

А.Б. Мазрухо, В.Д. Кругликов, Е.В. Монахова, Э.А. Москвитина, И. С. Шестиалтынова, О.А. Подойницына, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, Р.В. Писанов, Д.А. Зубкова, Т.А. Кудрякова, М.И. Ежова, Н.Н. Ускова, М.В. Скачко

РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА ЗА ХОЛЕРНЫМИ ВИБРИОНАМИ В АКВАТОРИИ ТАГАНРОГСКОГО ЗАЛИВА АЗОВСКОГО МОРЯ В 2011–2012 гг.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора», 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40

*Осложнение эпидемической ситуации по холере в Украине (2011) обусловило усиление мероприятий по мониторингу на холерные вибрионы морской воды Таганрогского залива в рамках мер по предупреждению распространения инфекции на территорию Ростовской области и страны. Были охарактеризованы фено- и генотипические особенности выделенных трех атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* eltor O1 и одного токсигенного *V. cholerae* eltor Inaba № 301, содержащего гибридный профаз. С большой долей вероятности установлено отсутствие связи данного штамма со вспышкой инфекции на территории сопредельного государства, но выявлено его родство с завозными штаммами (1999, 2005). Атоксигенные штаммы имели сходство со штаммами, обнаруженными ранее в водных объектах Ростовской области. Проведение комплекса мероприятий по усилению эпидемиологического надзора позволило предотвратить завоз инфекции на территорию Российской Федерации в 2011–2012 гг.*

Ключевые слова: мониторинг, морская вода, штаммы, холерные вибрионы, ПЦР-типирование, секвенирование, VNTR-типирование, эпидемиологический надзор за холерой

A.B. Mazrukho, V.D. Kruglikov, E. V. Monakhova, E. A. Moskvitina, I.S. Shestialtynova, O.A. Podoinitsyna, A.S. Vodopyanov, S.O. Vodopyanov, R.V. Pisanov, D.A. Zubkova, T.A. Kudryakova, M.I. Ezhova, N.N. Uskova, M.V. Skachko

THE RESULTS OF THE MONITORING OF VIBRIO CHOLERAЕ IN THE TAGANROG BAY OF THE AZOV SEA IN 2011-2012

“Rostov-on-Don Anti-Plague Institute”, 117/40, M. Gor'kogo Str., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344002

*The complication of cholera epidemic situation in Ukraine (2011) caused the reinforcement measures on monitoring *Vibrio cholerae* in seawater in Taganrog Bay in the framework of measures for prevention of the spread of infection over the territory of the Rostov region and the country. Phenotypic and genotypic features of 3 selected atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* eltor O1 and 1 toxigenic strain of *V. cholerae* eltor Inaba № 301, containing the hybrid prophage were characterized. With great probability there was established the absence of association of this strain with the outbreak of infection within the territory of the neighboring country, but there was revealed his relationship with to imported strains (1999, 2005). Atoxigenic strains were similar to strains previously detected in water bodies of the Rostov region. The implementation of the set of measures for the strengthening of epidemiological control permitted to prevent the importation of infection into the territory of the Russian Federation in 2011 - 2012.*

Key words: monitoring, sea water, strains, *V. cholerae*, PCR - typing, sequencing, VNTR- typing, cholera surveillance

Введение

По данным государственной санитарно-эпидемиологической службы Украины, с мая 2011 г. среди населения Мариуполя регистрировались случаи холеры, вызванные токсигенными штаммами холерных вибрионов эльтор Огава и связанные с употреблением в пищу морских рыбных продуктов. Ростовская область относится к территориям I типа по эпидемиологическим проявлениям холеры, имеет общую акваторию Азовского моря с Донецкой областью Украины, а также интенсивную миграцию населения в пунктах пропуска через государственную границу Российской Федерации. В связи с этим в рамках эпидемиологического надзора за холерой были проведены мероприятия в целях предотвращения завоза холеры с сопредельной территории [1, 2]. Это касалось интенсификации (с 6 июня 2011 г.) мониторинговых исследований морской воды Таганрогского залива

Азовского моря на присутствие *Vibrio cholerae*, которые были продолжены и в 2012 г.

Цель настоящего исследования состояла в анализе результатов мониторинга наличия холерных вибрионов в морской воде Таганрогского залива с расширенной фено- и генотипической характеристикой выделенных штаммов и оценке эффективности указанных мероприятий в связи с предупреждением завоза инфекции на территорию нашей страны.

Материалы и методы

Отбор проб морской воды в зонах рекреации и местах сброса сточных вод и их исследование на присутствие *V. cholerae* O1 осуществляли 2 раза в неделю по 12 точкам, в том числе 6 стационарным и 6 дополнительным. Выделение и идентификацию культур холерных вибрионов проводили в соответствии с действующими нормативно-методическими документами [3, 4].

ПЦР-генотипирование исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 проводили по набору следующих генов: все гены CTX и RS-элементов (ser, orfU, ace,

Для корреспонденции: Мазрухо Алексей Борисович, канд. мед. наук, зав. лаб. питательных сред, e-mail: plague@aaanet.ru

Таблица 1

Характеристика штаммов *V. cholerae* O1 eltor, выделенных из морской воды Таганрогского залива в период 2011–2012 г.

Серovar и номер штамма	Дата выделения	Источник выделения	Ген		В том числе по тестам идентификации			
			ctxA	tcpA	фаг эльтор	фаг классический	фаготип	гемолиз
Inaba № 76	16.06.11	Морская вода, место сброса сточных вод ОСК МУП, Управление "Водоканал", Дмитриадовка, Неклиновский район	-	-	10 ⁻²	ц	15	+
Ogava № 229	20.07.11	Морская вода, зона рекреации, пляж "Центральный", Таганрог	-	-	10 ⁻²	-	13	+
Inaba № 301	03.08.11	Морская вода, зона рекреации, пляж "Солнечный", Таганрог	+	+	ц 10 ⁻¹ 10 ⁻²	-	15	-
Ogava № 180	19.07.12	Морская вода, с. Петрушино (место сброса ливневой канализации, Таганрог)	-	-	ц	ц	13	+

zot, ctxA, ctxB^{elt} и ctxB^{class}, rstB, rstR^{elt} и rstR^{class}, rstA, rstC, attRS, VPI (tcpA^{elt} и tcpA^{class}, toxT), VPI-2 (int, nanH, vce), кластер MARTX (rtxA, acd-rtxA, rtxC), гены контактно-зависимых систем секреции T3SS (vcsN2, vcsC2, vcsV2, vspD) и T6SS (vasA, vasF, vasK, pbd-vgrG3, acd-vgrG1, hcp), гены cef, hapA, toxR, mshA, tolQRA, vpsA, vpsL, sltA, stn/sto с использованием как специфических праймеров, описанных ранее [5], так и сконструированных нами.

VNTR-генотип каждого конкретного штамма O1 выражали в цифровом виде через комбинацию составляющих его генотип аллелей локусов VcA, VcB, VcC, VcD, VcG. Кластерный анализ проводили с использованием разработанной в Ростовском-на-Дону противочумном институте Геоинформационной системы «Холера. Штаммы – VNTR» № 2007620389 [6].

Секвенирование фрагментов ДНК токсигенного штамма осуществляли на генетическом анализаторе ABI Prism 3130 с использованием набора The BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, согласно рекомендациям изготовителя. Анализ полученных нуклеотидных последовательностей проводили с помощью набора компьютерных программ Vector NTI Suite 11 (www.informax.com).

Результаты и обсуждение

В ходе проведения мониторинга наличия холерных вибрионов в водных объектах в период с 2011 по 2012 г. было исследовано 778 проб. В результате изолировано 4 штамма *V. cholerae* O1, которые были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам.

В 2011 г. при исследовании 522 проб воды было выделено 2 атоксигенных и 1 токсигенный штаммы холерного вибриона O1 (№ 301). После выделения последнего с 6 августа по 8 сентября 2011 г. количество дополнительных точек по эпидемиологическим показателям увеличилось до 26 (пробы морской и пресной воды, стоков, рыбы, гидробионтов), были введены контрольные и ограничительные мероприятия. В результате *V. cholerae* O1 в этом году больше не выделялись. В 2012 г. при исследовании 256 проб воды был изолирован один атоксигенный штамм *V. cholerae* O1. Харак-

теристика обнаруженных штаммов представлена в табл. 1.

По данным ПЦР-анализа штаммы № 76 и 229, несмотря на то что были выделены в разные сроки и относились к разным сероварам, имели идентичные генотипы (табл. 2). Оба штамма были лишены профагов CTX и RS1 и острова патогенности VPI, т. е. не представляли эпидемической опасности. Второй остров патогенности VPI-2 содержал делецию в 3'-концевой части (vce), сохранив интактный ген nanH. Интересной особенностью этих штаммов явилось присутствие в их геномах генов T3SS, которая может участвовать в патогенезе заболеваний, вызываемых нетоксигенными штаммами. У них также были обнаружены гены vasA, vasF и vasK, входящие в кластер второй контактно-зависимой системы секреции – T6SS, а также ген ее транслокона hcp. Однако эта система вряд ли функциональна, поскольку у данных штаммов не было выявлено последовательностей, кодирующих два ее активных домена – acd-vgrG1 и pbd-vgrG3. Штаммы также содержали гены ряда дополнительных факторов патогенности/персистенции. Не исключено, что они обладают измененным геном термостабильного токсина stn/sto, поскольку с одной из двух использованных пар праймеров в ПЦР был получен слабоположительный сигнал. Штаммы с аналогичными генотипами выделялись из водных источников внешней среды и ранее [7].

Таблица 2

Результаты ПЦР-генотипирования

Ген	Номер штамма			
	76	229	301	180
CTX, RS1	-	-	+	-
tcpAeltor, toxT	-	-	+	-
vce	-	-	+	-
acd-vgrG1, pbd-vgrG3	-	-	+	+
vcsN2, vcsV2, vcsC2, vspD	+	+	-	+
attRS, rtxA, rtxC, acd-rtxA, int, nanH, vasA, vasF, vasK, hcp, hapA, cef, mshA, tolQRA, vpsA, vspL, toxR	+	+	+	+
stn/sto, slt1	+/-	+/-	+/-	+/-

Наибольший интерес представлял штамм № 301, который содержал профаги CTX и RS1, а также остров патогенности VPI. В отличие от штаммов, вызвавших эпидосложнения в Украине, он относился к серовару Инаба. Расширенный ПЦР-анализ позволил выявить в его геноме ген *rstR* типа эльтор и *ctxB* классического типа. Вопрос о копияности *ctx* в геноме этого штамма остается открытым и является предметом отдельного исследования, однако если он дуплицирован, то обе копии скорее всего идентичны, поэтому мы осуществили секвенирование межгенной области *zot-ctxA* и 5'-концевой последовательности гена *ctxB* с использованием амплификатов тотальной ДНК штамма №301. Результаты показали наличие четырех повторов TTTTGAT в промоторной области *ctxA*, что характерно для вибрионов эльтор, хотя в последнее время были выявлены и классические профаги с таким числом повторов, тогда как ранее считалось, что они должны содержать 7–8 повторов. Последовательность гена *ctxB* была типичной для классических профагов – содержала C в позициях 115 и 203 (у профагов эльтор в этих позициях находится T). Эти результаты полностью согласуются с данными других авторов по этому штамму [8].

Таким образом, штамм № 301 содержал гибридный профаг, имеющий ген *rstR* типа эльтор, 4 повтора TTTTGAT и ген *ctxB* классического типа. По совокупности этих признаков этот профаг отличался от таковых, интегрированных в геном трех штаммов, выделенных в 2010 г. от больных в Москве (завоз из Индии), которые содержали *rstR* обоих типов, 5 указанных повторов и дополнительную замену C/A в положении 58 в гене *ctxB* [9]. С другой стороны, он был сходен с профагами штаммов, выделенных от больных в Иркутске и Ачинске в 1997 г. (завоз из Казахстана) [10]. В связи с отсутствием в нашем распоряжении штаммов, выделенных в Украине, мы не могли сравнить их генотипы с генотипом штамма № 301 и полагаем, что он не был занесен из Мариупольского очага только на основании принадлежности к другому серовару. По всей видимости, этот штамм имел другое происхождение.

При VNTR-типировании было установлено, что у штамма № 301 locus *VcA* содержал 19 повторов, *VcB* – 16, *VcC* – 10, *VcD* – 4 и *VcG* – 5. Этот генотип оказался близким к таковым завозных клинических штаммов, выделенных ранее (Владивосток, 1999; Москва, 2005), а одному из них был идентичен. VNTR-генотип штамма № 76 оказался уникальным и ранее не встречался на территории Российской Федерации. Штамм № 180 имел сходство со штаммами, выделенными в Ростовской области в период с 2008 по 2011 г., и был идентичен одному из них. Штамм № 229 оказался идентичным штаммам, выделенным в Ростовской области в 2008–2009 гг., и являлся генетически близкородственным вышеупомянутому штамму № 180, а также штаммам, выделенным в 2008 и 2010 гг.

Заключение

Несмотря на географическую близость Таганрога к Донецкой области Украины, где в 2011 г. отмечалось осложнение эпидемиологической обстановки по холере, токсигенный штамм *V. cholerae*, выделенный нами в этот же период из воды Таганрогского залива, по всей видимости, имел другое происхождение. Тем не менее факт обнаружения эпидемического штамма холерного вибриона, а также нетоксигенных, но содержащих гены дополнительных факторов патогенности штаммов указывает на необходимость постоянного мониторинга за возбудителем в данном регионе. Полученные данные позволили определить (для лабораторий регионального и федерального уровня) оптимальные последовательность и алгоритм ПЦР- и VNTR-генотипирования штаммов холерных вибрионов.

Благодаря своевременному осуществлению мер по оптимизации эпидемиологического надзора за холерой на территории Ростовской области, в том числе мероприятий ограничительного характера, распространение холеры на территорию Российской Федерации в 2011–2012 гг. допущено не было.

ЛИТЕРАТУРА

1. Мазрухо А.Б., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Прометной В.И., Черепихина И.Я., Водяницкая С.Ю. и др. Мероприятия по предотвращению заноса холеры на территорию Ростовской области и другие субъекты Российской Федерации в связи с осложнением эпидемиологической обстановки на Украине в 2011 году. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы. Материалы проблемной комиссии. Ростов-н-Д.; 2012; 25: 31–9.
2. Санитарные правила СП 3.1.1.2521-09: Профилактика холеры. Общие требования к эпидемиологическому надзору за холерой на территории Российской Федерации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009; 35.
3. Методические указания МУК 4.2.2870-11.: Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011; 83.
4. Методические указания МУК 4.2.2218-07: Лабораторная диагностика холеры. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007; 87.
5. Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Божско Н.В. ПЦР-детекция генов системы секреции третьего типа (TTSS) и других факторов патогенности/персистенции у холерных вибрионов различных серогрупп. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2010; 6: 20–5.
6. Водопьянов С.О., Олейников И.П., Гончаров Е.К., Дуванова О.В., Мишанькин Б.Н., Сучков И.Ю. и др. Вариабельный тандемный повтор *VcA* of *Vibrio cholerae*. Мол. Биол. 2002; 36: 1074–9 (in Russian).
7. Монахова Е.В., Божско Н.В. Изучение экспрессии контактозависимых систем секреции холерными вибрионами на модели *Dictyostelium discoideum*. Журнал микробиологии и иммунобиологии. 2010; 4: 89–92.
8. Шайкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *Vibrio cholerae* 301 биовара Эльтор, изолированного в 2011 году в России. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 4 (114): 61–4.
9. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шайкова А.В., Кутырев В.В.

Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор, изолированных на территории России в современный период. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2011; 3: 11–8.

10. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Балахонov С.В. и др. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика атипичных токсигенных клонов *Vibrio cholerae* eltor. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы совещания и проблемной комиссии. 2011; 24: 97–101.

REFERENCES

1. Mazrukho A.B., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Prometnoy V.I., Cherepakhina I.Ya., Vodyanitskaya S.Yu. et al. Actions towards prevention of cholera import to the territory of Rostov region and other areas of Russian Federation in connection of the complication of epidemic situation in Ukraine in 2011. In: Cholera and *Vibrio* human pathogens: Materials of Problem Committee. Rostov-on-Don; 2012; 25: 31–9 (in Russian).
2. Sanitary regulations SP 3.1.1.2521-09: Prophylaxis of cholera. General requirements to epidemiological inspection of cholera on the territory of Russian Federation. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2009 (in Russian).
3. Metodich directives MUK 4.2.2870-11: Procedure of organization and conduction of laboratory diagnostics of cholera for laboratories of territorial, regional and federal levels. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2011 (in Russian).
4. Metodich directives MUK 4.2.2218-07: Laboratory diagnostics of

cholera. Moscow: Federal Center of Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor; 2007 (in Russian).

5. Monakhova E.V., Smolikova L.V., Bozhko N.V. PCR detection of the type three secretion system (TTSS) genes and other pathogenicity/persistence factors in *Vibrio cholerae* of different serogroups. Epidemiol. i Inf. Bolezni. 2010; 6: 20–5 (in Russian).
6. Vodop'ianov S.O., Oleinikov I.P., Goncharov E.K., Duvanov O.V., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu. et al. Variable tandem repeat Vca of *Vibrio cholerae*. Mol. Biol. 2002; 36 (6): 1074–9 (in Russian).
7. Monakhova E.V., Smolikova L.V., Bozhko N.V. Study of expression of contact-dependent secretion systems in *Vibrio cholerae* on the model of *Dictyostelium discoideum*. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2010; 4: 89–92 (in Russian).
8. Shashkova A.V., Agafonov D.A., Cherkasov A.V., Zadnova S.P., Smirnova N.I. Phenotypic and molecular-genetic analysis of genetically modified toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strain 301, isolated in 2011 in Russia. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2012; 4 (114): 61–4 (in Russian).
9. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A. V., Kutyrev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* El Tor isolated to the area of Russia. Cholera and *Vibrio* human pathogens. Mol. Genet., Mikrobiol., Virusol. 2011; 3: 11–8 (in Russian).
10. Mironova L.V., Afanasyev V.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Basov E.A., Polovinkina V.S. et al. Molecular-epidemiological characterization of atypical toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor clones. In: Cholera and *Vibrio* human pathogens: Materials of conference and Problem Committee. Rostov-on-Don; 2011; 24: 97–101 (in Russian).

Поступила 19.04.13

ОБЗОРЫ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2013

УДК 616.34-002-022:579.852.13]-078

Н.М. Гюлазян¹, О.Ф. Беляя², В.А. Малов², С.Г. Пак²

ТОКСИНЫ А И В *C. DIFFICILE* ГЛАЗАМИ КЛИНИЦИСТА

¹Ереванский государственный медицинский университет им. М. Гераци Министерства образования и науки Армении, Ереван, 0025, ул. Корюна, 2; ²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

На сегодняшний день *C. difficile* рассматривается как этиологический фактор псевдомембранозного колита и антибиотико-ассоциированной диареи, а также как ведущая причина внутрибольничных диарей распространенных преимущественно в экономически развитых странах. Сложность лабораторно-экспериментального исследования инфекции заключается в том, что микроб не поддается генетическим манипуляциям. Вместе с тем большинство госпитальных и муниципальных лабораторий не имеют возможности проводить исследования по обнаружению токсинов *C. difficile*, что ограничивает возможности истинной оценки распространения этого заболевания в РФ.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции; патогенетические механизмы действия токсинов клостридий; псевдомембранозный колит; антибиотико-ассоциированная диарея; детекция клостридиальных токсинов

N.M. Gyulazyan¹, O.F. Belaya², V.A. Malov², S.G. Pak²

C. DIFFICILE TOXINS A AND B FROM THE CLINICIAN'S VIEWPOINT

¹Yerevan State Medical University after Mkhitar Heratsi, 2 Koryun street, Yerevan, Armenia, 0025

²I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, 8-2, Trubetskaya Str., Moscow, Russia, 119991

To date, *C. difficile* is considered as an etiological factor in pseudomembranous colitis and antibiotic-associated diarrhea as well as the main cause of nosocomial diarrhea spread mainly in economically developed countries. The complexity of laboratory and experimental studies of infection is what the microbe cannot be genetically manipulated. At the same time, the most of hospital and municipal laboratories have no the possibility to carry out research on detection *C. difficile* toxins, that limits the resource of real estimation of the spread of the disease in the Russian Federation.

Key words: acute intestinal infections; pathogenic mechanisms of action of clostridial toxins; pseudomembranous colitis; antibiotic-associated diarrhea; detection of clostridial toxins