

Патогенетический потенциал *Vibrio vulnificus* как возбудителя септических инфекций

С.Ю.Темякова, Р.В.Писанов, Е.В.Ступникова

Ростовский-на-Дону противочумный институт, Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Vibrio vulnificus – галофильная грамотрицательная бактерия, относящаяся к роду *Vibrio* и семейству *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* может вызывать серьезные, в т.ч. смертельные, инфекции: первичную септицемию, связанную с употреблением зараженных морепродуктов, раневые инфекции, возникающие при воздействии загрязненной морской воды на открытую рану, реже – инфекции желудочно-кишечного тракта. Летальность при развитии первичного сепсиса достигает 50%, а смерть обычно наступает в течение 72 ч после появления первых симптомов.

В данной обзорной работе описываются ключевые аспекты биологии *V. vulnificus*, включающие в себя факторы вирулентности и их регуляцию, информацию о биотипах и генотипах патогена, особенности выживания как в окружающей среде, так и в организме человека, а также способы диагностики и генотипирования. Анализ литературных источников за последние 10 лет показал, что микроорганизм имеет ряд факторов, вызывающих патогенные проявления при попадании в организм человека, такие как гемолизин, металлопротеиназа, липополисахарид, MARTX, капсула, сидерофоры, система утилизации и получения железа. При этом отмечается, что основную роль в развитии патогенеза играют качественный состав эффекторных доменов MARTX и способность бактерии к капсулообразованию. Несмотря на большое количество исследований, детерминанты вирулентности четко не определены и нельзя с уверенностью разделить вирулентные и авирулентные штаммы.

В последние годы интерес к исследованию морского вибриона возрос, вероятно в связи с его расширяющимся географическим ареалом. Высокий уровень смертности, связанный с данной инфекцией, указывает на необходимость модернизации программ информирования для групп риска. Ввиду достаточно разнообразного проявления инфекции встает проблема ранней диагностики и генотипирования. Необходим комплексный подход к изучению патогена и мониторинг распространения штаммов на территории Российской Федерации.

Ключевые слова: обзор, *Vibrio vulnificus*, септическая инфекция, раневая инфекция, факторы вирулентности, MARTX, капсульный полисахарид, гемолизин

Для цитирования: Темякова С.Ю., Писанов Р.В., Ступникова Е.В. Патогенетический потенциал *Vibrio vulnificus* как возбудителя септических инфекций. Бактериология. 2023; 8(2): 72–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-72-78

Pathogenetic potential of *Vibrio vulnificus* as a causative agent of septic infections

S.Yu.Temyakova, R.V.Pisanov, E.V.Stupnikova

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russian Federation

Vibrio vulnificus – a halophilic gram-negative bacterium belonging to the genus *Vibrio* and the family *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* can cause serious and fatal infections: primary septicemia caused by the consumption of contaminated seafood, wound infections that occur when exposed to contaminated sea water on an open wound, rarely infections of the gastrointestinal tract. Mortality in the development of primary sepsis reaches 50%, and death usually occurs within 72 hours after the onset of the first symptoms. This review paper describes key aspects of the biology of *V. vulnificus*, including virulence factors and their regulation, information about the biotypes and genotypes of the pathogen, survival features both in the environment and in the human body, as well as diagnostic and genotyping methods. An analysis of literature sources over the past 10 years has shown that the microorganism has a number of factors that cause pathogenic manifestations when it enters the human body, such as hemolysin, metalloproteinase, lipopolysaccharide, MARTX, capsule, siderophores, iron utilization and production system. It is noted that the qualitative composition of the MARTX effector domains and the ability of the bacterium to form capsules play the main role in the development of pathogenesis. Despite a large number of studies, the determinants of virulence are not clearly defined and it is impossible to distinguish virulent and avirulent strains with certainty.

In recent years, interest in the study of the marine vibrio has increased, probably due to its expanding geographic range. The high mortality rate associated with this infection points to the need for improved information programs for at-risk groups. In view of the rather diverse manifestation of infection, the problem of early diagnosis and genotyping arises. An integrated approach is needed to study the pathogen and monitor the spread of strains on the territory of the Russian Federation.

Key words: review, *Vibrio vulnificus*, septic infection, wound infection, virulence factors, MARTX, capsular polysaccharide

For citation: Temyakova S.Yu., Pisanov R.V., Stupnikova E.V. Pathogenetic potential of *Vibrio vulnificus* as a causative agent of septic infections. Bacteriology. 2023; 8(2): 72–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2023-2-72-78

Для корреспонденции:

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40
E-mail: temyakova_syu@antiplague.ru

Статья поступила 26.05.2023, принята к печати 30.06.2023

For correspondence:

Svetlana Yu. Temyakova, Junior researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor

Адрес: 117/40 M.Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
E-mail: temyakova_syu@antiplague.ru

The article was received 26.05.2023, accepted for publication 30.06.2023

V*ibrio vulnificus* – галофильная грамотрицательная бактерия, относящаяся к роду *Vibrio* и семейству *Vibrionaceae*. *V. vulnificus* может вызывать серьезные, в т.ч. смертельные, инфекции: первичную септицемию, вызванную употреблением зараженных морепродуктов, раневые инфекции, возникающие при воздействии загрязненной морской воды на открытую рану, реже инфекции желудочно-кишечного тракта. Летальность при развитии первичного сепсиса достигает 50%, а смерть обычно наступает в течение 72 ч после появления первых симптомов [1]. По данным CDC, риску инфекции наиболее подвержены мужчины в возрасте старше 45 лет, с сопутствующими заболеваниями печени [2].

Распространенность *V. vulnificus* в большей степени зависит от температуры и солености морской воды [3]. Возбудитель инфекции чаще встречается при температуре воды $\geq 18^{\circ}\text{C}$ и солености ~15–25% [4]. Микроорганизм накапливается в устрицах, не вызывая при этом патогенеза. Также *V. vulnificus* повсеместно встречается в аквариумах, что может свидетельствовать об угрозе для содержащихся в неволе морских животных и обслуживающих аквариумы людей [5].

Наибольшее внимание исследованию патогена уделяется в странах Северной и Южной Америки, а также в Японии и Южной Корее. В базе данных National Center of Biotechnology Information (NCBI) насчитывается более 6000 публикаций по изучению *V. vulnificus*, из них 2500 опубликованы за последние 5 лет, что говорит об усиливающемся интересе к проблеме во всем мире. Однако в России данная проблема практически не освещена. Тем временем расширяется географический ареал этих условно-патогенных микроорганизмов и увеличивается их патогенный потенциал. Например, есть данные о вспышках инфекции *V. vulnificus*, зарегистрированных на широтах Балтийского моря [6, 7] и Аляски, ранее считавшихся слишком холодными для развития морского вибриона [8].

В связи с этим возникает необходимость углубленного изучения штаммов *V. vulnificus*, обитающих в акваториях на территории Российской Федерации, создания диагностических систем, оценки возможных клинических случаев заражения людей, мониторинга пищевой продукции, а также более глубокого анализа геномов выделенных микроорганизмов.

Биотипы и генотипы

Известно существование 3 биотипов *V. vulnificus*, а среди штаммов биотипа 1, наиболее часто поражающих человека, выделяют два генотипа. Биотип 1 был описан первым и встречается практически во всех клинических случаях. Биотип 2 вызывает сепсис у угрей, и в редких случаях штаммы этого биотипа вызывали клинические проявления у человека. Биотип 3 был описан совсем недавно, он выделен только от людей с раневыми инфекциями, заразившихся при разведении тилапии на территории Израиля, и генетически представляет собой химеру первых двух биотипов [9]. Филогенетический анализ показал, что популяция *V. vulnificus* делится на две основные линии. В линии I преобладают клинические штаммы, в то время как в линии II – штаммы из источников окружающей среды. Также были идентифицированы две другие небольшие линии: линия III,

включающая штаммы биотипа 3, и линия IV, в которой преобладают штаммы из окружающей среды [10]. Линия I также известна как С (Clinical – характерная для клинических штаммов), линия II – как Е (Environmental – характерная для штаммов, выделенных из окружающей среды) [11]. Результаты RAPD-ПЦР-анализа¹ многочисленных клинических штаммов и штаммов, выделенных из окружающей среды, позволили выявить ПЦР-ампликон, уникальный для клинических изолятов человека [12, 13]. В дальнейшем полногеномное секвенирование подтвердило существование двух генотипов, С и Е, среди штаммов биотипа 1, а также очень значимую корреляцию С-генотипа со способностью вызывать заболевание у человека [14].

Геном *V. vulnificus*, как и других видов *Vibrio*, представлен двумя хромосомами разного размера. Размер большой хромосомы составляет ~3,2 Мб, тогда как размер малой хромосомы – ~1,8 Мб [11]. У некоторых штаммов отмечают наличие плазмиды. На сегодняшний день в литературе описано по меньшей мере 28 плазмидных профилей. Плазмида вирулентности встречается у штаммов биотипа 2, тогда как конъюгативные плазмиды того же семейства широко распространены среди всех трех биотипов и могут способствовать передаче плазмиды вирулентности [15]. Все эти плазмиды, вероятно, играют важную роль в экологической адаптации и пластичности вида. Наличие плазмид у микроорганизма делает его потенциальным резервуаром генов для других видов бактерий.

Факторы вирулентности и патогенез

V. vulnificus, как и любой микроорганизм, обладающий патогенным потенциалом, имеет ряд факторов, помогающих ему не только проникнуть и сохраниться, но и размножиться, распространиться в тканях и органах организма, воздействуя при этом на его функции. В данном обзоре мы постарались описать факторы патогенности и их регуляторы, наиболее значимые для развития инфекции.

Гемолизин (VvH)

VvH (гемолизин *V. vulnificus*) – токсин, секретируемый во внеклеточное пространство. Кодированная его последовательность содержит две открытые рамки считывания: гены *vvhA* и *vvhB*. Функция гена *vvhB* еще не определена, поэтому в основном рассматривается функция *vvhA*. Ген *vvhA* имеет общую длину 1416 п.н. и присутствует у всех штаммов *V. vulnificus*, являясь структурным геном гемолизина [16]. Гемолизин относится к семейству холестерин-зависимых цитолизинов, порообразующих токсинов [17]. Гемолизин водорастворим и термолабилен. Он влияет на воспалительный патогенез, регулируя аутофагическую гибель клеток без апоптотического процесса [18]. Белок VvhA также может вызывать вазодилатацию, играя значительную роль в развитии гипотензивного септического шока [19].

Металлопротеиназа (VVP)

Металлопротеиназа синтезируется в клетках в виде предшественника, в котором различают 4 области: сигнальный пептид, N-концевой домен (nPP), C-концевой домен (Cter100)

¹Полимеразная цепная реакция (ПЦР) со случайной амплификацией полиморфной ДНК (Random Amplification of Polymorphic DNA/RAPD).

и зрелая протеаза, которая образуется в результате самопроцессинга [20].

Сначала металлопротеиназа выполняет роль эластазы, которая увеличивает поверхностную адгезию и проницаемость сосудов в организме хозяина в результате образования брадикинина. Брадикинин, действующий как сосудорасширяющее средство, важен для распространения патогена по организму [21]. Затем происходит активация протромбина и фибринолизина с помощью VVP, что приводит к свертыванию и защищает бактерии от иммунного ответа организма хозяина во время распространения бактериальной инфекции. Металлопротеиназа также может вызывать апоптоз через пути, включающие активацию ERK (extracellular signal-regulated kinase), деградацию коллагена IV типа, высвобождение цитохрома C и активацию каспаз-3 и -9 [22, 23]. Кроме того, VVP может ингибировать экспрессию транскрипции муцина 2, который является важным компонентом кишечного эпителиального барьера, и нарушать структурную целостность кишечного тракта. Таким образом, металлопротеиназа ускоряет попадание *V. vulnificus* из кишечника в кровь, что в конечном итоге приводит к возникновению сепсиса [24, 25]. Однако стоит отметить, что данный фермент также в значительной степени продуцируется у микроорганизма, находящегося в интерстициальных тканях конечностей, где температура ниже, чем в тонком кишечнике и кровотоке, вызывая серьезные коллагенолитические, геморрагические и отежные поражения кожи конечностей [19]. Чаще всего патоген проявляет себя как раневая инфекция, нередко прогрессирует до сепсиса [26]. Можно предположить, что ведущую роль в этом играет металлопротеиназа.

MARTX

MARTX (Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin) – это многофункциональный самопроцессирующий токсин, содержащий повторы в молекуле белка. Он играет важную роль в сепсисе, вызванном инфекцией *V. vulnificus* [27]. MARTX кодируется геном *rtxA1*, размером около 15,6 т.п.н., и представляет собой токсин, состоящий из областей, содержащих N-концевые повторы, C-концевые повторы и эффекторные домены. MARTX состоит из 5206 аминокислотных остатков, имеет расчетную молекулярную массу 556 кДа. В настоящее время он признан самым крупным полипептидным токсином [28]. Аминокислотные N- и C-концевые повторы образуют поры в мембране эукариотических клеток. Формирование пор облегчает транслокацию центральной области эффекторных доменов в цитозоль эукариот, после чего эффекторы высвобождаются в результате аутопроцессинга. Токсин MARTX, описанный у репрезентативного клинического штамма СМСП6, имеет 5 эффекторных доменов и включает домен неизвестной функции в первом положении (DUF1), Rho-домен инактивации ГТФазы (RID), α/β -гидролазу (ABH), flopp-белок (MCF – makes caterpillars floppy-like domain) и Ras/Rap1-специфическую эндопептидазу (RRSP) [29]. Описанные выше домены функционируют по разным биохимическим механизмам, обычно нарушая один из трех ключевых клеточных процессов: изменяют динамику цитоскелета, специфически взаимодействуя с филламином А, тем самым вызывая острую некротическую гибель клеток [30], нарушают передачу сигналов

ГТФазы или везикулярный транспорт [31]. Описан эксперимент, определяющий роль каждого из эффекторных доменов в развитии патогенеза для штамма СМСП6. Результаты данного исследования позволяют предположить, что эффекторные домены DUF1 и ABH фактически снижают вирулентность, а RRSP и RID доминируют над потенциалом вирулентности *V. vulnificus* [30]. Кроме того, MARTX способствует выживанию патогена в организме хозяина, предотвращая его поглощение фагоцитами [32], эту роль также выполняют эффекторные домены [30].

Таким образом, MARTX вызывает некроз кишечных эпителиальных клеток, позволяя *V. vulnificus* проникать напрямую в кровоток, что является доминирующим фактором в развитии сепсиса [33], а качественный состав эффекторных доменов определяет потенциал вирулентности.

Капсульный полисахарид

Капсульный полисахарид (CPS) – еще один ключевой фактор вирулентности *V. vulnificus*. При возникновении и развитии сепсиса способность бактерии обходить иммунный ответ хозяина в основном объясняется наличием капсулы, которая обеспечивает устойчивость к опсонизации комплементом и последующему фагоцитозу макрофагами. Капсула играет значительную роль в развитии септического шока, вероятно, индуцируя чрезмерную продукцию воспалительных цитокинов, через TLR2/NF- κ B-зависимый путь [34]. Ранее были идентифицированы четыре генетических области, которые необходимы для экспрессии и вирулентности CPS. Три являются частью капсульного генного локуса, состоящего из генов биосинтеза, полимеризации и транспорта, сгруппированных на одном хромосомном фрагменте. Четвертая, интегроноподобная, область аналогична области суперинтегрона *V. cholerae* [35]. Моделью для характеристики биосинтеза и генетики капсул многих микроорганизмов, в том числе и *V. vulnificus*, послужила характеристика капсулы *Escherichia coli* [36]. Отдельные моносахариды собираются на липидном носителе ундекапренилфосфате, при этом сборка происходит на внутренней стороне внутренней мембраны. Полимеризация цепи происходит при помощи ферментов гликозилтрансфераз (WecA, WcvE, WcvF, WcvG и WcvI) [37]. Флиппаза Wzx после завершения сборки перемещает моносахариды, не связанные с липидным носителем, через внутреннюю мембрану. Затем моносахариды соединяются вместе на периплазматической стороне внутренней мембраны полимеразой Wxy. В перемещении капсулы через внешнюю мембрану участвуют белки Wza, Wzb и Wzc, представляющие собой белок-транспортёр полисахаридов, фосфатазу и тирозиновую аутокиназу соответственно [38]. Биосинтетическая область включает в себя несколько открытых рамок считывания, которые участвуют в биосинтезе активированных предшественников моносахаридов. Среди описанных генов: ген эпимеразы *wcvA* и дегидрогеназы *wcvB*. Отдельно выделяют гены *rml*: *rmlA*, *rmlD* и *rmlC*, участвующие в биосинтезе L-рамнозы как наиболее распространенного сахара в капсуле *V. vulnificus*. Вероятно, данная группа генов подвергается полицистронному транскрибированию [37].

Фенотипически наличие или отсутствие капсулы можно определить культивированием на плотных питательных сре-

дах. При этом выделяют два типа колоний *V. vulnificus*: прозрачные и непрозрачные. Прозрачные колонии не образуют капсулы и не патогенны для мышей, а непрозрачные, напротив, вызывают заболевание, а, следовательно, могут противостоять иммунному ответу организма хозяина и обладают антифагоцитарной активностью [39]. Вероятно, между этими двумя морфотипами могут происходить фазовые переходы, причем такие переходы могут быть как обратимыми, так и необратимыми для одного и того же штамма [40]. На фазовые вариации CPS у *V. vulnificus* влияют различные факторы окружающей среды [41]. Таким образом, продукция капсульного полисахарида контролируется как факторами окружающей среды, так генетическими и регуляторными факторами. В то же время патогенность *V. vulnificus* напрямую связана с присутствием капсульного полисахарида, который является важным фактором вирулентности.

Липополисахарид

Некоторые авторы предполагают, что липополисахарид (ЛПС) также является одним из наиболее важных факторов (как и для большинства грамотрицательных бактерий) развития тяжелых инфекций, вызываемых *V. vulnificus*, таких как глубокое повреждение мягких тканей и септический шок [42]. По некоторым данным, заражению описываемым патогеном наиболее подвержены мужчины, тогда как в защите женщин от эндотоксической активности ЛПС *V. vulnificus* участвует эстроген [43].

Все выделенные штаммы разделяют по O-антигену на 7 серогрупп [44]. Среди проанализированных работ встречается мало данных по описанию серогрупп данного вибриона, в связи с чем разработка отечественных сывороток может быть перспективным направлением работы. Также стоит заметить, что в литературе очень мало внимания уделяется изучению генетического строения липополисахаридного кластера, однако исследования в данной области могут помочь в более глубокой характеристике выделенных штаммов. Так, например, структурный анализ липополисахаридного кластера у клинических штаммов показал, что можно выделить не менее пяти антигенных подгрупп. Первая подгруппа наиболее распространена среди данных штаммов. Есть предположение, что-либо присутствие этого типа ЛПС само по себе вызывает повышенную вирулентность, либо этот тип ЛПС является маркером более вирулентных штаммов [45].

Сидерофоры, система утилизации и получения железа

Показано, что люди с ослабленной иммунной системой или хроническими заболеваниями печени, такими как цирроз, в 80 раз чаще, чем здоровые люди, страдают первичной септициемией, вызванной *V. vulnificus* [46]. Эпидемиологические данные подтверждаются лабораторными исследованиями, в которых изучалась роль железа в заболевании, когда повышенный уровень железа в сыворотке крови является характерной чертой для инфицированных людей [47].

Для получения железа из окружающей среды *V. vulnificus* использует вульнибактин, аэробактин, ферриоксамин В, гем и свободные ионы двух- и трехвалентного железа [48]. Первой была охарактеризована структура катехинового сидерофора, названного вульнибактином [49]. Вульнибактин

синтезируется в цитоплазме *V. vulnificus* и транслоцируется во внеклеточное пространство. Изохоризматсинтаза (ICS) и изохоризматаза (VenB) играют ключевую роль в биосинтезе вульнибактина. Он хелатирует Fe^{3+} в окружающей среде, и комплекс железо–вульнибактин импортируется в периплазму через специфический рецептор внешней мембраны, VuuA. В то время как VuuA является единственным рецептором в системе утилизации трехвалентного железа и вульнибактина, белки HupA и HvtA функционируют как рецепторы гема [48]. Показано, что клинические штаммы *V. vulnificus* способны в большей степени, чем штаммы, выделенные из окружающей среды, продуцировать вульнибактин и использовать железо, связанное с трансферрином [50], что свидетельствует о важной роли системы получения и утилизации железа в развитии патогенеза.

К факторам вирулентности также можно отнести Tad-пили, или пили плотной адгезии, кодируемые тремя локусами гена *tad* [51], а также эффлюкс-помпы для оттока антибактериальных препаратов и других токсичных соединений [52].

Согласно некоторым исследованиям, не только клинические штаммы *V. vulnificus*, но и штаммы, выделенные из окружающей среды, имеют факторы вирулентности [53]. Поэтому именно анализ наличия факторов вирулентности, ответственных за развитие патогенеза, поможет принимать необходимые меры в отношении изолятов, выделяемых на территории Российской Федерации, и оценивать риски инфицирования людей.

Регуляторы факторов вирулентности

Микроорганизм обладает несколькими регуляторами экспрессии факторов вирулентности. Например, уровень сывороточного железа тесно связан с тяжестью инфекции *V. vulnificus* при сепсисе [54]. Также регуляторами вирулентности являются белки LuxS, LuxP-LuxQ, LuxU-LuxO и SmcR (основной регулятор транскрипции для генов-мишеней, контролируемых системой quorum sensing (QC)) [55].

Циклический аденозинмонофосфат (сAMP), основной клеточный сигнальный метаболит, образует комплекс с циклическим аденозинмонофосфатным рецепторным белком (CRP), который может связываться с ДНК и влиять на экспрессию многих генов, таких как гены цитолизина, металлопротеиназы и системы захвата железа [56].

HlyU – белок, регулирующий экспрессию гена гемолизина/цитоллизина *vvhA* и гена эластолитической протеазы *vvrE*. HlyU также контролирует экспрессию гена *rtxA1*, ослабляя действие репрессора, конкурируя с его сайтом связывания [57].

Белок AphV является членом семейства регуляторов транскрипции LysR и играет центральную роль в экспрессии генов вирулентности посредством регуляции каскада [58].

Все описанные выше регуляторы необходимы для роста и размножения *V. vulnificus* в крови человека [59].

Диагностика и внутривидовое генотипирование

При подозрении на *V. vulnificus* у человека проводится бактериологическое исследование [60]. При возможности параллельно проводится ПЦР-анализ для ускоренного скрининга. В качестве мишеней для ПЦР-диагностики в литера-

туре описано использование нескольких генов: *vvhA* [61], *gyrB* [62], *vcgC*, *vcgE* и 16S рРНК типа А и В [63].

Внутривидовое генотипирование проводят с целью исследования эпидемиологических случаев и установления родства штаммов. Для внутривидового генотипирования, по данным литературных источников, наиболее часто используются SNP-анализ (Single Nucleotide Polymorphism), MLST (Multilocus sequence typing) и MLVA (Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis).

MLST – типирование на основе мультилокусных последовательностей – активно используется для внутривидового типирования *V. vulnificus*. Схема MLST *V. vulnificus* использует внутренние фрагменты следующих десяти генов домашнего хозяйства: *glp*, *gyrB*, *mdh*, *metG*, *purM*, *dtbS*, *lysA*, *pntA*, *pyrC*, *tnaA*. Авторы разделили исследованные штаммы на 2 линии: MLST А и MLST В [64].

MLVA – мультилокусное исследование на основе VNTR (Variable Number Tandem Repeat). VNTR *V. vulnificus* показывает широкий спектр полиморфизма. В литературе описывается исследование штаммов *V. vulnificus* по 12 VNTR-локусам, в результате которого все изоляты были разделены на 2 группы: группу А, в которую вошли в основном штаммы биотипа 1, и группу В, в которой оказались только представители биотипа 2 [65].

SNP – однонуклеотидный полиморфизм. В целом результаты генотипирования по SNP разделили *V. vulnificus* на три основные филогенетические линии и дополнительную подгруппу, кладу В, состоящую из изолятов, встречающихся только в Израиле [66].

Анализ SNP представляется наиболее удобным для оценки эволюции штаммов и к тому же позволяет проводить полногеномное сравнение, тогда как MLST, например, использует оценку вариабельности консервативных генов «домашнего хозяйства» и к тому же является наиболее трудоемким, как и MLVA.

Вероятно, что анализ штаммов, встречающихся на территории нашей страны, покажет иную картину распределения и определит новые филогенетические ветви.

Следует отметить, что ни один из доступных методов обнаружения *V. vulnificus* не позволяет отличить вирулентные штаммы от авирулентных, поскольку детерминанты вирулентности на сегодняшний день четко не определены [67]. Таким образом, поиск маркеров, определяющих патогенность микроорганизма, является ключевым направлением в дальнейших исследованиях.

Заключение

Анализ патогенетического потенциала *V. vulnificus* подчеркивает необходимость развития мониторинга данного патогена. В последние годы географический район распространения вибриона значительно расширился. Высокий уровень смертности, связанный с данной инфекцией, указывает на необходимость модернизации программ информирования для групп риска. Ввиду достаточно разнообразного проявления инфекции встает проблема ранней диагностики и генотипирования. Основной вопрос заключается в том, как достаточно быстро отследить патогенные для человека штаммы в морской воде и морепродуктах. Ответом на данный вопрос может быть комплексный подход к изучению

патогена, включающий в себя геномные исследования, исследования по проявлению вирулентности и условий, ее обуславливающих, а также транскриптомный анализ.

Стоит отметить, что из всех описанных выше факторов вирулентности наиболее весомый вклад в развитие инфекции вносят способность микроорганизма образовывать капсулу и наличие определенных эффекторных доменов MARTX. Эти данные дают основание предположить, что более глубокое исследование именно этих факторов позволит определить истинный вирулентный потенциал *V. vulnificus*.

Вклад авторов

Все авторы внесли значительный вклад в концепцию работы, комплектование, анализ, интерпретацию, составление и доработку работы, окончательное утверждение версии для публикации.

Author contribution

All authors did a significant contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

Источник финансирования

Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Funding source

The authors state that there is no external funding for the study.

Конфликт интересов

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Conflict of interest

The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Литература / References

1. Yun NR, Kim DM. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health. Korean J Intern Med. 2018 Nov;33(6):1070-1078. DOI: 10.3904/kjim.2018.159
2. Baker-Austin C, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: new insights into a deadly opportunistic pathogen. Environ Microbiol. 2018 Feb;20(2):423-430. DOI: 10.1111/1462-2920.13955
3. Sullivan TJ, Neigel JE. Effects of temperature and salinity on prevalence and intensity of infection of blue crabs, *Callinectes sapidus*, by *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus*, and *V. vulnificus* in Louisiana. J Invertebr Pathol. 2018 Jan;151:82-90. DOI: 10.1016/j.jip.2017.11.004
4. Yun NR, Kim DM. *Vibrio vulnificus* infection: a persistent threat to public health. Korean J Intern Med. 2018 Nov;33(6):1070-1078. DOI: 10.3904/kjim.2018.159
5. Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: death on the half shell. A personal journey with the pathogen and its ecology. Microb Ecol. 2013 May;65(4):793-9. DOI: 10.1007/s00248-012-0140-9
6. Kordas RL, Harley CDG, O'Connor MI. Community ecology in a warming world: the influence of temperature on interspecific interactions in marine systems. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology. 2011; 400(1-2):218-226. DOI:10.1016/j.jembe.2011.02.029
7. Baker-Austin C, Triñanes J, Taylor NGH, Hartnell R, Siitonen A, Martinez-Urtaza J, et al. Emerging *Vibrio* risk at high latitudes in response to ocean warming. Nature Climate Change. 2013;3(1):73-77. DOI: 10.1038/NCLIMATE1628

8. Martinez-Urtaza J, Bowers JC, Trinanes J, DePaola A. Climate anomalies and the increasing risk of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* illnesses. *Food Research International*. 43(7):1780-1790. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.04.001
9. Oliver JD. The Biology of *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3). DOI: 10.1128/microbiolspec
10. Bisharat N, Koton Y, Oliver JD. Phylogeography of the marine pathogen, *Vibrio vulnificus*, revealed the ancestral scenarios of its evolution. *Microbiologyopen*. 2020 Sep;9(9):e1103. DOI: 10.1002/mbo3.1103
11. López-Pérez M, Jayakumar JM, Haro-Moreno JM, Zaragoza-Solas A, Reddi G, Rodriguez-Valera F, et al. Evolutionary Model of Cluster Divergence of the Emergent Marine Pathogen *Vibrio vulnificus*: From Genotype to Ecotype. *mBio*. 2019 Feb 19;10(1):e02852-18. DOI: 10.1128/mBio.02852-18
12. Warner JM, Oliver JD. Randomly amplified polymorphic DNA analysis of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus* and other *Vibrio* species. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Mar;65(3):1141-4. DOI: 10.1128/AEM.65.3.1141-1144.1999
13. Rosche TM, Yano Y, Oliver JD. A rapid and simple PCR analysis indicates there are two subgroups of *Vibrio vulnificus* which correlate with clinical or environmental isolation. *Microbiol Immunol*. 2005;49(4):381-9. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2005.tb03731.x
14. Morrison SS, Williams T, Cain A, Froelich B, Taylor C, Baker-Austin C, et al. Pyrosequencing-based comparative genome analysis of *Vibrio vulnificus* environmental isolates. *PLoS One*. 2012;7(5):e37553. DOI: 10.1371/journal.pone.0037553
15. Roig FJ, Amaro C. Plasmid diversity in *Vibrio vulnificus* biotypes. *Microbiology (Reading)*. 2009 Feb;155(Pt 2):489-497. DOI: 10.1099/mic.0.023424-0
16. Li G, Wang MY. The role of *Vibrio vulnificus* virulence factors and regulators in its infection-induced sepsis. *Folia Microbiol (Praha)*. 2020 Apr;65(2):265-274. DOI: 10.1007/s12223-019-00763-7
17. Kashimoto T, Sugiyama H, Kawamidori K, Yamazaki K, Kado T, Matsuda K, et al. *Vibrio vulnificus* hemolysin associates with gangliosides. *BMC Microbiol*. 2020 Mar 30;20(1):69. DOI: 10.1186/s12866-020-01755-1
18. Song EJ, Lee SJ, Lim HS, Kim JS, Jang KK, Choi SH, et al. *Vibrio vulnificus* VvhA induces autophagy-related cell death through the lipid raft-dependent c-Src/NOX signaling pathway. *Sci Rep*. 2016 Jun 2;6:27080. DOI: 10.1038/srep27080
19. Elgaml A, Miyoshi SI. Regulation systems of protease and hemolysin production in *Vibrio vulnificus*. *Microbiol Immunol*. 2017 Jan;61(1):1-11. DOI: 10.1111/1348-0421.12465
20. Kawase T, Miura F, Debnath A, Imakura K, Miyoshi SI. Functional analysis of N-terminal propeptide in the precursor of *Vibrio vulnificus* metalloprotease by using cell-free translational system. *Protein Expr Purif*. 2018 Sep;149:13-16. DOI: 10.1016/j.pep.2018.04.004
21. Lee MA, Kim JA, Yang YJ, Shin MY, Park SJ, Lee KH. VvpM, an extracellular metalloprotease of *Vibrio vulnificus*, induces apoptotic death of human cells. *J Microbiol*. 2014 Dec;52(12):1036-43. DOI: 10.1007/s12275-014-4531-0
22. Lee TH, Cha SS, Lee CS, Rhee JH, Chung KM. Monoclonal antibodies against *Vibrio vulnificus* RtxA1 elicit protective immunity through distinct mechanisms. *Infect Immun*. 2014 Nov;82(11):4813-23. DOI: 10.1128/IAI.02130-14
23. Kawase T, Miura F, Debnath A, Imakura K, Miyoshi SI. Functional analysis of N-terminal propeptide in the precursor of *Vibrio vulnificus* metalloprotease by using cell-free translational system. *Protein Expr Purif*. 2018 Sep;149:13-16. DOI: 10.1016/j.pep.2018.04.004
24. Lee SJ, Jung YH, Oh SY, Jang KK, Lee HS, Choi SH, et al. *Vibrio vulnificus* VvpE inhibits mucin 2 expression by hypermethylation via lipid raft-mediated ROS signaling in intestinal epithelial cells. *Cell Death Dis*. 2015 Jun 18;6(6):e1787. DOI: 10.1038/cddis.2015.152
25. Lee SJ, Jung YH, Song EJ, Jang KK, Choi SH, Han HJ. *Vibrio vulnificus* VvpE Stimulates IL-1 β Production by the Hypomethylation of the IL-1 β Promoter and NF- κ B Activation via Lipid Raft-Dependent ANXA2 Recruitment and Reactive Oxygen Species Signaling in Intestinal Epithelial Cells. *J Immunol*. 2015 Sep 1;195(5):2282-93. DOI: 10.4049/jimmunol.1500951
26. Jones MK, Oliver JD. *Vibrio vulnificus*: disease and pathogenesis. *Infect Immun*. 2009 May;77(5):1723-33. DOI: 10.1128/IAI.01046-08
27. Guo RH, Lim JY, Tra My DN, Jo SJ, Park JU, Rhee JH, et al. *Vibrio vulnificus* RtxA1 Toxin Expression Upon Contact With Host Cells Is RpoS-Dependent. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018 Mar 15;8:70. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00070
28. Satchell KJ. MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins. *Infect Immun*. 2007 Nov;75(11):5079-84. DOI: 10.1128/IAI.00525-07
29. Gavin HE, Satchell KJF. RRSF and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. *J Infect Dis*. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
30. Guo RH, Im YJ, Shin SI, Jeong K, Rhee JH, Kim YR. *Vibrio vulnificus* RtxA1 cytotoxin targets filamin A to regulate PAK1- and MAPK-dependent cytoskeleton reorganization and cell death. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8(1):934-945. DOI: 10.1080/22221751.2019.1632153
31. Woida PJ, Satchell KJF. Coordinated delivery and function of bacterial MARTX toxin effectors. *Mol Microbiol*. 2018 Jan;107(2):133-141. DOI: 10.1111/mmi.13875
32. Chen CL, Chien SC, Leu TH, Harn HI, Tang MJ, Hor LI. *Vibrio vulnificus* MARTX cytotoxin causes inactivation of phagocytosis-related signaling molecules in macrophages. *J Biomed Sci*. 2017 Aug 19;24(1):58. DOI: 10.1186/s12929-017-0368-2
33. Jeong HG, Satchell KJ. Additive function of *Vibrio vulnificus* MARTX(Vv) and VvhA cytolytins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection. *PLoS Pathog*. 2012;8(3):e1002581. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2019 Jun 19;15(6):e1007895. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002581
34. Lee BC, Kim MS, Choi SH, Kim TS. Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF- κ B pathway in *Vibrio vulnificus*-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells. *Int J Mol Med*. 2010 Apr;25(4):581-91. DOI: 10.3892/ijmm_00000380
35. Цырулина ОА, Чемисова ОС, Носков АК. Факторы патогенности *Vibrio vulnificus*. Обзор. Здоровье населения и среда обитания – ЗНСО. 2022;30(6):59-65. / Tsyulina OA, Chemisova OS, Noskov AK. Pathogenicity factors of *Vibrio vulnificus*: A review. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2022;30(6):59-65. DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65 (In Russian).
36. Whitfield C. Biosynthesis and assembly of capsular polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:39-68. DOI: 10.1146/annurev.biochem.75.103004.142545
37. Smith AB, Siebeling RJ. Identification of genetic loci required for capsular expression in *Vibrio vulnificus*. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1091-7. DOI: 10.1128/IAI.71.3.1091-1097.2003
38. Pettis GS, Mukerji AS. Structure, Function, and Regulation of the Essential Virulence Factor Capsular Polysaccharide of *Vibrio vulnificus*. *Int J Mol Sci*. 2020 May 5;21(9):3259. DOI: 10.3390/ijms21093259
39. Garrison-Schilling KL, Grau BL, McCarter KS, Olivier BJ, Comeaux NE, Pettis GS. Calcium promotes exopolysaccharide phase variation and biofilm formation of the resulting phase variants in the human pathogen *Vibrio vulnificus*. *Environ Microbiol*. 2011 Mar;13(3):643-54. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2010.02369.x
40. Chatzidakis-Livanis M, Jones MK, Wright AC. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. *J Bacteriol*. 2006 Mar;188(5):1987-98. DOI: 10.1128/JB.188.5.1987-1998.2006
41. Hilton T, Rosche T, Froelich B, Smith B, Oliver J. Capsular polysaccharide phase variation in *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Nov;72(11):6986-93. DOI: 10.1128/AEM.00544-06
42. Gulig PA, Bourdage KL, Starks AM. Molecular Pathogenesis of *Vibrio vulnificus*. *J Microbiol*. 2005 Feb;43 Spec No:118-31.
43. Merkel SM, Alexander S, Zufall E, Oliver JD, Huet-Hudson YM. Essential role for estrogen in protection against *Vibrio vulnificus*-induced endotoxic shock. *Infect Immun*. 2001 Oct;69(10):6119-22. DOI: 10.1128/IAI.69.10.6119-6122.2001

44. Iguchi T, Kondo S, Hisatsune K. Sugar composition of the polysaccharide portion of lipopolysaccharides of *Vibrio fluvialis*, *Vibrio vulnificus*, and *Vibrio mimicus*. *Microbiol Immunol*. 1989;33(10):833-41. DOI: 10.1111/j.1348-0421.1989.tb00969.x
45. Vinogradov E, Wilde C, Anderson EM, Nakhamchik A, Lam JS, Rowe-Magnus DA. Structure of the lipopolysaccharide core of *Vibrio vulnificus* type strain 27562. *Carbohydr Res*. 2009 Mar 10;344(4):484-90. DOI: 10.1016/j.carres.2008.12.017
46. Scaglione S, Kliethermes S, Cao G, Shoham D, Durazo R, Luke A, et al. The Epidemiology of Cirrhosis in the United States: A Population-based Study. *J Clin Gastroenterol*. 2015 Sep;49(8):690-6. DOI: 10.1097/MCG.000000000000208
47. Thiaville PC, Bourdage KL, Wright AC, Farrell-Evans M, Garvan CW, Gulig PA. Genotype is correlated with but does not predict virulence of *Vibrio vulnificus* biotype 1 in subcutaneously inoculated, iron dextran-treated mice. *Infect Immun*. 2011 Mar;79(3):1194-207. DOI: 10.1128/IAI.01031-10
48. Miyamoto K, Kawano H, Okai N, Hiromoto T, Miyano N, Tomoo K, et al. Iron-Utilization System in *Vibrio vulnificus* M2799. *Mar Drugs*. 2021 Dec 17;19(12):710. DOI: 10.3390/md19120710
49. Okujo N, Saito M, Yamamoto S, Yoshida T, Miyoshi S, Shinoda S. Structure of vulnibactin, a new polyamine-containing siderophore from *Vibrio vulnificus*. *Biometals*. 1994 Apr;7(2):109-16. DOI: 10.1007/BF00140480
50. Stelma GN Jr, Reyes AL, Peeler JT, Johnson CH, Spaulding PL. Virulence characteristics of clinical and environmental isolates of *Vibrio vulnificus*. *Appl Environ Microbiol*. 1992 Sep;58(9):2776-82. DOI: 10.1128/aem.58.9.2776-2782.1992
51. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog*. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
52. Lee S, Song S, Lee K. Functional analysis of TolC homologs in *Vibrio vulnificus*. *Curr Microbiol*. 2014 Jun;68(6):729-34. DOI: 10.1007/s00284-014-0537-4
53. Natividad-Bonifacio I, Fernández FJ, Quiñones-Ramírez EI, Curiel-Quesada E, Vázquez-Salinas C. Presence of virulence markers in environmental *Vibrio vulnificus* strains. *J Appl Microbiol*. 2013 May;114(5):1539-46. DOI: 10.1111/jam.12149
54. Bogard RW, Oliver JD. Role of iron in human serum resistance of the clinical and environmental *Vibrio vulnificus* genotypes. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Dec;73(23):7501-5. Erratum in: *Appl Environ Microbiol*. 2008 May;74(10):3322. DOI: 10.1128/AEM.01551-07
55. Elgaml A, Higaki K, Miyoshi S. Effects of temperature, growth phase and luxO-disruption on regulation systems of toxin production in *Vibrio vulnificus* strain L-180, a human clinical isolate. *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Feb;30(2):681-91. DOI: 10.1007/s11274-013-1501-3
56. Bang YB, Lee SE, Rhee JH, Choi SH. Evidence that expression of the *Vibrio vulnificus* hemolysin gene is dependent on cyclic AMP and cyclic AMP receptor protein. *J Bacteriol*. 1999 Dec;181(24):7639-42. DOI: 10.1128/JB.181.24.7639-7642.1999
57. Liu M, Crosa JH. The regulator HlyU, the repeat-in-toxin gene rtxA1, and their roles in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. *Microbiologyopen*. 2012 Dec;1(4):502-13. DOI: 10.1002/mbo3.48
58. Kim WB, Lee BC, Choi SH. *Vibrio vulnificus* AphB is involved in interleukin-8 production via an NF- κ B-dependent pathway in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 27;417(4):1265-70. DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.12.122
59. Carda-Diéguez M, Silva-Hernández FX, Hubbard TP, Chao MC, Waldor MK, Amaro C. Comprehensive identification of *Vibrio vulnificus* genes required for growth in human serum. *Virulence*. 2018 Dec 31;9(1):981-993. DOI: 10.1080/21505594.2018.1455464
60. Coerd KM, Khachemoune A. *Vibrio vulnificus*: Review of Mild to Life-threatening Skin Infections. *Cutis*. 2021 Feb;107(2):E12-E17. DOI: 10.12788/cutis.0183
61. Yin JF, Wang MY, Chen YJ, Yin HQ, Wang Y, Lin MQ, et al. Direct Detection of *Vibrio vulnificus*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio alginolyticus* from Clinical and Environmental Samples by a Multiplex Touchdown Polymerase Chain Reaction Assay. *Surg Infect (Larchmt)*. 2018 Jan;19(1):48-53. DOI: 10.1089/sur.2017.203
62. D'Souza C, Kumar BK, Rai P, Deekshit VK, Karunasagar I. Application of *gyrB* targeted SYBR green based qPCR assay for the specific and rapid detection of *Vibrio vulnificus* in seafood. *J Microbiol Methods*. 2019 Nov;166:105747. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.105747
63. Çam S, Brinkmeyer R, Schwarz JR. Quantitative PCR enumeration of *vccG* and 16S rRNA type A and B genes as virulence indicators for environmental and clinical strains of *Vibrio vulnificus* in Galveston Bay oysters. *Can J Microbiol*. 2019 Aug;65(8):613-621. DOI: 10.1139/cjm-2018-0399
64. Kim HJ, Cho JC. Genotypic Diversity and Population Structure of *Vibrio vulnificus* Strains Isolated in Taiwan and Korea as Determined by Multilocus Sequence Typing. *PLoS One*. 2015 Nov 23;10(11):e0142657. DOI: 10.1371/journal.pone.0142657
65. Pan J, Zhang Y, Jin D, Ding G, Luo Y, Zhang J, et al. Molecular characterization and antibiotic susceptibility of *Vibrio vulnificus* in retail shrimps in Hangzhou, People's Republic of China. *J Food Prot*. 2013 Dec;76(12):2063-8. DOI: 10.4315/0362-028X.JFP-13-161
66. Raz N, Danin-Poleg Y, Hayman RB, Bar-On Y, Linetsky A, Shmoish M, et al. Genome-wide SNP-genotyping array to study the evolution of the human pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 3. *PLoS One*. 2014 Dec 19;9(12):e114576. DOI: 10.1371/journal.pone.0114576
67. Chatzidaki-Livanis M, Jones MK, Wright AC. Genetic variation in the *Vibrio vulnificus* group 1 capsular polysaccharide operon. *J Bacteriol*. 2006 Mar;188(5):1987-98. DOI: 10.1128/JB.188.5.1987-1998.2006

Информация о соавторах:

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института

Ступникова Елена Вадимовна, научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций Ростовского-на-Дону научно-исследовательского противочумного института ORCID: 0000-0002-9574-9684

Information about co-authors:

Ruslan V. Pisanov, PhD in Biological Sciences, Leading researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor

Elena V. Stupnikova, Researcher, Laboratory of molecular biology of natural focal and zoonotic infections of the Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor ORCID: 0000-0002-9574-9684