На правах рукописи

Архангельская Ирина Викторовна

ХАРАКТЕРИСТИКА *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ И РЕСПУБЛИКЕ КАЛМЫКИЯ

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Ростов-на-Дону – 2019 г.

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Монахова Елена Владимировна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник

Официальные оппоненты: **Савельев Вилорий Николаевич**, доктор медицинских наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующий лабораторией холеры и других кишечных инфекций

Куклева Любовь Михайловна, кандидат биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной микробиологии

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится **«3» октября 2019 г.** в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте http://www.microbe.ru/disser/dissert Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «____»_____2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп (НАГ-вибрионы) широко распространены в природе и известны как возбудители острых кишечных инфекций (ОКИ) различной степени тяжести – от слабой и умеренной диареи до алгидных форм с летальным исходом (Finch et al., 1987; Dalsgaard et al., 1995; Singh et al., 2001; Bidinost et al., 2004; Luo et al. 2013 и др.). Практически по всему миру постоянно регистрируются спорадические случаи, обусловленные этими возбудителями – «местные» либо завозные (Ramamurthy et al., 1993; Kamble et al., 2000; Pourshafie et al., 2002; Khazaei et al., 2005; Theophilo et al., 2006; Chatterjee et al., 2009; González et al., 2009; Ranjbar et al., 2010; Dutta et al., 2013 и др.); реже встречаются сообщения о вспышках (Bagchi et al., 1993; Dalsgaard et al., 1999; Onifade et al., 2011; Luo et al., 2013).

В России и бывших республиках СССР большинство вспышек, вызванных *V.cholerae* nonO1/nonO139, было зарегистрировано в прошлом столетии (Онищенко с соавт., 2001), затем число сообщений о них значительно снизилось. Тем не менее, они продолжают регистрироваться в виде спорадических случаев. С 1968 по 1999 гг. ОКИ, вызванные НАГ-вибрионами, неоднократно регистрировались на территории Ростовской области, в Музее живых культур с Центром патогенных вибрионов сохранились 97 штаммов, выделенных от больных и носителей. Начиная с 2000 г. клинические штаммы регулярно поступают в Референс-центр из диагностических лабораторий Ростовской области, а также имеющей с ней протяженную границу республики Калмыкия. Родственные связи между возбудителями прежних вспышек и нынешних спорадических, в т.ч. множественных, случаев на момент начала наших исследований не были изучены; неясными оставались и причины их столь длительной циркуляции в данных регионах. С одной стороны, возможно, что они длительно сохраняются в объектах окружающей среды (ООС) либо в организме бессимптомных носителей, с другой – существует вероятность их периодических заносов с других территорий за счет миграции людей, фито- и зоопланктона, позвоночных и беспозвоночных гидробионтов, водоплавающих птиц (Senderovich et al., 2010; Lutz et al., 2013), а также с инфицированными пищевыми продуктами из гидробионтов (Onifade et al., 2011; Taylor, 2013; Preeprem et al., 2014 и др.). Учитывая, что НАГ-вибрионы являются постоянными обитателями поверхностных водоемов, представляется актуальным сравнение фенотипических и генотипических свойств культур, выделенных от больных и на этой же территории из ООС, с целью установления наиболее вероятного происхождения, источников и путей распространения инфекции, патогенетического и персистентного потенциала.

Степень разработанности темы исследования. Известно, что НАГ-вибрионы представляют собой генетически гетерогенную группу возбудителей. В геномах разных штаммов выявляются различные сочетания детерминант факторов патогенности, жизнеобеспечения, антибиотикорезистентности (Ерошенко с соавт., 2006; 2007; Фадеева, 2012; Dalsgaard. et al., 1995; Octavia et al., 2013). Подавляющее большинство авторов сходятся во мнении о том, что они служат природными резервуарами генов, которые могут передавать другим холерным вибрионам (Chatterjee et al., 2009; Hasan et al., 2013; Li et al., 2014 и др.). Отсюда вытекает опасность формирования новых клонов с повышенным патогенетическим потенциалом, последствия распространения которых непредсказуемы. Для отдельных штаммов установлена структура и биологическая активность ряда факторов, таких как

цитотоксин MARTX (Dolores, Sachell, 2013), контакт-зависимые системы секреции T3SS (Dzeijman et al., 2005; Shin et al., 2011) и T6SS (Pukatzki, Provenzano, 2013), MSHA-подобные пили адгезии Vcf (Kuroki et al., 2001), нейраминидаза (Eneva et al., 2001), однако сравнительный анализ большого числа штаммов из одного региона (Индия) проводился только для Cholix-токсина (Awasthi et al., 2013). Во многих работах отмечено нарастание с течением времени числа антибиотикорезистентных штаммов НАГ-вибрионов, как клинических, так и выделенных из ООС на территориях разных стран (Tjaniadi et al., 2003; Chandrasekhar et al., 2008; Dutta et al., 2013 и др.), что также может быть связано с горизонтальной передачей детерминант резистентности, локализованных на мобильных элементах (Laviad-Shitrit et al., 2018). Для прогнозирования и предотвращения заболеваемости, а также эффективного выбора средств этиотропной терапии необходимо знать фено- и генотипические особенности НАГ-вибрионов, циркулирующих на конкретных территориях. В то время как зарубежные авторы проводят такие исследования, отечественные в основном используют выборки, включающие по несколько штаммов из разных регионов, что не позволяет составить полное представление о той или иной популяции. Как отмечено выше, для нас наибольший интерес представляют Ростовская область и Калмыкия, поскольку случаи ОКИ, вызванных данными микроорганизмами, регистрируются здесь почти ежегодно, тогда как из других областей Российской Федерации единичные клинические штаммы поступают в ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора довольно редко. Биологические свойства и структура геномов многочисленных штаммов – этиологических агентов ОКИ на указанных территориях практически не изучены, разрозненные данные не систематизированы, что затрудняет установление источников заражения и происхождения возбудителей. Следует отметить, что совокупный набор генов популяции может обогащаться за счет заносов новых штаммов из других регионов, что служит еще одним аргументом в пользу актуальности генотипических исследований.

Цель работы: комплексное изучение биологических свойств и особенностей структуры генома *V.cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области и республике Калмыкия.

Задачи исследования:

1. Анализ динамики выделения от людей *V.cholerae* nonO1/nonO139 на территориях Ростовской области и республики Калмыкия, изучение фенотипических свойств клинических штаммов и изолированных из водных объектов окружающей среды.

2. Определение серогрупповой принадлежности и чувствительности к антибактериальным препаратам штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139, выделенных из разных источников с 1968 по 2018 гг.

3. Выявление с помощью ПЦР генов, связанных с патогенностью и выживаемостью в различных экологических нишах, определение их набора в геноме каждого штамма *V.cholerae* nonO1/nonO139 и в популяции в целом.

4. Секвенирование ДНК клинических штаммов и биоинформационный анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей, геномных островов, отдельных генов и их продуктов.

Научная новизна работы. На основе комплексного изучения получены приоритетные данные о фено- и генотипическом разнообразии НАГ-вибрионов, циркулирующих на

территориях Ростовской области и республики Калмыкия. Определены антибиотики, к которым все штаммы остались чувствительными (тетрациклины, левомицетин, налидиксовая кислота и ципрофлоксацин), и те, к которым приобрели устойчивость (стрептомицин, фуразолидон и цефтазидим). На основе данных ПЦР созданы индивидуальные генетические портреты штаммов, в обеих популяциях установлены наборы генов факторов патогенности/персистенции. Впервые секвенированы полные геномы штаммов, вызвавших ОКИ на указанных территориях, идентифицированы отдельные гены, их кластеры, геномные острова, выявлены новые аллели наиболее значимых генов факторов патогенности и персистенции и проведен сравнительный биоинформационный анализ их продуктов, что позволяет прогнозировать возможность экспрессии генов и продукции полноценных белков, а также формирования новых клонов за счет генетического обмена. В частности, идентифицированы ранее не описанные варианты цитотоксина RtxA, не имеющие ключевого активного домена, но содержащие новые домены, что указывает на возможное приобретение ими свойств других токсинов. Выявлены существенно отличные от прототипа варианты нейраминидазы, сохранившие, тем не менее, свойственную этому белку активность. Определена полная структура кластеров, ответственных за продукцию MSHA-подобных пилей адгезии, которые обладают гемагглютинирущей активностью, не ингибируемой маннозой. Для штаммов, содержащих гены кластера T3SS, несмотря на различия в их структуре, показана потенциальная способность к экспрессии данной системы секреции. Впервые обнаружены штаммы дикого типа, утратившие детерминанты эффекторов T6SS и, как следствие, способность к ее экспрессии. Среди клинических штаммов, выделенных в Ростовской области, выявлены представители трех клональных комплексов, способные к длительному сохранению и распространению.

Теоретическая и практическая значимость. При анализе полногеномных сиквенсов 20 клинических штаммов установлено, что генетическая гетерогенность НАГ-вибрионов выражается не только в наличии/отсутствии определенных генов, но и в составе их аллелей, распределение которых позволило выявить мозаичную структуру геномов штаммов, выделенных на одной территории. Вместе с тем, посредством Blasp-анализа продуктов трансляции многих измененных генов в NCBI были найдены полные либо 99%-ные гомологи, принадлежащие штаммам из разных регионов мира, что указывает на неслучайный характер их отбора и сохранения в геномах. Полученные данные создают основу для изучения путей эволюции и глобального распространения НАГ-вибрионов.

Зарегистрированы базы данных «Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области» (свидетельство № 2015620331 от 19.02.2015) и «Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп Республики Калмыкия» (свидетельство № 2017620363 от 03.04.2017). Обе базы внедрены в работу Музея живых культур РостНИПЧИ (акты о внедрении от 27.06.2018) и Волгоградского НИПЧИ (акты от 04.07.2018).

Разработаны, одобрены Ученым советом (протокол №9 от 08.12.2015) и утверждены директором Ростовского противочумного института методические рекомендации по изучению чувствительности/устойчивости холерных вибрионов к *Dictyostelium discoideum*.

В Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» депонированы штаммы *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 Р-19260 и Р-912, содержащие ген cholix-токсина соответственно I и III типа под номерами КМ 254 и КМ 255); пять штаммов

с установленными генотипическими характеристиками (КМ 2053–КМ 2056, КМ 2058).

В NCBI GenBank депонированы нуклеотидные последовательности полных геномов двух штаммов под номерами QENS01000000 и RHMB01000000; профага preCTX и генов *tcpABQ* штамма Р-17751 (MH782192, MH782191), RTX-кластеров шести штаммов (MF375482-MF375484, MF375487, MF375488, MF399211), генов *rtxA* 18 штаммов (KY741961-KY741978, MF417378, MF417379), *rtxC* 20 штаммов (MF358505-MF358524), *nanH* 11 штаммов (MH513986-MH513996), T3SS-кластера двух штаммов (MF374350, MH494080), генов *chxA* 14 штаммов (KR259135-KR259137, KR265171-KR265175, KR362249, KU215668, KY595959-KY595959), *ompW* 17 штаммов (MF033150-MF099914), *cef* 18 штаммов (KM456182-KM522859, KM588827, KY996718, KY996719), *hapA* 18 штаммов (MF358482-MF358499), *prtV* 19 штаммов (MF099941-MF099959), *hapR* 19 штаммов (MF100096-MF100114, MF100121), *toxR* 14 штаммов (MF099920-MF099933), всего 157 последовательностей.

Данные ПЦР-типирования используются для паспортизации штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, хранящихся в МЖК с ЦПВ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Сведения, полученные в рамках данного исследования, используются при чтении лекции по микробиологии холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп при проведении дополнительного профессионального образования по особо опасным инфекциям при ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Штаммы *V.cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующие в пределах Ростовской области и республики Калмыкия, представлены множеством серогрупп и различаются по профилям антибиотикорезистентности. С 1968 по 2018 г. произошло увеличение числа резистентных и полирезистентных штаммов, однако все они сохранили чувствительность к тетрациклинам, левомицетину, налидиксовой кислоте и ципрофлоксацину.
2. Данные ПЦР-типирования с одной стороны свидетельствуют о крайней генетической гетерогенности *V.cholerae* nonO1/nonO139. С другой стороны, при кластерном анализе установлено сходство клинических штаммов, выделенных на разных территориях, а также из ООС в Ростовской области. В их геномах выявлены разные сочетания генов факторов патогенности/персистенции, однако весь их набор присутствует в совокупной популяции в конкретном географическом регионе.
3. В геномах штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139 идентифицированы множественные, в том числе уникальные аллели генов ряда факторов патогенности/персистенции (*rtxA, nanH, mshA, chxA, cef, hapA, prtV, ompU, toxRS* и др.). Охарактеризован «природный резервуар» этих аллелей, которые могут служить генетическим материалом для формирования новых клонов.
4. Анализ первичной структуры продуктов трансляции разных аллелей позволил идентифицировать новые варианты цитотоксина RtxA, нейраминидазы, структурных единиц пилей MSHA, транслоконов T6SS. Штаммы, содержащие измененные гены *nanH*, *msh* и T6SS обладают соответственно нейраминидазной, гемагглютинирующей и актиномодулирующей активностью.

Степень достоверности и апробация работы. Все исследования выполнены на

сертифицированном оборудовании, прошедшем метрологическую поверку. Воспроизводимость результатов была показана в сериях экспериментов, достоверность полученных данных подтверждена статистической обработкой.

Материалы диссертации представлены на научных конференциях: проблемной комиссии «Холера и патогенные для человека вибрионы» в рамках Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации (Ростов-на-Дону, 2010-2018); международной научно-практической конференции «Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней» (Сочи, 2015), международных форумах специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности «Инфекционные болезни» «Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России Министерства здравоохранения РФ» (Краснодар, 2016, 2017); Всероссийской научно-практической конференции «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями» (Н. Новгород, 2016), XIX и XXII Российских Гастроэнтерологических неделях (Москва, 2013, 2016), на международной конференции «The 53rd year US-Japan Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections» (Ханой, Вьетнам, 2019).

Личный вклад автора. Личный вклад автора состоит в анализе данных литературы при планировании, постановке всех исследовательских задач, подготовке и проведении бактериологических, серологических, молекулярно-биологических экспериментальных работ, обработке, обсуждении и интерпретации всех полученных результатов, в подготовке публикаций, депонировании штаммов; написании диссертации и автореферата. Определение чувствительности к антибиотикам проведено совместно с с.н.с. лаборатории биобезопасности и лечения ООИ к.м.н. Селянской Н.А. Работа по секвенированию полных геномов штаммов холерного вибриона выполнена совместно с зав. лабораторией диагностики ООИ к.б.н. Писановым Р.В. Работу по созданию баз данных выполняли совместно с руководителем группы вирусологии к.м.н. Водопьяновым А.С.

Публикации. Материалы исследований отражены в 28 опубликованных работах, из них 4 в изданиях из перечня рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Работа выполнена в лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора в рамках трех государственных тем: «Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп, вызывающие заболевания людей на территории Ростовской области» (№ гос. регистрации 01200907521), «Характеристика биологических свойств и генетической организации холерных вибрионов, выделяемых из объектов окружающей среды на территории Ростовской области» (№ гос. регистрации 01201352135), «Молекулярные основы персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала холерных вибрионов различного происхождения» (№ гос. регистрации АААА-А16-116070610105-6), материалы диссернтации частично вошли в отчеты по указанным НИР.

Структура диссертации. Диссертация построена по традиционному плану, изложена на 171 страницах, состоит из введения, одной главы обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения и выводов. Работа иллюстрирована 17 таблицами и 33 рисунками. Библиография содержит ссылки на 259 публикаций, из которых 55 отечественных и 204 зарубежных.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. Для сравнительного изучения отобраны 196 клинических штаммов НАГ-вибрионов, изолированных в Ростовской области (135) и республике Калмыкия (61) и 60 штаммов, выделенных из ООС Ростовской области, в том числе 4 штамма из рыбы (Азовское море, 2011), 46 – из морской воды в зонах рекреации (2012, 2014) и 10 – из балластных вод судов порта Таганрог. Выделение культур из проб ООС и изучение культурально-морфологических свойств, биохимической активности, постановку тестов внутривидовой дифференциации проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами. Серотипирование осуществляли в реакции слайд-агглютинации с помощью набора сывороток для серологической идентификации вибрионов неО1/неО139, полученных нами в соответствии с рекомендациями, разработанными Авдеевой с соавт. (2001). Чувствительность/устойчивость штаммов к 11 антибактериальным препаратам изучали методом серийных разведений на агаре Мюллера-Хинтона (HIMEDIA, Индия). Для постановки гемагглютинационного теста использовали эритроциты I группы крови человека и куриные эритроциты. Способность холерных вибрионов убивать клетки слизевика *D.discoideum* оценивали методом, предложенным Zheng et al. (2011) в нашей модификации. Подготовку и обеззараживание материала для ПЦР проводили в соответствии с МУ 1.3. 2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I -IV групп патогенности». Кластерный анализ ПЦР-генотипов и построение дендрограмм выпоняли по методу UPGMA с использованием программного обеспечения, разработанного Водопьяновым А.С. с соавт. (2016). Отдельные гены и их кластеры идентифицировали в полных геномах с помощью программ BLASTN 2.2.29 (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov) и BioEdit 7.2.5 (http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit). Трансляцию генов, сравнительный анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных последовательностей их продуктов осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Прототипами генов, общих для всех холерных вибрионов, служили соответствующие последовательности референс-штамма *V. cholerae* N16061 (AE003852, AE003853). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках, а также выявления их гомологов у штаммов из других регионов мира выполняли Blastp-анализ (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

1 Распространение, этиологическая значимость и фенотипическая характеристика *V. cholerae* nonO1/nonO139

В Ростовской области в 1960-е годы заболеваемость, вызванная НАГ-вибрионами, чаще носила вспышечный характер, после чего в тех же районах до настоящего времени периодически регистрировались спорадические случаи. С 1968 по 1999 гг. штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139 выделены от больных, проживающих в шести населенных пунктах Ростовской области. Результаты дальнейших исследований, проведенные с 2001 по 2018 гг. показали, что в инфекционные отделения стационаров Ростовской области поступило 38 больных ОКИ, проживающих в 17 населенных пунктах на побережье рек и Азовского моря. На территории Калмыкии с 2000 по 2018 гг. от больных ОКИ из 10 населенных пунктов был изолирован 61 штамм. Сравнительный анализ динамики выделения НАГ-

вибрионов от людей за 19-летний период показал, что на обеих территориях сохраняется спорадическая заболеваемость ОКИ, вызванными данными микроорганизмами, в летние месяцы с подъемом заболеваний в Калмыкии в 2000 г. и 2005 г. (соответственно 16 и 13 человек) и Ростовской области в 2014 г. (рис.1).

Рисунок 1. Динамика выделения штаммов НАГ-вибрионов от людей на территориях Ростовской области и республики Калмыкия с 2000 по 2018 гг.

Все изолированные штаммы были типичны по культурально-морфологическим свойствам, гемолизпозитивные. При серотипировании принадлежность к определенной серогруппе удалось установить у 64,9 % штаммов к 42 серогруппам (табл.1).

Таблица 1. Количественная и серологическая характеристика штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 Ростовской области и республики Калмыкия

Количество штаммов и серогрупповая принадлежность	Происхождение штаммов			
	Больные, Ростовская область 1968-1999 гг.	Больные, Ростовская область 2000-2018 гг.	Больные, Калмыкия 2000-2018 гг.	ООС, Ростовская область, 2011-2014 гг.
Число штаммов/из них типируемых (%)	97/75 (77,3 %)	38/22 (57,9 %)	61/41 (67,2 %)	60/27 (45 %)
Серогруппа (число штаммов)	O2(9), O4(2), O5(10), O6(7), O8 (3), O13(4), O16 (1), O17(2), O24(3), O34 (2), O35(1), O37(1), O39 (2), O45(1), O46(1), O47(8), O49(2), O50(5), O51(6), O52(3), O53(1), O54(1), н/т(22)	O2(3), O5(1), O6(4), O8(1), O17(1), O27(1), O34(1), O39 (4), O47(1), O59(1), O76(1), O81(2), O82(1), н/т (15)	O2(2), O3(2), O4(1), O5(4), O6(1), O8(3), O16(1), O19(3), O34(2), O39(2), O47(1), O49(1), O50(3), O57(1), O58(4), O60(2), O62(1), O72(1), O76(1), O78(2), O80(2), O82(1), н/т(19)	O2(4), O5(3), O24(8), O32(1), O44(1), O48(1), O51(2), O67(1), O71(1), O76(5), н/т(33)

Примечание – н/т – не типируется

В XXI веке на территории Ростовской области выявлены представители пяти ранее не встречавшихся на данной территории серогрупп (О27, О59, О76, О81, О82). В то же время среди клинических штаммов из обоих регионов выявлены представители О2, О5, О8, О34, О39, О47, О76 и О82 серогрупп. Снижение числа типируемых культур, изолированных из водных экосистем, свидетельствует о циркуляции в водоемах большего количества клонов. Однако О2 и О5 серогруппы были представлены во всех популяциях, а некоторые – в одной-трех, что свидетельствует в пользу длительного сохранения и циркуляции родственных штаммов в пределах данного географического региона.

Значительную вариабельность фенотипов показал и анализ профилей устойчивости к антибактериальным препаратам. Несмотря на то, что все изученные клинические штаммы сохраняли на протяжении более 40 лет чувствительность к тетрациклинам, левомицетину, налидиксовой кислоте и ципрофлоксацину, значения МПК к тетрациклинам выросли с 0,5 до 1,0 мг/л. Установлено, что среди клинических штаммов в Ростовской области выросла устойчивость к ампициллину (от 14,3 % до 70,0 %), появились культуры, резистентные к стрептомицину (30,0 %), фуразолидону (40,0 %) и цефтазидиму (6,7 %). НАГ-вибрионы на данной территории оставались устойчивы к канамицину и триметоприму/сульфаметоксазолу. Антибиотикорезистентный фенотип вибрионов, выделенных из ООС, был еще более разнообразен и включал одновременно до пяти маркеров

2 ПЦР-генотипирование холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп

Так как виду *V.cholerae* свойственна значительная пластичность генома, на следующем этапе нами был проведен сравнительный анализ, основанный на результатах ПЦР-детекции генов факторов патогенности/персистенции. Сходство заключалось в том, что все штаммы были лишены генов ключевого фактора патогенности холерного токсина, но содержали гены таких факторов как гемагглютинин/протеаза, металлопротеаза PrtV, коллагеназа VchC (VC1650), цитотонический фактор Cef, транслоконы системы секреции шестого типа (T6SS), факторов жизнеобеспечения и персистенции OmpW (белка наружной мембраны), *tol*- и *vps*-кластеров, а также регуляторные гены *toxR* и *hapR*. Ни у одного штамма в ПЦР не было выявлено генов термостабильного, шигаподобного токсинов, прямого термостабильного и родственного ему гемолизинов. Только один штамм 17751, выделенный в Ростове в 1981 г., значительно отличался от всех остальных наличием в его геноме профага preCTX и острова патогенности VPI. Остальные гены выявлялись в различных сочетаниях. Наиболее интересной «находкой» мы считаем обнаружение у 22 клинических штаммов генов cholix-токсина (*chxA*) I либо II типов (у одного штамма – III типа). По-видимому, у разных штаммов роль основного фактора патогенности играют различные факторы.

При кластерном анализе данных ПЦР по методу UPGMA было выявлено 254 генотипа, которые были объединены в 12 кластеров, обозначенных A-L (рис.2). Один их кластеров (J) был представлен единственным клиническим штаммом (Элиста, 2006), два других (K и L) включали по два штамма. Вошедшие в состав кластера K были выделены от больных в 1976 и 2008 г. в Ростовской области, а в кластере L один (Ростов, 1981) существенно отличался от других наличием профага pre-CTX, второй (Таганрог, 1974) не имеет pre-CTX, однако по остальному набору генов близок к нему.

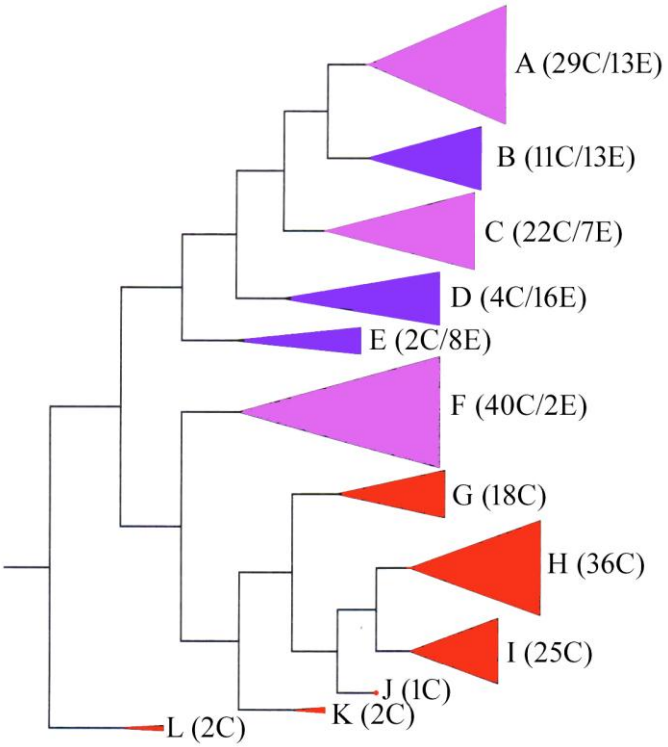


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная на основании кластерного анализа распределения генов. В скобках указано число штаммов (С – клинических, Е – из ООС).

человек	A1	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A15	A16	A17	A23	A29
	A30	A31	A33	A34	A35	A36	A37	A38	A39	A40	A41	A42	A43	A44	A45
	B1	B3	B17	B18	B19	B2	B20	B21	B22	B23	B24	C1	C2	C4	C5
	C6	C7	C8	C13	C14	C15	C16	C18	C19	C20	C21	C22	C23	C24	C25
	C26	C27	C28	C29	D1	D11	D8	D9	E10	E2	F1	F4	F5	F6	F7
	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F16	F18	F19	F2	F20	F21	F22	F23
	F24	F25	F26	F27	F28	F29	F3	F30	F31	F32	F33	F34	F35	F36	F37
	F38	F39	F40	F41	F42	G1	G2	G3	G4	G5	G6	G7	G8	G9	G10
	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	H1	H10	H11	H12	H13	H14	H15
	H16	H17	H18	H19	H2	H20	H21	H22	H23	H24	H25	H26	H27	H28	H29
	H3	H30	H31	H32	H33	H34	H35	H36	H4	H5	H6	H7	H8	H9	
	I1	I3	I4	I5	I6	I7	I8	I9	I10	I11	I12	I13	I14	I15	I16
	I17	I18	I19	I2	I20	I21	I22	I23	I24	I25	J1	K1	K2	L1	L2
рыба	A25	A32	B7	B9											
морская вода	A12	A22	A24	A26	A27	A28	B4	B5	B6	B8	B11	B12	B14	B15	B16
	C9	C10	C11	C12	C17	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D10	D12	D13	D14
	D15	D16	D17	D18	D19	D20	E1	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	F15	F17
балластная вода	A13	A14	A18	A19	A2	A20	A21	B10	B13	C3					

Рисунок 3. Распределение кластеров в зависимости от источника выделения

Внутри остальных кластеров штаммы отличались друг от друга наличием/отсутствием одного или нескольких генов, при этом клинические штаммы оказались более разнообразными и вошли в состав всех кластеров, а штаммы из ООС – в кластеры A, B, C, D, E, F вместе с клиническими (рис. 3). При этом какие-либо корреляции между ПЦР-генотипами и серогрупповой принадлежностью отсутствовали. Представители одной и той же серогруппы относились к разным генотипам. Например, 16 клинических штаммов O5 серогруппы, которые были изолированы от больных и в Ростовской области, и в республике Калмыкия, относились к кластерам B, C, F, G, H, I, L.

3 Изучение структуры геномов *V. cholerae* nonO1/nonO139

При анализе 20 полногеномных сиквенсов клинических штаммов по наличию и числу точковых мутаций в 1747 генах в их геномах было выявлено большое количество однонуклеотидных замен (SNP). Как видно из рисунка 4, по результатам секвенирования (А) и ПЦР (Б), часть штаммов группировалась одинаково на обеих дендрограммах. Прежде всего это относится к трем группам: 1) 6 и 9798; 2) 16, 930 и 19260; 3) 9699, 9705, 9767 и 9786, по-видимому, каждая из них представляет отдельный клональный комплекс. Из остальных штаммов только 9760 сгруппировался с одними и теми же штаммами на двух дендрограммах, у других 10 ПЦР- и SNP-генотипы не коррелировали друг с другом. По общему числу SNP наиболее отличным от всех остальных оказался штамм 912 – единственный содержащий ген cholix-токсина III типа, а по данным ПЦР – штамм 17751, содержащий pre-CTX. Очевидно, это связано с независимым характером мутаций в разных участках генома.

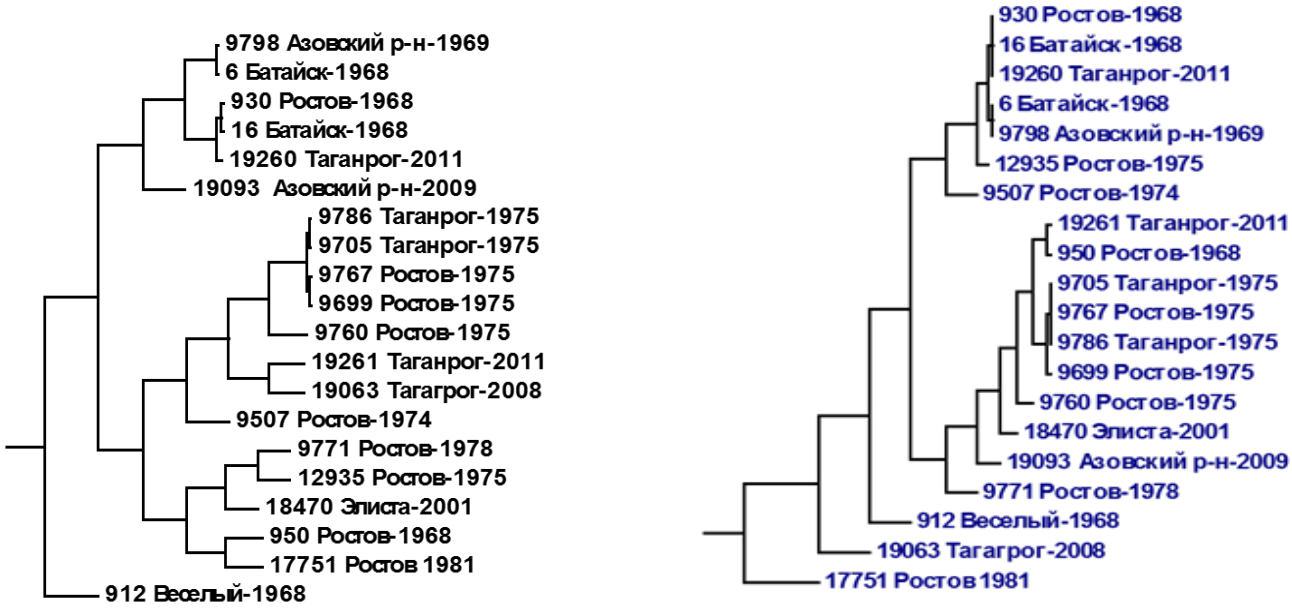


Рисунок 4. Дендрограммы, построенные на основании кластерного анализа методом UPGMA по результатам секвенирования (слева) и ПЦР (справа)

Дальнейшие исследования были направлены на выявление и анализ структуры наиболее значимых генов и их кластеров – RTX, *chxA*, VC1649, *vchC* (VC1650), *cef*, *hlyA*, *hapA*, *nanH*, *ompU*, *ompW*, *msh*, *toxR*, *hapR*, T3SS, T6SS. Некоторые были изменены настолько, что не поддавались детекции с помощью ПЦР. Также были выявлены новые, в т.ч. уникальные аллели многих генов, продукты которых не имели гомологов в базах NCBI GenBank. В ряде случаев наблюдалось появление отдельных генов, усеченных за счет образования преждевременных стоп-кодонов, что влекло за собой продукцию неполноценных белков. Поскольку далеко не все SNP представляют собой миссенс-мутации, при анализе мы ориентировались в основном на продукты трансляции измененных генов. Результаты AlignX-анализа аминокислотных последовательностей более 20 белков, показали, что разные штаммы могли иметь сходство по структуре одних белков и существенно различаться по структуре других, в результате чего их кластеризация была различной на каждой

дендрограмме. Высокий уровень сходства всех белков сохраняли только представители трех вышеупомянутых клональных комплексов. В качестве примера на рис.5 показаны дендрограммы, отражающие сходство и различия штаммов по структуре HlyA и сериновой протеазы VC1649. Такая же картина наблюдалась при сравнении дендрограмм остальных белков.

Как показал Blastp-анализ, несмотря на существенные различия первичных структур, белки обычно сохраняли активные домены, свойственные прототипам.

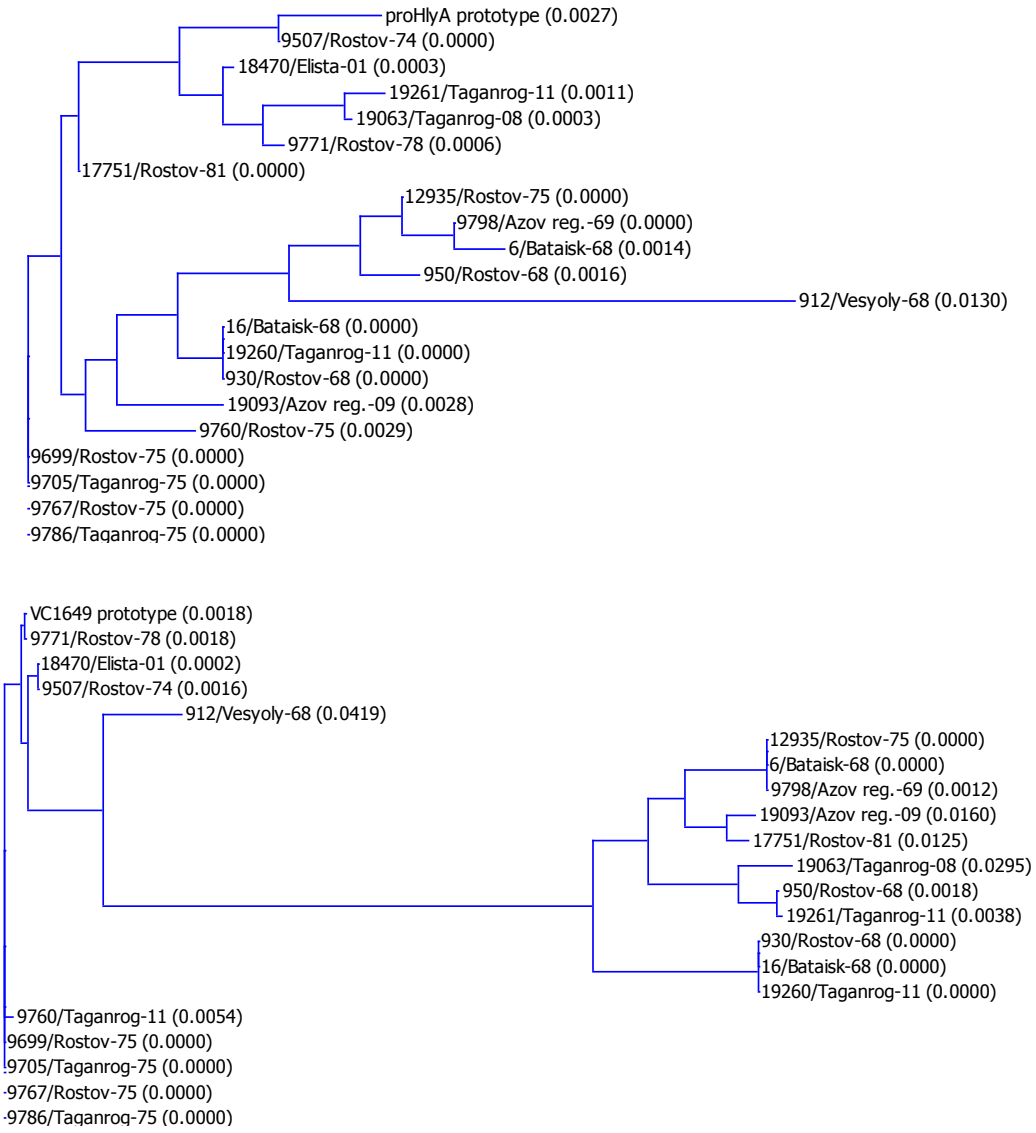


Рисунок 5. Дендрограммы, построенные по результатам AlignX-анализа белков proHlyA (вверху) и сериновой протеазы (внизу)

Значительным разнообразием отличалась структура высокомолекулярного цитотоксина RtxA. У 11 штаммов они были более или менее близки прототипу и сохранили все характерные для этого белка активные домены, тогда как у семи отсутствовал актин-связывающий домен ACD и появился второй RID (инактивирующий ГТФазу), у двух появилось по новому домену – Hia, ранее не выявленный у холерных вибрионов и характерный для адгезинов, и VIP2, имеющий высокий уровень гомологии с токсином VIP2 *Bacillus cereus* – модификатором G-актина. Поэтому вполне вероятно, что они приобрели свой-

ства других токсинов. У одного штамма ген *rtxA* был существенно усечен за счет преждевременного стоп-кодона, и его продукт не мог сохранить биологическую активность. Структура RtxA разных штаммов показана на рис. 6.

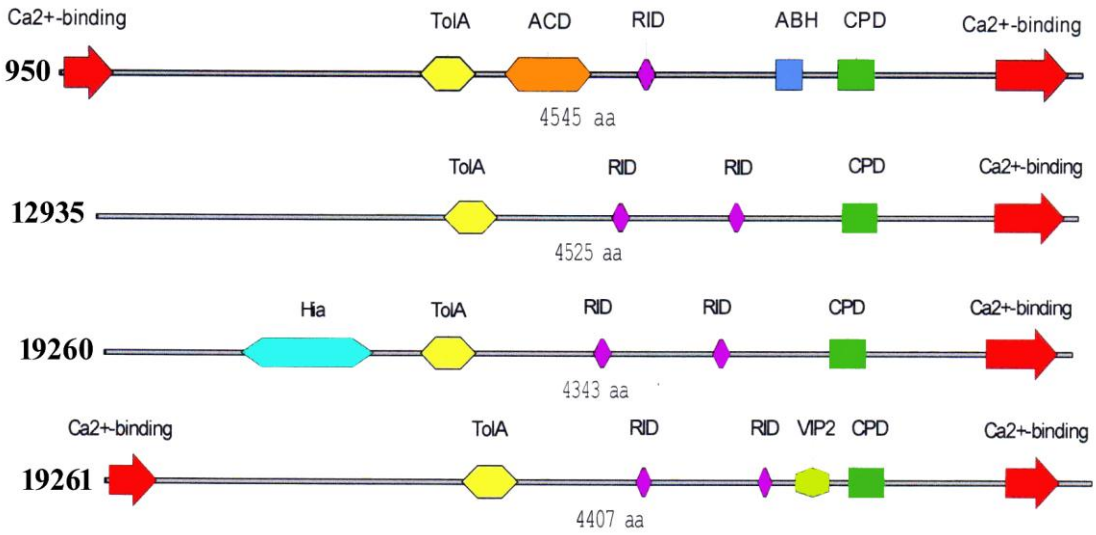
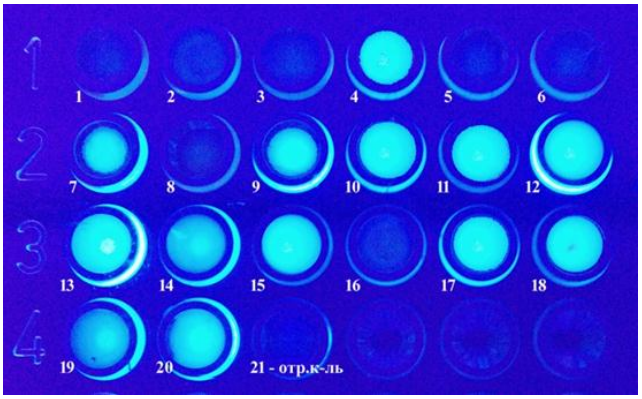


Рисунок 6. Домены в RtxA разных штаммов НАГ-вибрионов

Домены ACD, RID, CPD, VIP2 и Hia описаны в тексте; Ca2+-binding, TolA и и Abh (альфа-бета гидролаз), функции которых в MARTX не установлены, показаны для дополнения общей картины локализации доменов.

Далеко не у всех исследуемых штаммов в ПЦР был выявлен ген *nanH*. Для семи штаммов его отсутствие было подтверждено результатами поиска в полногеномных сиквенсах, тогда как в геномах трех штаммов был найден измененный ген, и содержащие его штаммы обладали нейраминидазной активностью (рис.7).



№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
штамм	6	16	930	950	912	9798	9507	12935	9767	9699	9705	9786	9771	17751	19063	19260	19261	18470	9760	19093
ПЦР	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-
Seq.	-	-	-	+	-	-	nd	-	+	+	+	+	+	nd	+	-	+	+	+	+
ФТ	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Рисунок 7. Результаты определения наличия гена *nanH* и фенотипического проявления нейраминидазной активности у 20 штаммов НАГ- вибрионов.

Нумерация соответствует порядку штаммов в таблице. ФТ – фенотип, nd – нет данных.

Существенные отличия от прототипа наблюдались в структурных единицах пилей MSHA. Только у одного штамма ген *mshA* был близок прототипу и узнавался праймерами. У остальных 19 были обнаружены гены, обладающие 5′-концевыми участками (1-122 п.н.) с высоким уровнем гомологии прототипу, тогда как остальные последовательности не имели с ним практически ничего общего и были близки генам *vcfA*, ранее выявленным у НАГ-вибрионов японскими исследователями (Kuroki et al., 2001). Тем не менее, содержащие их штаммы вызывали агглютинацию эритроцитов человека и курицы, причем реакции не ингибировалась маннозой (рис.8).

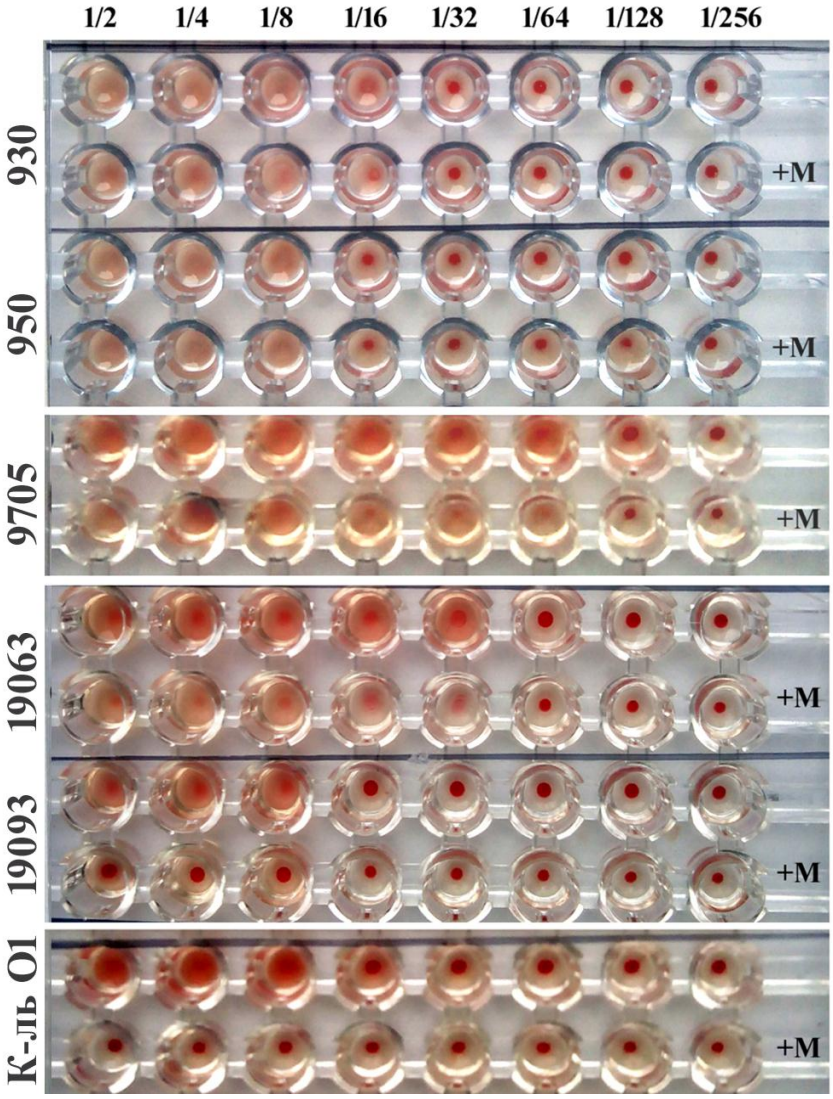


Рисунок 8. Агглютинация куриных эритроцитов клетками НАГ-вибрионов. Начальная концентрация – 10 млрд м.к./мл, +М – реакция с добавлением маннозы, К-ль О1 – контрольный штамм О1 серогруппы.

Результаты анализа полногеномных сиквенсов подтвердили данные ПЦР о наличии у некоторых штаммов генов T3SS (табл. 2), хотя они и различались по длине и нуклеотидному составу. Напротив, далеко не все штаммы содержали гены T6SS, необходимые для проявления ее биологической активности по отношению к эукариотическим клеткам. У некоторых не были выявлены гены ключевых эффекторов – актиномодулятора VgrG1, порообразователя VasX и липазы TseL. Эти данные в основном совпали с результатами фенотипического изучения этих свойств. Лишь отдельные штаммы, содержащие интактные

гены T6SS, экспрессировали ее антагонистическую активность по отношению к *Dictyostelium discoideum*, тогда как большинство, с отсутствующими либо поврежденными генами, такой активностью не обладали (табл.2).

Таблица 2. Dictyo-фенотипы НАГ-вибрионов

№	штаммы	Генетические детерминанты					Устойчивость к *D. discoideum*	
		T3SS	*acd-vgrG1*	*vasX*	*pbd-vgrG3*	*tseL-like*	Мин. число спор для образования бляшки	Dictyo-фенотип
	К-ль						1	**S**
1	9798	-	+	+	+	-	16-32	**R**
2	6	-	+	+	+	-	16-32	**R**
3	16	-	+	+	+	-	>250	**R**
4	930	-	+	+	+	-	>250	**R**
5	19260	-	+	+	+	-	250	**R**
6	12935	-	+	+	+	+	250	**R**
7	9760	+	+	+	+	+	250	**R**
8	912	-	-	-	+	+	1	**S**
9	17751	-	-	-	+	-	1	**S**
10	9699	+	-	-	+	-	1-2	**S**
11	9705	+	-	-	+	-	1	**S**
12	9767	+	-	-	+	-	1	**S**
13	9786	+	-	-	+	-	1-2	**S**
14	9771	+	-	+	+	-	125	**R**
15	19261	+	-	+	+	-	62-125	**R**
16	19093	-	-	+	+	-	62-125	**R**
17	9507	-	-	+	+	-	125	**R**
18	950	-	-	-	+	-	1	**S**
19	18470	+	-	-	+	-	1	**S**
20	19063	+	-	-	-	-	1	**S**

Приведенные результаты анализа свидетельствуют о гетерогенности изученных штаммов по содержанию тех или иных аллелей отдельных генов. В таблице 3 показаны варианты их продуктов, обозначенные разными цветами. У представителей трех клональных комплексов подавляющее большинство белков были идентичными. Остальные 11 штаммов обладали уникальными наборами вариантов большинства белков несмотря на то, что у некоторых совпадали места и годы выделения.

Эти данные указывают, с одной стороны, на возможность распространения представителей одного клонального комплекса в пределах области и длительного сохранения (от одного года до нескольких десятков лет, как в случае со штаммом 19260, выделенным в Таганроге в 2011 г. и практически идентичным двум штаммам 1968 г.), с другой – на чрезвычайную пластичность их геномов, следствием которой является мутационная изменчивость отдельных генов на фоне консервации остальных. На примере даже столь небольшой выборки можно говорить о мозаичной структуре генома НАГ-вибрионов.

Таблица 3. Варианты 20 белков НАГ-вибрионов

	штамм	с/гр	Место и время выделения	RtxA	RtxC	ChxA	Ser. prot.	VchC	HA/P	PrtV	HlyA	Cef	NanH	HapR	ToxR	OmpU	OmpW	«MshA»	«MshC»	VopF	VgrG3	VasX	TseL
1	9798	O8	Азовский р-н-69	alt		II							-							-	pt		-
2	6	O5	Батайск-68	alt		II							-							-	pt		-
3	16	O5	Батайск-68	alt		I							-							-			-
4	930	н/т	Ростов-68	alt		I							-							-			-
5	19260	н/т	Таганрог-11	alt		I							-							-			-
6	912	O45	Веселый-68	nd		IIID							-		nd				nd	-		-	
7	950	н/т	Ростов-68			I														-	pt	-	-
8	9507	O47	Ростов-74			-							nd							-			-
9	12935	O47	Ростов-75	alt		I							-							-			
10	9767	O47	Ростов-75			I																-	-
11	9699	O6	Ростов-75			I																-	-
12	9705	O6	Таганрог-75			I																-	-
13	9786	O2	Таганрог-75			I																-	-
14	9771	O2	Ростов-78			-																	-
15	17751*	O8	Ростов-81	alt		-							nd							-		-	-
16	19063	O27	Таганрог-08			I												D			D	-	-
17	19261	н/т	Таганрог-11	alt		I										nd					pt		-
18	18470	O82	Элиста-01			I																-	-
19	9760	O47	Ростов-75	nd		nd		nd	nd			nd		D			D					pt	
20	19093	O81	Азовский р-н-09	D		-		nd				nd								-			-
	N16961	**O1**	**референс**			-														-			
	Всего идентифицировано генов			18	20	15	20	18	19	20	20	18	11	20	19	19	20	20	19	9	20	11	3
	Число вариантов продукта			14	3	9	12	13	13	14	15	14	7	3	10	8	11	12	11	6	14	8	2

Варианты белков в каждой группе выделены разными цветами. nd – ген не удалось собрать, т.к. в полногеномном сиквенсе присутствуют отдельные его фрагменты; - – ген отсутствует у данного штамма; D – дефективный белок (продукт усеченного гена), alt – существенно отличный от прототипа, pt – неполная аа последовательность. Для ChxA римскими цифрами обозначены типы, среди каждого из которых имеются разные аллели. *штамм, содержащий профаг pre-CTX.

Для многих отличных от прототипов белков в NCBI были найдены полные либо 99%-ные гомологи, принадлежащие штаммам из разных регионов мира. Это указывает на неслучайный характер их отбора и сохранения в геномах. Мы не исключаем, что НАГ-вибрионы «специально» изменяют некоторые гены с сохранением функций их продуктов или без сохранения в целях энергосбережения и используют для реализации патогенетического потенциала те факторы, продукция которых требует наименьших энергетических затрат.

Заключение

В результате проведенных исследований установлено, что генетическое разнообразие НАГ-вибрионов выражается не только в наличии/отсутствии определенных генов, но и в составе их аллелей, продукты которых могут либо утрачивать функциональность, либо, наоборот, приобретать повышенную активность. Наличие множественных аллелей каждого гена, вероятно, способствует отбору наиболее конкурентоспособных штаммов и поддержанию популяцией в целом как патогенетического, так и персистентного потенциала.

Практические рекомендации и перспективы дальнейших исследований

Популяция изученных штаммов в целом содержит совершенно определенный набор генов факторов патогенности/персистенции при полном отсутствии либо повреждении других, что представлено в созданных нами базах данных «Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп, циркулирующие в Ростовской области» и «Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп Республики Калмыкия», необходимых для определения происхождения свежевыделенных штаммов и их способности к длительному сохранению на данных территориях. Так, штаммы с генотипами, идентичными либо близкими к уже представленным в базах, скорее всего, являются «аборигенными», а содержащие, например, профаги CTX, pre-CTX либо RS1, остров патогенности VPI, полный остров пандемичности VSP-I либо VSP-II, гены *stn/sto*, *tdh* либо *trh* – заносными с других территорий. Предполагается пополнение этих баз по мере выделения новых штаммов. Кроме того, установлению путей эволюции возбудителей может способствовать дальнейший сравнительный анализ полногеномных последовательностей ДНК, полученных как в процессе выполнения настоящей работы, так и в будущем. Особый интерес представляет более детальное изучение биологической и биохимической активности продуктов измененных генов факторов патогенности и персистенции, выявленных в настоящем исследовании.

Выводы

1. В результате серотипирования холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на территориях Ростовской области и республики Калмыкия, установлена принадлежность 64,9 % штаммов к 42 серогруппам, из которых представители пятнадцати выделялись на обеих территориях в разное время и из разных источников, что свидетельствует в пользу длительного сохранения и циркуляции родственных штаммов в пределах данного географического региона.
2. За период с 1968 по 2018 г. среди холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, как клинических, так и изолированных из водных экосистем, произошло увеличение количества антибиотикорезистентных штаммов, в том числе с множественной лекарственной устойчивостью. Тем не менее, ни один из них не утратил чувствительности к тет-

рациклинам, левомицетину, налидиксовой кислоте и ципрофлоксацину, которые можно считать сохранившими статус эффективных средств экстренной этиотропной терапии при невозможности определения антибиотикограммы конкретного возбудителя.

3. С помощью ПЦР у всех штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 выявлены гены гемагглютинин/протеазы, металлопротеазы PrtV, коллагеназы VchC (VC1650), цитотонического фактора Cef, транслоконов системы секреции шестого типа (T6SS), белка наружной мембраны OmpW, *tol*- и *vps*-кластеров, регуляторов ToxR и HapR и не было выявлено генов холерного, термостабильного, шигаподобного токсинов, гемолизинов TDH и TRH. Гены RTX-кластера, островов патогенности VPI и VPI-2, пандемичности VSP-I и II, эффекторов T3SS и T6SS, сериновой протеазы, cholix-токсина, пилей MSHA образовали различные сочетания, вследствие чего общее число ПЦР-генотипов достигло 254.
4. При анализе данных ПЦР методом UPGMA *V. cholerae* nonO1/nonO139 образовали 12 кластеров, внутри которых штаммы отличались друг от друга наличием/отсутствием одного и более генов. При этом в состав шести кластеров наряду с клиническими вошли штаммы из объектов окружающей среды, что свидетельствует в пользу наличия родственных связей между ними.
5. Биоинформационный анализ полногеномных последовательностей ДНК 20 клинических штаммов с использованием SNP-маркеров позволил выявить представителей трех клональных комплексов возбудителей, выделенных в разных населенных пунктах и/или в разные годы, причем эти данные совпали с результатами ПЦР-типирования по наличию/отсутствию генов факторов патогенности и персистенции. Это является еще одним доказательством их длительного сохранения и распространения на территории Ростовской области.
6. В геномах штаммов *V.cholerae* nonO1/nonO139, выявлены множественные, в том уникальные аллели генов ряда факторов патогенности/персистенции (*rtxA, nanH, mshA, chxA, cef, hapA, prtV* и др.), однако продукты трансляции большинства измененных генов сохранили характерные активные домены, а некоторые белки RtxA утратили актин-связывающий домен ACD, но приобрели новые: второй инактивирующий ГТФазу RID, характерный для адгезинов Hia и модификатор актина VIP2, что указывает на возможное приобретение этим фактором свойств иных токсинов.
7. В экспериментах in vitro показано, что штаммы, содержащие существенно отличные от прототипов гены *nanH* обладают нейраминидазной активностью, имеющие MSHA-подобные кластеры – обусловливают маннозо-независимую гемагглютинацию, а сохранившие гены эффекторов T6SS – проявляют антагонизм по отношению к *Dictyostelium discoideum* и *E.coli*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1 Кругликов, В.Д. Характеристика штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, вызвавших заболевания людей в Ростовской области / В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова **И.В. Архангельская**, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Е.П. Авдеева, Н.В. Божко, Л.М. Смоликова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2011. – № 5. – С.18-22. **(из перечня ВАК, Scopus)**

2 Селянская, Н.А. Чувствительность к антибактериальным препаратам штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области / Н.А. Селянская, А.В. Тришина, Л.М. Веркина, **И.В. Архангельская**, В.Д. Кругликов, Ю.М. Зленко // Антибиотики и химиотерапия. – 2014. – Т. 59. – № 11-12. – С.16-19. **(из перечня ВАК, Scopus)**

3 Селянская, Н.А. Типирование штаммов *Vibrio cholerae* неО1/неО139, изолированных в Ростовской области в 2014 году // Н.А. Селянская, **И.В. Архангельская**, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов, С.Ю. Водяницкая, Л.М. Веркина, Н.Б. Непомнящая // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2016. – № 1. – С.3-9. **(из перечня ВАК, Scopus)**

4 Монахова, Е.В. Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций: современная ситуация в России и в мире / Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская** // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2. – С.14-23. **(из перечня ВАК)**

5 Ломов, Ю.М. Разнообразие генотипов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных от людей в Ростовской области / Ю.М. Ломов, **И.В. Архангельская**, В.Д. Кругликов, Е.П. Авдеева, Е.В. Монахова, А. С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, О.А. Шалу // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04). – Ростов-на- Дону, 2010. – № 23. – С.47-49.

6 **Архангельская, И.В.** Ретроспективный анализ свойств штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, вызвавших заболевания людей в Ростовской области / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, В.Д. Кругликов, Н.Б. Непомнящая, Л.В. Григоренко, Н.Н. Ускова, О.А. Шалу, М.И. Ежова // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы совещания специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемиологического надзора за холерой и материалы проблемной комиссии (48.04). – Ростов-на- Дону, 2011. – № 24. – С.111-114.

7 **Архангельская, И.В.** Сравнительный анализ свойств штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, циркулирующих на территории Ростовской области / И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, В.Д. Кругликов, Н.Н. Ускова, М.В. Скачко, Е.В. Монахова // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2012. – № 25. – С.124-127.

8 **Архангельская, И.В.** Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова В.Д. Кругликов, А.С. Водопьянов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2013. – Т. XXIII. - № 5 (приложение 42, материалы XIX РГЭН). – С.342.

9 **Архангельская, И.В.** ПЦР-детекция генов дополнительных факторов патогенности в геномах клинических штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова, М.И. Ежова, В.Д. Кругликов // Холера и патогенные для человека вибрионы: материа-

лы совещания специалистов Роспотребнадзора в г. Ростове-на-Дону. ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора. – 2014. – № 27. – С.66-70.

10 **Архангельская, И.В.** Генетическая неоднородность популяции *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, циркулирующих в Ростовской области / И.В. Архангельская, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 3(264). – С. 25-28.

11 Селянская, Н.А. Мониторинг антибиотикорезистентности штаммов холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп, выделенных из объектов окружающей среды в Ростовской области в 2011-2014 гг. / Н.А. Селянская, Л.М. Веркина, **И.В. Архангельская**, А.В. Тришина, С.Ю. Водяницкая // Здоровье населения и среда обитания. – 2015. – № 7. – С.33-36.

12 Селянская, Н.А. Сравнительная оценка антибиотикорезистентности штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных от людей в Ростовской области в разные годы / Н.А. Селянская, **И.В. Архангельская**, Л.М. Веркина, Е.А. Березняк, С.В. Титова, Н.Г. Железняк // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2015. – Т. 20. – № 3. – С.32-35.

13 **Архангельская, И.В.** Генотипирование холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп Ростовской области / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2015. – № 28. – С.124-129.

14 Селянская, Н.А. Характеристика штаммов *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139, изолированных в Ростовской области в 2014 году / Н.А. Селянская, **И.В. Архангельская**, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов, С.Ю. Водяницкая, Л.М. Веркина, Н.Б. Непомнящая // Перспективы сотрудничества государств-членов Шанхайской организации сотрудничества в противодействии угрозе инфекционных болезней: материалы Международной научно-практической конференции. Под редакцией проф. А.Ю. Поповой. – Сочи, 2015. – С.347-351.

15 Титова, С.В. Природные популяции холерных вибрионов как резервуар генов факторов патогенности / С.В. Титова, Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая // Здоровье населения и среда обитания. – 2016. – № 5(278). – С. 45-47.

16 **Архангельская, И.В.** Сравнительная характеристика разных популяций *V. cholerae* nonO1/nonO139 / И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая, Е.В. Монахова / Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2016. – № 29. – С.78-81.

17 Монахова, Е.В. Структура и изменчивость генов и белков CHOLIX-токсина холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп / Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов / Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической

охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2016. – № 29. – С.131-136.

18 **Архангельская, И.В.** Характеристика штаммов холерных вибрионов *Vibrio cholerae* неО1/неО139, вызвавших заболевания людей в Республике Калмыкия / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, А.С. Водопьянов, Н.Б. Непомнящая // Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной «Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями». – Н. Новгород, 2016. – С.21-25.

19 **Архангельская, И.В.** Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп в этиологии острых кишечных инфекций в Республике Калмыкия / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, Р.В. Писанов // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2016. – Т. XXVI, № 5 (приложение 48, материалы XXII РГЭН). – С.96.

20 **Архангельская, И.В.** Холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп как возбудители кишечных инфекций в Ростовской области и Республике Калмыкия / И.В. Архангельская, А.С. Водопьянов, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, Г.В. Демидова // Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России: материалы межрегионального форума специалистов с заседанием профильной комиссии по специальности "Инфекционные болезни" Министерства здравоохранения РФ. – Краснодар, 2016. – С.25-27.

21 **Архангельская, И.В.** Заболевания, вызываемые холерными вибрионами неО1/неО139 серогрупп, в России / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, Д.А. Левченко // Актуальные вопросы инфекционной патологии Юга России: материалы II Межрегионального научно-практического форума. – Краснодар, 2017. – С.14-15.

22 Монахова, Е.В. Структура и изменчивость генов факторов патогенности/персистенции холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп // Е.В. Монахова, Е.П. Омельчук, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов // Холера и патогеные для человека вибрионы: Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону, 2017. – № 30. – С.150-155.

23 **Архангельская, И.В.** *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 как возбудители кишечных инфекций в России / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, Н.Б. Непомнящая, Д.А. Левченко // Обеспечение эпидемиологического благополучия: вызовы и решения: Материалы XI съезда общероссийского научно- практического общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов. – Москва, 2017. – С.334.

24 **Архангельская, И.В.** Формирование коллекции штаммов холерных вибрионов с охарактеризованными генетическими свойствами / И.В. Архангельская, Е.В. Монахова, М.И. Ежова, Д.А. Левченко, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая, С.В. Титова // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. – 2018. – № 31. – С.109-112.

25 Монахова, Е.В. Структура и изменчивость нейраминидазы (NanH) холерных вибрионов неО1/неО139 серогрупп / Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов, Н.Б. Непомнящая, О.В. Дуванова // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник

статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – Ростов-на-Дону. – 2018. – № 31. – С.112-115.

26 Монахова, Е.В. Биоинформационный анализ продуктов генов *rtxA* как факторов патогенности *V. cholerae* nonO1/nonO139 / Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов // Холера и патогенные для человека вибрионы. Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. – 2018. – № 31. – С.116-120.

27 Монахова, Е. В. Особенности первичной структуры цитотоксина MARTX нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* разных серогрупп / Е.В. Монахова, **И.В. Архангельская**, Р.В. Писанов, С.В. Титова // Пробл. особо опасных инф. – 2018. – № 3. – С.73-77.

28 Monakhova, E.V. Genetic diversity of Russian *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolates from diarrheal patients / E.V. Monakhova, **I.V. Arkhangel'skaya**, N.B. Nepomnyaschaya, G.V. Demidova, R.V. Pisanov // Abstract book of US-Japan 53rd Year Joint Panel Conference on Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. – Hanoi (Vietnam), 2019. – P.109.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

МЖК с ЦПВ – музей живых культур с центром патогенных вибрионов, м.к. – микробная клетка, МПК – минимальная подавляющая концентрация, НАГ-вибрионы – холерные вибрионы неО1/неО139 серогрупп, ОКИ – острые кишечные инфекции, ООС – объекты окружающей среды, ПЦР – полимеразная цепная реакция, Cef – CHO cell elongaion factor, ChxA – cholix токсин, CT – холерный токсин, HlyA – гемолизин, MARTX – многофункциональный самопроцессирующийся цитотоксин, NanH – нейраминидаза, OMPs – outer membrane proteins (белки наружной мембраны), ORF – open reading frame (открытая рамка считывания), SXT/ICE – интегративные конъюгативные элементы, SNP – single nucleotide polymorphism (однонуклеотидный полиморфизм), T3SS и T6SS – контакт-зависимые системы секреции третьего и шестого типов, TCP – токсинкоррегулируемые пили адгезии, UPGMA – Unweighted Pair-Group Method using Arithmetic averages (попарное невзвешенное кластирование с арифметическим усреднением), VPI – *Vibrio* Pathogenicity Island (остров патогенности).