987 по 1990 гг.

Материалы и методы

Характеристика штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, использованных в работе, представлена в таблице 1.

Таблица 1

Характеристика штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, использованных в работе

№ п/п	Характеристика штаммов	Место и год выделения	Серогруппа	Количество штаммов	
1	ctx+ / tcp+	Узбекистан, 1987 г.	O41	1	24
			O74	3	
			O84	1	
		Узбекистан, 1988 г.	н/о	1	
			Узбекистан, 1990 г.	O9	
		O15		1	
		O28		1	
		O74		4	
		н/о		7	
		Судан, 1999 г., типовой штамм коллекции Саказки	O37	1	
2	ctx- / tcp-	Узбекистан, 1987 г.	не типифицируется	8	8

Ранее данные штаммы были изучены нами по способности ферментации маннита и сорбита, по адгезивным свойствам, по гемолитической и липазной активностям [6]. Штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 хранили в столбиках 0,3% агара Мартена (рН 7,8) под слоем вазелинового масла. Перед проведением опытов штаммы 2-3-кратно пассировали через бульон Мартена (рН

7,8), после чего из суточной агаровой культуры готовили 1 млрд. микробную взвесь по стандарту мутности ОСО ГИСК им. Тарасевича в дистиллированной воде и кипятили на водяной бане в течение 30 минут. Затем центрифугировали при 10000 об/мин в течение 2 минут. Надосадочные жидкости использовали в качестве источника хромосомальной ДНК для постановки ПЦР. Амплифика-



цию ДНК проводили с использованием авторских специфических праймеров к VNTR локусам холерных вибрионов: VcA, VcB, VcI, VcD, VcG. Результаты обрабатывали с помощью стандартного программного обеспечения. Размеры аллелей рассчитывали с использованием авторской программы GEL1.0. и программы Quatity One 4.40, "Bio-Rad". В качестве маркеров молекулярных стандартов использовали ДНК штаммов с известной аллельной формулой [3,4,5].

Кластерный и территориально-пространственный анализ штаммов осуществляли построением дендро-

граммы с учётом полиморфизма аллельного состояния исследованных VNTR-локусов с использованием геоинформационной системы (ГИС) «Холера-штаммы-VNTR», а также открытого программного обеспечения Phylip 3.6 [3,4,5,7].

Результаты

VNTR-анализ позволил протипировать все 32 изученные культуры штаммов *V. cholerae* non O1/non O139, включая изоляты с неустановленным серотипом (таблица 2).

Таблица 2

Генотипы токсигенных и атоксигенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных от людей на территории Узбекистана

№ п/п	VNTR генотип	Серогруппы	Место и время выделения	Количество штаммов
Токсигенные штаммы <i>V. cholerae</i> non O1/non O139 – ctx AB+				
1.	A1	O74, O41, O28, O9, O15, не типизируются	Самаркандская обл., 1987 г.	2
			Джизакская обл., 1990 г.	8
			Ферганская обл, 1990 г.	1
			Самаркандская обл., 1990 г.	3
			Узбекистан, 1988 г.	1
			Хорезмская обл., 1990 г.	1
2.	A2	O74	Самаркандская обл., 1990 г.	1
3.	A3	O9	Джизакская обл., 1990 г.	1
4.	B1	O74	Самаркандская обл., 1987 г.	1
5.	B2	O74	Кашка-Дарьинская обл., 1990 г.	1
6.	D1	O74	Самаркандская обл., 1990 г.	1
7.	D2	не типизируется	Самаркандская обл., 1990 г.	1
8.	D3	O84	Ташкентская обл., 1987 г.	1
9	E	O37	Судан, 1999 г., типовой штамм коллекции Саказаки	1

Установлено, что все нетоксигенные штаммы не обладали локусом VcB, что проявилось в отсутствии полосы специфического амплификата при постановки ПЦР. По результатам кластерного анализа построена дендрограмма VNTR-генотипов (рисунок 1).

Было показано, что в коллекции токсигенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серологических групп, выделенных на территории Узбекистана [7], преобладают потомки одного клона. Формально 24 изученных ctx+ штамма четко подразделились на 4 кластера А, В, D и Е. Типовой штамм из коллекции Саказаки, относя-

щийся к O37 серологической группе с генотипом Е, был выделен на территории Судана в 1999 году. Подавляющее большинство токсигенных культур (16 из 24) относились к мажорному VNTR-генотипу А1. Штаммы данного генотипа циркулировали на территории Узбекистана в течение 1987-1990. Девять оставшихся культур сформировали 9 минорных VNTR-генотипов. Два минорных VNTR-генотипа входили в состав мажорного кластера А, пять оставшихся сформировали три минорных кластера В (генотипы В1 и В2), D (D1 и D2) и Е (типовой штамм).

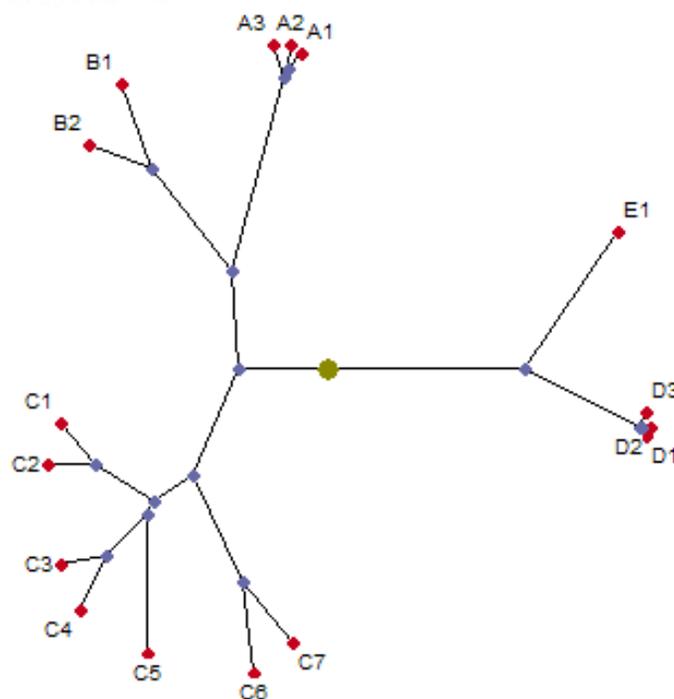


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе распределения аллелей VNTR штаммов *V. cholerae non O1/non O139*, выделенных от людей, на территории республики Узбекистан с 1987 по 1990 гг.

По результатам дендрограммы отмечена четкая дискриминация токсигенных от нетоксигенных вариантов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных в течение 1987 года на территории республики Узбекистан. Восемь нетоксигенных изолятов не содержали локуса VcB и сформировали отдельно расположенный кластер С, представленный семью VNTR-генотипам. При этом для нетоксигенных вариантов было характерно отсутствие клональности, поскольку лишь генотип С1 был представлен двумя штаммами. Отсутствие выраженной клональности было продемонстрировано нами ранее при анализе коллекции нетоксигенных штаммов вибрионов O1, выделенных из объектов внешней среды [3]. Интересной особенностью всех нетоксигенных штаммов явилось отсутствие локуса VcB. Это вызывает некоторое удивление, поскольку в секвенированных геномах вибрионов O1 locus VcB располагается на значительном удалении от гена stx (штаммы MJ-1236 и O395), а в случае штамма *V. cholerae non O1/non O139* 16961 указанные гены вообще локализованы на разных хромосомах.

Обсуждение

Существование среди изученного набора штаммов мажорного VNTR-генотипа A1 указывает на устойчивую циркуляцию потомков данного токсигенного клона в течение трех лет среди населения Узбекистана и свидетельствует о высоком эпидемическом потенциале данного уникального геноварианта. Подобная картина распределения с преобладанием одного мажорного VNTR-генотипа была выявлена нами при анализе штаммов вибрионов O1 серогруппы, выделенных в ходе вспышки в Казани [5].

На основании анализа характера дендрограммы можно предположить, что эпидпроцесс на территории республики Узбекистан, вызванный *V. cholerae non O1/non O139*, устойчиво протекал длительное время, поскольку между токсигенными штаммами отмечена значительная генетическая дистанция.

При сопоставлении результатов серотипирования с распределением аллелей VNTR не обнаружено взаимосвязи между VNTR-генотипом и серогруппой. Напротив, токсигенные штаммы мажорного VNTR-генотипа A1 относились к серовариантам O74, O41, O28, O9, O15 и вариантам с неустановленным серотипом.

Заключение

Полученные результаты, на наш взгляд, свидетельствуют о независимом характере происхождения токсигенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серологических групп. Нетоксигенные варианты представляют собой отдельную популяцию, не связанную происхождением с токсигенными вариантами. Наиболее вероятным событием, объясняющим существование различных сероваров внутри одного VNTR-генотипа, нам представляется перенос кассеты генов, детерминирующих продукцию O-антигена. Подобные предположения на сегодняшний день широко обсуждаются в литературе [1,2]. На наш взгляд необходимы дополнительные исследования для проверки этого предположения.

Кроме того, на основании полученных результатов можно сделать вывод, что методы VNTR-типирования и серотипирования являются взаимодополняющими и должны быть использованы в комплексе при проведении эпиднадзора за холерой.



ЛИТЕРАТУРА

1. Ерошенко Г. А., Куклева Л. М., Шавина Н. Ю. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика и возможное происхождение *Vibrio cholerae* не O1/не O139 с полным и ограниченным набором вирулентности// ЖМЭИ. – 2007. - №5. – с.24-28
2. Ерошенко Г. А. *Vibrio cholerae* O139: генетика и молекулярные механизмы образования возбудителя холеры не O1 серогруппы//Проблемы особо опасных инфекций, Саратов, 2006. – Вып. 92. – с. 15-18
3. Мишанькин Б. Н., Водопьянов А. С., Ломов Ю. М. и др. Вариабельные тандемные повторы (VNTR-анализ) у *Vibrio cholerae* O139, выделенных от людей и из воды поверхностных водоёмов России//ЖМЭИ, - 2003. - №6. – с. 11-15
4. Мишанькин Б. Н., Водопьянов А. С., Ломов Ю. М. и др. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры//Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2004. - №2. – с. 28-33
5. Онищенко Г. Г., Ломов Ю. М., Мишанькин Б. Н. и др. Характеристика холерных вибрионов эльтор, выделенных в г. Казань в 2001 г.//ЖМЭИ. – 2002. - №2. – с. 3-6
6. Акулова М. В., Телесманич Н. Р., Ломов Ю. М. и др. Сравнительная характеристика способности к адгезии холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных от человека и свежесвыделенных из объектов окружающей среды//Здоровье населения и среда обитания. – М, 2010. - № 6 – с.17-19
7. Онищенко Г.Г., Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С. и др. Холерные вибрионы серогрупп не O1, выделенные в Узбекистане в 1987-1990 г.: ретроспективный анализ// Эпидемиология и инфекционные болезни. - 2003. - № 6. - с.25-29

ПОСТУПИЛА: 26.02.2013