

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

УДК 616.932:579:61

Д.А. Левченко, В.Д. Кругликов, И.В. Архангельская, О.А. Якушева, Л.П. Алексеева,  
С.О. Водопьянов, М.И. Ежова, А.К. Носков

### Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

**Цель** исследования – ретроспективный анализ диапазона вариабельности антигенных свойств и генотипических характеристик атипичных по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта. **Материалы и методы.** Изучено 169 атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта с применением тест-системы «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL». Определение O1-антигена осуществляли с помощью набора реагентов «Иг – *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА». **Результаты и обсуждение.** Проведен ретроспективный анализ комплекса фено- и генотипических характеристик штаммов, изолированных в ходе мониторинга за 30-летний период из поверхностных водоемов на территориях трех бывших республик СССР и 13 субъектов Российской Федерации и идентифицированных при выделении как нетоксигенные штаммы *V. cholerae* R-варианта. При повторной идентификации установлено, что штаммы относились как к эпидемически опасным (3,0 %), так и к неопасным (97,0 %). Диапазон изменчивости выразился в их распределении на три группы и заключался в сохранении агглютинабельности только сывороткой холерной RO в первой группе (34,5 % штаммов); утрате этого признака, но приобретении способности агглютинироваться в разных сочетаниях сыворотками O1, Огава или Инаба – во второй (16,7 %); а также в потере агглютинабельности со всеми диагностическими холерными сыворотками – в третьей (48,8 %). Установленное наличие гена *wbeT* у взятого в сравнение штамма *V. cholerae* classical R-варианта не исключает наличия геномной области биосинтеза O1-антигена у других R-штаммов, возможно, в измененной форме, что может быть уточнено в дальнейших молекулярно-генетических исследованиях. В альтернативном случае такие штаммы, по-видимому, могут быть отнесены к *V. cholerae* nonO1/nonO139. Выявлены штаммы *V. cholerae* R-варианта с различным количеством поверхностного антигена (диапазон оптической плотности – от  $0,088 \pm 0,002$  до  $1,226 \pm 0,003$ ). Полученные данные могут использоваться при мониторинге холеры в лабораториях регионального и федерального уровней.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, R-вариант, изменчивость, агглютинабельность, фено- и генотип, мониторинг, объекты окружающей среды.

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

Для цитирования: Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:107–114. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

Поступила 11.09.2020. Отправлена на доработку 30.11.2020. Принята к публ. 15.06.2022.

D.A. Levchenko, V.D. Kruglikov, I.V. Arkhangel'skaya, O.A. Yakusheva, L.P. Alekseeva,  
S.O. Vodop'yanov, M.I. Ezhova, A.K. Noskov

### Assessment of the Variation Range of Agglutinability in *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Course of Monitoring Studies

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

**Abstract.** The aim of the study was to retrospectively analyze the range of variability of antigenic properties and genotypic characteristics of *Vibrio cholerae* R-variant strains atypical in terms of agglutinability. **Materials and methods.** 169 strains of *V. cholerae* R-variant with atypical agglutinability have been studied using the “AmpliSens® *Vibrio cholerae*-FL” test-system. The determination of O1 antigen was carried out using the “Ig-*V. cholerae* O1/O139 – ELISA/dot-ELISA” reagent kit. **Results and discussion.** A retrospective analysis of the complex of pheno- and genotypic characteristics of strains isolated from surface water bodies in the territories of three former Soviet republics and 13 constituent entities of the Russian Federation in the course of 30-year monitoring and identified upon isolation as non-toxicogenic *V. cholerae* R-variant strains has been performed. Upon re-identification, it was found that the strains belong to both epidemically dangerous (3.0 %) and non-dangerous strains (97.0 %). The range of variability was expressed in their distribution into three groups and consisted in retaining of agglutinability only with cholera RO serum in the first group (34.5 % of strains); the loss of this trait, but the acquisition of the ability to agglutinate in different combinations with O1, Ogawa or Inaba sera – in the second (16.7 %); and also in the loss of agglutinability with all diagnostic cholera sera – in the third (48.8 %). The presence of the *wbeT* gene in the compared *V. cholerae* classical R-variant strain does not exclude the presence of the genomic region for O1 antigen biosynthesis in other R-strains, possibly in a modified form, which can be clarified in further molecular-genetic studies. Alternatively, such strains are likely to be attributed to *V. cholerae* nonO1/nonO139. Strains of *V. cholerae* R-variant with different amounts of surface antigen (optical density range – from  $0.088 \pm 0.002$  to  $1.226 \pm 0.003$ ) have been identified. The data obtained can be used for monitoring of cholera in laboratories of regional and federal levels.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, R-variant, variability, agglutinability, phenotype and genotype, monitoring, 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., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. Assessment of the Variation Range of Agglutinability in *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Course of Monitoring Studies. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:107–114. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114

*Received* 11.09.2020. *Revised* 30.11.2020. *Accepted* 15.06.2022.

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>  
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>  
Arkhangel'skaya I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7569-8584>  
Yakusheva O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8159-7547>

Alekseeva L.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9866-3579>  
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>  
Ezhova M.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4254-3313>  
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Главной задачей мониторинговых исследований на холеру, как известно, является выявление в объектах окружающей среды (ООС) штаммов холерных вибрионов серогрупп O1, O139 и определение их эпидемической опасности. Идентификация, проводимая с помощью реакции агглютинации холерными диагностическими серогрупповыми и серовар-специфическими сыворотками (O1, O139, Огава, Инаба и RO), в большинстве случаев позволяет достаточно легко дифференцировать представителей O1-серогруппы от штаммов O139 и nonO1/nonO139 (МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры»). Вместе с тем встречаются отдельные штаммы, не агглютинирующиеся перечисленными сыворотками, кроме RO, и определение их истинной серогрупповой принадлежности вызывает определенные затруднения. Такие штаммы, обозначаемые как R-варианты, обычно практически не отличаются от других холерных вибрионов по морфологии колоний, культуральным и биохимическим свойствам; различия касаются только агглютинабельности серогрупповыми и сероварспецифическими сыворотками. Для более точной дифференциации необходима ПЦР-детекция генов *wbeT* и *wbfR*, строго специфичных для представителей соответствующих серогрупп, которая проводится наряду с выявлением гена А-субъединицы холерного токсина (*ctxA*) и структурной единицы токсин-корегулируемых пилей (*tcpA*), что позволяет определить наличие/отсутствие эпидемической опасности. Зарубежными исследователями установлено, что некоторые R-варианты, выделенные от больных холерой в Индии и Бангладеш, не только содержали гены *ctxA* и *tcpA*, но также продуцировали холерный токсин (СТ) *in vitro* в таких же, а иногда даже в больших количествах по сравнению с типичными (S-варианты) *Vibrio cholerae* [1–3]. Они также не уступали S-вариантам в способности к токсинопродукции и адгезивной активности в экспериментах *in vivo* [3]. В их геномах были выявлены детерминанты *wbe*-O1 (у одного – *wbf*-O139), однако соответствующими сыворотками они не агглютинировались, проявляя специфичность только к RO-сыворотке [1, 2]. Таким образом, токсигенные R-варианты могут представлять эпидемическую опасность, в связи с чем их надежная идентификация крайне актуальна.

Данные микробиологического мониторинга холеры за последние три десятилетия свидетельствуют об обнаружении в клиническом материале и в основном в пробах из объектов окружающей среды на территориях бывшего СССР и субъектов

Российской Федерации штаммов холерных вибрионов, атипичных по признаку агглютинабельности [4, 5]. В результате идентификации (после выделения) установлено, что указанные штаммы типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, но агглютинировались в диагностических титрах только диагностической сывороткой холерной RO, на основании чего были отнесены к *V. cholerae* RO. При использовании методов, актуальных на время проведения их идентификации, эти штаммы охарактеризованы как эпидемически неопасные (нетоксигенные). В большинстве случаев их принадлежность к O1-серогруппе методом ПЦР не определена (МР 01-19/55-17 «Методические рекомендации по мониторингу окружающей среды за контаминацией холерными вибрионами на территории Российской Федерации», 1995). Атипичность штаммов *V. cholerae* O1 по признаку агглютинабельности объяснялась процессами адаптации к воздействию неблагоприятных условий окружающей среды, приводящих к формированию новых антигенных вариантов за счет изменения боковых цепей липополисахарида (ЛПС), отвечающих за серологическую специфичность штаммов *V. cholerae*, а также утратой сахаров, характерных для S-форм холерного вибриона, и другими причинами, связанными с потерей O-специфичности [6].

И.Я. Черепahiной с соавт. [5] установлено наличие двух вариантов штаммов среди холерных вибрионов RO: R и SR. Так, штаммы *V. cholerae* O1, агглютинирующиеся только диагностической холерной сывороткой RO, отнесены к R-варианту, а к SR-варианту – штаммы, характеризующиеся способностью агглютинироваться в разных сочетаниях диагностическими сыворотками холерными, в том числе и RO. Необходимо отметить, что в данном случае речь идет об R-вариантах (от англ. *rough* – шероховатые), а не о ругозных (от англ. *rugose* – морщинистые, складчатые), существенно отличающихся от типичных по морфологии колоний [3, 7]. Они не растут на питательных средах, используемых при проведении лабораторной диагностики холеры, вследствие чего не являются актуальными при мониторинговых исследованиях [8]. Вместе с тем при длительном хранении в лиофильно высушенном состоянии не исключена возможность сероконверсии и/или утраты агглютинабельности диагностическими сыворотками холерными из-за остановки метаболических процессов в клетках микроорганизмов, что снижает их защищенность от окислительных реакций [9].

Представляется актуальным уточнение изначального определения таксономической принадлежности и эпидемической опасности штаммов, идентифицированных при выделении как *V. cholerae* R-варианта. То есть, наряду с выявлением способности агглютинироваться только сывороткой RO в диагностическом титре, важно определить наличие/отсутствие генов *ctxA*, *tcpA*, *wbe-O1* и *wbf-O139*. Обнаружение ампликона *wbe-O1* дает возможность выдачи ответа о наличии/отсутствии принадлежности штаммов *V. cholerae* R-варианта к атипичным по агглютинабельности штаммам O1-серогруппы. В связи с этим для дальнейшего совершенствования диагностики представляется целесообразным повторное комплексное изучение музейных штаммов *V. cholerae* R-варианта по фено- и генотипическим признакам.

**Целью** настоящего исследования является ретроспективный анализ диапазона варибельности антигенных свойств и генотипических характеристик атипичных по агглютинабельности штаммов *V. cholerae* R-варианта.

### Материалы и методы

В работе использованы 169 атипичных по агглютинабельности штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* R-варианта, из которых 168 штаммов, выделенных из ООС на территориях бывшего СССР и субъектов РФ, ранее были отнесены к эпидемически неопасным (нетоксигенным) и один эпидемически опасный штамм *V. cholerae* R-варианта (№ 16197/1), выделенный от больного в Калькутте (Индия) [10].

Все штаммы с момента поступления и идентификации хранились в лиофильно высушенном состоянии в музее живых культур Ростовского-на-Дону противочумного института.

Определение биологических свойств штаммов *V. cholerae* проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры». При проведении ПЦР-анализа использовали набор реагентов для выявления ДНК *V. cholerae* и идентификации патогенных штаммов *V. cholerae* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL» в соответствии с инструкцией.

Для детекции O1-антигена методом твердофазного иммуноферментного анализа (ТИФА) применяли набор реагентов «Иммуноглобулины моноклональные диагностические, меченные пероксидазой хрена, сухие для серологической идентификации *V. cholerae* O1 и O139 (*in vitro*) методом ТИФА и дот-ИФА» («Иг – *V. cholerae* O1/O139 – ИФА/дот-ИФА») согласно прилагаемой инструкции [11]. Оптическую плотность (ОП) измеряли на спектрофотометре BioTekEL\*800 (BioTekInstruments, США) при длине волны 450 нм (референс-волна – 630 нм).

Серологическую идентификацию холерных вибрионов серогрупп nonO1/nonO139 проводили диа-

гностическими кроличьими моноспецифическими сыворотками против типовых штаммов холерных вибрионов серогрупп O2–O83 в реакции слайд-агглютинации (МУК 4.2.2218-07). При анализе результатов использованы параметрические статистические методы ( $P < 0,05$ ) [12]. Все исследования проводили в трех повторностях.

### Результаты и обсуждение

Проведен анализ данных паспортов на взятые в исследование штаммы, которые выделены из ООС на территориях бывшего СССР и субъектов РФ в ходе микробиологического мониторинга за период 1988–2019 гг. В результате установлено, что из 168 штаммов, идентифицированных как *V. cholerae* R-варианта, большинство изолировано на территории бывшей Казахской ССР и в Приморском крае РФ.

На первом этапе, по результатам проведенных нами ретроспективных исследований, штаммы, первично идентифицированные как нетоксигенные *V. cholerae* R-варианта, распределены на три группы по критериям агглютинабельности диагностическими холерными сыворотками в диагностическом титре, по эпидемической опасности (наличие/отсутствие генов *ctxA* и *tcpA*) и серогрупповой принадлежности (детекция генов *wbeT* и *wbfR*), что представлено в табл. 1.

К первой группе (R) отнесены 34,5 % штаммов *V. cholerae* от общего числа изучаемых культур. Эта группа, названная нами «консервативная» и обозначенная как R-вариант, включала штаммы, которые агглютинируются только диагностической сывороткой холерной RO от 1/2 диагностического титра и у которых отсутствовал ген *wbeT*. Генотип:  $hly^+ctxA^-tcpA^-wbeT^-wbfR^-$ .

Вторая группа (SR-варианты), условно обозначенная как «гетерогенная», состояла из 16,7 % штаммов и представлена как токсигенными *V. cholerae* O1, так и нетоксигенными. Штаммы агглютинировались серогрупповой (O1) и сероварспецифическими (Огава или Инаба) диагностическими холерными сыворотками в диагностических титрах в различных сочетаниях, содержали ген *wbeT* и имели разные генотипы:  $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$ ;  $hly^+ctxA^-tcpA^+wbeT^+wbfR^-$ ;  $hly^+ctxA^-tcpA^-wbeT^+wbfR^-$ . Эпидемически опасные штаммы холерных вибрионов с генотипом  $hly^+ctxA^+tcpA^+wbeT^+wbfR^-$  выделены на территории бывшего СССР (Казахская ССР, 1988 г. – три штамма). Третья группа штаммов, условно названная «не агглютинирующаяся», оказалась самой многочисленной, включала 48,8 % нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, которые не агглютинировались диагностическими сыворотками холерными, в том числе RO, и поэтому были отнесены к группе штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 с генотипом  $hly^+ctxA^-tcpA^-wbeT^-wbfR^-$ . Таким образом, полученные результаты привели к уменьшению количества территорий, на которых из ООС выде-

Таблица 1 / Table 1

## Характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных из ООС, по биологическим признакам

Biological characteristics of *Vibrio cholerae* strains isolated from environmental objects

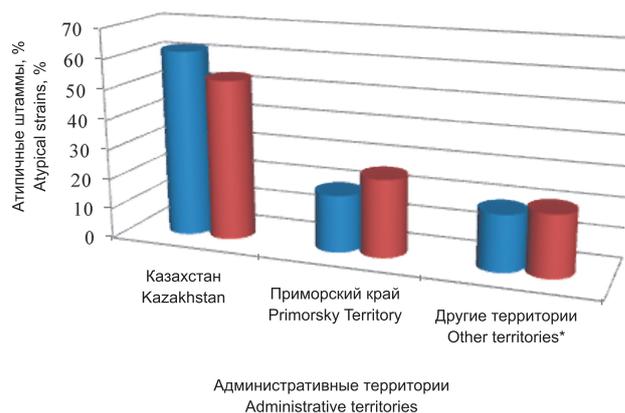
Наименование признака The name of the feature	R-вариант R-variant	SR-вариант SR-variant	nonO1/nonO139
Агглютинабельность диагностическими холерными сыворотками Agglutinability with diagnostic cholera sera			
Сыворотка RO в диагностическом титре RO serum in the diagnostic titer	+	–	–
Сыворотками O1, Огава или Инаба O1, Ogawa and Inaba sera	–	+/-	–
Генотипическая характеристика Genotypic characteristics			
<i>hly</i>	+	+	+
<i>ctxA</i>	–	+/-	–
<i>tcpA</i>	–	+/-	–
<i>wbeT</i>	–	+	–
<i>wbfR</i>	–	–	–
Количество штаммов Number of strains	58	28	82
<i>Итого</i> <i>Total</i>	168		

лялись штаммы *V. cholerae* R-варианта, и удельного веса атипичных штаммов (в %) от общего количества (58 штаммов) за период с 1988 по 2019 год (рисунок).

Для более наглядной характеристики диапазона изменчивости по агглютинабельности, эпидемической опасности и особенностей генотипов произведена случайная выборка из 11 штаммов *V. cholerae*, куда вошли штаммы из трех вышеописанных групп (табл. 2). Для сравнения дополнительно взят эпидемически опасный R-вариант штамма *V. cholerae classical* (№ СА 385), выделенный от больного в Калькутте (Индия).

В результате проведенных исследований установлено (табл. 2), что четыре штамма, идентифицированные при поступлении как нетоксигенные *V. cholerae* R-варианты, при повторной идентификации отнесены к SR-вариантам. У трех из них установлена эпидемическая опасность (*hly<sup>+</sup>ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>wbeT<sup>+</sup>wbfR<sup>-</sup>*). У одного нетоксигенного штамма выявлено наличие токсин-корегулируемых пилей адгезии (*hly<sup>+</sup>ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>+</sup>wbeT<sup>+</sup>wbfR<sup>-</sup>*). Шесть других штаммов сохранили агглютинабельность только RO-сывороткой, имели генотип *hly<sup>+</sup>ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>wbeT<sup>-</sup>wbfR<sup>-</sup>*, в то время как штамм *V. cholerae classical* R-варианта имел генотип *hly<sup>+</sup>ctxA<sup>+</sup>tcpA<sup>+</sup>wbeT<sup>+</sup>wbfR<sup>-</sup>*. Штамм № 548 отнесен к *V. cholerae nonO1/nonO139*, так как не агглютинировался диагностическими сыворотками холерными, в том числе RO, и имел генотип *hly<sup>+</sup>ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>wbeT<sup>-</sup>wbfR<sup>-</sup>*.

Полученные данные свидетельствуют о целесообразности представления в последующих исследованиях данных комплексного анализа геномов разных групп штаммов.



Удельный вес выделенных из ООС на различных административных территориях штаммов холерных вибрионов R-варианта (%) за период с 1988 по 2019 год:

■ – процент от общего числа выделенных атипичных по агглютинабельности штаммов за изучаемый временной период (исходная идентификация); ■ – процент от общего числа выделенных штаммов холерных вибрионов R-варианта за изучаемый временной период после повторной идентификации; \* – Каракалпакия, Таджикистан, Республика Калмыкия, Крым, Амурская, Иркутская, Ленинградская, Московская, Новосибирская, Ростовская, Рязанская области, Забайкальский, Краснодарский, Хабаровский края

The proportion of environmental R-variant *Vibrio cholerae* strains isolated in different administrative territories (%) over the period between 1988 and 2019:

■ – percent of the total number of strains with atypical agglutinability isolated during the studied time period (initial identification); ■ – percent of the total number of strains of *Vibrio cholerae* R-variant isolated during the studied time period (after re-identification); \* – Karakalpakstan, Tajikistan, Republic of Kalmykia, Crimea, Amur, Irkutsk, Leningrad, Moscow, Novosibirsk, Rostov, Ryazan Regions, Transbaikal, Krasnodar, Khabarovsk Territories

Диапазон изменчивости поверхностной антигенной структуры выборки атипичных штаммов холерных вибрионов охарактеризован в ТИФА с использованием моноклональных антител (МКА) к ЛПС O1 (табл. 3).

Таблица 2 / Table 2

Характеристика выборки штаммов холерных вибрионов  
Characteristics of selected *Vibrio cholerae* strains

№ штамма Strain No.	Год выделения Year of isolation	Административная территория Administrative territory	Агглютинабельность холерными сыворотками Agglutinability with cholera sera										Генетическая характеристика Genetic characteristics			Группы штаммов Groups of <i>V. cholerae</i> strains	
			O1		Oгава Ogawa		Инаба Inaba		RO		ctxA	tcpA	wbeT				
			1	2	1	2	1	2	1	2							
1317	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	-	1/1600	1/100	1/400	-	-	1/400	-	2	2	2	2	2	2	
1375	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	-	1/800	1/100	1/400	-	-	1/800	-	+	+	+	+	+	+	SR
1606	1988	Казахская ССР (вода) The Kazakh SSR (water)	1/100	1/1600	1/100	1/800	-	-	1/400	-	+	-	+	+	+		
77	1994	Новосибирская обл. (вода) The Novosibirsk Region (water)	1/2000	1/1600	1/1600	-	-	-	1/800	-	-	-	+	+	+		
73-RO	1991	Приморский край (вода) Primorsky Territory (water)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/800	-	-	-	-	-		
155	1994	Новосибирская обл. (вода) Novosibirsk Region (water)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/400	-	-	-	-	-		
227	1999	Ленинградская обл. (вода) Leningrad Region (water)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/400	-	-	-	-	-		
104	2002	Новосибирская обл. (вода) Novosibirsk Region (water)	-	-	-	-	-	-	1/1600	1/800	-	-	-	-	-		R
120	2017	Ростовская обл. (вода) Rostov Region (water)	-	-	-	-	-	-	1/400	1/400	-	-	-	-	-		
1-19	2019	Иркутская обл. (вода) Irkutsk Region (water)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/800	-	-	-	-	-		
CA 385	1953	Калькутта (Индия) (больной) Calcutta (India) (patient)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/800	-	+	+	+	+		
548	2007	Краснодарский край (вода) Krasnodar Territory (water)	-	-	-	-	-	-	1/800	1/800	-	-	-	-	-		nonO1/nonO139

Примечание: 1 – данные по паспорту; 2 – результаты повторной идентификации; ген *wb/r* отсутствовал у всех штаммов; все штаммы имели ген *hly*.  
Note: 1 – the data contained in the certificate; 2 – results of re-identification; *wb/r* gene was absent in all strains; all strains had the *hly* gene.

При анализе результатов изучения выборки штаммов холерных вибрионов, представленной семью штаммами *V. cholerae* R-варианта, четырьмя – SR-варианта и одним – *V. cholerae* nonO1/nonO139, выявлено, что значения ОП в ТИФА с МКА к ЛПС O1 варьировали от значений  $K^-$  до  $K^+$ . Так, штаммы холерных вибрионов, отнесенные к SR-варианту, в ТИФА имели различную антигенную характеристику. Интерес вызвал штамм *V. cholerae* O1 № 1317 (ОП=0,128±0,002), который не вступал во взаимодействие с МКА к ЛПС O1, но агглютинировался холерной диагностической сывороткой O1 в титре 1/1600 и имел ген *wbeT*. Полученные результаты свидетельствовали о возможном изменении или повреждении структурных компонентов поверхностного антигена вышеуказанных штаммов. Остальные культуры холерных вибрионов (SR) имели различную ОП – от (0,674±0,002) до (1,28±0,01) нм, что подтверждало, наряду с наличием гена *wbeT* и агглютинабельности холерными диагностическими сыворотками (O1, Огава, Инаба), их принадлежность к O1-серогруппе. Штаммы из ООС, идентифицированные как *V. cholerae* R-варианта (№ 73-RO, 155, 227, 104, 120 и 1-19), не взаимодействовали с МКА к ЛПС O1, имели ОП от (0,069±0,01) до (0,197±0,014) нм и не содержали ген *wbeT*. Однако у штамма *V. cholerae classical* R-варианта № СА 385, изолированного от человека, при сравнимом значении ОП (0,197±0,014) определялся ген *wbeT*. Возможно, отрицательный результат по детекции гена *wbeT* у штаммов из ООС был получен вследствие наличия изменений в генети-

ческой детерминированности признака принадлежности к O1-серогруппе, что требует проведения полной характеристики и анализа структуры набора генов биосинтеза O1-антигена. У штамма № 548 отмечалось низкое значение ОП, что дополнительно подтвердило его принадлежность к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

По результатам типирования диагностическими кроличьими моноспецифическими сыворотками против типовых штаммов холерных вибрионов серогрупп O2–O83, штамм № 548 отнесен к O35-серогруппе. В то же время штаммы № 227 и O104, отнесенные к R-группе, агглютинировались сыворотками O76 и O30 соответственно. Данный факт свидетельствовал о возможности их принадлежности к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Таким образом, представляется важным изучение комплекса фено- и генотипических характеристик штаммов *V. cholerae* R-варианта, выделенных в ходе мониторинга за последние 30 лет из ООС на территориях трех бывших республик СССР и 13 субъектов РФ, в связи с затруднением определения их принадлежности к атипичным по агглютинабельности штаммам *V. cholerae* O1 при отсутствии детекции участков кластера *wbe*-O1; с необходимостью установления эпидемической опасности с использованием современного метода ПЦР-диагностики; с возможными изменениями серологических характеристик в результате длительного хранения в лиофильно высушенном состоянии.

Так, проведенное сравнительное изучение вариабельности биологических свойств позволило разделить 168 исследуемых штаммов, обнаруженных в ООС, на три группы и выявить различия между ними по ряду свойств, таких как агглютинабельность холерными серогрупповой (O1) и сероварспецифическими (Огава или Инаба) диагностическими холерными сыворотками. Результаты анализа собственных и литературных данных указывают на приоритетность данных ПЦР при решении вопроса о серогрупповой принадлежности R-вариантов холерных вибрионов O1 (по наличию амплификации мишени *wbeT*) и O139 (*wbfR*). При этом диапазон изменчивости штаммов, определенных при выделении как *V. cholerae* R-варианта, заключался в том, что первая группа штаммов («консервативная – R») сохранила агглютинабельность только диагностической сывороткой холерной RO, в то время как вторая («гетерогенная – SR») – утратила этот признак, но приобрела способность агглютинироваться в разных сочетаниях сыворотками диагностическими холерными O1, Огава или Инаба; а третья («не агглютинирующая – nonO1/nonO139») – потеряла агглютинабельность со всеми сыворотками, и штаммы этой группы определены как *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Установление наличия гена *wbeT* у взятого в сравнение штамма *V. cholerae classical* R-варианта, выделенного от человека, не исключает полностью того, что геномная область биосинтеза O1-антигена

Таблица 3 / Table 3

Характеристика поверхностных антигенов выборки атипичных по признаку агглютинабельности штаммов холерных вибрионов методом ТИФА

Characteristics of surface antigens in the selected *Vibrio cholerae* strains with atypical agglutinability using ELISA

№ штамма Strain No.	Оптическая плотность, нм Optical density, nm
1317	0,128±0,002
1375	0,958±0,005
1606	1,226±0,003
77	1,28±0,01
73-RO	0,102±0,002
155	0,128±0,002
227	0,088±0,002
104	0,099±0,002
120	0,069±0,01
1-19	0,111±0,007
СА 385	0,197±0,014
548	0,181±0,004
$K^+$	1,298±0,006
$K^-$	0,094±0,003

Примечание:  $K^+$  – положительный контроль;  $K^-$  – отрицательный контроль.

Note:  $K^+$  – positive control;  $K^-$  – negative control.

имеется и у других «консервативных» R-штаммов, возможно, в измененной форме, что может быть предметом дальнейших молекулярно-генетических исследований по полной характеристике и анализу структуры набора генов, детерминирующих биосинтез O-антигена. В альтернативном случае штаммы с генотипом *hly<sup>+</sup>ctxA<sup>-</sup>tcpA<sup>-</sup>wbeT<sup>-</sup>wbfR<sup>-</sup>*, по-видимому, могут быть отнесены к *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Анализируя результаты Blast-поиска детерминант *wbe*-O1, следует отметить, что на сегодняшний день в литературе имеется всего одно сообщение об обнаружении специфичного для O1 гена *wbeN* у клинического токсигенного штамма, выделенного в Бразилии во время вспышки холеры и отнесенного к O26-серогруппе [13]. Второй такой же штамм, отнесенный к серогруппе nonO1/nonO139, не типировался и, по-видимому, представлял типичный R-вариант O1, на что указывали и результаты анализа сиквенсов межгенных участков 16S–23S рРНК. Штамм O26-серогруппы также был близок *V. cholerae* O1 и отличался от других (*wbe*-O1-негативных) штаммов O26. Возможно, что гены, определяющие O26-серотип, приобретены штаммом O1 путем генетического обмена (если здесь не имела место неспецифическая перекрестная реакция), во всяком случае, примеры серогрупповой конверсии за счет процессов трансформации либо конъюгативного переноса участков генома, кодирующих синтез O-антигена, известны и описаны в литературе [14, 15].

Анализ поверхностных структур ЛПС O1 штаммов *V. cholerae* позволил выявить штаммы с измененными (или поврежденными) структурами поверхностного антигена в диапазоне оптической плотности от (0,088±0,002) до (1,226±0,003) нм. В связи с этим мы считаем целесообразным применение в лабораторной диагностике холеры дополнительного иммунодиагностического метода (ТИФА с МКА), что имеет значение для дифференциации *V. cholerae* O1 R-варианта и *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Полученные данные могут способствовать интерпретации результатов мониторинговых исследований на холеру в лабораториях регионального и федерального уровней.

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

**Список литературы**

1. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
2. De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
3. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., Sack R.B. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4):229–35. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x.
4. Исаев Н.Д., Лозовский Ю.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Популяционная неоднородность природных штаммов *Vibrio*

*cholerae* классического биовара: координированное изменение морфологии колоний, подвижности, токсигенности и ферментативных свойств. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2005; 1:43–6.

5. Черепяхина И.Я., Балахнова В.В., Подосинникова Л.С., Огнева Н.С., Сорокин В.М., Прозорова Л.А., Фецайлова О.П., Чиркова О.О. Современные подходы к изучению антигенной variability холерных вибрионов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 1996; 4:85–6.

6. Hisatsune K., Yamamoto T., Kondo S. Lypopolysaccharide of *Vibrio cholerae*: chemical and serological properties. In: Kuwahara S., Pierce N.F., editors. *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas.* Tokyo; 1985. P. 17–24.

7. Chowdhury G., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., Nagamani K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10):1130–6. DOI: 10.1099/jmm.0.000344.

8. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2010; 3:13–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.

9. Грачева И.В., Осин А.В. Механизмы повреждений бактерий при лиофилизации и протективное действие защитных сред. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 3:5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

10. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

11. Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Кретенчук О.Ф., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Бурша О.С. Иммуноферментные методы анализа в диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

12. Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. Л.: Медгиз; 1962. 180 с.

13. Cariri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.

14. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.

15. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.

**References**

1. Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
2. De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
3. Islam M.S., Ahsan S., Khan S.I., Ahmed Q.S., Rashid M.H., Islam K.M.N., Sack R.B. Virulence properties of rough and smooth strains of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol. Immunol.* 2004; 48(4):229–35. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2004.tb03518.x.
4. Isaev N.D., Lozovsky Yu.V., Zаднова S.P., Smirnova N.I. [Population heterogeneity of natural *Vibrio cholerae* strains, classical biovar: coordinated changes in colony morphology, motility, toxigenicity and enzymatic properties]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2005; (1):43–6.
5. Cherepakina I.Ya., Balakhnova V.V., Podosinnikova L.S., Oгнева N.S., Sorokin V.M., Prozorova L.A., Fetseylova O.P., Chirkova O.O. Modern approaches to the study of antigenic variability of cholera vibrios. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1996; (4):85–6.
6. Hisatsune K., Yamamoto T., Kondo S. Lypopolysaccharide of *Vibrio cholerae*: chemical and serological properties. In: Kuwahara S., Pierce N.F., editors. *Advances in Research on Cholera and Related Diarrheas.* Tokyo; 1985. P. 17–24.
7. Chowdhury G., Bhadra R.K., Bag S., Pazhani G.P., Das B., Basu P., Nagamani K., Nandy R.K., Mukhopadhyay A.K.,

Ramamurthy T. Rugose atypical *Vibrio cholerae* O1 El Tor responsible for 2009 cholera outbreak in India. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(10):1130–6. DOI: 10.1099/jmm.0.000344.

8. Zadnova S.P., Smirnova N.I. [The role of extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; (3):13–719. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.

9. Gracheva I.V., Osin A.V. [Mechanisms of damaging bacteria during lyophilization and protective activity of shielding media]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2016; (3):5–12. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-3-5-12.

10. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Titova S.V., Arkhangel'skaya I.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I. [GIS: capabilities of data analysis of phenot- and genotyping of El Tor O1 serogroup cholera vibrios isolated from aquatic objects of the environment in the Russian Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; (6):19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

11. Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Kretenchuk O.F., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Bursha O.S. [The immune-enzyme techniques of analysis in the diagnostics of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2016; 61(5):303–7. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-5-303-307.

12. Ashmarin I.P., Vorob'ev A.A. [Statistical Methods in Microbiological Research]. Leningrad; 1962. 180 p.

13. Cariri F.A., Costa A.P., Melo C.C., Theophilo G.N., Hofer E., de Melo Neto O.P., Leal N.C. Characterization of potentially virulent non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strains isolated from human patients. *Clin. Microbiol. Infect.* 2010; 16(1):62–7. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2009.02763.x.

14. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.

15. Smirnova N.I., Zhuravlyova E.A., Livanova L.F., Shopyreva S.V. Construction and characterization of recombinant *Vibrio cholerae* strains carrying heterologous genes encoding non-O1 antigen or cholera enterotoxin. *Microb. Pathog.* 1995; 19(2):65–72. DOI: 10.1006/mpat.1995.0046.

#### Authors:

Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

#### Об авторах:

Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.