

М.И.Ежова, В.Д.Кругликов, А.С.Водопьянов, С.О.Водопьянов, И.С.Шестиалтынова, И.П.Олейников, Н.Б.Непомнящая, О.А.Подойницына

ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ О1 СЕРОГРУППЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ В ХОДЕ МОНИТОРИНГА В 2008–2012 гг.

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

Выявлены особенности биологических свойств и происхождения штаммов холерных вибрионов О1 серогруппы, выделенных в процессе мониторинга из водных объектов Ростова-на-Дону с 2008 по 2012 год. Из 767 проб воды выделен и изучен 41 атоксигенный штамм *V. cholerae* О1. Показана стойкая тенденция увеличения количества выделяемых из водных объектов атоксигенных штаммов *V. cholerae* О1. При ПЦР-генотипировании с использованием специфических праймеров для детекции 45 нуклеотидных последовательностей, связанных с патогенностью *V. cholerae* у исследуемых штаммов выявлены гены дополнительных факторов патогенности. При VNTR-типировании с использованием авторских локуспецифических праймеров штаммы были распределены по 19 VNTR-генотипам, объединенным в 6 кластеров. Выявлены штаммы с одинаковыми генотипами из разных точек как в течение года, так и на протяжении нескольких лет. Штаммы, по всей видимости, имели завозной характер и обладали способностью к переживанию в водных объектах окружающей среды в течение определенного времени.

Ключевые слова: холерные вибрионы, мониторинг, VNTR-типирование, генотип, ПЦР, дополнительные факторы патогенности.

M.I.Ezhova, V.D.Kruglikov, A.S.Vodop'yanov, S.O.Vodop'yanov, I.S.Shestialtynova, I.P.Oleynikov, N.B.Nepomnyashchaya, O.A.Podoynitsyna

O1 Serogroup Cholera Vibrios Isolated from the Rostov-on-Don Water Bodies in the Course of Surveillance in 2008–2012

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Identified are the peculiarities of biological properties and origin of cholera vibrio O1 serogroup strains isolated from the Rostov-on-Don water bodies in the course of surveillance in 2008–2012. 41 atoxigenic *V. cholerae* O1 strains have been isolated from 767 water samples and investigated. Stable tendency of isolation of increased numbers of atoxigenic *V. cholerae* O1 strains over time has been demonstrated. In addition, in the strains under study detected have been the genes of additional pathogenicity factors, by PCR genotyping using specific primers for 45 nucleotide sequences associated with *V. cholerae* pathogenicity. The strains have also been classified according to 19 VNTR-genotypes grouped into 6 clusters based on VNTR-typing using exclusive copyright locus-specific primers. Discovered have been the strains with similar genotypes though isolated at different points both throughout the year and over the period of several years. These ones have probably been imported. They are characterized by a capacity to persist in ambient water bodies for a certain period of time.

Key words: cholera vibrios, monitoring, VNTR-typing, genotype, PCR, additional pathogenicity factors.

Эпидемиологическая обстановка и прогноз по холере в мире остаются неблагоприятными [9]. Завоз холеры на территорию Ростова-на-Дону вполне реален, и существует опасность распространения этого заболевания. А вероятность наличия в водной среде популяции токсигенных форм холерных вибрионов не исключает того, что водные объекты окружающей среды при определенных условиях могут быть резервуаром инфекции и представлять эпидемическую опасность.

В этой связи данные микробиологических исследований, получаемые в процессе динамичного мониторинга наличия холерных вибрионов в поверхностных водоемах и сточных водах, продолжают оставаться неотъемлемой составляющей лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за холерой на территории Российской Федерации.

Постоянный мониторинг холеры и проведение эпидрасследования вспышек с идентификацией ис-

точника инфекции невозможны без использования современных методов типирования возбудителей. Так, например, помимо основных факторов патогенности, существует ряд генетических детерминант дополнительных токсинов, количество и уровень экспрессии которых могут различаться от штамма к штамму. Для этого целесообразно использовать набор праймеров для детекции не только основных, но и дополнительных факторов патогенности [7]. А прием VNTR-типирования позволяет получать наиболее полную информацию о происхождении штаммов и о степени генетического родства между ними [6]. Исходя из этого, особое значение приобретает установление индивидуальных генотипов штаммов *V. cholerae* О1, выделенных из водных объектов окружающей среды в течение многолетнего периода на определенной административной территории.

Таким образом, цель настоящего исследования – охарактеризовать на современном уровне особенно-

сти биологических свойств и происхождения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы, выделенных из водных объектов Ростова-на-Дону с 2008 по 2012 год.

Материалы и методы

Анализ нашей работы основывался на результатах исследований воды поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых стоков Ростова-на-Дону по 12 стационарным точкам отбора. Точки с 1-й по 8-ю были закреплены за Ростовским-на-Дону научно-исследовательским противочумным институтом: 1-я – р. Дон, правый берег у Державинского спуска; 2-я – р. Темерник, устье впадения в р. Дон; 3-я – сточные воды, городские очистные сооружения, приемная камера КНС № 4; 4-я – р. Дон, у железнодорожно-автомобильного моста «Западный обход»; 5-я – пр. Мертвый Донец, левый берег, 500 м ниже автомобильного моста (на Кумжинскую рощу); 6-я – р. Темерник, ботанический сад, у моста; 7-я – р. Дон, правый берег, 200 м ниже впадения р. Темерник (у железнодорожного моста); 8-я – р. Дон, правый берег, Кировский спуск, напротив здания экипажа № 2 РМК им. Г.Я.Седова. Точки с 9-й по 12-ю были закреплены за Северо-Кавказской ПЧС: 9-я – р. Темерник, правый берег около вагонного депо СКЖД; 10-я – р. Темерник, левый берег около вагонного депо СКЖД; 11-я – р. Темерник, у моста Текучева; 12-я – р. Дон, у железнодорожного моста. Причем точки с 9-й по 12-ю были добавлены в 2011 г.

Мониторинговое исследование, выделение, идентификация и изучение биологических свойств культур *V. cholerae* eltor проводились в соответствии с требованиями действующих нормативно-методических документов [3, 9]. Фаговары тестировали с помощью набора Дрожжевкиной-Арутюнова.

ПЦР-диагностика включала: видовую идентификацию (*hapA*, *toxR*), дифференциацию сероваров (*wbe*, *wbf*), определение эпидемической опасности штаммов *V. cholerae* O1 (*ctxA*, *ctxB^{elt}*, *ctxB^{class}*, *tcpA^{elt}*, *tcpA^{class}*, *tcpA^{env}*, *tcpA^{calc}*). Помимо этого, определяли наличие генов СТХ-элемента и прилегающих к нему областей (*cep*, *orfU*, *zot*, *ace*, *rstR^{elt}*, *rstR^{class}*, *rstA*, *rstB*, *rstC*), сайта специфической интеграции СТХφ (*attRS*), генов островов патогенности VPI и VPI-2 (*toxT*, *int*, *nanH*, *vce*) и RTX-кластера (*rtxA*, *rtxC*, *ACD-rtxA*), генов, относящихся к системам секреции третьего (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*) и шестого (*vasK*, *vasA*, *vasF*, *vgrG3*) типов, а также ряд генов – факторов патогенности и персистенции (*slt1*, *stn/sto*, *tdh*, *trh*, *hcp*, *ACD-vgrG1*, *mshA*, *tolQRA*, *cef*) [7]. VNTR-типирование проводили с использованием авторских специфических праймеров к VNTR-локусам холерного вибриона *VcA* (TGCTGT)_n, *VcB* (ACAAGA)_n, *VcC* (AACAGA)_n, *VcD* (GACCCTA)_n, и *VcG* (GATAATCCA)_n [1].

Результаты обрабатывали с помощью стандарт-

ного программного обеспечения. Размеры аллелей рассчитывали с использованием авторской программы GEL 1.0. и программы Quantity One 4.40, «Bio-Rad». В качестве маркеров молекулярных размеров использовали ДНК-маркеры FastRuler™ SM1113 в диапазоне от 100 до 5000 нуклеотидных пар, производства Fermentas. Кластерный и территориально-пространственный анализ штаммов осуществляли построением дендрограммы с учетом полиморфизма аллельного состояния исследованных VNTR-локусов и с использованием разработанной нами геоинформационной системы «Штаммы *Vibrio cholerae*» [2], а также открытого программного обеспечения. Кластерный анализ, построение дендограммы и расчет генетических расстояний проводили по методу UPGMA (невзвешенного попарного среднего).

Результаты и обсуждения

Всего исследовано 767 проб воды, выделен 41 атоксигенный штамм *V. cholerae* O1. Все штаммы были изолированы только из проб воды поверхностных водоемов. Из р. Темерник выделено 25 штаммов, из р. Дон – 14 и из протоки р. Мертвый Донец – 2.

Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы за изучаемый период свидетельствовал о количественном увеличении изолированных штаммов в 2010 и 2011 гг. и о снижении их числа в 2012 г. Вместе с тем при сравнении с данными, полученными за предшествующие пятилетние периоды [5], выявлялась стойкая тенденция увеличения количества выделяемых штаммов *V. cholerae* O1 из водных объектов окружающей среды на территории Ростова-на-Дону. Так, ретроспективный анализ показал, что за период проведения мониторинга (2008–2012 гг.) было выделено на 10 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы больше, чем за предшествующее десятилетие.

Проведенный нами сравнительный анализ результатов мониторинга холеры в Ростове-на-Дону за последние 15 лет дал основание предполагать, что и в дальнейшем возможно обнаружение в водных экосистемах города токсигенных штаммов холерного вибриона завозного происхождения. Так, на фоне эпидемического благополучия по холере на изучаемой территории с 1992 по 2012 год выделялись единичные эпидемически опасные культуры (2000, 2001, 2003 гг.), а также *ctx⁻tcp⁺* штаммы (2001, 2002, 2007 гг.) [4, 5]. Вышесказанное, в свою очередь, указывает на необходимость настороженности в отношении этой инфекции и подчеркивает актуальность проведения мониторинговых исследований холеры.

Все изолированные в изучаемый период штаммы *V. cholerae* O1 были типичны по культурально-морфологическим, биохимическим, серологическим свойствам и относились к биовару эльтор. Принадлежность к серовару Гикошима была установлена у одного штамма, к Огава – у 29, к Инаба – у 11. Все выделенные штаммы являлись гемолизполо-

жительными и атоксигенными (не содержали генов *ctxA⁺* и *tcpA⁺*).

В ходе проведенной идентификации удалось установить принадлежность к определенному фаготипу у 36,6 % исследованных культур *V. cholerae* O1. Остальные штаммы холерных вибрионов O1 не типировались. Было установлено, что на изучаемой территории встречались штаммы *V. cholerae* O1 11, 16, 15-го и 13-го фаготипов.

Среди всех штаммов, выделенных в течение изучаемого периода в ПЦР, не выявлено штаммов, содержащих сочетания генов *ctxA⁺* и *tcpA⁺*, или *ctxA⁻* и *tcpA⁺*. У всех штаммов выявлены гены *hapA*, *vasA*, *vasK*, *vasF*, *hcr*, *cef*, *toxR*, *tolQRA*, *mshA* и отсутствовали гены *ctxAB*, *cep*, *orfU*, *zot*, *ace*, *rstA*, *rstB*, *rstR*, *rstC*, *tcpA*, *toxT*, *sltA*, *stn*, *tdh*, *trh*.

Положительные результаты ПЦР, а именно проведение детекции одного или более видоспецифичных генов (*hapA*, *toxR*), подтвердили данные фенотипической идентификации и позволили с уверенностью отнести все исследуемые штаммы к виду *V. cholerae*.

Об эпидзначимости штаммов *V. cholerae* судили по наличию генов холерного токсина *ctxAB* и структурной единицы токсин-регулируемых пилей адгезии *tcpA* в составе острова патогенности VPI. Поскольку ген *tcpA* отличается высокой степенью изменчивости, мы дополнительно определяли наличие еще одного гена VPI – *toxT*.

Полученные результаты показали, что ни один из штаммов не содержал названных генов, т.е. они являлись эпидемически безопасными. Однако в геномах исследуемых штаммов в различных сочетаниях были выявлены генетические детерминанты таких потенциальных факторов вирулентности, как цитотоксический кластер RTX; второй остров патогенности VPI-2 с геном нейраминидазы; маннозочувствительные пилы адгезии (*mshA*); гемагглютинин/протеаза (HA/P); цитотонический фактор Cef; система секреции третьего типа (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*), а также система секреции шестого типа (*vasA*, *vasK*, *vasF*) [10, 11, 12]. Поэтому нельзя исключать, что штаммы, циркулирующие в открытых водоемах, в определенных условиях могут послужить причиной заболеваний у отдельных ослабленных людей.

Вопрос о реальной способности штаммов, выделенных из внешней среды, экспрессировать выявленные гены и вызывать заболевания требует дальнейших исследований с использованием биологических моделей *in vivo* и *in vitro*.

Изучение распределения VNTR-аллелей у 41 атоксигенного штамма холерных вибрионов O1 позволило установить факт циркуляции на территории Ростова-на-Дону в период с 2008 по 2012 год 19 VNTR-генотипов *V. cholerae* O1. Подобное генотипическое разнообразие изолированных штаммов свидетельствовало как об изменениях в популяции холерного вибриона, что обеспечивало его экологическую адаптацию в естественных условиях, так и

о возможности циркуляции на территории Ростова-на-Дону различных генотипов. Вероятно, штаммы с разными VNTR-генотипами имеют способность к выживанию в данных конкретных экологических условиях на изучаемой территории.

Было установлено, что VNTR-генотипы были распределены по шести кластерам, обозначенным литерами А-Е, при этом основную массу штаммов составили представители трех мажорных кластеров А, В и D (кластер А состоял из 14 штаммов, кластер В – из 15, кластер D из – 7). Три минорных кластера С, Е и F были представлены пятью штаммами: кластеры С и Е содержали по одному штамму, а кластер F – три штамма. Отмечено, что в разные годы выделялись штаммы с одинаковым генотипом. Так, например, генотип В1 встречался у штаммов, выделенных из водных объектов Ростова-на-Дону в 2009 и 2011 гг. Вместе с тем генотипы А1 и D1 встречались у штаммов, изолированных только в 2008 и 2009 гг., в то время как другие генотипы не повторялись за изучаемый промежуток времени.

Также необходимо отметить, что в 2008, 2010, 2011 и 2012 гг. встречались идентичные по генотипам штаммы *V. cholerae* O1, которые были выделены из разных точек в течение одного эпидемического сезона, что, по всей видимости, свидетельствовало об их селективном распространении в данный период времени. Например, в 2008 г. штаммы с генотипом F1 встречались в точках № 1, 4 и 7, или с генотипом А3 в точках № 1, 5, 6, 7.

Таким образом, в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону в течение 2008–2012 гг. была установлена циркуляция с количественным нарастанием атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, которые, по всей видимости, имели завозной характер, обладали способностью к переживанию в водных объектах окружающей среды в течение определенного времени и в своем геноме содержали гены дополнительных факторов патогенности. Наряду с этим, разнообразие штаммов по VNTR-генотипам свидетельствовало о циклических изменениях в популяции штаммов холерных вибрионов O1, циркулирующих на территории Ростова-на-Дону.

Использование современных методов изучения водных штаммов холерных вибрионов позволило выявить индивидуальные особенности их генома и обеспечило возможность слежения за динамикой циркуляции указанных штаммов в водных экосистемах. С нашей точки зрения, перспективные исследования по накоплению сравнительных данных позволят получить достоверное представление о продолжительности переживания атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы в данных экологических условиях на конкретной территории.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Водопьянов, А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.

2. Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов С.О., Монахова Е.В., Непомнящая Н.Б., Шалу О.А., Олейников И.П. Свидетельство о государственной регистрации 2012620979 базы данных «Штаммы *Vibrio cholerae*», RU. Зарегистрировано в Реестре баз данных 21 сентября 2012 г.
3. Лабораторная диагностика холеры. МУК 4.2.2218-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2007.
4. Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Ежова М.И., Шестиальтнова И.С., Шалу О.А., Непомнящая Н.Б., Архангельская И.В. Мониторинг вибриофлоры водных объектов окружающей среды в системе эпиднадзора за холерой. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2010; 5:24–8.
5. Ломов Ю.М., Телесманич Н.Р., Кругликов В.Д., Авдеева Е.П., Ежова М.И., Шалу О.А., Агафонова В.В., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В. Фенотипическая и молекулярно-биологическая характеристика штаммов холерных вибрионов эль-тор, выделенных из водных объектов окружающей среды Ростова-на-Дону в 2003–2008 гг. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2011; 1:24–8.
6. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., Водопьянов С.О., Сучков И.Ю., Гончаров Е.К., Дуванова О.В., Шишняну М.В. Варибельные tandemные нуклеотидные повторы (VNTR-анализ) у *V. cholerae* O139, выделенных от людей и из воды поверхностных водоемов России. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2004; 1:29–34.
7. Монахова Е.В., Смоликова Л.М., Божко Н.В. ПЦР-детекция генов системы секреции III типа (TTSS) и других факторов патогенности/персистенции у холерных вибрионов разных серогрупп. *Эпидемиол. и инф. бол.* 2010; 6:20–5.
8. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XX в. Прогноз на глобальном уровне. *Пробл. особо опасных. инф.* 2012; 1(111):62–5.
9. Порядок организации и проведения лабораторной диагностики холеры для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней. Методические указания. МУК 4.2.2870-11. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2011.
10. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathogen.* 2000; 29(1):1–8.
11. Sheahan K.-L., Cordero C.L., Satchell K.J. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(26):9798–803.
12. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2:11–7.
2. Ezhova M.I., Kruglikov V.D., Vodop'yanov S.O., Monakhova E.V., Nepomnyashchaya N.B., Shalu O.A., Oleynikov I.P. [Certificate of the State Registration of data base “*Vibrio cholerae* strains”, 2012620979, RU].
3. [Laboratory diagnostics of cholera: Methodological Recommendations]. MR 4.2.2218-07. M.: Rosпотребнадзор Federal Center for Hygiene and Epidemiology; 2007. 87 p.
4. Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., Avdeeva E.P., Ezhova M.I., Shestial'tynova I.S., Shalu O.A., Nepomnyashchaya N.B., Arkhangel'skaya I.V. [Monitoring over the ambient water bodies within the frames of epidemiological surveillance program as regards cholera]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2010; 5:24–8.
5. Lomov Yu.M., Telesmanich N.R., Kruglikov V.D., Avdeeva E.P., Ezhova M.I., Shalu O.A., Agafonova V.V., Mazrukho A.B., Arkhangel'skaya I.V. [Phenotypic and molecular-biological characteristics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated from ambient Rostov-on-Don water bodies in 2003–2008]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2011; 1:24–8.
6. Mishan'kin M.B., Vodop'yanov A.S., Lomov Yu.M., Vodop'yanov S.O., Suchkov I.Yu., Goncharov E.K., Duванова O.V., Shishiyanu M.V. [Variable nucleotide tandem repeats (VNTR-assay) in *V. cholerae* O139 isolated from humans and surface waters in the territory of Russia] *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2004; 1:29–34.
7. Monakhova E.V., Smolikova L.M., Bozhko N.V. [PCR detection of TTSS genes (Third Type Secretion System) and other pathogenicity/persistence factors in cholera vibrios of various serogroups]. *Epidemiol. Infek. Bol.* 2010; 6:20–5.
8. Monakhova E.V., Fedorenko G.M., Mazrukho A.B., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Markina O.V., Alekseeva L.P. [Study of biological effect of CHO-cell elongating factor of *Vibrio cholerae* on models *in vitro* and *in vivo*]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2012; 1(111): 62–65.
9. [Operational practices and organizational procedures for the laboratory diagnostics of cholera in specialized facilities on the local, regional and national scale: Methodological recommendations]. MR 4.2.2870-11. M.: Rosпотребнадзор Federal Center for Hygiene and Epidemiology; 2011. 76 p.
10. McCardell B.A., Kothary M.H., Hall R.N., Sathyamoorthy V. Identification of a CHO-elongating factor produced by *Vibrio cholerae* O1. *Microb. Pathogen.* 2000; 29(1):1–8.
11. Sheahan K.-L., Cordero C.L., Satchell K.J. Identification of a domain within the multifunctional *Vibrio cholerae* RTX toxin that covalently cross-links actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(26):9798–803.
12. Wu Z., Nybon A., Magnusson K.E. Distinct effects of *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease on the structure and localization of the tight junction-associated proteins occludin and ZO-1. *Cell Microbiol.* 2000; 2:11–7.

Authors:

Ezhova M.I., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Shestial'tynova I.S., Oleynikov I.P., Nepomnyashchaya N.B., Podoyitsynina O.A. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru

Об авторах:

Ежова М.И., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Шестиальтнова И.С., Олейников И.П., Непомнящая Н.Б., Подойицына О.А. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru

References

1. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats elicited in the course of computerized analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotechnologiya.* 2001; 6:85–8.

Поступила 28.02.13.