

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ СЕРОВАРОВ LEPTOSPIRA МЕТОДОМ MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

<sup>1</sup>НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, С.-Петербург, <sup>2</sup>Первый С.-Петербургский государственный медицинский университет им. И.П.Павлова

**Цель.** Попытка использования метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации изолятов лептоспир на уровне сероваров. **Материалы и методы.** В исследование были включены 8 референсных штаммов *Leptospira* spp. и 11 штаммов лептоспир, выделенных от больных лептоспирозом и инфицированных животных в Северо-Западном регионе России. Масс-спектры всех исследуемых штаммов получали прямым профилированием клеточных экстрактов. Созданные главные спектральные профили (MSP) референсных штаммов использовали для идентификации изолятов. Оценку идентификации осуществляли путем вычисления коэффициентов совпадения отдельных спектров каждого изолята с MSP всех референсных штаммов. **Результаты.** Результаты идентификации показали схожесть спектров изолятов, относящихся к серогруппам *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* и *Canicola*, с MSP сапрофитного штамма *L. biflexa* Patoc I. Предполагается, что спектры исследуемых штаммов содержали в своем составе пики полисахаридных O-антигенов. При этом максимальные средние значения коэффициентов совпадения между спектрами изолятов и MSP патогенных референсных штаммов лептоспир правильно совпадали с типом серовара изолята. **Заключение.** Дальнейшие расширенные исследования могут быть положены в основу разработки быстрого и простого метода типирования возбудителей лептоспироза на уровне сероваров с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 42—49

Ключевые слова: *Leptospira* spp., серотипирование, серовары, MALDI-TOF масс-спектрометрия

Е.В.Зуева<sup>1</sup>, Н.А.Стоянова<sup>1</sup>, Н.К.Токаревич<sup>1</sup>, Арег А.Тотолян<sup>1,2</sup>

## IDENTIFICATION OF LEPTOSPIRA SEROVARS BY MALDI-TOF MASS-SPECTROMETRY

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, <sup>2</sup>Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Russia

**Aim.** An attempt to use MALDI-TOF mass-spectrometry method for identification of leptospiral isolates on the serovar level. **Materials and methods.** 8 reference *Leptospira* spp. and 11 leptospira strains isolated from leptospiral patients and infected animals in the North-Western region of Russia were included into the study. Mass-spectra of all the studied strains were obtained by direct profiling of cell extracts. The created main spectral profiles (MSP) of reference strains were used for identification of isolates. Evaluation of identification was carried out by calculating coefficients of matching rate of separate spectra of each isolate with MSP of all the reference strains. **Results.** Results of identification have shown the similarity of spectra of isolates belonging to *Pomona*, *Icterohaemorrhagiae* and *Canicola* serogroups, with MSP of saprophyte strain *L. biflexa* Patoc I. It is assumed that spectra of the studied strains contained peaks of polysaccharide O-antigens. Wherein maximum mean values of matching rate coefficients between spectra of isolates and MSP of pathogenic reference strains of leptospira correctly matched serovar type of the isolate. **Conclusion.** Further extended studies may form the base of development of a simple and rapid method of typing of leptospirosis causative agents on the level of serovars using MALDI-TOF mass-spectrometry.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2017, No. 1, P. 42—49

Key words: *Leptospira* spp., serotyping, serovars, MALDI-TOF mass-spectrometry

## ВВЕДЕНИЕ

Лептоспироз — зоонозное бактериальное заболевание, наиболее распространенное в районах с высоким уровнем осадков и теплым климатом. Ежегодно лептоспирозом заболевают около одного миллиона человек и регистрируется до 60 000 смертей среди населения планеты. При этом наибольшая заболеваемость и летальность отмечаются в самых бедных регионах мира, а также в местах, где санитарно-эпидемиологический надзор осуществляется не на должном уровне [12]. Согласно данным глобальных исследований Международного общества по лептоспирозу, ежегодно регистрируется 350 000 — 500 000 тяжелых случаев течения заболевания [9]. Эти оценки свидетельствуют о значимости лептоспироза как одного из ведущих зоонозных заболеваний. Ожидается, что в ближайшие десятилетия лептоспироз станет важной эпидемиологической проблемой в связи с изменениями климата и демографии нашей планеты. Факторами риска повышения заболеваемости лептоспирозом могут стать глобальное потепление, частые экстремальные климатические явления, урбанизация, миграция [14].

Возбудителями лептоспироза являются бактерии рода *Leptospira*, принадлежащие к самостоятельному семейству *Leptospiraceae* в порядке *Spirochaetales*. Генетическая классификация, основанная на методе ДНК-ДНК гибридизации, насчитывает 21 вид лептоспир [18], которые можно разделить на три эволюционные ветви: 1) патогенные виды, 2) промежуточные, которые являются патогенно-подобными видами, 3) сапрофиты [Picardeau M., 2014]. Согласно традиционной серологической классификации, основанной на структурной неоднородности полисахаридных О-антигенов, входящих в состав липополисахаридов (ЛПС) клеточной мембраны грамотрицательных бактерий, представители рода лептоспир подразделяются более чем на 300 сероваров, которые сгруппированы в 29 серогрупп в соответствии с антигенным родством [11, 16].

Лептоспироз имеет широкое географическое распределение из-за большого спектра млекопитающих (грызуны, домашние и сельскохозяйственные животные), являющихся хозяевами инфекционного агента и выделяющих его с мочой в окружающую среду. Распространение различных сероваров лептоспир связано с одним или несколькими хозяевами, которые служат в качестве резервуара инфекции. Например, крысы служат в качестве резервуара для сероваров *icterohaemorrhagiae*, в то время как собаки, чаще всего, могут быть источником серовара *canicola*. [1, 6, 19]. В России наибольшее эпидемиологическое значение имеют возбудители серовариантов *icterohaemorrhagiae*, *sopenhageni*, *canicola*, *grippotyphosa*, *romona*, *tarassovi*, *sejroe* [2, 6], относящиеся к трем геномным видам: *L. interrogans*, *L. kirschneri*, *L. borgpetersenii*. Таким образом, идентификация штаммов лептоспир, выделенных от больных и инфицированных животных, на уровне сероваров и серогрупп важна для решения эпидемиологических задач и понимания распространенности лептоспир в различных регионах.

В настоящее время таксономическое типирование подвидов лептоспир базируется на классических серологических методах, таких как реакция микроскопической агглютинации (РМА) для определения серогруппы и тест-перекрестной агглютинации-абсорбции для идентификации сероваров. Серотипирование изолятов лептоспир является сложной процедурой, которая

может быть выполнена только в референсных центрах. По этой причине в качестве альтернативы были предложены различные молекулярно-генетические методы [9], среди которых наиболее часто используемыми являются секвенирование гена 16S рибосомальной РНК и мультилокусное секвенирование-типирование. Эти методы генотипирования позволяют дифференцировать лептоспир на уровне видов и в настоящее время используются преимущественно в качестве инструмента популяционного филогенетического анализа для более глубокого понимания эволюции лептоспир [5, 8, 10, 15, 20].

Таким образом, серотипирование лептоспир до сих пор остается чрезвычайно ценным инструментом эпидемиологических исследований, который нуждается в новых подходах к их идентификации и простых в исполнении современных методах типирования штаммов лептоспир на уровне сероваров.

В последнее десятилетие для идентификации бактерий и грибов стал использоваться метод матрикс-активированной лазерной десорбции/ионизации времяпролетной (MALDI-TOF) масс-спектрометрии. Появились единичные литературные данные, свидетельствующие о том, что MALDI-TOF масс-спектрометрия может быть быстрым и надежным методом идентификации лептоспир путем создания библиотеки спектров [3, 13]. Кроме того, показано, что масс-спектрометрия позволяет идентифицировать штаммы лептоспир на уровне видов аналогично методам секвенирования [18], определена возможность применение этого метода для категоризации штаммов лептоспир на патогенные и непатогенные группы [21], а также для лабораторного контроля пересева эталонных штаммов *Leptospira*, используемых в РМА [4].

Цель данной работы — попытка применения метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации штаммов *Leptospira*, выделенных от больных лептоспирозом людей и инфицированных животных, на уровне сероваров с использованием подхода построения библиотеки эталонных спектров.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

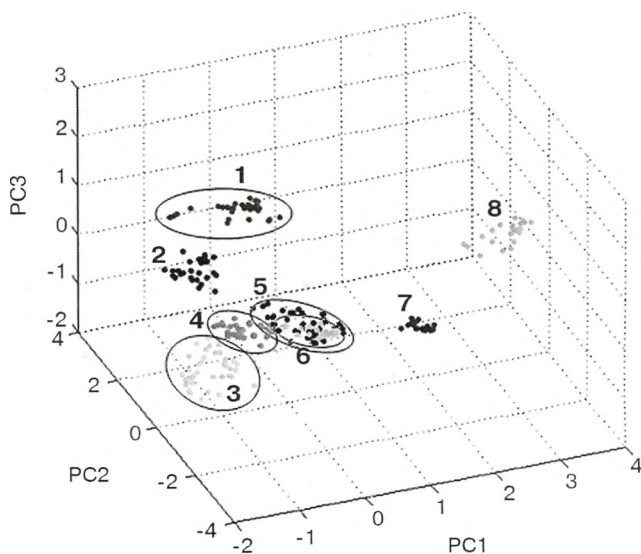
В исследовании использовали набор референсных штаммов *Leptospira* spp., применяемый в РМА, включающий 4 штамма вида *L. interrogans*, 1 штамм вида *L. borgpetersenii*, 2 штамма вида *L. kirschneri* и 1 сапрофитный штамм *L. biflexa*, а также 11 штаммов лептоспир, выделенных в Северо-Западном регионе России. Все исследуемые штаммы были из коллекции С.-Петербургского НИИ им. Пастера. Предварительная характеристика изолятов была проведена на уровне определения серогруппы методом РМА и сероваров методом перекрестной агглютинации-абсорбции. Три штамма исследуемых изолятов относились к серогруппе Pomona (серовары *mozdoc* и *pomona*), два штамма — к серогруппе Icterohaemorrhagiae (серовары *copenhageni*), два штамма — к серогруппе Canicola, два штамма — к серогруппе Grippotyphosa и два штамма — к серогруппе Tarassovi. Референсные штаммы и штаммы изолятов культивировали в течение 14 дней в фосфатно-сывороточной среде Терских при 28°C. Масс-спектры клеточных экстрактов были получены на масс-спектрометре «Microflex RLF» (Bruker Daltonics, Германия) с использованием в качестве калибратора бактериального тест-стандарта (Bruker Daltonics, Германия). Эталонные спектры 8 референсных штаммов получены путем объединения не менее 15 отдельных спектров каждого штамма в главный спектральный профиль (MSP). Кластерный анализ спектров осуществляли

методом главных компонент и путем построения MSP дендрограммы с помощью программного обеспечения «Biotyper 3.1» (Bruker Daltonics). Оценка идентификации 11 штаммов *Leptospira*, выделенных от людей и инфицированных животных, осуществлялась путем вычисления коэффициентов совпадения не менее 6 отдельных спектров каждого изолята со всеми эталонными спектрами. Результаты сравнительной идентификации обрабатывали с использованием программы GraphPad Prism v.6.0. Различия между коэффициентами совпадения спектров изолятов с референсными штаммами оценивали однофакторным дисперсионным анализом ANOVA методом множественного сравнения с использованием критерия Даннета при  $\alpha = 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для создания библиотеки эталонных масс-спектров был проведен масс-спектрометрический анализ семи хорошо охарактеризованных патогенных референсных штаммов *Leptospira* spp., входящих в диагностический набор для постановки РМА, и одного непатогенного штамма Patoc I. Оценка отдельных спектров, включенных в состав эталонного спектра каждого референсного штамма, проведенная с помощью кластерного анализа методом главных компонент (рис. 1), показала четкое разделение отдельных спектров на кластеры согласно соответствующим сероварам. Визуализация результатов анализа представлена в виде 3-мерного графика, в котором система координат (основные компоненты) отражает линейную комбинацию коэффициентов корреляции Тау-Кендалла между множеством значений интенсивности пиков в спектрах. Как видно на рис. 1, отдельные спектры каждого референсного штамма, представленные в виде точек, имели близкие коэффициенты корреляции и группировались в кластеры согласно соответствующим сероварам. При этом спектры сероваров pomona, copenhageni, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa и tarassovi давали четкое разделение на однородные кластеры. В то же время, спектры сероваров patoc, canicola и mozdoc, хотя и образовывали отдельные кластеры, но коэффициенты корреляции между их пиками не имели достаточного различия для удовлетворительного визуального расхождения их кластеров.

Для определения сход-



**Рис. 1.** Анализ масс-спектров референсных штаммов *Leptospira* spp. методом главных компонент.

Значения по осям координат соответствуют коэффициентам корреляции Тау-Кендалла между спектрами. Кластеры: 1 — *L.interrogans* copenhageni st. M20, 2 — *L.interrogans* icterohaemorrhagiae st. RGA, 3 — *L.interrogans* pomona st. Pomona, 4 — *L.biflexa* patoc st. Patoc I, 5 — *L.kirschneri* mozdoc st. 5621, 6 — *L.interrogans* canicola st. Hond Utrecht IV, 7 — *L.kirschneri* grippotyphosa st. Moskva V, 8 — *L.borgpetersenii* tarassovi st. Perepelitsin.

ства и таксономического родства между референсными штаммами и исследуемыми изолятами *Leptospira* spp. был проведен анализ их главных спектральных профилей с помощью построения дендрограммы (рис. 2), представляющей собой иерархию всех 18 штаммов. Видно, что профили всех штаммов группировались в три подгруппы, дистанция между которыми, обозначенная пунктирными линиями, составляла около 130, 160 и 220 арбитральных единиц. При этом подгруппа I включала штаммы, относящиеся к серогруппе Tarassovi, подгруппа II включала штаммы серогруппы Grippotyphosa. Подгруппа III содержала профили штаммов серогрупп Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola, а также непатогенного штамма Patoc I.

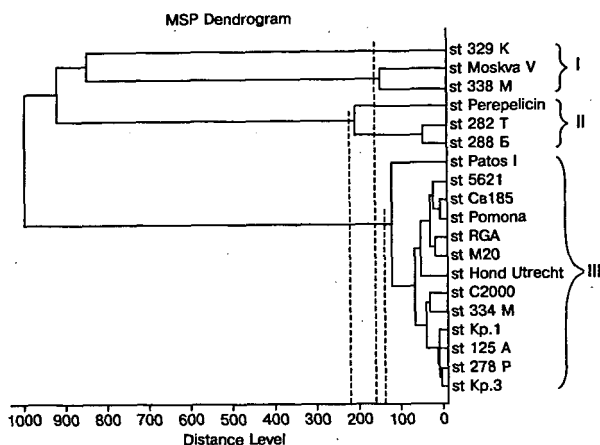


Рис. 2. Иерархическая кластеризация спектров референсных штаммов и изолятов *Leptospira*. Ось абсцисс — расстояние с баллами значений меры близости (расстояние Евклида) между спектральными профилями. Произвольные вертикальные пунктирные линии обозначают отсечение значений подобия между кластерами.

При идентификации изолятов лептоспир для каждого исследуемого штамма был назначен контрольный эталонный спектр серовара, на уровне которого изолят был предварительно серотипирован. Из представленных в табл. результатов видно, что для всех изолятов при сопоставлении их спектров с

#### Результаты идентификации изолятов лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии

Серогр. изолята (РМА)	Штамм изолята	Среднее значение (M) коэффициента совпадения изолята с MSP контрольного серовара и отличие от него средних значений коэффициентов совпадения изолята с сероварами референсных штаммов							
		pomona	mozd.	patoc	canicola	copenh.	ictero.	grippot.	tarass.
Ictero.	346A	0,15	0,34	-0,08	0,08	M=2,2	0,04	0,56*	1,30***
Ictero.	278P	0,32	0,53	0,12	0,21	M=2,3	0,16	1,09**	1,46***
Canicol.	C2000	0,13	0,39*	0,04	M=2,1	0,40*	0,23	0,42*	0,84***
Canicol.	M480	1,6***	0,09	0,15	M=2,4	0,13	0,38	0,23	2,0***
Pomona	Св185	M=2,7	0,50**	0,27	0,57**	0,49*	0,63***	0,93***	0,85***
Pomona	Кр1	0,67***	M=2,3	-0,07	0,21	0,50**	0,30	0,38*	0,88***
Pomona	Кр3	0,66*	M=2,3	-0,06	0,25	0,66*	0,13	0,52*	1,64***
Grippot.	338M	0,15	0,52**	0,19	0,41*	0,27	0,39*	M=2,1	0,65**
Grippot.	329K	0,77***	0,48**	0,31*	0,66***	0,47**	0,95***	M=2,3	1,10***
Tarass.	288Б	0,55	0,79**	1,4***	0,94***	0,89**	0,91***	1,15***	M=2,2
Tarass.	282Т	1,1*8	1,11*	1,20**	0,83	1,57***	1,21**	1,47**	M=2,0

Примечание. \*P<0,05; \*\*P<0,01; \*\*\*P<0,001 — уровень значимости различия коэффициентов совпадения согласно тесту множественного сравнения с применением критерия Даннета.

MSP патогенных референсных штаммов наиболее высокие баллы коэффициентов совпадения регистрировались у соответствующих контрольных сероваров. В то же время, при сопоставлении с сапрофитным штаммом Patoc I у изолятов 125A, Kp1 и Kp3 оценки совпадения с ним были немного более высокие, чем с соответствующими контрольными сероварами. Кроме того, не было достоверно значимого различия между оценками совпадения большинства изолятов с сапрофитом, за исключением изолятов, которые относились к серогруппам Tarassovi и Grippytyphosa. Наиболее достоверно значимые показатели классификации наблюдались у изолятов серогрупп Grippytyphosa, Pomona и Tarassovi, в то время как у изолятов серогрупп Canicola и Icterohaemorrhagiae статистически значимое различие было только с сероварами tarassovi и grippytyphosa.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Методы серотипирования, такие как РМА и тест перекрестной агглютинации-абсорбции, являются трудоемкими, требующими наличия и поддержания коллекции эталонных штаммов, а также панелей стандартных кроличьих сывороток, специфичных к различным серогруппам и сероварам лептоспир. Поскольку патогенные *Leptospira* spp. насчитывают более 250 сероваров [11], то к большинству из них соответствующие антисыворотки отсутствуют, что ограничивает возможности этих методов по типированию эпидемиологически важных штаммов. В то же время, несмотря на прогресс в области молекулярно-генетических исследований в последние десятилетия, методы генотипирования пока не позволяют идентифицировать лептоспиры на уровне сероваров.

Для определения возможности типирования лептоспир методом MALDI-TOF масс-спектрометрии был применен подход построения библиотеки эталонных спектров референсных штаммов *Leptospira* spp., относительно которых проведен сравнительный анализ спектров изолятов. Иерархия спектров всех исследуемых штаммов, представленная в виде дендрограммы, выявила дифференциацию их на три подгруппы, при этом две из них соответствовали серогруппам Tarassovi и Grippytyphosa. Третья подгруппа объединяла штаммы сразу нескольких серогрупп, включая и сапрофитный штамм Patoc I. Небольшое различие в баллах Евклидова расстояния между профилями спектров в этом кластере свидетельствует о значительной мере близости между патогенными штаммами серогрупп Pomona, Icterohaemorrhagiae, Canicola и непатогенным штаммом Patoc I. Эти результаты согласуются с хорошо известными данными о том, что сыворотки крови больных лептоспирозом имеют перекрестную реактивность в РМА с некоторыми сапрофитными штаммами [7, 20]. Доказано, что иммунологический перекрест этих сапрофитов с патогенными сероварами обусловлен сходством строения их ЛПС, что позволило использовать полисахаридный антиген *L. biflexa* Patoc I в производстве диагностических наборов для определения IgG и IgM к основным возбудителям лептоспироза [17].

Результаты идентификации десяти изолятов также показали отсутствие достоверно значимых различий между оценками совпадения большинства их с сапрофитным штаммом Patoc I. Полученные результаты схожести патогенных штаммов, относящиеся к серогруппам Pomona, Icterohaemorrhagiae и Canicola, с непатогенным штаммом Patoc I позволили предположить, что как исследуемые спектры изолятов, так и эталонные спектры референсных штаммов содержат в своем составе пики не только белков, но и полисахаридных

О-антигенов, структурное различие которых обуславливает серологическую специфичность. По-видимому, присутствие в спектрах полисахаридных пиков обусловило получение максимальных значений коэффициентов совпадения изолятов с эталонными спектрами соответствующих сероваров патогенных штаммов, на уровне которых изоляты были серотипированы, и в целом позволило правильно идентифицировать изоляты согласно их серологической классификации.

Дальнейшие исследования по созданию библиотеки эталонных спектров с включением в нее широкого набора референсных штаммов *Leptospira* spp., совершенствованию протокола масс-спектрометрии, а также проведение испытания на большом количестве образцов выделенных штаммов могут способствовать применению быстрого, простого в исполнении метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для идентификации возбудителей лептоспироза на уровне сероваров.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Ананьина Ю.В. Лептоспирозы в Российской Федерации: современные особенности эпидемического проявления природных и техногенных очагов. Ветеринарная патология 2004, 4: 54-57.
2. Ананьина Ю.В., Петров Е.М. Лептоспирозы в России: этиологическая структура и современная этиология. Пест-Менеджмент 2006, 1: 8-10.
3. Бренева Н.В., Афанасьев М.В., Шаракшанов М.Б. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ клеточных белков в идентификации представителей *Leptospira*. Журн. микробиол. 2014, 4: 36-43.
4. Зуева Е.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К., Тотолян Арег А. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ штаммов *Leptospira* spp., используемых в серодиагностике лептоспироза. Журн. микробиол. 2015, 6: 28-36.
5. Останкова Ю.В., Семенов А.В., Стоянова Н.А., Токаревич Н.К. и др. Типирование штаммов *Leptospira* spp. на основе 16S rRNA. Журн. микробиол. 2016, 1: 35-39.
6. Эпидемиология, диагностика и профилактика заболеваний лептоспирозами. Методические указания 3.1.1128-02. М., МЗ РФ, 2002.
7. Addamiano L, Babudieri B. Water strains of *Leptospira* in the serodiagnosis of human and animal leptospirosis. Bull. World Health Organ. 1968, 39: 925-934.
8. Ahmed A., Thaipadungpanit J., Boonsilp S. et al. Comparison of two multilocus sequence based genotyping schemes for *Leptospira* species. PLoS Negl. Trop. Dis. 2011, 5: e1374.
9. Ahmed A., Grobusch M.P., Klatser P.R., Hartskeerl R.A. Molecular approaches in the detection and characterization of *Leptospira*. J. Bacteriol. Parasitol. 2012, 3: 1000133.
10. Boonsilp S., Thaipadungpanit J., Amornchai P. et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species. PLoS Negl. Trop. Dis. 2013, 7 (1): e1954.
11. Cerqueira G.M., Picardeau M. A century of *Leptospira* strain typing. Infect. Genet. Evol. 2009, 9: 760-768.
12. Costa F., Hagan J. E., Calcagno J. et al. Global morbidity and mortality of leptospirosis: A systematic review. PLoS Negl. Trop. Dis. 2015, 9: e0003898.
13. Djelouadji Z., Roux V., Raoult D. et al. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry identification of *Leptospira* organisms. Vet. Microbiol. 2012, 6: 142-146.
14. Lau C.L., Smythe L.D., Craig S.B., Weinstein P. Climate change, flooding, urbanisation and leptospirosis: fuelling the fire? Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2010b, 104: 631-638.
15. Leon A., Pronost S., Fortier G. et al. Multilocus sequence analysis for typing *Leptospira* interrogans and *Leptospira kirschneri*. J. Clin. Microbiol. 2010, 48 (2): 581-585.
16. Levett P.N. Leptospirosis. Clin. Microbiol. Rev. 2001, 14: 296-326.
17. Matsuo K., Isogai E., Araki Y. Control of immunologically crossreactive leptospiral infection by administration of lipopolysaccharides from a nonpathogenic strain of *Leptospira biflexa*. Microbiol. Immunol. 2000, 44: 887-890.

18. Rettinger A., Krupka I., Grünwald K. et al. *Leptospira* spp. strain identification by MALDI TOF MS is an equivalent tool to 16S rRNA gene sequencing and multi locus sequence typing (MLST). *BMC Microbiology* 2012, 12: 185.
19. Stoyanova N., Tokarevich N., Gracheva L. et al. Leptospirosis in North-West Russia. *EpiNorth*. 2004, 2: 29–32.
20. Voronina O.L., Kunda M.S., Aksenova E.I. et al. The characteristics of ubiquitous and unique *Leptospira* strains from the collection of Russian centre for leptospirosis. *BioMed Res. Int.* 2014: 649034.
21. Xiao D., Zhang C., Zhang H. et al. A novel approach for differentiating pathogenic and non-pathogenic *Leptospira* based on molecular fingerprinting. *J. Proteomics*. 2015, 119: 1–9.

Поступила 25.08.16

Контактная информация: Зуева Елена Викторовна, к.б.н.,  
197101, С.-Петербург, ул. Мира, 14, р.т. (812)232-31-55

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

*И.В.Савельева*<sup>1</sup>, *С.Н.Тихонов*<sup>2</sup>, *В.Н.Савельев*<sup>1</sup>, *Д.А.Ковалев*<sup>1</sup>, *С.В.Писаренко*<sup>1</sup>,  
*Е.С.Котенев*<sup>1</sup>, *Б.В.Бабеншев*<sup>1</sup>, *Л.С.Зинич*<sup>2</sup>, *Н.Н.Пидченко*<sup>2</sup>, *А.Н.Куличенко*<sup>1</sup>

## **РЕТРОСПЕКТИВНЫЙ АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ, ВЫДЕЛЕННЫХ В УКРАИНЕ В 1994 — 2011 ГГ.**

<sup>1</sup>Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт, <sup>2</sup>Противочумная станция Республики Крым, Симферополь

*Цель.* Ретроспективный анализ биологических и молекулярно-генетических свойств штаммов возбудителя холеры, выделенных в период эпидемий в Украине в 1994 — 2011 гг. *Материалы и методы.* С помощью традиционных бактериологических и генетических методов исследованы фенотипические и молекулярно-генетические свойства 5 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, выделенных от больных холерой, и 4 штамма — из объектов окружающей среды. Детекцию ДНК генов токсигенности и генов, присущих биовару Эль Тор или классическому, осуществляли методом ПЦР с использованием набора реагентов: «АмплиСенс-Vibrio cholerae FRT» и «Гены *Vibrio cholerae* ctxB-rstR-rstC, РЭФ» (экспериментальная тест-система). Секвенирование геномов 4 штаммов возбудителя холеры осуществляли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine. *Результаты.* Штаммы холерных вибрионов, идентифицированные в Украине в 1994 и 2011 гг. как типичный токсигенный биовар Эль Тор (*V.cholerae* O1, El Tor, Ogawa, Hly-, ctxA<sup>+</sup>, trxA<sup>+</sup>), содержат в своем геноме гены классического холерного вибриона и являются генетически измененными (гибридными) вариантами холерного вибриона биовара Эль Тор, продуцирующими энтеротоксин СТ1 и обладающими повышенной вирулентностью, что клинически выразилось в преобладании тяжелых форм течения холеры в Мариуполе Донецкой области в 2011 г. Геномные последовательности четырех исследуемых штаммов депонированы в международную базу данных DDBJ/EMBL/GenBank. *Заключение.* По результатам сравнения геномных последовательностей исследуемых штаммов с геномами штаммов *V. cholerae* из международной базы данных GenBank установлено, что исследуемые изоляты входят в клад штаммов, ассоциируемых со вспышками холеры на Гаити и на Азиатском континенте, откуда в 2010 г. генетически измененные штаммы холерных вибрионов биовара Эль Тор были завезены на Гаити.

Журн. микробиол., 2017, № 1, С. 49—55

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, холера, ПЦР, гентипирование, гибридные варианты биовара Эль Тор