

УДК:616.932-036.21-07(571.6)"1970/201"

МОЛЕКУЛЯРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ СИТУАЦИИ ПО ХОЛЕРЕ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ В ПЕРИОД СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ

Л.В. Миронова¹, Ж.Ю. Хунхеева¹, А.С. Пономарева¹, Е.А. Басов¹,
Э.Г. Гольдапель¹, Л.Я. Урбанович¹, Т.В. Громова³, В.Н. Краснощеков²,
В.П. Борзов², А.В. Алленов², А.Г. Ковальский³, С.В. Балахонов¹

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт
Роспотребнадзора, г. Иркутск

²ФКУЗ «Приморская противочумная станция» Роспотребнадзора,
г. Уссурийск

³ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция» Роспотребнадзора,
г. Хабаровск

С применением современных молекулярных технологий проведен анализ ситуации по холере в Дальневосточном регионе в период седьмой пандемии. Установлено, что эпидемиологические проявления холеры на территории в течение анализируемого периода характеризуются регистрацией отдельных случаев завоза инфекции, развитием в результате завоза в двух случаях острых местных вспышек холеры с выделением токсигенного возбудителя из объектов окружающей среды, многолетним обнаружением вибрионов эльтор в водных объектах в благополучный по холере период.

Молекулярно-эпидемиологический анализ с применением комплекса методов (амплификационное профилирование, MLVA- PFGE- MLST-типирование) показал возможность дифференциации изолятов на отдельные группы по их эпидемической значимости и выявил полиморфизм внутри этих групп по структуре отдельных локусов, что определяет эффективность использования такого подхода при установлении причин развития эпидемических осложнений по холере, выяснении направлений заноса и путей распространения возбудителя на территории, а также при изучении эволюционных взаимосвязей различных групп штаммов.

Ключевые слова: холера, молекулярно-эпидемиологический анализ, *V. cholerae*, молекулярное типирование, PFGE, MLVA, MLST

MOLECULAR EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF THE SITUATION OF CHOLERA IN THE RUSSIAN FAR EAST DURING THE SEVENTH PANDEMIC

L.V. Mironova¹, Zh.Yu. Khunkheeva¹, A.S. Ponomareva¹, E.A. Basov¹, E.G. Goldapel¹, L. Ya. Urbanovich¹, T.V. Gromova³, V.N. Krasnoshchekov², V.P. Borzov², A.V. Allenov², A.G. Kovalski³, S.V. Balakhonov¹

¹Irkutsk Anti-plague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk

²Primorye Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor, Ussuriisk

³Khabarovsk Anti-Plague Station of Rospotrebnadzor, Khabarovsk

The analysis of the situation of cholera in the Far East during the seventh pandemic was made with using modern molecular technologies. It was found, that the epidemiological onsets of cholera in the territory during the analyzed period is characterized by the registration of individual cases of introduction of infection, and as a result developing in two cases acute local outbreaks of cholera with the recovering of toxigenic pathogen from environmental objects, long-term detection of *V. cholerae* eltor in surface water in the satisfactory cholera period.

Molecular-epidemiological analysis based on complex methodological approaches (amplification profiling, MLVA- PFGE- MLST-typing) isolates showed the ability to differentiate into separate groups according to their epidemiological significance and identified polymorphisms within these groups on the structure of individual loci, that determines the effectiveness of different approaches to identifying the causes of complications for cholera, clarifying the direction of the skid and pathways of the pathogen in the territory.

Keywords: cholera, molecular-epidemiological analysis, *V. cholerae*, molecular typing, PFGE, MLVA, MLST

Территория российского Дальнего Востока занимает около 36 % от общей площади России и с учетом географического положения, наличия границ с Китаем, Японией, КНДР и функционирования мультимодальных транспортных узлов имеет важное геополитическое значение. Дальневосточный регион характеризуется разнообразными климатическими условиями (от арктических и субарктических на севере до муссонных в Сахалинской, Еврейской и Амурской областях, в Приморском и Хабаровском краях), омывается шестью морями и имеет развитую внутреннюю гидрологическую сеть, представленную крупными и мелкими реками, озерами. При этом следует отметить, что одна из крупнейших водных артерий региона – р. Амур и ее приток – р. Уссури на значительном протяжении являются границей с КНР. Кроме того, в р. Амур впадает протекающая по территории Китая р. Сунгари [5, 6].

Климато-географические особенности Дальнего Востока, интенсивные торгово-экономические и туристические связи со странами Азии, в том числе неблагополучными по холере, определяют опасность заноса инфекции на территорию и возможность сохранения и накопления возбудителя в отдельных благоприятных для жизнедеятельности холерного вибриона участках водных объектов [5, 6].

Цель работы - анализ ситуации по холере в Дальневосточном регионе в период седьмой пандемии с применением современных молекулярных технологий.

Материалы и методы

Эпидемиологический анализ проведен на основании первичных документов (паспорта и журналы идентификации культур холерного вибриона, донесения учреждений Роспотребнадзора при эпидемических осложнениях по холере), научных публикаций, отчетов.

При молекулярно-генетическом анализе использовались 137 изолированных от людей и из объектов окружающей среды в Дальневосточном регионе при разных эпидемиологических ситуациях на протяжении седьмой пандемии штаммов *V. cholerae*. Все исследуемые штаммы хранились в лиофилизированном состоянии в музее живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора. Изучение биологических свойств *V. cholerae* проводилось в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [1].

Экстракция ДНК штаммов осуществлялась с применением стандартных коммерческих наборов, оценка качества и количества геномной ДНК – электрофоретически и спектрофотометрически.

Эпидемическая опасность *V. cholerae* оценивалась на основании скрининга детерминант патогенности (генов холерного токсина – *ctxAB* и токсин-корегулируемых пилей адгезии – *tcpA*) в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени или с электрофоретической детекцией.

Амплификационное профилирование эпидемически опасных штаммов осуществлялось посредством детекции и определения структуры биоварспецифических и ассоциированных с патогенностью генов [2].

Мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов в штаммах *V. cholerae* *eltor* (MLVA-типирование) проводился на основании определения структуры локусов *VcA*, *VcB*, *VcC*, *VcD*, *VcG* с идентификацией размеров на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer.

Макрорестрикционное картирование хромосомной ДНК выполнялось в соответствии с предложенным *PulseNet* протоколом с применением эндонуклеаз *NotI* (GC↑GGCCGC) и *SfiI* (GGCCNNNN↑NGGCC). Рестрикты разделялись в 1,0 % агарозном геле в системе «CHEF Mapper XA System». В качестве размерного стандарта использовался *XbaI*-генерированный паттерн рестрикции ДНК штамма *Salmonella* ser. Braenderup H98124 [11].

Сиквенс-тип изолятов (мультилокусное секвенс-типирование – MLST) определялся на основании изучения структуры фрагментов генов «домашнего хозяйства» *dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *gyrB*, *cat*, *chi*; одного гена, ассоциированного с локусом серогруппоспецифичности – *gmd*, и одного гена, входящего в состав мобильного генетического элемента в геноме эпидемически опасных *V. cholerae* – *rstA* [9].

Кластерный анализ результатов генотипирования осуществлялся с использованием инструментов программного комплекса Bionumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия).

Результаты и обсуждение

Ситуация в мире по холере продолжает оставаться напряженной. В 2014 г. зарегистрировано 126 626 случаев в 31 стране мира [4]. Следует отметить, что в странах Азии, с которыми у Дальневосточного региона сложились тесные торгово-экономические, туристические взаимосвязи, ежегодно регистрируются вспышки и спорадические случаи заболевания холерой. Так, с 2010 г. эпидосложнения по холере ежегодно регистрируются в КНР, Таиланде, Малайзии, в отдельные годы – в Японии, Корее, Вьетнаме и др. странах Азии [12-15].

Анализ эпидемиологической ситуации по холере на Дальнем Востоке в период седьмой пандемии показал, что впервые холера Эль-тор в регион была занесена в начале 70-х гг. прошлого сто-

летия – в 1970 г. диагноз холера был поставлен прибывшей авиарейсом в г. Якутск из г. Одессы женщине. По времени это совпало с первым периодом интенсивного распространения седьмой пандемии в мире и России, в частности.

В дальнейшем, после практически 30-летнего отсутствия эпидемических осложнений по холере в регионе, завозные случаи были зарегистрированы в 1999 г. в г. Уссурийск у троих водителей, прибывших из г. Дуин (КНР). Двоим из них диагноз «холера» поставлен при обращении за медицинской помощью, третий выявлен при обследовании контактировавших с больными лиц. В связи с регистрацией в Приморском крае завозных случаев холеры было введено лабораторное обследование прибывающих из Китая туристов. Эти мероприятия способствовали выявлению в г. Южно-Сахалинске среди группы возвратившихся из г. Далянь (КНР) шоп-туристов одного больного холерой и одного вибрионосителя [7, 8].

Позднее, в августе-сентябре 1999 г., на Дальнем Востоке зарегистрированы острые эпидемические вспышки холеры в гг. Владивостоке и Южно-Сахалинске. В г. Владивостоке вспышка холеры продолжалась 35 дней. За это время выявлено 23 больных и 5 вибрионосителей, из проб воды поверхностных водоемов и сточных вод выделено 11 штаммов холерного вибриона эльтор. В г. Южно-Сахалинске за период вспышки (20 дней) зарегистрировано 11 больных, 11 вибрионосителей, из проб объектов окружающей среды изолировано 14 штаммов *V. cholerae* eltor [7, 8].

С 2000 г. случаев заболевания холерой в Дальневосточном регионе не зарегистрировано.

Следует сказать, что тактика эпидемиологического надзора за холерой в РФ предусматривает, наряду с обследованием на холеру контингентов риска, мониторинговые исследования вибриофлоры объектов окружающей среды, направленные на своевременное обнаружение в них возбудителя холеры. При этом порядок и сроки мониторинга определены на основании районирования территорий по эпидемическим проявлениям холеры. В соответствии с используемыми для районирования критериями в Дальневосточном регионе определены три типа территорий – II тип (Приморский край), III А тип (Республика Саха (Якутия), Сахалинская область), III Б тип (Хабаровский край, Амурская область), остальные территории относятся к III В типу.

Всего за период наблюдения (1976-2014 гг.) из объектов окружающей среды Дальнего Востока на фоне эпидемиологического благополучия выделено 1098 изолятов *V. cholerae* O1 серогруппы и 229 – RO варианта. Наибольший удельный вес изолированных культур приходится на территорию Приморского края (90,8 % - 1205 культур), где вибрионы выделяются практически ежегодно на протяжении анализируемого периода (37 из 39 лет наблюдения). В водных объектах Хабаровского края обнаружено 53 культуры (4,0 % от общего количества), в Амурской области – 46 (3,5 %) и республике Саха (Якутия) – 23 культуры (1,7 %). Максимальное число изолятов *V. cholerae* из объектов окружающей среды выделено в начале периода наблюдения – 70-е гг. прошлого столетия (рис. 1), в дальнейшем отмечается снижение их количества.

Разнообразие эпидемиологических проявлений холеры на территории Дальнего Востока (завозные очаги, острые местные вспышки с выделением возбудителя из объектов окружающей среды, транзитное вибрионосительство, обнаружение вибрионов эльтор в водных объектах в благополучный по холере период) определяет актуальность анализа ситуации с оценкой молекулярно-генетических особенностей этиологического агента, эволюционных взаимосвязей разных групп патогена, выяснения закономерностей появления и распространения возбудителя на территории с привлечением современных молекулярных технологий.

Детекция комплекса основных детерминат патогенности *V. cholerae* – гена холерного токсина *ctxA* и гена токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA*, показала дифференциацию изолированных на Дальнем Востоке штаммов на три группы:

- эпидемически опасные – штаммы, содержащие гены *ctxA*, *tcpA*;
- эпидемически неопасные – штаммы, лишенные генов *ctxA*, *tcpA*;
- потенциально эпидемически опасные – штаммы с генотипом *ctxA*⁻ *tcpA*⁺.

Все эпидемически опасные *V. cholerae* изолированы от больных и вибрионосителей в завозных очагах холеры и от больных, вибрионосителей и из объектов окружающей среды в период острых местных вспышек. Лишь один штамм, выделенный от вибрионосителя в завозном очаге в г. Южно-Сахалинске, оказался лишен генов вирулентности и, соответственно, отнесен к эпидемически неопасным. При анализе структуры гена субъединицы В холерного токсина эпидемически опасных *V. cholerae* eltor установлено, что все изолированные в 1999 г. в период эпидосложнений штаммы несут специфическую для классического биовара аллель указанного гена [2] и относятся, соответственно, к генетически измененным атипичным вариантам вибриона эльтор, широко распространившимся в мире с начала 90-х гг. прошлого столетия и практически вытеснившим типичные вибрионы эльтор начала седьмой пандемии [10]. По данным амплификационного профилирования по комплексу биовар-специфических и ассоциированных с патогенностью генов эти штаммы отнесены нами ко II генотипу (*ctxB1*⁺*rstR*^{Et}*rstR*^{Ct}*rstC*⁺*TLC*⁻*tbr*₄), а сопоставление результатов генотипирования с данными эпидемиологического анализа позволило заключить, что принадлежность к тому или иному генотипу по ком-

плексу указанных генов коррелирует с направлением заноса инфекции, в данном случае – с заносом возбудителя из КНР [2].

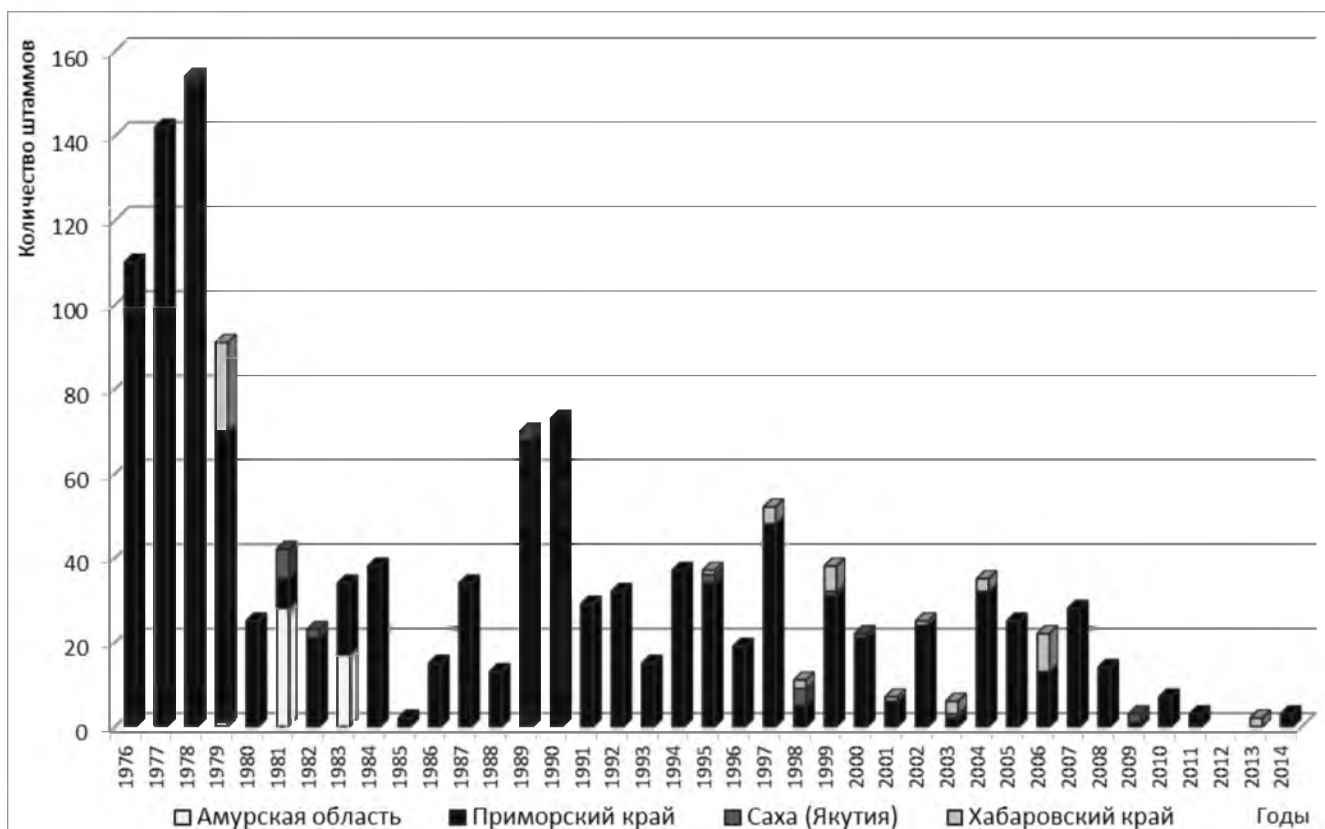


Рисунок 1. Динамика выделения штаммов *V. cholerae* O1 и RO из объектов окружающей среды Дальневосточного региона на фоне эпидемиологического благополучия.

Макрорестрикционное картирование хромосомной ДНК клональных по данным амплификационного профилирования токсигенных штаммов ($n=23$) выявило вариабельность их *NotI/SfiI*-генерируемых профилей рестрикции. Исследованные *V. cholerae* *el*tor из г. Южно-Сахалинска дифференцируются на четыре пульсотипа с одним доминирующим, для изолятов из Приморского края характерен индивидуальный *NotI/SfiI*-профиль рестрикции (рис. 2). Молекулярно-эпидемиологическая характеристика эпидосложнений в г. Южно-Сахалинска показала, что большая часть (76,5%) изолятов принадлежит к одному, распространенному во всех анализируемых очагах вспышки, паттерну. Штаммы с отличающимися от доминирующего профилями рестрикции не обнаруживают привязки к определенному месту выделения, тогда как прослеживается связь типа паттерна со временем, объектом выделения штамма и тяжестью клинического течения заболевания [3]. Соответственно, преимущественное обнаружение в период вспышки в г. Южно-Сахалинска штаммов одного пульсотипа, принадлежность к этому же пульсотипу завозного токсигенного штамма, минимальные отличия вариабельных PFGE-профилей от доминирующего, а также установленная способность *V. cholerae* к спонтанному изменению паттерна рестрикции свидетельствуют о клональном характере вспышки с вероятным формированием субклонов в результате генетических преобразований в водной окружающей среде или организме человека.

Что касается результатов MLVA типирования, то при анализе аллельных профилей эпидемически опасные штаммы образуют на дендрограмме отдельный клональный комплекс с кластеризацией в зависимости от территории изоляции, тогда как для нетоксигенных *V. cholerae* из поверхностных водоемов характерна более высокая гетерогенность популяции. Для данной группы установлено, в большинстве случаев, объединение в генотипы по временному признаку.

При макрорестрикционном картировании хромосомной ДНК выделенные на фоне эпидемиологического благополучия изоляты также образуют отдельную, дистанцированную от группы эпидемически опасных *V. cholerae*, гетерогенную линию с кластеризацией на PFGE-профили в зависимости от времени и места выделения штамма.

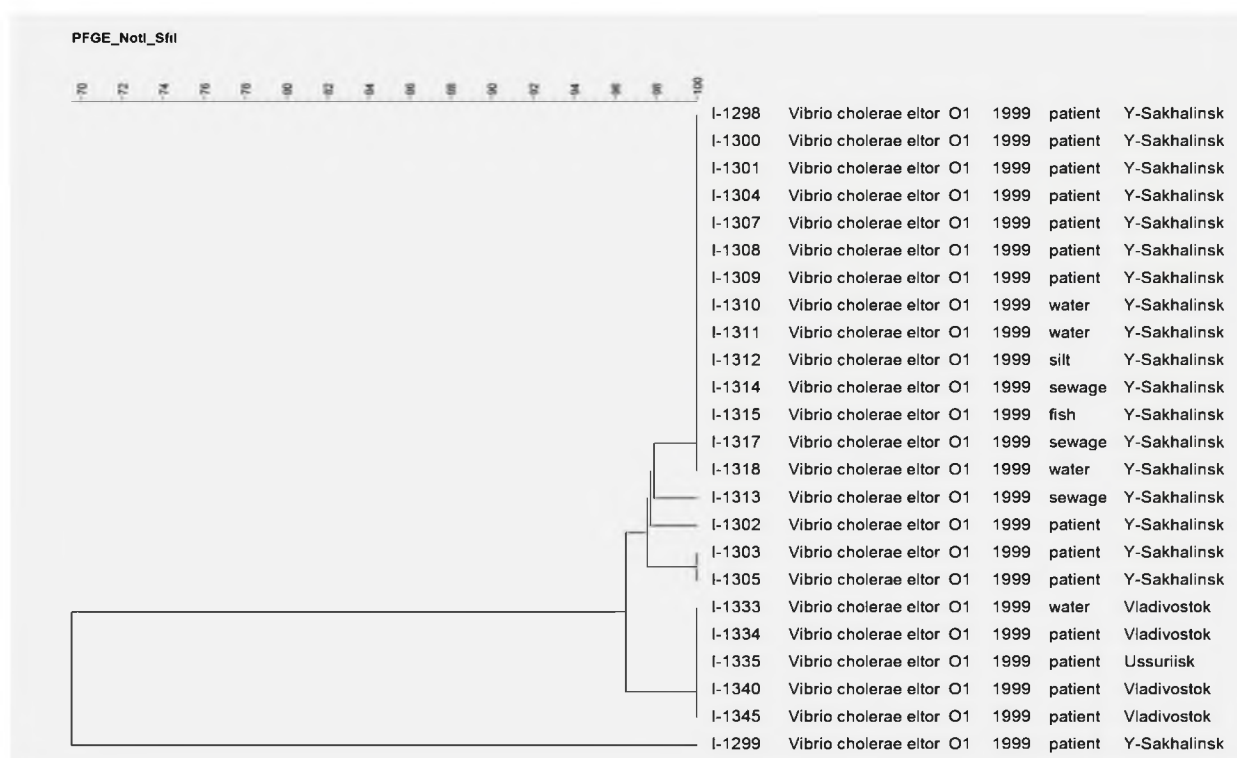


Рисунок 2. Дендрограмма, построенная по алгоритму UPGMA на основании комплексного анализа *NotI/SfiI*-генерируемых профилей рестрикции штаммов *V. cholerae eltor*.

Особый интерес представляют данные молекулярного типирования изолированных в 2013 г. в г. Хабаровске на фоне эпидемиологического благополучия потенциально эпидемически опасных штаммов (генотип *ctxA⁻ tcpA⁺*). Следует отметить, что *V. cholerae eltor*, содержащие ген токсин-регулируемых пилей *tcpA* при отсутствии гена холерного токсина *ctxA* в водных объектах Дальнего Востока были выявлены впервые. При MLVA-типировании в геноме указанных штаммов установлено наличие локуса VcB, что отличает их от обнаруживаемых в объектах окружающей среды на фоне эпидблагополучия вибрионов эльтор. Однако для этих изолятов оказалось характерно большее, в сравнении с токсигенными штаммами, количество повторов в VcB – их аллельный профиль определен как VcA18, VcB30, VcC12, VcD9, VcG6. При филогенетическом анализе результатов MLVA типирования с использованием алгоритма MST для нумерических данных штаммы, изолированные в Хабаровском крае, вошли в отдельную дистанцированную линию в составе клонального комплекса, образованного нетоксигенными вибрионами. Однако PFGE-типирование данных изолятов выявило сходство их *NotI/SfiI*-генерируемых паттернов рестрикции ДНК с профилями токсигенных штаммов вибриона эльтор начала 7 пандемии, что может свидетельствовать о близости генетической организации эпидемически опасных и потенциально эпидемически опасных вариантов возбудителя. Сопоставление результатов молекулярного типирования с данными эпидемиологического расследования позволило сделать заключение о заносе потенциально-эпидемически опасных вариантов холерного вибриона в водоемы Хабаровского края.

Установление филогенетических взаимосвязей, изолированных в Дальневосточном регионе при разных эпидемиологических ситуациях штаммов *V. cholerae* на основании мультилокусного сиквенс-типирования позволило выявить существенные различия структурной организации генов жизнеобеспечения микробной клетки у штаммов разной эпидемической значимости. При этом атипичные генетически измененные варианты *V. cholerae eltor*, послужившие этиологическим агентом эпидемических осложнений в регионе в 1999 г., характеризуются идентичным аллельным профилем и относятся к одному сиквенс-типу, наряду с типичными представителями вибриона эльтор. Нетоксигенные штаммы демонстрируют вариативность структуры генов «домашнего хозяйства» и принадлежность к отдельным сиквенс-типам в зависимости от времени выделения и серогруппы изолята (O1 или RO).

Таким образом, проведенный анализ свидетельствует о существовании риска завоза холеры в Дальневосточный регион из неблагополучных по данной инфекции стран, что подтверждено зарегистрированными в 70-е и 90-е гг. прошлого столетия эпидемическими осложнениями. Применение комплексного подхода при молекулярно-эпидемиологическом анализе позволяет эффективно оценить эпидемиологическую ситуацию, определить вероятные пути заноса и распространения инфек-

ции, а также охарактеризовать генетическое разнообразие и выявить эволюционные взаимосвязи выделенных при разных ситуациях вибрионов эльтор.

Литература

1. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора
2. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С., Половинкина В.С., Куликалова Е.С., Афанасьев М.В. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном районах России // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2012. – № 2. – С. 13-20.
3. Миронова Л.В. Афанасьев М.В. Басов Е.А., Урбанович Л.Я., Балахонов С.В. Ретроспективный макрорестрикционный анализ штаммов *Vibrio cholerae* eltor, изолированных при эпидемических осложнениях на дальнем востоке России // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2014. – № 2. – С. 29-36.
4. Москвитина Э.А., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Иванова С.М., Анисимова Г.Б. Холера: эпидемиологическая обстановка в мире в 2005 – 2014 гг., прогноз на 2015 г. // Пробл. особо опас. инф.- 2015 – Вып.1. – С. 18-25.
5. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в период подготовки и проведения саммита АТЭС-2012 / под ред. Академика РАМН Г.Г. Онищенко // Новосибирск: Наука-Центр, 2013. – 419 с.
6. Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия населения при ликвидации последствий наводнения на Дальнем Востоке (2013 г.) / Под ред. Г.Г. Онищенко, С.В. Балахонова: Новосибирск: Наука-Центр, 2014.
7. Онищенко Г. Г., Марамович А. С., Голубинский Е.П. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Владивостоке // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С. 26-31.
8. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Южно-Сахалинск // Журн. микробиол. – 2000. - № 5. – С.31-35.
9. Garg P., Aydanian A., Smith D., Glenn M.J., Nair G.B., Stine O.C. Molecular Epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: Mutation, Lateral Gene Transfer, and Founder Flush. *Emerg // Infect. Dis.* – 2003. – V. 9(7). – P. 810-814.
10. Kim E.J., Lee D., Moon S.H., Lee C.H., Kim D.W. CTX Prophages in *Vibrio cholerae* O1 Strains // *J. Microbiol. Biotechnol.* – 2014. – V. 24(6). – P. 725-731
11. Standard operating procedure for PFGE of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus*. Iterational Molecular Subtyping Network for Foodborne Disease Surveillance // *Pulsenet International*. 2013. Available at: http://www.pulsenetinternational.org/assets/PulseNet/uploads/pfge/PNL06_Vchol-VparahPFGEprotocol.pdf (accessed 22 January 2013).
12. Weekly epidemiological record – 2011. – Vol.86, No. 31 – P. 325-340.
13. Weekly epidemiological record – 2012. – Vol.87, No. 31-32 – P. 289 – 304.
14. Weekly epidemiological record – 2013. – Vol.88, No. 31- 32 – P. 321-336.
15. Weekly epidemiological record – 2014. – Vol.89, No. 31 – P. 345-356.

Сведения об авторах

Миронова Лилия Валерьевна – кандидат медицинских наук, зав. лабораторией холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: miroanova-lv@yandex.ru)

Хунхеева Жанна Юрьевна – врач-бактериолог лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: khunkheeva2011@yandex.ru)

Пономарева Анна Сергеевна – врач-бактериолог лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru).