

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ НАДЗОР ЗА ХОЛЕРОЙ В СИБИРСКОМ И ДАЛЬНЕВОСТОЧНОМ РЕГИОНАХ И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО МОНИТОРИНГА VIBRIO CHOLERAЕ

В последние годы (2006-2012 гг.) в тесно связанных по экономическим, туристическим и другим направлениям сотрудничества с Россией и регионом Сибири и Дальнего Востока странах Азии наметилась тенденция снижения заболеваемости холерой (со средним ежегодным темпом снижения 1,662 %) [5]. Вместе с тем, увеличилось число пораженных стран Азии с 6 (2006 г.) до 15 (2011 г.) с крупными вспышками в Афганистане (2369 больных холерой в 2010 г., 3733 – в 2011 г.), Йемене (31789 больных в 2011 г.), Иране (1187 – в 2011 г.), Вьетнаме (1946 в 2007 г. и 606 – в 2010 г.), Таиланде (1974 в 2008 г.), Индонезии (1007 в 2008 г.), на Филиппинах (1778 в 2012 г.), Малайзии (586 больных в 2011 г.); Индии (206 в 2011 и 1171 в 2012 гг.), Непале – (1790 в 2010 г.) и др. [5, 10]. На этом континенте продолжают формироваться клоны холерного вибриона с новыми генетическими свойствами, обладающие способностью к пандемическому распространению и закреплению на ранее свободных территориях, вызывающие заболевания с более тяжелым клиническим течением и характеризующиеся множественной резистентностью к антибиотикам. Ежегодно из стран Азии регистрируются трансконтинентальные и межгосударственные заносы холеры, достигающие иногда до 76,9 % от общего числа заносов в мире (2008 г.) [8]. Классическим примером может служить импортиция из Южной Азии клона *V. cholerae* на о. Гаити с развитием здесь с октября 2010 г. масштабной эпидемии и последующим вовлечением в эпидпроцесс стран Центральной и Северной Америки [9].

Угроза завоза холеры на территорию определяется растущей миграцией населения всеми видами международного транспорта. Например, оценивая внешнюю миграцию по Иркутской области в 2011 г. (данные Управления Федеральной миграционной службы по Иркутской области) можно отметить три основных потока въезжающих иностранных граждан: среднеазиатское направление (Казахстан, Таджикистан, Узбекистан, Кыргызстан) – 61,3 %; восточно-азиатское направление (Китай, Монголия, КНДР и др.) – 20,5 % и западное направление (Украина, Белоруссия, Молдова и некоторые страны Евросоюза) – 10,3 %. Число въехавших иностранных граждан через воздушный пункт пропуска Аэропорт Иркутск в 2011 году возросло по сравнению с предыдущим годом на 72 %. За 9 месяцев 2012 г. поставлен на миграционный учет 141 141 иностранный гражданин, что на 19,5 % больше, чем за аналогичный период прошлого года, при этом 45,2 % из них составляют трудовые мигранты. Кроме трудовой миграции, необходимо учитывать подъем динамично развивающейся туристической отрасли, открытие новых прямых международных рейсов, выполняемых на современных комфортабельных воздушных судах повышенной вместимости. Так, в прошлом году санитарно-карантинному контролю подвергнуто 2737 воздушных судов (больше чем в 2011 г. в 1,12 раз), досмотрено 376982 пассажиров и членов экипажей, разрешен ввоз 7 партий подконтрольного товара, в том числе из стран, неблагополучных по инфекциям, требующих проведения мероприятий по санитарной охране территории.

Случаев эпидемиологических осложнений по холере в регионе с 2000 г. не зарегистрировано. Однако на территории ежегодно из небольших малопоточных водоемов (особенно в местах сброса сточных вод и ливневой канализации) выделяются штаммы нетоксигенного холерного

вибриона. Это свидетельствует о возможной резервуарной роли подобных водоемов для сохранения и накопления эпидемически значимых клонов возбудителя во время заноса [3]. Поэтому в системе эпиднадзора за холерой важную роль кроме обследования (по эпидемиологическим и клиническим показаниям) контингентов риска играет мониторинг поверхностных водоемов с обязательным расследованием причин обнаружения в них холерного вибриона [1, 2, 4].

В 2012 году на территории Сибири из поверхностных водоемов изолировано 22 штамма *V. cholerae eltor*, в том числе: в Алтайском крае – один, Забайкальском крае – шесть, Иркутской области – два, Тюменской области – 13 культур.

Представляет интерес выделение в течение месяца (2.07.12 – 02.08.12) из озера Верхнее Кривое Тюменской области 13 штаммов нетоксигенного холерного вибриона эльтор. Согласно информации из базы данных «*Vibrio cholerae eltor*. Сибирь и Дальний Восток», за период VII пандемии холерный вибрион эльтор в поверхностных водоемах Тюменской области обнаруживался дважды: в 1974 г. (р. Томь) и 1976 г. (р. Вогай). Озеро Верхнее Кривое расположено на 11 км Салаирского тракта от г. Тюмени на левом берегу р. Тура. Площадь его зеркала 0,31 кв.м., глубина 2,7-12 м. Ранее озеро пополнялось водой р. Тура во время весеннего паводка, после строительства защитной дамбы в 1998 г. уровень воды в озере понижается. Озеро используется в рекреационных целях. В ходе санитарно-эпидемиологического расследования по поводу многократного выделения нетоксигенного штамма *V.cholerae eltor* из проб воды озера Верхнее Кривое установлено (информация Управления Роспотребнадзора по Тюменской области от 25.07.2012 г.), что на территории расположенной на его берегу базы отдыха «Верхний Бор» оборудован благоустроенный пляж протяженностью 600 м. Обращает на себя внимание наличие здесь двух открытых термальных бассейнов, заполняемых щелочной минеральной водой (рН 7,3-7,5) из скважины глубиной 1239 м. Для нормального функционирования скважины производится постоянный выпуск в озеро неиспользованной минеральной воды объемом 150 м³/сут по подземному коллектору (длина 40 м., диаметр 0,67 м.). Отведение отработанной воды из бассейнов и хозяйственно-бытовых сточных вод базы отдыха производится в 16 выгребных ям не поглощающего типа (септики) достаточного объема с регулярной откачкой и вывозом. Аварийных хозфекальных сбросов в летний период не зарегистрировано. Из вышеизложенного следует, что обнаружение нетоксигенного холерного вибриона оказалось результатом не установленного заноса в озеро Верхнее Кривое, а многократное выделение микроорганизма в течение месяца – за счет его размножения и накопления в подщелачиваемых минеральной водой благоприятных экологических условиях водоема. Введенные после выделения *V.cholerae eltor* ограничительные мероприятия были сняты после трех отрицательных результатов ежедневного исследования проб.

Бактериологическое исследование изолированных на территории Сибири в 2012 г. *V.cholerae eltor* показало, что все штаммы принадлежат к O1 серогруппе, из них 17 – к серовару Огава, 5 – к Инаба. Штаммы гемолизположительны в пробе Грейга, не лизируются классическим фагом «С», диагностическим фагом «Эльтор» в разных разведениях лизируются лишь 4 штамма, а дифференциально-диагностическим (ДДФ) фагом – 5 культур. Фаготип определен только у 3 штаммов, выделенных в Забайкальском крае. У остальных культур фаготип определить не удалось или полученные результаты не укладываются в схему фаготипирования.

С целью дополнительной идентификации изолированных в регионе штаммов *V.cholerae eltor*, а также для ускоренной идентификации подозрительных на *V. cholerae* колоний в процессе

мониторинговых исследований поверхностных водоемов г. Иркутска в летний сезон 2012 г. нами применен метод MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа с использованием расширенной базы данных MALDI Biotyper 3,0. В результате по профилю константных белков подтверждена принадлежность к *V. cholerae* всех 22 штаммов, изолированных на территории. Что касается применения масс-спектрометрии для идентификации культур на этапе бактериологического анализа при мониторинге поверхностных водоемов г. Иркутска, то из 179 исследованных подозрительных колоний масс-спектрометрически достоверная идентификация до вида *V. cholerae* установлена для 20 колоний, которые впоследствии были подтверждены бактериологически (*V. cholerae* O1 eltor – 2 штамма, *V. cholerae* не O1/O139 – 18 штаммов). Кроме того, на основании белковых профилей два образца отнесены к *V. fluvialis* и 17 – к *Aeromonas* spp. При этом, для последних, в ряде случаев установлено расхождение с данными классического микробиологического анализа по некоторым тестам, однако выборочная дополнительная биохимическая идентификация на бактериологическом анализаторе Vitek-2 и секвенирование специфических участков генома подтвердило результаты масс-спектрометрии. Корреляция результатов MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа с данными классической микробиологии, дополнительной биохимической идентификации и молекулярно-генетического анализа, а также скорость постановки и простота выполнения протокола позволяют рекомендовать указанный метод для включения в схему лабораторной диагностики холеры для ускоренной идентификации культуры.

Молекулярно-генетическая паспортизация 22 изолированных на территории Сибири в 2012 г. штаммов *V. cholerae* O1 показала, что все они характеризуются как эпидемически не опасные – не содержат генов холерного токсина *ctxAB* и токсин-корегулируемых пилей *tcpA*, лишены детерминант «островов пандемичности» VSP-I (*tnp* 0183) и VSP-II (*pro*490). В геноме 95,5 % изолятов установлено наличие детерминант O1 серогруппы (ген *wbeT*), гена *hlyA* – в 81,8 %, кластера генов цитотоксина RTX (*rtxA* и *rtxC*) – в 100% изолятов. Что касается генетических маркеров персистенции в объектах окружающей среды, то все выделенные вибрионы содержат ген, регулирующий продукцию экзополисахарида (*vpsR*), в то время как ген маннозочувствительного гемагглютинина (*mshQ*) обнаружен лишь у 40,9% штаммов. При этом *mshQ*-отрицательными оказались все выделенные на протяжении месяца из оз. Верхнее Кривое штаммы, что свидетельствует о существовании у них других механизмов, определяющих возможность длительного сохранения *V. cholerae* в объектах окружающей среды.

Мультилокусный анализ пяти вариабельных тандемных повторов дифференцировал исследуемые штаммы *V. cholerae* на семь генотипов. Два изолированных из болотно-озерного комплекса и р. Сарафановки г. Иркутска штамма характеризуются идентичным MLVA-типом - VcA15, VcB0, VcC11, VcD5, VcG2. При PFGE-типировании они также демонстрируют одинаковые NotI-генерируемые профили рестрикции, что подтверждает гомологичность их геномной организации. Следует отметить, что в 2011 г. в г. Иркутске из р. Ангары на протяжении полутора месяцев выделялись штаммы того же генотипа. Однако в 2012 г. при регулярном в течение сезона исследовании проб воды в тех же стационарных точках р. Ангары холерный вибрион обнаружен не был. В предыдущие годы также среди исследованных штаммов из поверхностных водоемов г. Иркутска варианты с указанным профилем не выявлялись. Эти данные подтверждают высказанное ранее мнение о том, что обнаружение новых геновариантов вибриона эльтор в таких случаях необходимо рассматривать как результат заноса их в водоем [1].

Популяционный состав штаммов *V. cholerae* eltor из оз. Верхнее Кривое Тюменской области оказался неоднородным по структуре одного из вариабельных тандемных локусов VcA: большая часть штаммов (10) содержит 13 повторов, а три штамма – 12 повторов при идентичности остальных анализируемых повторяющихся участков генома (генотипы VcA13, VcB0, VcC15, VcD4, VcG3 и VcA12, VcB0, VcC15, VcD4, VcG3, соответственно). Связи аллельного профиля *V. cholerae* eltor с периодом и объектом выделения не установлено, т.к. штаммы с профилем VcA13, VcB0, VcC15, VcD4, VcG3 обнаруживались на протяжении месяца как в воде, так и в иле, с профилем VcA12, VcB0, VcC15, VcD4, VcG3 – только в воде независимо от периода. Кроме того, выявлен и полиморфизм профилей рестрикции геномной ДНК данной группы штаммов, не совпадающий с вариабельностью MLVA-генотипов. Вместе с тем, различия в структуре анализируемых участков генома штаммов из оз. Верхнее Кривое минимальны (различие на один повтор в локусе VcA, генерирование дополнительного фрагмента рестрикции в пульс-электрофорезе), что позволяет судить о попадании в водоем одного клона холерного вибриона и возможном формировании субклонов в период накопления и персистенции в данной экологической нише.

V. cholerae eltor из поверхностных водоемов Забайкальского края дифференцируются на четыре MLVA-генотипа за счет вариабельности по VcA и VcC локусам, тогда как по локусам VcD и VcG они демонстрируют идентичность как друг с другом, так и со штаммами, изолированными в Тюменской области. Такие аллельные варианты VcD и VcG локусов (четыре и три повтора, соответственно) оказываются достаточно распространенными среди нетоксигенных вибрионов эльтор, изолируемых на территории Сибири и Дальнего Востока в разные годы: из 129 исследованных штаммов 69% содержат четыре повтора VcD и 65% - три повтора VcG. В группе же токсигенных штаммов таких аллелей не обнаружено.

В целом, комплексное генотипирование изолированных из поверхностных водоемов региона штаммов демонстрирует гетерогенность их генетической организации (в большинстве случаев ассоциирующуюся с территорией выделения) и обеспечивает дополнительные возможности своевременного выявления новых вариантов вибриона в водных биотопах.

Вариабельность генома штаммов из объектов окружающей среды определена и при ретроспективном исследовании структуры комплекса генов жизнеобеспечения холерного вибриона (*dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *gyrB*, *cat*, *gmd*, *chi*) в коллекции штаммов разной эпидемической значимости ($n=42$). В результате филогенетического анализа, проведенного на основании установления эволюционных дистанций между нуклеотидными последовательностями «house-keeping» генов, 20 эпидемически неопасных штаммов распределились на девять сиквенс-типов. При этом отмечается кластеризация сиквенс-типов нетоксигенных штаммов в зависимости от серогруппы. Так, в один кластер объединено четыре сиквенс-типа, включающие штаммы холерного вибриона O139 серогруппы и PO варианта, в другой – *V. cholerae* O1 серогруппы. Дифференциация на отдельные сиквенс-типы штаммов разных серогрупп обусловлена не только особенностями нуклеотидной последовательности ассоциированного с локусом серогруппоспецифичности гена – *gmd* (указанный ген отсутствует у всех штаммов PO варианта и имеет существенные отличия у штамма O139 серогруппы в сравнении с O1), но и структурной организацией других исследованных генов. В ряде случаев прослеживается связь аллельного профиля штаммов с территорией изоляции.

Изолированные в Сибирском и Дальневосточных регионах на разных этапах седьмой пандемии эпидемически опасные штаммы формируют отдельную монофилетическую группу с идентичным

сиквенс-типом, значительно отличающуюся по нуклеотидной последовательности генов домашнего хозяйства от неопасных вариантов вибриона эльтор, что дает основание судить о разной филогенетической истории указанных групп холерного вибриона. Гомология нуклеотидных последовательностей генов домашнего хозяйства типичных вибрионов эльтор начала седьмой пандемии и атипичных вариантов *V. cholerae* eltor с измененной структурой гена *ctxB*, с одной стороны, свидетельствует об их генетическом родстве, а с другой определяет низкую дискриминирующую способность генотипирования эпидемически опасных вибрионов эльтор по данной схеме. Поэтому актуален поиск новых полиморфных генетических локусов, ассоциированных с жизнедеятельностью микробной клетки, изучение структуры которых обеспечит дифференциацию эпидемически опасных изолятов холерного вибриона эльтор для выяснения механизмов их эволюционной дивергенции и путей формирования новых клонов патогена, и установления молекулярно-эпидемиологических закономерностей их распространения.

Вместе с тем максимальной информативностью для решения фундаментальных задач изучения эволюции патогенов, несомненно, характеризуется анализ структурных особенностей генома микроорганизмов (выявление SNP, SNV, indel и др.) на основании полногеномного секвенирования. При полногеномном анализе однонуклеотидных полиморфизмов Mutreja A. с соавт. обнаружили порядка 250 SNP в коровой области генома штаммов *V. cholerae*, изолированных на разных этапах седьмой пандемии, что дало возможность разделить их на три большие группы, соответствующие трем волнам глобального распространения пандемических клонов [7]. С учетом этих характеристик авторы предлагают и новый подход к генотипированию СТХ профага холерного вибриона. SNP-генотипирование изолятов с о. Гаити в сравнении со штаммами с эндемичных по холере территорий позволило сделать заключение о трансконтинентальной импортиции клона *V. cholerae* на остров из Южной Азии [6] и явилось важным моментом в выяснении причин развития эпидемии холеры в регионе Карибского бассейна.

Полученные нами предварительные результаты полногеномного секвенирования штамма *V. cholerae* eltor (генотип – *ctxB1+rstREI+rstRCl-rstC+TLC+tbr3*), изолированного в заносном очаге в г. Иркутске (1997 г.), показали существование значительного количества однонуклеотидных полиморфизмов и других генетических перестроек в различных участках его генома по сравнению с прототипным штаммом *V. cholerae* биовара эльтор № 16961 (NC002505), что подтверждает перспективность использования данного подхода для углубленного изучения генетического полиморфизма возбудителя холеры.

Таким образом, современная ситуация по холере в мире, особенности эпидемиологии инфекции на текущем этапе седьмой пандемии и высокий патогенный потенциал возбудителя определяет высокий риск заноса инфекции на любую территорию, в т.ч. и регион Сибири и Дальнего Востока. На этом фоне в системе надзора за холерой важное значение приобретает совершенствование подходов к комплексному эпидемиологическому анализу с привлечением современных молекулярных технологий для своевременного выявления новых вариантов патогена, выяснения закономерностей развития эпидемических осложнений, механизмов персистенции холерного вибриона и разработки с учетом результатов анализа эффективных профилактических и противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Голубинский Е.П., Ганин В.С., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Микробиологический мониторинг поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока в системе эпидемиологического надзора за холерой // Холера и патогенные для человека вибрионы: Матер. Пробл комиссии – Ростов н/Д, 2005. – Вып.18. – С. 19-22.
2. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В., Куликалова Е.С., Ганин В.С., Кожевникова А.С. Оценка ситуации по холере в Сибири и на Дальнем Востоке по результатам эпидемиологического мониторинга и молекулярно-генетического исследования штаммов холерного вибриона // Холера и патогенные для человека вибрионы. Матер. совещания пробл. комиссии – Ростов н/Д, 2008. – Вып. 21. – С. 29-32.
3. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Куликалова Е.С., Шкаруба Т.Т. Роль и значение поверхностных водоемов в становлении и развитии VII пандемии холеры // Эпидемиология и инфекц. болезни. – 2009. – № 2. – С. 21-25.
4. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В., Куликалова Е.С., Ганин В.С., Кожевникова А.С., Шкаруба Т.Т., Эпидемиологический риск заноса и распространения холеры в регионе Сибири и Дальнего Востока // Холера и патоген. для человека вибрионы. Матер. пробл. комиссии – Ростов н/Д, 2009.- Вып. 22. – С. 32-36.
5. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Арешина О.А., Назаретян А.А., Кругликов В.Д., Иванова С.М., Козина Д.А. Характеристика эпидемиологической обстановки по холере в мире (2003-2012 гг.) и прогноз на 2013 г. // Пробл. особо опасных инф. 2013. – Вып. 1. – С. 11-17
6. Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R., Bullard J., Webster D.R., Kasarskis A., Peluso P., Paxinos E.E., Yamaichi Y., Calderwood S.B., Mekalanos J.J., Schadt E.E., Waldor M.K. The Origin of the Haitian Cholera Outbreak Strain // N. Engl. J. Med. – 2011. – Vol. 364. – P. 33-42.
7. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L.N., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic // Nature. – 2011. – Vol. 477. – P. 462-465.
8. Weekly epidemiological record – 2009. – Vol. 84, No. 31, P. 309-324
9. Weekly epidemiological record – 2011. – Vol. 86, No. 31, P. 325-340
10. Weekly epidemiological record – 2012. – Vol. 87, No. 31-32, P. 289-304

Обзор подготовлен специалистами ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора Балахоновым С.В., Мироновой Л.В., Урбанович Л.Я., Куликаловой Е.С., Афанасьевым М.В., Ганиным В.С., Басовым Е.А., Хунхеевой Ж.Ю., Гольдапелем Э.Г. и Управления Роспотребнадзора по Иркутской области Каверзиной С.В.