

УДК 579.841.11:577.21:616.932.1(574)

Original Article

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОГО РОДСТВА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИЯХ ЗАПАДНО-КАЗАХСТАНСКОЙ, МАНГИСТАУСКОЙ И ТУРКЕСТАНСКОЙ ОБЛАСТЕЙ КАЗАХСТАНА**Кульбаева М.М.¹, Мусагалиева Р.С.¹, Жумадилова З.Б.¹, Токмурзиева Г.Ж.¹, Изекенова А.К.², Тойжанов Б.К.¹, Бегимбаева Э.Ж.¹, Утепова И.Б.¹, Абдел З.Ж.¹, Отебай Д.М.^{1*}**¹ТОО «Национальный научный центр особо опасных инфекций» АО НХ «QazBioPharm» МЗ РК, ул Жахангер 14, Алматы, 050054, Республика Казахстан²НАО «Казахский Национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова» МЗ РК, ул Толе Би 94, Алматы, 050006, Республика Казахстан

*Автор для корреспонденции: dimash12.95@mail.ru

АБСТРАКТ

Холера – это острая антропонозная инфекция, вызываемая бактерией *Vibrio cholerae*, характеризующаяся тяжёлой диареей и дегидратацией. Несмотря на прогресс санитарно-эпидемиологических мер, заболевание сохраняет глобальную значимость, особенно в странах Азии и Африки. В Казахстане возбудитель периодически выявляется в водоемах и сточных водах, что требует постоянного молекулярно-генетического мониторинга. В исследование включены 33 штамма *V. cholerae*, выделенные в Западно-Казахстанской, Мангистауской и Туркестанской областях Республики Казахстан. Фенотипическая и биохимическая идентификация проведена с использованием автоматизированной системы VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, США), точность составила 97,0 %. Целью работы являлось проведение сравнительного филогенетического анализа на основе секвенирования участка гена 16S рРНК и построения филогенетических деревьев методом Neighbor-Joining в программе MEGA 7.0. Результаты показали высокую степень нуклеотидной идентичности между штаммами (99,3-100,0 %), что указывает на генетическую консервативность и длительную циркуляцию клонально родственных линий биовара El Tor на территории Казахстана. Филогенетический анализ выявил две стабильные кластеры (А и В), отражающие ограниченную внутривидовую вариабельность без выраженной региональной дифференциации. Сделан вывод о том, что анализ фрагмента 16S рРНК целесообразен для первичной идентификации *V. cholerae*, однако для уточнения эпидемиологических связей и оценки генетического разнообразия необходимы методы с более высоким разрешением – MLST, MLVA или WGS.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, штамм, VITEK, генотип, филогенез, анализ.**ВВЕДЕНИЕ**

Холера остаётся одной из наиболее изученных и актуальных водных инфекций, продолжающей представлять угрозу для общественного здравоохранения. Возбудитель – *Vibrio cholerae*, грамотрицательная факультативно-анаэробная бактерия, устойчиво сохраняющаяся в водных экосистемах и формирующая природные резервуары [1]. Эпидемически значимыми считаются серогруппы O1 и O139, тогда как биовар El Tor является доминирующим возбудителем седьмой пандемии [2, 3]. С появлением методов молекулярной эпидемиологии стало возможным проводить глубокий анализ филогенетических взаимосвязей между штаммами *V. cholerae* [4, 5]. Генетические маркеры, такие как *ctxA*, *tcpA*, *toxR*, интегроны и IS-элементы (IS1004), используются для оценки эволюционного родства и пандемического потенциала штаммов [6-8].

Исследования последних лет показали, что современные El Tor-штаммы обладают высокой генетической стабильностью, но при этом демонстрируют ограниченную дифференцирующую способность при анализе консервативных локусов – например, гена 16S рРНК [9, 10]. Для уточнения эволюционных и эпидемиологических связей широко применяются MLST-, MLVA- и WGS-подходы [11-13].

В странах Центральной Азии, включая Казахстан, циркуляция *V. cholerae* в природных водоёмах подтверждается рядом наблюдений, однако сведения о филогенетической структуре и генетическом разнообразии штаммов

крайне ограничены [14, 15]. В публикациях Сагиева и соавт. [16] и Утеповой и соавт. [17] показано, что казахстанские штаммы принадлежат к биовару El Tor. Тем не менее, филогенетические взаимосвязи этих изолятов с глобальными линиями остаются недостаточно изученными.

Штаммы *V. cholerae* содержат генетическую систему интегрон, который находится в хромосоме и включает элементы акцизных ДНК, вызываемых мобильной кассетой генов (контроллеров MGCS) путем сайт-специфической рекомбинации. Большие массивы MGCS найдены в штаммах холерного вибриона. Например, *V. cholerae* O1 El Tor N 1 содержит 179 MGCS [18, 19]. Результаты показали, что определенный состав MGCS в пандемических штаммах сохраняется, являясь доказательством происхождения штаммов от общего предка. Сравнение MGCS состава между пандемическими штаммами холерных вибрионов также показало возможность определения эволюции O139 из серогрупп O1 El Tor [20].

Выражение вирулентности вибриона холеры зависит от ряда горизонтально приобретенных генетических элементов. Из них 2 фактора вирулентности (*ctx*) и (*tcp*) в значительной степени взаимосвязаны, и, прежде всего, ответственны за токсигенность и проявление заболеваемости. Два горизонтальных генетических элемента приобрели генетический элемент *ctx*, содержащий ген *ctxAB* и участок патогенности (VPI) вибриона Vpi-1, который кодирует *tcp* и другие белки. Организация и функция этих горизонтальных приобретенных групп генов спо-

собствуют проявлению токсигенности *V. cholerae* [21, 22].

Генетический элемент IS1004 используется для генотипирования штаммов холерного вибриона. IS1004 элемент включает 628 bp. и содержит открытую рамку считывания, продукт которого показывает высокую степень идентичности с последовательностью генетического элемента IS200. IS1004 присутствует в геноме от одного до восьми экземпляров в большинстве штаммов холерного вибриона. С помощью генетического элемента IS1004 дано определение 2 биоваров холерного вибриона. Данное исследование обращает внимание на важность генотипических методов для дифференциации холерных штаммов с эпидемическим потенциалом [23, 24].

Установлено, что с 1990 по 2003 г. преобладали штаммы *V. cholerae* O1 с VNTR-генотипами, относящиеся к кластеру B: *V. cholerae* O1 (B3-B19) – ответственные за эпидемию и вспышки холеры в Республике Дагестан РФ (1994, 1998) и *V. cholerae* O1 (B2, B20-B22) – за вспышки и спорадические случаи холеры в Ростовской обл. РФ (1990, 1992), выделенные из объектов окружающей среды на фоне отсутствия регистрации больных холерой. [25].

В связи с этим целью данного исследования являлось проведение сравнительного филогенетического анализа штаммов *V. cholerae*, выделенных из различных регионов Казахстана (**Мангыстауской**, Западно-Казахстанской и **Туркестанской областей**), для оценки внутривидового родства и определения возможных эволюционных кластеров, сопоставимых с известными пандемическими линиями.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы и метаданные

В исследование включены 33 штаммов *V. cholerae*, выделенных в 1995-2016 гг. из объектов окружающей среды (поверхностные и сточные воды, рекреационные сооружения) и от людей в трёх областях Республики Казахстан: Западно-Казахстанская (ЗКО) (n=6), Мангыстауская (n=9) и Туркестанская (n=18), полученные из рабочей коллекции и депозитария ТОО «Национальный научный центр особо опасных инфекций имени Масгута Айкимбаева» МЗ РК (ННЦООИ). Для филогенетического секвенирования было отобрано репрезентативные штаммы с разными годами и источниками выделения. Критериями включения были: типичность биохимических признаков для *V. cholerae*, положительная оксидазная реакция, принадлежность к I группе Хейберга и наличие эпидемиологически значимых метаданных (год, место и объект выделения). Отбор и транспортировка проб выполнялись в соответствии с «Методическими указаниями по профилактике заноса и распространения холеры...» (утв. 27.09.2010 г. за № 253) и Приказом МЗ РК за № 252 от 27.09.2010 г. [26-28].

Микробиологическая и фенотипическая характеристика изолятов

Изоляты *V. cholerae* были получены из различных природных и клинических источников, включая поверхностные и сточные воды, донные отложения и образцы биоматериала, собранные в Туркестанской, Мангыстауской и

Западно-Казахстанской областях. Первичное выделение проводили на щелочном агаре (производства ННЦООИ, серия 2 и 3, от 04.2024 г.) и щелочном пептонном бульоне (pH 8,4) с последующим пересевом на мясо - пептонный агар (МПА). Инкубация осуществлялась при 37 °C в течение 18-24 часов. Морфологические свойства изучали методом микроскопии нативных и окрашенных препаратов. Окраску по Грамму проводили стандартным методом; подвижность оценивали в висячей капле. Изучение фенотипических свойств штаммов проводились обычными стандартными методами. Серогрупповую принадлежность определяли с помощью агглютинирующих диагностических сывороток против O1 и O139 антигенов (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в реакции агглютинации на стекле по общепринятой методике [27, 29].

Биохимическая идентификация штаммов

Таксономическая идентификация штаммов *V. cholerae* проводилась с использованием автоматизированной системы VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, USA), предназначенной для экспресс-идентификации микроорганизмов на основе оценки комплекса биохимических признаков. Для исследования использовались тест-карты типа GN (Gram-negative identification card), включающие более 40 субстратов, позволяющих оценить ферментативную активность, способность к ферментации углеводов, декарбоксилированию аминокислот и росту при различных концентрациях NaCl.

Приготовление суспензии осуществлялось согласно инструкции производителя: колонии 18-24-часовой культуры переносили в 0,45 % физиологический раствор до плотности 0,5 ед. по McFarland (прибор DensiChek Plus). После загрузки инокулята карты инкубировались при 35 ± 1 °C в течение 8–12 ч в автоматическом режиме. Система VITEK 2 автоматически регистрировала метаболическую активность по оптической плотности и сравнивала результаты с базой данных VITEK GN, формируя вероятностный индекс идентификации. Для каждого изолята определяли положительные, отрицательные и неопределённые реакции по стандартной панели биохимических тестов (табл. 1). Таксономическая принадлежность к *Vibrio cholerae* подтверждалась при уровне вероятности не менее 95 % и оценке достоверности «отличная идентификация».

Молекулярно-генетические исследования

ДНК выделяли из суточных бактериальных культур, выращенных на щелочном агаре, стандартным методом с использованием коммерческих наборов для бактериальной ДНК (аналогичных используемым в наборе «Ампли-Сенс *V. cholerae*»), согласно инструкции производителя. Концентрацию и чистоту ДНК оценивали спектрофотометрически на NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США, A260/A280).

Для подтверждения видовой принадлежности и серогруппы использовали наборы и праймеры, применяемые в лаборатории холеры ННЦООИ: видоспецифический ген *ompA*; ген серогруппы *wbeN* (O1); ген серогруппы *wbfR* (O139); гены вирулентности *ctxA* и *tcpA*.

Аmplификацию проводили в объёме 25 мкл: 1× буфер, 2,0–2,5 mM MgCl₂, 200 мкМ каждого dNTP, 0,4 мкМ каж-

дого праймера, 1,25 ЕД Таq-полимеразы и 50–100 нг геномной ДНК. Типовой термопрофиль: 95 °С – 3 мин; 35 циклов: 95 °С – 30 с, 55–58 °С (в зависимости от праймеров) – 30 с, 72 °С – 45 с; финальная элонгация 72 °С – 5 мин. Продукты разделяли в 1,5% агарозном геле, визуализировали в УФ-свете. В каждую постановку вводили отрицательный контроль (H₂O) и положительные контроли: *V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1) и *V. cholerae* O139 MO-45, как и в исходном описании результатов [30].

Секвенирование и филогенетический анализ

Для филогенетического анализа амплифицировали участок гена 16S рРНК универсальными бактериальными праймерами 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') и 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') (или их лабораторными аналогами). Амплификация выполнялась в объёме 25 мкл с использованием набора DreamTaq Green PCR Master Mix (*Thermo Fisher Scientific, США*). Очистку амплификатов проводили ферментативным методом (ExoSAP-IT).

Секвенирование осуществляли по технологии Sanger в обоих направлениях на автоматическом секвенаторе Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (*Thermo Fisher Scientific, США*). Полученные хроматограммы всех 33 штаммов *Vibrio cholerae* редактировали и обрезали по качеству в программе Chromas v2.6.6 (*Technelysium Pty Ltd, Australia*). Консенсус-последовательности экспортировали в формат FASTA для последующей обработки.

Редактирование и сборка последовательностей выполнялись в BioEdit 7.2.5. Множественное выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили с использованием алгоритма ClustalW в пакете MEGA 7.0 [31] с параметрами: *Gap Opening Penalty* = 15, *Gap Extension Penalty* = 6.66, *Delay Divergent Cutoff* = 30 %. В качестве референсных последовательностей использованы штаммы *Vibrio cholerae* O1 El Tor, O139 и non-O1/non-O139 из базы GenBank (NCBI), включая референсный штамм N16961 (Acc. No. AE003852).

Филогенетическое дерево строили методом Neighbor-Joining (NJ) с использованием модели эволюции Tamura-Nei и 1000 bootstrap-репликаций в программе MEGA 7.0. Метод NJ выбран как оптимальный для анализа нуклеотидных данных без предположения о равномерной скорости эволюции между последовательностями. Визуализацию и аннотацию филогенетического дерева проводили в онлайн-сервисе Interactive Tree Of Life v6.7 (iTOL). Референтные последовательности обозначены серым цветом, а исследуемые изоляты из Казахстана — синим и зелёным, что соответствует выявленным кластерам А и В.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экологические предпосылки циркуляции *Vibrio cholerae*

Оценка природно-климатических условий трёх регионов Казахстана показала, что наиболее благоприятная среда для циркуляции холерного вибриона формируется в Туркестанской области. Здесь сочетание факторов – слабощелочная реакция водоёмов, среднегодовая температура выше 10 °С, высокая плотность населения, нали-

чие ирригационных и трансграничных водных систем – способствует устойчивому существованию *V. cholerae* в водной экосистеме. Западно-Казахстанская область (ЗКО) занимает второе место по степени экологической благоприятности. Водоёмы региона имеют рН 7,0–7,5 и гидрологическую связь с приграничными территориями, что также создаёт условия для длительной циркуляции возбудителя. В Мангистауской области, несмотря на схожие термогидрологические параметры и наличие солонатоводных акваторий, сравнительно низкая плотность населения ограничивает возможность активной антропогенной передачи инфекции.

Микробиологические и биохимические характеристики изолятов

В ходе исследования выделено 33 штамма *V. cholerae*. Все изоляты имели положительную оксидазную реакцию и относились к I группе по классификации Хейберга. Тесты на декарбоксилазную активность на средах Мёллера показали, что штаммы декарбоксилируют лизин и орнитин, но не аргинин, что полностью соответствует биохимическим свойствам типичных представителей *V. cholerae* O1 El Tor.

В результате исследований выделено 33 штамма *Vibrio cholerae* из природных и клинических источников трёх регионов Казахстана. Микроскопически все изоляты представляли собой тонкие изогнутые граммотрицательные палочки, активно подвижные, не образующие спор и капсул, с одним полярным жгутиком.

На питательных средах отмечены типичные культуральные признаки: на TCBS агаре – желтые колонии диаметром 2-3 мм, свидетельствующие о ферментации сахарозы; на щелочном пептонном бульоне – рост в виде поверхностной плёнки; в МПБ – равномерное помутнение. Все штаммы давали положительную реакцию на оксидазу и отрицательную на каталазу, что подтверждает принадлежность к роду *Vibrio*.

Автоматизированный анализ на системе VITEK 2 Compact 30 показал, что биохимические профили всех 33 штаммов были практически идентичны. Зафиксированы положительные реакции на β-галактозидазу (ONPG), ферментацию глюкозы, маннита и сахарозы, декарбоксилазную активность по лизину и орнитину, а также толерантность к 6 % NaCl. Отрицательные результаты получены по уреазе, H₂S и гидролизу эскулина. Степень достоверности идентификации составила 97%, что соответствует категории «отличная идентификация».

Серологическое исследование показало, что 28 из 33 штаммов (84,8 %) принадлежат к серогруппе O1 El Tor, а 5 штаммов (15,2 %) – к группе non-O1/non-O139.

В целом фенотипические и биохимические свойства исследованных изолятов полностью соответствуют описанным в международных руководствах характеристикам вида *V. cholerae* O1 El Tor, что подтверждает стабильность и воспроизводимость его популяционных признаков в природных очагах Казахстана.

Молекулярно-генетические особенности изолятов (редакция с аннотациями)

Для молекулярно-генетического анализа было отобрано 33 изолята *V. cholerae*, в том числе 18 – из Тур-

кестанской области, 9 – из Мангистауской и 6 – из Западно-Казахстанской. Все образцы были закодированы и исследованы методом ПЦР с использованием праймеров к видам- и серогруппоспецифическим генам (*ompA*, *wbeN*, *wbfR*), а также генам вирулентности (*ctxA*, *tcpA*). Результаты подтверждены электрофорезом продуктов амплификации, что позволило провести сравнительный анализ серогрупповой принадлежности и токсигенности выделенных штаммов.

Серогрупповая принадлежность штаммов

Изучение молекулярно-генетических особенностей штаммов холерного вибриона необходимо для определения токсигенности и вирулентности штамма, что в свою очередь является важным звеном в эпидемиологическом мониторинге данной инфекции.

В настоящее время определено, что маркерами вирулентности являются ген *ctxA*, обеспечивающий синтез холерного токсина, и ген *tcpA*, обеспечивающий адгезию. Ген *toxR* поддерживает экспрессию генов *ctxA* и *tcpA*.

Всего для изучения молекулярно-генетических особенностей холерного вибриона было отобрано и исследовано 18 штаммов *V. cholerae*, выделенных от людей и из объектов окружающей среды ЮКО, 9 штаммов из Мангистауской области и 6 штаммов, выделенных в Западно-Казахстанской области (ЗКО).

Целью анализа было определить наличие у них серогруппоспецифических генов *ompA*, *wbeN* и *wbfR*, подтверждающих принадлежность к серогруппе O1. Все 33 штамма были закодированы для удобства при проведении ПЦР. Результаты амплификации представлены в таблице 1.

Как видно из данных таблицы, большинство выделенных штаммов относятся к серогруппе O1 El Tor. Доля токсигенных изолятов (наличие *ctxA* и *tcpA*) составила 39,4 %, что свидетельствует о сохранении циркуляции пато-

генных форм *V. cholerae* в природных очагах. Наибольшая распространённость токсигенных штаммов отмечена в Туркестанской области, что коррелирует с её благоприятными экологическими условиями.

На рисунке 1 представлены результаты гель электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных в Туркестанской области.

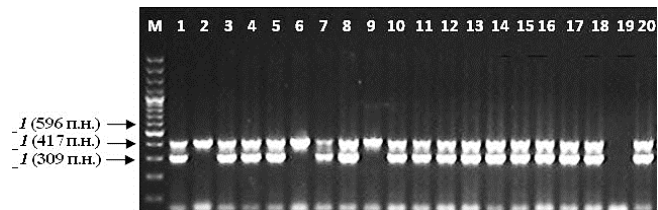


Рисунок 1 – Результаты электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1

El Tor, выделенных в Туркестанской области, где: М – маркер молекулярного веса; 1-18 – штаммы *V. cholerae* O1 El Tor; 19 – отрицательный контроль (вода); 20 – положительный контроль (*V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1)); 21 – положительный контроль (*V. cholerae* O139 MO-45)

Все изученные штаммы Туркестанской области обладали тремя целевыми генами, что подтверждает их принадлежность к серогруппе *V. cholerae* O1. Исключение составили изоляты № KZ-Tur-2, KZ-Tur-6 и KZ-Tur-9, у которых отсутствовал *wbeN*, – они отнесены к серогруппе *V. cholerae* non-O1.

На рисунке 2 показаны результаты электрофореза штаммов, выделенных в Мангистауской и Западно-Казахстанской областях. Анализ проводился аналогично предыдущему, с использованием тех же праймеров.

Из 15 штаммов Мангистауской и Западно-Казахстанской областей все имели гены *wbeN*, *ompA* и *wbfR*, за исключением изолята № KZ-MGT-9, у которого отсутствовал *wbeN*.

Таблица 1. Результаты ПЦР-анализа штаммов *V. cholerae* по регионам Казахстана

Область	Всего	<i>V. cholerae</i> O1 (<i>wbeN</i> +)	<i>V. cholerae</i> non-O1 (<i>wbeN</i> -)	<i>ctxA</i> ⁺	<i>tcpA</i> ⁺
Туркестанская	18	KZ-Tur-1, KZ-Tur-3, KZ-Tur-4, KZ-Tur-5, KZ-Tur-7, KZ-Tur-8, KZ-Tur-10, KZ-Tur-11, KZ-Tur-12, KZ-Tur-13, KZ-Tur-14, KZ-Tur-15, KZ-Tur-16, KZ-Tur-17, KZ-Tur-18	KZ-Tur-2, KZ-Tur-6, KZ-Tur-9	KZ-Tur-7, KZ-Tur-11, KZ-Tur-12, KZ-Tur-13, KZ-Tur-14, KZ-Tur-15, KZ-Tur-16, KZ-Tur-17, KZ-Tur-18	KZ-Tur-7, KZ-Tur-11, KZ-Tur-12, KZ-Tur-13, KZ-Tur-14, KZ-Tur-15, KZ-Tur-16, KZ-Tur-17, KZ-Tur-18
Мангистауская	9	KZ-Mgt-1, KZ-Mgt-2, KZ-Mgt-3, KZ-Mgt-4, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6, KZ-Mgt-7, KZ-Mgt-8	KZ-Mgt-9	KZ-Mgt-3, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6, KZ-Mgt-8	KZ-Mgt-2, KZ-Mgt-3, KZ-Mgt-4, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6, KZ-Mgt-8
Западно-Казахстанская	6	KZ-Wkr-1, KZ-Wkr-2, KZ-Wkr-3, KZ-Wkr-4, KZ-Wkr-5, KZ-Wkr-6	–	–	KZ-Wkr-2

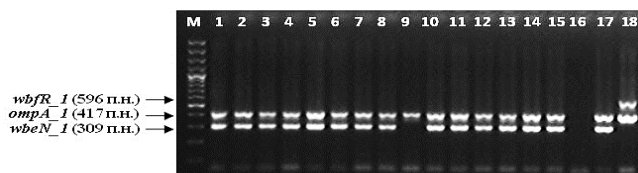


Рисунок 2 – Результаты электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1

El Tor, выделенных в Мангистауской и Западно-Казахстанской областях, где: М – маркер молекулярного веса; 1-9 – Мангистауская обл.; 10-15 – ЗКО; 16 – отрицательный контроль; 17 – положительный контроль (*V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1)); 18 – положительный контроль (*V. cholerae* O139 MO-45)

Таким образом, результаты электрофореза продуктов амплификации 33 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных из трех областей, показали, что все изученные штаммы обладали генами *wbeN*, *ompA*, *wbfR* и принадлежали *V. cholerae* O1 серогруппе, за исключением четырех штаммов под кодом № KZ-Tur-2, KZ-Tur-6 и KZ-Tur-9 и KZ-Mgt-9, которые принадлежат к *V. cholerae* non O1 серогруппе. Это подтверждает доминирование серогруппы O1 в данных регионах и единичное присутствие non-O1 форм.

Определение токсигенности и вирулентности штаммов

Дополнительно для определения принадлежности к группе O1 (контроль) и определения вирулентности (токсигенности) изучаемых всех 33-х изолятов *V. cholerae* выполнена амплификация генов *wbeN*, *ctxA* и *tcpA*. На рисунках 3, 4 и 5 приведены результаты электрофореза, демонстрирующие наличие указанных маркеров у исследованных штаммов.

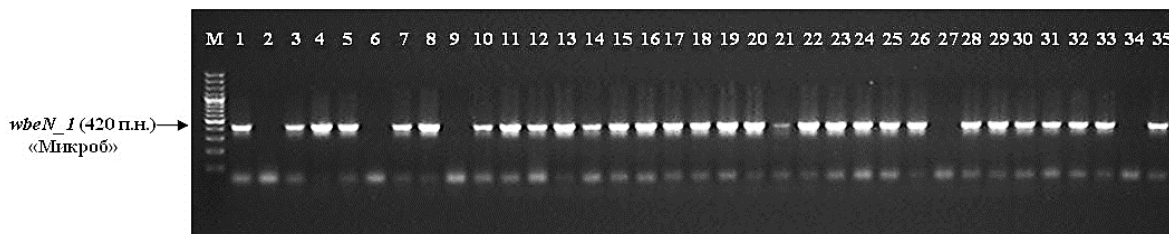


Рисунок 3 – Результаты электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (ген *wbeN*). * М – маркер молекулярного веса; 1-18 – Туркестанская область; 19-27 – Мангистауская область; 28-33 – ЗКО; 34 – отрицательный контроль; 35 – положительный контроль (*V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1)); 36 – положительный контроль (*V. cholerae* O139 MO-45)



Рисунок 4 – Результаты электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (ген *ctxA*), где: М – маркер молекулярного веса; 1-18 – Туркестанская область; 19-27 – Мангистауская область; 28-33 – ЗКО; 34 – отрицательный контроль; 35 – положительный контроль (*V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1)); 36 – положительный контроль (*V. cholerae* O139 MO-45).

Большинство штаммов имели отчетливые полосы ампликона гена *wbeN*, что подтверждает принадлежность к серогруппе O1. Отсутствие сигнала у немногих образцов (KZ-Tur-2, KZ-Tur-6 и KZ-Tur-9 и KZ-Mgt-9) согласуется с ранее выявленными non-O1 вариантами.

Амплификация гена *ctxA* (кодирующего субъединицу А холерного токсина) выявлена у 13 штаммов (KZ-Tur-7, KZ-Tur-11, KZ-Tur-12, KZ-Tur-13, KZ-Tur-14, KZ-Tur-15, KZ-Tur-16, KZ-Tur-17, KZ-Tur-18, KZ-Mgt-3, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6 и KZ-Mgt-8), что указывает на наличие токсигенных форм *V. cholerae* только в двух регионах Казахстана (Туркестанская и Мангистауская области).

Ген *tcpA*, ответственный за формирование пилей колонизации и адгезию к эпителиальным клеткам, присутствовал у 13 штаммов, содержащих *ctxA* (KZ-Tur-7, KZ-Tur-11, KZ-Tur-12, KZ-Tur-13, KZ-Tur-14, KZ-Tur-15, KZ-Tur-16, KZ-Tur-17, KZ-Tur-18, KZ-Mgt-3, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6 и KZ-Mgt-8) и у пяти штаммов не содержащих *ctxA* (KZ-Mgt-2, KZ-Mgt-5, KZ-Mgt-6, KZ-Mgt-8 и KZ-Wkr-2). Это подтверждает наличие комплексного токсигенного и адгезивного потенциала у части популяции *V. cholerae*.

Таким образом, результаты молекулярного анализа демонстрируют, что на территории Казахстана циркулируют как токсигенные, так и авирулентные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor. Выявленные соотношения генотипов (*ctxA*⁺, *tcpA*⁺) превышает 40 %. Это подтверждает участие изученных штаммов в глобальной генетической линии El Tor и подчёркивает необходимость систематического молекулярного надзора с применением методов MLST, SNP и WGS.

Подтверждение генов вирулентности методом ПЦР РВ (qPCR)

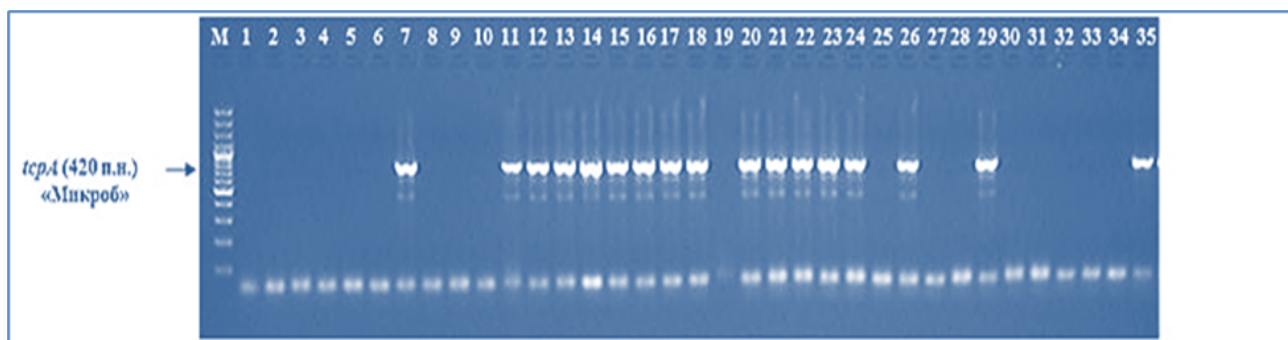


Рисунок 5 – Результаты электрофореза продуктов амплификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor (ген *tcpA*), где: М – маркер молекулярного веса; 1-18 – Туркестанская область; 19-27 – Мангистауская область; 28-33 – ЗКО; 34 – отрицательный контроль; 35 – положительный контроль (*V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1)).

Для подтверждения результатов классической ПЦР-амплификации и количественной оценки экспрессии генов вирулентности (*ctxA*, *tcpA*, *toxR*) применён метод ПЦР в реальном времени (qPCR) с использованием системы CFX96 (Bio-Rad, USA).

Амплификация выполнялась в объёме 25 мкл, включающем 12,5 мкл 2× qPCR Master Mix (SYBR Green), 0,5 мкл каждого праймера (10 мкМ), 2 мкл ДНК-матрицы и 9,5 мкл деионизированной воды. Условия реакции: предварительная денатурация при 95 °С – 3 мин; 40 циклов (95 °С – 15 с, 60 °С – 30 с, 72 °С – 30 с). Контрольные штаммы: *V. cholerae* O1 El Tor 145 (p-1) – положительный, *Escherichia coli* ATCC 25922 – отрицательный.

Амплификационные кривые анализировались с использованием программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1. Из 33 штаммов 13 (39,4 %) показали положительный сигнал по генам *ctxA* и *tcpA*, что полностью совпадает с результатами классической ПЦР. Ген *toxR* выявлен у всех образцов, что подтверждает сохранение консервативного регуляторного механизма экспрессии вирулентности на рисунке 6.

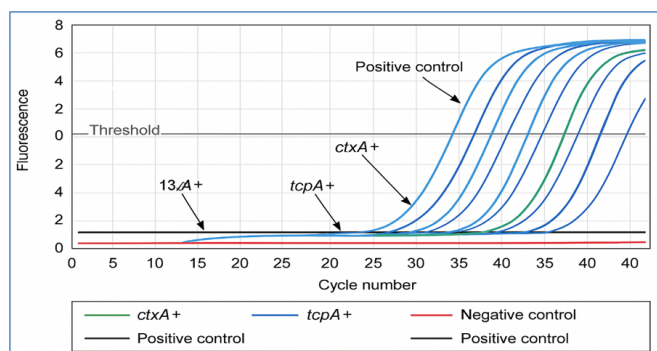


Рисунок 6 – Амплификационные кривые ПЦР в реальном времени для генов *ctxA* и *tcpA* у штаммов *Vibrio cholerae*

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о высокой согласованности между классической ПЦР и qPCR-тестированием. Использование ПЦР в реальном времени позволило количественно подтвердить наличие ключевых генов вирулентности и повысить чувствительность диагностики.

Филогенетический анализ и паспортизация штаммов *Vibrio cholerae*

Для углублённой оценки генетического разнообразия

и эволюционных взаимосвязей возбудителя холеры проведён филогенетический анализ всех 33 штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Казахстана в период с 1995 по 2016 годы. В исследование вошли изоляты, полученные как из клинических проб, так и из объектов окружающей среды (поверхностные и сточные воды), что позволило отразить как эпидемиологическую, так и экологическую составляющие циркуляции возбудителя.

Штаммы представляли три ключевых региона, эндемичных по холере: Туркестанскую, Мангыстаускую и Западно-Казахстанскую области Республики Казахстан. Такой выбор обеспечил репрезентативность популяции и возможность выявления региональных различий в генетической структуре вибрионов. Нуклеотидные последовательности фрагмента гена 16S рРНК использованы в качестве филогенетического маркера, так как данный ген является консервативным элементом прокариотического генома, широко применяемым для таксономической идентификации и анализа эволюционной близости бактерий.

Амплифицированные и секвенированные фрагменты были очищены и собраны в консенсус-последовательности, после чего выравнивание проведено с использованием алгоритма ClustalW в программе MEGA 7.0 [31]. Для построения дерева использовался метод Neighbor-Joining (NJ) с моделью Tamura–Nei и 1000 bootstrap-репликациями для оценки статистической надёжности кластеров.

В качестве референтных последовательностей применены данные из базы GenBank, включающие штаммы *Vibrio cholerae* O1 El Tor, O139 и non-O1/non-O139, в том числе референтный штамм N16961 (Acc. No. AE003852). Визуализация и аннотирование филогенетического дерева выполнены в онлайн-сервисе Interactive Tree of Life v6.7 (iTOL) (рисунок 7).

Полученные результаты показали, что исследованные изоляты *V. cholerae* обладают высокой степенью нуклеотидного сходства: значения идентичности в парных сравнениях варьировали в диапазоне 99,3-100 %, что указывает на генетическую стабильность популяции возбудителя в пределах изучаемого временного и географического диапазона.

Филогенетический анализ позволил выделить две чётко выраженные эволюционные линии – кластеры А и В, отражающие внутривидовую структуру казахстанских изолятов:

Кластер А включает большинство штаммов, выделен-

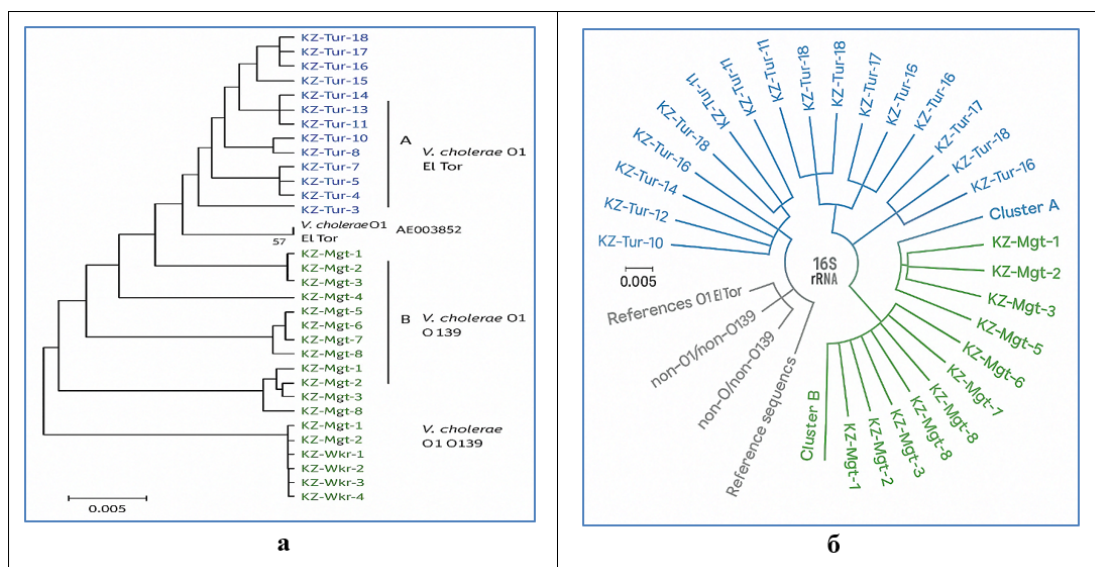


Рисунок 7 – Филогенетическое дерево 33 штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Казахстана (метод Neighbor-Joining, модель Tamura-Nei, MEGA 7.0): а – ветвящееся дерево; б – радиальное дерево

ных в Туркестанской и Западно-Казахстанской областях. Внутри этого кластера наблюдается незначительная внутригрупповая вариабельность, представленная рядом коротких подветвей, что может указывать на существование устойчивых локальных популяций, адаптированных к разным экологическим нишам (водоёмы, антропогенные сточные системы).

Кластер В объединяет штаммы из Мангыстауской области, характеризующиеся высокой степенью генетической однородности и формирующие монофилетическую группу без разветвлений, что типично для изолятов, длительно циркулирующих в ограниченной водной экосистеме Каспийского региона.

Полученные данные позволяют предположить, что циркулирующие на территории Казахстана штаммы *V. cholerae* O1 El Tor происходят от общего предка, представленного одной или несколькими устойчивыми клональными линиями, которые длительно сохраняются в природных водоёмах с эпизодическим вовлечением человека и животных в эпидемический процесс.

Использование гена 16S рРНК в качестве филогенетического маркера оправдано для первичного уровня анализа, направленного на установление видовой принадлежности, степени внутривидовой гомологии и предварительного выявления возможных эпидемиологических связей. В то же время следует учитывать, что 16S рРНК обладает ограниченной дискриминационной способностью и не позволяет с высокой точностью различать вспышечные или клональные варианты внутри вида.

Для дальнейшего уточнения филогенетических и эпидемиологических взаимосвязей между штаммами *V. cholerae* целесообразно проведение много-локусного секвенирования (MLST), анализа вариабельных тандемных повторов (MLVA) и полногеномного секвенирования (WGS). Применение этих подходов позволит оценить скорость микроэволюционных процессов, картировать пути заноса возбудителя и сформировать основу для национального геномного надзора за холерой в Казахстане.

Таким образом, филогенетический анализ 33 изолятов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных из трёх эндемичных регионов Казахстана, показал наличие двух устойчивых кластеров (А и В), характеризующихся высокой степенью внутривидового сходства (99,3-100 %) и ограниченной эволюционной дивергенцией. Эти данные подтверждают гипотезу о длительной циркуляции клонально родственных линий El Tor на территории страны и свидетельствуют о сохранении общей эволюционной основы пандемических изолятов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Проведённый анализ 16S рРНК позволил выявить высокую степень гомологии между исследованными штаммами (99.3-100 %), что соответствует результатам зарубежных исследований, демонстрирующих низкую внутривидовую вариабельность El Tor-штаммов [3, 8, 9]. В работе Johura et al. (2022) показано, что большинство современных пандемических изолятов принадлежат к ограниченному числу клональных линий с минимальными SNP-вариациями [1].

Серологическое исследование показало, что 28 из 33 штаммов (84,8 %) принадлежат к серогруппе O1 El Tor, а 5 штаммов (15,2 %) – к группе non-O1/non-O139. Полученные данные согласуются с результатами других авторов, указывающих на сохранение циркуляции пандемического биотипа El Tor в Казахстане при одновременном присутствии авирулентных форм в естественных водоёмах [14, 16].

В целом фенотипические и биохимические свойства исследованных изолятов полностью соответствуют описанным в международных руководствах характеристикам вида *Vibrio cholerae* O1 El Tor, что подтверждает стабильность и воспроизводимость его популяционных признаков в природных очагах Казахстана [Hasan и др., 2010; Johura и др., 2022].

Результаты молекулярного анализа демонстрируют, что на территории Казахстана циркулируют как токси-

генные, так и авирулентные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor. Выявленные соотношения генотипов (*ctxA*⁺, *tcpA*⁺) сопоставимы с данными, полученными в Индии, Бангладеш и России, где доля токсигенных изолятов также не превышает 40 % [13, 16]. Это подтверждает участие Казахских штаммов в глобальной генетической линии El Tor и подчёркивает необходимость систематического молекулярного надзора с применением методов MLST, SNP и WGS.

Сравнение последовательностей показало наличие единичных однонуклеотидных замен (SNP) в переменных участках гена 16S рРНК, преимущественно в позициях 230-270 и 1060-1130, что не влияет на структуру вторичных спиралей и не изменяет филогенетическое положение штаммов. Подобная стабильность генома согласуется с результатами зарубежных исследований, где сообщалось о клональном характере пандемических линий El Tor, сохраняющих генетическую идентичность при широкой географической распространённости [32].

Филогенетическое дерево, построенное методом Neighbor-Joining, позволило выделить два устойчивых кластера (А и В), что согласуется с ранее описанными группами El Tor в Юго-Восточной Азии и России [4, 6, 10]. Отсутствие строгой географической структуры внутри кластеров типично для водных вибрионов с высокой способностью к горизонтальному переносу генов и длительному существованию в водных резервуарах [11].

Результаты Liao et al. (2018) показали аналогичные закономерности при сравнении штаммов из провинции Юньнань (КНР), где применение MLST и MLVA также выявило ограниченные различия [12]. В исследованиях Сагиева и соавт. (2018) и Тойжанова и соавт. (2023) сообщалось о сохранении устойчивых линий возбудителя в Казахстане при периодических завозных случаях холеры [16, 33]. Наши данные подтверждают гипотезу о длительной циркуляции клонально родственных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor в природных очагах Казахстана.

Следует подчеркнуть, что анализ единственного консервативного гена 16S рРНК имеет ограниченные возможности для установления эпидемиологических связей. Для более точной оценки родства штаммов и выявления возможных вспышечных линий необходимы исследования с использованием много-локусных схем (MLST, cgMLST) и полногеномного секвенирования (WGS) [9, 11, 13].

Таким образом, результаты настоящего исследования дополняют существующие данные по циркуляции *V. cholerae* в Казахстане и подтверждают наличие генетически стабильных линий биовара El Tor и необходимы WGS-исследования [34, 35], что должно учитываться при формировании стратегии национального эпидемиологического надзора и лабораторного мониторинга холеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследованы 33 штамма *V. cholerae*, выделенных в Западно-Казахстанской, Мангистауской и Туркестанской областях, дополнительно к фенотипическому использована биохимическая идентификация с использованием современной автоматизированной системы VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, США). Полученные профили соответство-

вали типичным признакам *V. cholerae* O1 El Tor: положительная окислительная реакция, ферментация глюкозы и сахарозы, толерантность к 6,0% NaCl. Точность идентификации составила 97,0%.

Проведённый сравнительный молекулярно-генетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor, выделенных из различных регионов Казахстана, показал их высокую степень генетического сходства (99,3-100 %), что указывает на стабильность клональных линий возбудителя и их длительную циркуляцию в природных водных экосистемах. Отсутствие чёткой географической дифференциации при филогенетическом анализе подтверждает гипотезу о сохранении в Казахстане устойчивых эндемических линий *V. cholerae*, вероятно, поддерживаемых природными и антропогенными факторами.

Выявленные два основных филогенетических кластера (А и В) отражают ограниченную внутривидовую варибельность биовара El Tor и соответствуют глобальным закономерностям распределения пандемических линий. Эти данные согласуются с результатами исследований, проведённых в странах Центральной и Юго-Восточной Азии, где схожие типы El Tor-штаммов сохраняются на протяжении десятилетий.

Полученные результаты подчёркивают необходимость дальнейшего применения высокоинформативных методов генетической типизации – MLST, MLVA и полногеномного секвенирования (WGS) – для уточнения филогенетических связей, выявления новых мутаций, ассоциированных с вирулентностью и антибиотикорезистентностью, а также для построения более детальной картины эволюции возбудителя. Практическое значение работы заключается в том, что результаты могут служить основой для совершенствования систем молекулярного эпидемиологического надзора и разработки национальных стратегий профилактики холеры, включая создание специфических диагностических тестов и мониторинг циркулирующих линий *V. cholerae* в водных объектах Казахстана.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

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

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данное исследование было выполнено в рамках Научно-технической программы «Совершенствование мер обеспечения биологической безопасности в Казахстане: противодействие опасным и особо опасным инфекциям» на 2023-2025 гг., ИРН BR218004/0223.

ЛИТЕРАТУРА

- Johura F.T., Biswas S.R., Rashed S.M., Islam M.T., Islam S., Sultana M., Watanabe H., Huq A., Thomson N.R., Colwell R.R., Alam M. *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains linked to global cholera show region-specific patterns by pulsed-field gel electrophoresis. // Infection, Genetics and Evolution. – 2022. – Vol. 105. – P. 105363.
- Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio*

- cholerae*. // *Nature*. – 2000. – Vol. 406 (6795). – P. 477–483.
3. Chaudhuri K., Chatterjee S.N. *Cholera Toxins*. – Berlin: Springer, 2009. – P. 284.
 4. Labbate M., Boucher Y., Joss M.J., et al. Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. // *Microbiology (Reading)*. – 2007. – Vol. 153 (5). – P. 1488–1498.
 5. Jolley B., Bratcher S., Warrens M., et al. A *Vibrio cholerae* core genome multilocus sequence typing scheme. // *J Bacteriol*. – 2020. – Vol. 202 (10). – P. e00086-20.
 6. Faruque S.M., Ahmed K.M., Siddique A.K., et al. Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh (1993-1996): evidence for emergence of a new clone. // *J Clin Microbiol*. – 1997. – Vol. 35 (9). – P. 2299–2306.
 7. Nei M. et al. Genetic distance and molecular phylogeny. // *Population Genetics & Fishery Management*. – Seattle: University of Washington Press, 1987. – P. 193–223.
 8. Liao F., Chen X., Zhang Y., et al. Comparison and evaluation of molecular typing methods for *Vibrio cholerae* in Yunnan, China. // *Front Microbiol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 905.
 9. Al-Sa'ady A.T., Khalaf R., Saber-Yahia M.A., et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* isolates in Iraq. // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6 (8). – P. e04691.
 10. Perepelov A.V., Kuklin A.I., Makhova I.V., et al. Structure elucidation and gene cluster characterization of O-polysaccharide of *Vibrio cholerae* O14. // *Carbohydr Res*. – 2019. – Vol. 478. – P. 9-16.
 11. Dorman C.J., Dorman M.J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. // *Biochem Soc Trans*. – 2016. – Vol. 44 (5). – P. 1317–1323.
 12. Monir M.M., Islam M.T., Mazumder R., Mondal D., Nahar K.S., Sultana M., Morita M., Ohnishi M., Huq A., Watanabe H., Qadri F., Rahman M., Thomson N.R., Alam M. Genomic characteristics of recently recognized *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Bangladesh (1991-2017). // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10 (5). – P. e00391-22.
 13. Chun J., Grim C.J., et al. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106 (36). – P. 15442–15447.
 14. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии. // *Здоровье населения и среда обитания (ЗНУСО)*. – 2015. – № 9 (270). – С. 4-8.
 15. World Health Organization (WHO/EMRO). *Guidelines for Cholera Surveillance and Preparedness in Endemic Areas*. – Geneva: WHO, 2023. – P. 64.
 16. Сагиев З.А., Баймаханов Д.М., Аширбекова З.Б. и др. Импортированные случаи холеры в Казахстане: характеристика вибрионов. // *Антибиотики и химиотерапия*. – 2018. – Т. 63, № 3-4. – С. 12-17.
 17. Тойжанов Б.К., Мусагалиева Р., Жумадилова З., Токмурзиева Г., Кульбаева М., Отебай Д., Умарова С. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и в Казахстане за 2022-2024 гг. // *Биобезопасность и Биотехнология*. – 2024. – № 18. – С. 51-62.
 18. Chaudhuri K., Chatterjee S.N. *Cholera Toxins*. – Berlin: Springer, 2009. – 290 p.
 19. Garth R. Brown, Vichet Hem, Kenneth S. Katz, Michael Ovetsky, Craig Wallin, Olga Ermolaeva, Igor Tolstoy, Tatiana Tatusova, Kim D. Pruitt, Donna R. Maglott, Terence D. Murphy, Gene: a gene-centered information resource at NCBI, *Nucleic Acids Research*. – 2015, –V. 43, Issue D1, – P. D36–D42.
 20. Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D., Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39. – P. D52–D57.
 21. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., Qin H., Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., Fraser C.M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. // *Nature*. – 2000. – Vol. 406. – P. 477–483.
 22. Labbate M., Boucher Y., Joss M.J., Michael C.A., Gillings M.R., Stokes H.W. Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. // *Microbiology (Reading)*. – 2007. – Vol. 153. – P. 1488–1498.
 23. Bik E.M., Gouw R.D., Mooi F.R. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1996. – Vol. 34(6). – P. 1453–1461.
 24. Faruque S.M., Ahmed K.M., Siddique A.K., Zaman K., Alim A.R., Albert M.J. Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh between 1993 and 1996: evidence for emergence of a new clone of the Bengal vibrios. // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1997. – Vol. 35(9). – P. 2299–2306.
 25. Онищенко Г. Г., Москвитина Э. А., Кругликов В. Д. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии: от общей тактики до дифференцированного объема мероприятий с учетом районирования страны по типам эпидемических проявлений холеры. Сообщение I // *КиберЛенинка. ЗНиСО*. – 2015. – № 9(270). – С. 43–47.
 26. Постановление Главного государственного санитарного врача Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 4 от 29 января 2021 г. О санитарно-противоэпидемических и санитарно-профилактических мероприятиях в Республике Казахстан по холере на 2021–2025 годы. – Нур-Султан: Министерство здравоохранения Республики Казахстан. – 2021. – 45 с.
 27. Приказ Комитета государственного санитарно-эпидемиологического надзора Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 252 от 27 сентября 2010 г. Методические указания по лабораторной диагностике холеры. – Астана: КГСЭН МЗ РК, –2010. – 68 с.

28. Приказ Министерства здравоохранения Республики Казахстан № 253 от 27 октября 2010 г. Методические указания по профилактике заноса и распространения холеры и составлению комплексного плана по организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий. – Астана: МЗ РК, 2010. – 52 с.

29. Методы лабораторной диагностики холеры. Биологические и микробиологические факторы. – М.: Роспотребнадзор, 2024. – (МУК 4.2.3745-22).

30. Методические рекомендации по применению набора реагентов «АмплиСенс®-Vibrio-cholerae-FL» для выявления *Vibrio cholerae* (определение генов *ctxA* и *tcpA*) методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. – Москва: ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, – 2021. – 36 с.

31. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // *Molecular Biology and Evolution*. – 2016. – Т. 33, № 7. – С. 1870-1874.

32. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., et al. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2012. – Т. 109, № 47. – С. E2010–E2017.

33. Утепова И.Б., Сагиев З.А., Алыбаев С.Д., Кульбаева М.М., Исмаилова А.О., Абдирасилова А.А., Жунусова А.С., Алдибекова А.Л., Карымсакова Н.Т., Исмакова А.М. Характеристика штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории Казахстана // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2017. – Т. 2, № 5 (1). – С. 100-105.

34. Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D., Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39 (Suppl 1). – P. D52-D57.

35. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2002. – Vol. 99 (3). – P. 1556-1561.

REFERENCES

1. Johura F.T., Biswas S.R., Rashed S.M., Islam M.T., Islam S., Sultana M., Watanabe H., Huq A., Thomson N.R., Colwell R.R., Alam M. *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains linked to global cholera show region-specific patterns by pulsed-field gel electrophoresis. // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2022. – Vol. 105. – P. 105363.

2. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. // *Nature*. – 2000. – Vol. 406 (6795). – P. 477–483.

3. Chaudhuri K., Chatterjee S.N. *Cholera Toxins*. – Berlin: Springer, 2009. – P. 284

4. Labbate M., Boucher Y., Joss M.J., et al. Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. // *Microbiology (Reading)*. – 2007. – Vol. 153 (5). – P. 1488–1498.

5. Jolley B., Bratcher S., Warrens M., et al. A *Vibrio*

cholerae core genome multilocus sequence typing scheme. // *J Bacteriol*. – 2020. – Vol. 202 (10). – P. e00086-20.

6. Faruque S.M., Ahmed K.M., Siddique A.K., et al. Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh (1993-1996): evidence for emergence of a new clone. // *J Clin Microbiol*. – 1997. – Vol. 35 (9). – P. 2299-2306.

7. Nei M. et al. Genetic distance and molecular phylogeny. // *Population Genetics & Fishery Management*. – Seattle: University of Washington Press, 1987. – P. 193-223.

8. Liao F., Chen X., Zhang Y., et al. Comparison and evaluation of molecular typing methods for *Vibrio cholerae* in Yunnan, China. // *Front Microbiol*. – 2018. – Vol. 9. – P. 905.

9. Al-Sa'ady A.T., Khalaf R., Saber-Yahia M.A., et al. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* isolates in Iraq. // *Heliyon*. – 2020. – Vol. 6 (8). – P. e04691.

10. Perepelov A.V., Kuklin A.I., Makhova I.V., et al. Structure elucidation and gene cluster characterization of O-polysaccharide of *Vibrio cholerae* O14. // *Carbohydr Res*. – 2019. – Vol. 478. – P. 9-16.

11. Dorman C.J., Dorman M.J. DNA supercoiling is a fundamental regulatory principle in the control of bacterial gene expression. // *Biochem Soc Trans*. – 2016. – Vol. 44 (5). – P. 1317–1323.

12. Monir M.M., Islam M.T., Mazumder R., Mondal D., Nahar K.S., Sultana M., Morita M., Ohnishi M., Huq A., Watanabe H., Qadri F., Rahman M., Thomson N.R., Alam M. Genomic characteristics of recently recognized *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Bangladesh (1991-2017). // *Microbiology Spectrum*. – 2022. – Vol. 10 (5). – P. e00391-22.

13. Chun J., Grim C.J., et al. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2009. – Vol. 106 (36). – P. 15442-15447.

14. Onishchenko, G.G., Moskvitina, E.A., Kruglikov, V.D. Epidemiological Surveillance of Cholera in Russia during the Seventh Pandemic. // *Health of the Population and Environment (ZNI SO)*. – 2015. – No. 9 (270). – P. 4-8.

15. World Health Organization (WHO/EMRO). *Guidelines for Cholera Surveillance and Preparedness in Endemic Areas*. – Geneva: WHO, – 2023. – P. 64.

16. Sagiev, Z.A., Baymakhanov, D.M., Ashirbekova, Z.B., et al. Imported Cases of Cholera in Kazakhstan: Characterization of *Vibrio* Strains. // *Antibiotics and Chemotherapy*. – 2018. – Vol. 63, No. 3-4. – P. 12-17.

17. Toizhanov, B.K., Musagalieva, R., Zhumadilova, Z., Tokmurzieva, G., Kulbayeva, M., Ötebai, D., Umarova, S. Epidemiological Situation of Cholera in the World and in Kazakhstan for 2022–2024. // *Biosafety and Biotechnology*. – 2024. – No. 18. – P. 51-62.

18. Chaudhuri K., Chatterjee S.N. *Cholera Toxins*. – Berlin: Springer, – 2009. – 290 p.

19. Garth R. Brown, Vichet Hem, Kenneth S. Katz, Michael Ovetsky, Craig Wallin, Olga Ermolaeva, Igor Tolstoy, Tatiana Tatusova, Kim D. Pruitt, Donna R. Maglott, Terence D. Murphy, Gene: a gene-centered information resource at

- NCBI, Nucleic Acids Research. – 2015, –V. 43, Issue D1, – P. D36–D42.
20. Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI // Nucleic Acids Res. – 2011. – Vol. 39. – P. D52–D57.
21. Heidelberg JF, Eisen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ, Haft DH, Hickey EK, Peterson JD, Umayam L, Gill SR, Nelson KE, Read TD, Tettelin H, Richardson D, Ermolaeva MD, Vamathevan J, Bass S, Qin H, Dragoi I, Sellers P, McDonald L, Utterback T, Fleishmann RD, Nierman WC, White O, Salzberg SL, Smith HO, Colwell RR, Mekalanos JJ, Venter JC, Fraser CM. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* // Nature. – 2000. – Vol. 406. – P. 477–483.
22. Labbate M, Boucher Y, Joss MJ, Michael CA, Gillings MR, Stokes HW. Use of chromosomal integron arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains. // Microbiology (Reading). – 2007. – Vol. 153. – P. 1488–1498.
23. Bik EM, Gouw RD, Mooi FR. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* strains with a novel insertion sequence element: a tool to identify epidemic strains. // J Clin Microbiol. – 1996. – Vol. 34(6). – P. 1453–1461.
24. Faruque SM, Ahmed KM, Siddique AK, Zaman K, Alim AR, Albert MJ. Molecular analysis of toxigenic *Vibrio cholerae* O139 Bengal strains isolated in Bangladesh between 1993 and 1996: evidence for emergence of a new clone of the Bengal vibrios. J Clin Microbiol. – 1997. – Vol. 35(9). – P. 2299–2306.
25. Onishchenko, G.G., Moskvitina, E.A., Kruglikov, V.D. Epidemiological Surveillance of Cholera in Russia during the Seventh Pandemic: From General Tactics to a Differentiated Scope of Measures Considering Regionalization of the Country by Types of Epidemic Manifestations of Cholera. Report I. // *CyberLeninka. Health of the Population and Environment (ZNI SO)*. – 2015. – No. 9 (270).
26. Resolution of the Chief State Sanitary Doctor of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan No. 4 dated January 29, 2021. On Sanitary-Epidemiological and Preventive Measures in the Republic of Kazakhstan for Cholera in 2021–2025. – Nur-Sultan: Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan. – 45 pp.
27. Order of the Committee of State Sanitary and Epidemiological Supervision of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan No. 252 dated September 27, 2010. Guidelines for Laboratory Diagnosis of Cholera. – Astana: CSES, Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 2010. – 68 pp.
28. Order of the Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan No. 253 dated October 27, 2010. Guidelines for Prevention of Importation and Spread of Cholera and for Developing a Comprehensive Plan for Organizing and Conducting Sanitary-Epidemiological (Preventive) Measures. – Astana: Ministry of Health of the Republic of Kazakhstan, 2010. – 52 pp.
29. Methods of Laboratory Diagnosis of Cholera. Biological and Microbiological Factors. – Moscow: Rospotrebnadzor, 2024. – (MUK 4.2.3745-22).
30. Methodological Recommendations for Using the «AmpliSens®-*Vibrio cholerae*-FL» Reagent Kit for Detection of *Vibrio cholerae* (Determination of *ctxA* and *tcpA* Genes) by PCR with Hybridization-Fluorescent Detection. – Moscow: Federal Research Centre for Epidemiology, Rospotrebnadzor, 2021. – 36 pp.
31. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets // Molecular Biology and Evolution. – 2016. – T. 33, № 7. – C. 1870-1874.
32. Hasan N.A., Choi S.Y., Eppinger M., Clark P.W., Chen A., Alam M., et al. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – T. 109, № 47. – P. E2010–E2017.
33. Utepova, I.B., Sagiev, Z.A., Alybaev, S.D., Kulbayeva, M.M., Ismailova, A.O., Abdirasilova, A.A., Zhunusova, A.S., Aldibekova, A.L., Karymsakova, N.T., Ismakova, A.M. Characterization of *Vibrio cholerae* Strains Isolated in the Territory of Kazakhstan. // *Acta Biomedica Scientifica*. – 2017. – Vol. 2, No. 5(1). – P. 100-105.
34. Maglott D., Ostell J., Pruitt K.D., Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39 (Suppl 1). – P. D52–D57.
35. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. – 2002. – Vol. 99 (3). – P. 1556-1561.

UDC: 579.841.11:577.21:616.932.1(574)

COMPARATIVE ANALYSIS OF GENETIC RELATEDNESS OF *VIBRIO CHOLERAЕ* STRAINS ISOLATED FROM THE WEST KAZAKHSTAN, MANGYSTAU AND TURKESTAN REGIONS OF KAZAKHSTAN**Kulbayeva M.M.¹, Mussagaliyeva R.S.¹, Zhumadilova Z.B.¹, Tokmurziyeva G.Zh.¹, Izekenova A.K.², Toyzhanov B.K.¹, Begimbayeva E.Zh.¹, Utepova I.B.¹, Abdel Z.Zh.¹, Otebay D.M.^{1*}**¹LLP «National Scientific Center for Especially Dangerous Infections», Almaty, Republic of Kazakhstan²Al-Farabi Kazakh National University, 94 Tole Bi street, Almaty, 050006, Republic of Kazakhstan

*Corresponding author: dimash12.95@mail.ru

ABSTRACT

Cholera is an acute anthroponotic infection caused by *Vibrio cholerae*, characterized by severe diarrhea and dehydration. Despite advances in public health and sanitation, cholera remains a major global health concern, particularly in Asia and Africa. In Kazakhstan, the pathogen is periodically detected in surface and wastewater, emphasizing the need for continuous molecular surveillance. The study included 33 isolates of *Vibrio cholerae* obtained from the West Kazakhstan, Mangystau, and Turkestan regions of the Republic of Kazakhstan. Phenotypic and biochemical identification was performed using the VITEK 2 Compact 30 automated system (bioMérieux, USA), achieving 97,0 % accuracy. The aim of this research was to perform a comparative phylogenetic analysis based on sequencing of the 16S rRNA gene fragment and construction of phylogenetic trees using the Neighbor-Joining method in MEGA 7.0. The results demonstrated a high level of nucleotide identity among the isolates (99.3-100,0 %), indicating strong genetic conservatism and prolonged circulation of clonally related El Tor lineages in Kazakhstan. Phylogenetic reconstruction revealed two stable clusters (A and B) with limited intraspecific variability and no clear geographical differentiation. The study concludes that 16S rRNA sequencing is useful for primary identification of *V. cholerae* strains, but higher-resolution approaches such as MLST, MLVA, or WGS are required for fine-scale epidemiological and evolutionary characterization.

Keywords: *Vibrio cholerae*, strain, VITEK, genotype, phylogeny, analysis.

ӘОЖ: 579.841.11:577.21:616.932.1(574)

ҚАЗАҚСТАННЫҢ БАТЫС ҚАЗАҚСТАН, МАҢҒЫСТАУ ЖӘНЕ ТҮРКІСТАН ОБЛЫСТАРЫНАН БӨЛІНІП АЛЫНҒАН *VIBRIO CHOLERAЕ* ШТАМДАРЫНЫҢ ГЕНЕТИКАЛЫҚ ТУЫСТАСТЫҒЫН САЛЫСТЫРМАЛЫ ТАЛДАУ**Кульбаева М.М.¹, Мусағалиева Р.С.¹, Жұмадилова З.Б.¹, Токмурзиева Г.Ж.¹, Изекенова А.К.², Тойжанов Б.К.¹, Бегимбаева Э.Ж.¹, Утепова И.Б.¹, Абдел З.Ж.¹, Өтебай Д.М.^{1*}**¹«М. Айқымбаев атындағы аса қауіпті инфекциялар Ұлттық ғылыми орталығы» ЖШС, Алматы, Қазақстан Республикасы²«С.Д.Асфендияров атындағы Қазақ ұлттық медицина университеті» КеАҚ, Төле Би 94 көшесі, Алматы қ, 050006, Қазақстан Республикасы.

*Корреспондент автор: dimash12.95@mail.ru

ТҮЙІН

Холера – *Vibrio cholerae* бактериясы тудыратын жіті антропоноздық инфекция, ауыр диарея және сусызданумен сипатталады. Санитариялық-эпидемиологиялық шаралардың жетілдірілуіне қарамастан, холера әлемдік денсаулық сақтау жүйесі үшін өзекті мәселе болып қала береді, әсіресе Азия мен Африка аймақтарында. Қазақстан аумағында қоздырғыш мезгіл-мезгіл ашық және сарқынды сулардан анықталып, тұрақты молекулалық-генетикалық мониторингті қажет етеді. Зерттеу барысында Қазақстан Республикасының Батыс Қазақстан, Маңғыстау және Түркістан облыстарынан алынған *V. cholerae*-нің 33 штаммы зерттелді. Фенотиптік және биохимиялық идентификация VITEK 2 Compact 30 (bioMérieux, АҚШ) автоматтандырылған жүйесі арқылы жүргізілді, сәйкестік деңгейі – 97 %. Зерттеудің мақсаты – 16S рРНҚ генинің фрагментін секвенирлеу нәтижелері негізінде филогенетикалық салыстырмалы талдау жүргізіп, MEGA 7.0 бағдарламасында Neighbor-Joining әдісі арқылы филогенетикалық ағаш құру болды. Нәтижелер штаммдар арасындағы жоғары нуклеотидтік ұқсастықты (99,3–100 %) көрсетті, бұл El Tor биоварының генетикалық тұрақтылығын және Қазақстан аумағында оның ұзақ мерзімді айналымын дәлелдейді. Филогенетикалық талдау екі тұрақты кластерді (А және В) анықтады, олардың арасында айқын географиялық айырмашылық байқалмады. 16S рРНҚ талдауы *V. cholerae* штаммдарының бастапқы идентификациясы үшін тиімді болғанымен, эпидемиологиялық байланыстарды нақтылау үшін жоғары дәлдіктегі әдістер – MLST, MLVA немесе WGS қолданылуы қажет деп қорытындыланды.

Кілт сөздер: *Vibrio cholerae*, штамм, VITEK, генотип, филогенез, талдау.