

ХОЛЕРА ЭЛЬ-ТОР НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ: ЭВОЛЮЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ, КЛИНИКО- ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ, ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

И.В. Савельева, А.Н. Куличенко, В.Н. Савельев, Д.А. Ковалев, Т.В. Таран,
Е.И. Подопрigorа, О.В. Васильева, Н.А. Шапакoв

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Изучены фенотипические и молекулярно генетические свойства 133 штаммов генетически измененных (геновариантов) *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль-Тор, выделенных от больных в Дагестане (1993, 1994, 1998 гг.), и в сравнительном аспекте 246 штаммов типичного токсигенного холерного вибриона биовара Эль-Тор, выделенных на Кавказе в 1970–1990 гг. У 48,7% изученных штаммов генетически измененных вариантов выявлены смешанные фенотипические свойства биовара Эль-Тор и классического биовара, что свидетельствует о необходимости включить в существующую схему биотипирования маркерные гены биовара Classical (*ctxB^{Cl}+*, *rtxC-*), биовара Эль-Тор (*ctxB^{El}+*), геноварианта биовара Эль-Тор (*ctxB^{Cl}+*, *rtxC+*). Геноварианты биовара Эль-Тор, выделенные от больных в Дагестане, в своем геноме содержат, помимо эльторовских, гены классического биовара (*ctxB^{Cl}* и/или *rstR^{Cl}*), а также, как и типичные токсигенные холерные вибрионы Эль-Тор, острова персистенции (EPI), патогенности (VPI-1 и VPI-2) и пандемичности (VSP-I и VSP-II), но только у геновариантов биовара Эль-Тор обнаруживается интегративный и конъюгативный элемент SXT с генами полирезистентности к антибиотикам. Эпидемические вспышки холеры, обусловленные геновариантами биовара Эль-Тор, имевшие место на Кавказе в 1993–1998 гг., по тяжести течения соответствуют классической (азиатской) холере. Изучены эпидемиологические особенности современной холеры: основной путь реализации фекально-орального механизма заражения для типичного холерного вибриона Эль-Тор — водный, а для геноварианта Эль-Тор — контактно-бытовой. Первичные заражения при употреблении для питья и хозяйственно-бытовых нужд воды поверхностных водоемов, контаминированных типичными вибрионами Эль-Тор, реализуются за пределами семейного очага. При холере, вызванной гибридными вариантами Эль-Тор, осуществляется занос инфекции в семью с последующим распространением среди ее членов при реализации бытовых факторов передачи в условиях низкого санитарного уровня населения. В основе совершенствования лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за современной холерой Эль-Тор лежит разработка ПЦР-тест-систем с учетом эволюционных преобразований генома.

Ключевые слова: холера Эль-Тор, эволюция возбудителя, геноварианты биовара Эль-Тор, патогенез, клиника, эпидемиология, ПЦР-диагностика, эпидемиологический надзор.

Адрес для переписки:

Савельева Ирина Вилориевна
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт
Роспотребнадзора.
Тел.: 8 962 000-59-18. Факс: 8 (865) 226-03-12.
E-mail: Stavnipchi@mail.ru

Contacts:

Irina V. Savelyeva
355035, Russian Federation, Stavropol, Soviet str., 13–15,
Stavropol Research Institute for Plague Control.
Phone: +7 962 000-59-18. Fax: +7 (865) 226-03-12.
E-mail: Stavnipchi@mail.ru

Для цитирования:

Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопрigorа Е.И., Васильева О.В., Шапакoв Н.А. Холера Эль-Тор на современном этапе седьмой пандемии: эволюция возбудителя, клинико-эпидемиологические особенности, лабораторная диагностика // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 5. С. 917–926. doi: 10.15789/2220-7619-ETC-1476

Citation:

Savelyeva I.V., Kulichenko A.N., Saveliyev V.N., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprigorа E.I., Vasilieva O.V., Shapakov N.A. El Tor cholera at the contemporary stage of the seventh pandemic: pathogen evolution, clinical and epidemiological features, laboratory diagnostics // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2021, vol. 11, no. 5, pp. 917–926. doi: 10.15789/2220-7619-ETC-1476

EL TOR CHOLERA AT THE CONTEMPORARY STAGE OF THE SEVENTH PANDEMIC: PATHOGEN EVOLUTION, CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL FEATURES, LABORATORY DIAGNOSTICS

Savelyeva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprighora E.I., Vasilieva O.V., Shapakov N.A.
Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The phenotypic and molecular genetic properties of 133 strains of genetically modified (genovariant) *Vibrio cholerae* O1 El Tor biovar isolated from patients in Dagestan (1993, 1994, 1998), and compared with 246 strains of a typical toxigenic cholera vibrio El Tor biovar isolated in 1970–1990 at the Caucasus Region. It was found that 48.7% of the studied genetically modified strain variants had mixed phenotypic properties of the El Tor and classic biovars that evidences about a need to include the marker genes of the classical biovar (*ctxB^{Cl}*+, *rtxC*–) and the El Tor biovar (*ctxB^{El}*+, *rtxC*+) into the existing biotyping scheme. The genes of the El Tor biovar, isolated from patients in Dagestan, contain in addition to the El Tor ones, the genes of the classical biovar (*ctxB^{Cl}* and/or *rstR^{Cl}*), as well as the typical toxigenic cholera vibrios of El Tor, islands of persistence (EPI), pathogenicity (VPI-1 and VPI-2) and pandemicity (VSP-I and VSP-II). However, only the El Tor biovar genovariants were found to bear an integrative and conjugative SXT element with antibiotic polyresistance genes. Epidemic cholera outbreaks caused by the El Tor biovar genovariants that occurred in 1993–1998 at the Caucasus Region, correspond to classical (Asian) cholera based on disease severity. The epidemiological features of modern cholera were studied: the main way for transmission via fecal-oral route for typical El Tor cholera vibrio is waterborne, whereas for the El Tor gene variant — household. Primary infections upon water drinking and using domestic water from surface water bodies infected with typical El Tor vibrios occur outside the family hearth. In case of cholera caused by hybrid El Tor variants, infection is transmitted among family members via domestic factors under low sanitary level. The development of laboratory diagnostics and epidemiological surveillance of modern El Tor cholera is based on the development of PCR test systems taking into account the evolutionary genome transformations.

Key words: cholera El Tor, evolution of the pathogen, gene variants of biovar El Tor, pathogenesis, clinic, epidemiology, PCR diagnostics, epidemiological surveillance.

Введение

Седьмая пандемия холеры, начавшаяся на о. Сулавеси (Индонезия) в 1961 г., в настоящее время характеризуется интенсивными проявлениями инфекции в Африке, Азии и в Карибском бассейне на Гаити с высокой вероятностью выноса инфекции вследствие возрастающей активности миграции населения в другие страны, в том числе и в Россию. Основным возбудителем седьмой пандемии на протяжении более тридцати лет являлся холерный вибрион O1 биотипа Эль-Тор, геном которого содержит гены оперона *ctxAB*, кодирующие синтез термолabileного экзотоксина (СТ-2) — главного патогенетического фактора холеры. Типичные токсигенные вибрионы Эль-Тор (*V. cholerae* O1 биотипа El Tor, *Hly*–, *ctxA*+), устойчивые к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды за счет присутствия в их геноме островков персистенции (EPI), патогенности (VPI-1 и VPI-2) и пандемичности (VSP-I и VSP-II), были этиологическим фактором холеры в Азии (1961–1969 гг.), в Азии, Африке, Европе, США, Океании (1970–1980 гг.), в Азии, Африке, Европе, США, Океании, Австралии (1981–1990 гг.) [11, 12, 15].

В начале 90-х гг. прошлого столетия вследствие эволюционных преобразований появились штаммы холерного вибриона биовара Эль-Тор с генотипическими признаками классического биовара, продуцирующие классический тип энтеротоксина (СТ-1), обозначенные как гибридные, или генетически измененные

холерные вибрионы биовара Эль-Тор; они стали доминантными этиологическими агентами на современном этапе развития седьмой пандемии холеры Эль-Тор, а в первые два десятилетия XXI в., обладая высоким эпидемическим потенциалом, распространились по всему миру [2, 7, 9, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19].

В России завозные случаи холеры, обусловленные геновариантами биовара Эль-Тор, регистрировались в 1993 г. — завоз холеры в Дагестан из Пакистана; в 1994 г. — завоз в Дагестан паломниками, совершавшими хадж в Мекку; в 1998 г. — в Дагестан из Азербайджана; в 1999 г. — в Приморский край и на Сахалин из Китая; в 2010, 2012, 2014 гг. — авиаперейсами из Индии в Москву. Этиологический фактор завозной холеры был в то время идентифицирован как типичный токсигенный холерный вибрион биовара Эль-Тор.

Цель данного исследования — изучение и анализ биологических, молекулярно-генетических свойств геновариантов холерного вибриона биовара Эль-Тор и клинико-эпидемиологических особенностей обусловленной ими холеры на Кавказе; совершенствование лабораторного обеспечения эпидемиологического надзора за современной холерой Эль-Тор.

Материалы и методы

В работе использованы 246 штаммов типичных токсигенных *V. cholerae* O1 биотипа Эль-Тор, выделенные в период с 1970 по 1990 гг.

от больных холерой и из объектов окружающей среды на территории Кавказа (в Азербайджане, Армении, Грузии, Дагестане, Краснодарском и Ставропольском краях), 7 штаммов *V. cholerae cholerae*, выделенные в Индии, Пакистане в 1949, 1950 и 1965 гг. и 133 штамма генетически измененных холерных вибрионов биовара Эль-Тор, изолированных от больных в Дагестане в 1993, 1994 и 1998 гг. Все штаммы микроорганизмов получены из лаборатории «Коллекция культур патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора. Выделение, культивирование и идентификацию холерного вибриона осуществляли в соответствии с МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [4]. Анализ структуры генома изучаемых штаммов холерных вибрионов осуществляли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), в том числе с помощью ПЦР-тест системы «Гены *Vibrio cholerae* O1, вариант *ctxB*–*rstR*–*rstC*, РЭФ» (ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора). Подготовку проб для полимеразной цепной реакции проводили согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» [4] и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» [6]. Экстракция тотальной ДНК исследуемых штаммов микроорганизмов проводилась с использованием коммерческого набора для выделения нуклеиновых кислот «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (АмплиСенс, Россия).

Секвенирование геномной ДНК проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с набором реактивов BigDye Terminator v3.1 в соответствии с рекомендациями производителя. Исходные данные анализировали в программе Sequencing Analysis v5.4. При сопоставлении последовательностей были использованы программы FinchTV 1.4.0. b BLAST (NCBI). В качестве прототипных использовали нуклеотидные последовательности референс-штаммов *V. cholerae* N 16961 биовара Эль-Тор и классического биовара 0395, депонированных в базе данных GenBank.

Эпидемиологический анализ случаев заболеваний и вибриононосительства на Кавказе проводили в соответствии с руководствами «Эпидемиологический анализ» [3] и «Современный эпидемиологический анализ» [8]. С целью изучения эпидемиологических и клинических особенностей холеры, вызванной типичным токсигенным холерным вибрионом Эль-Тор, проведен ретроспективный анализ 198 эпидкарт и 410 историй болезни больных холерой (Дагестан, 1970–1973 гг., Ставрополь,

1990 г.), обусловленной типичным токсигенным холерным вибрионом биовара Эль-Тор, и 237 историй болезни больных и вибриононосителей из очагов холеры, этиологическим фактором которой явился генетически измененный (гибридный) вариант холерного вибриона биовара Эль-Тор в Республике Дагестан (Каякентский, Бабаюртовский, Кизлярский районы, гг. Избербаш, Дербент в 1993, 1994, 1998 гг.).

Результаты и обсуждение

Морфологические и фенотипические свойства возбудителя современной холеры Эль-Тор

Установлено, что, независимо от места и времени изоляции штаммов изучаемых микроорганизмов, последние таксономически относятся к роду *Vibrio* семейства *Vibrionaceae*, виду *Vibrio cholerae* серологической группы O1, серовару Ogawa или Inaba.

Вместе с тем оказалось, что если типичные токсигенные холерные вибрионы O1 серологической группы (выделенные в 1970–1990 гг.) фенотипически были биоваром Эль-Тор (устойчивы к 50 ЕД полимиксина В, агглютинировали эритроциты морской свинки, образовывали ацетилметилкарбинол в реакции Фогеса–Проскауэра, лизировались диагностическим бактериофагом Эль-Тор II), то часть (48,7%) генетически измененных вариантов имели смешанные фенотипические свойства биовара Эль-Тор и классического, что не позволяет отнести изучаемые штаммы холерных вибрионов к определенному биовару по набору традиционных фенотипических тестов. Учитывая выявленную изменчивость фенотипических признаков, определяющих классический биовар или биовар Эль-Тор, возникает необходимость поиска более стабильных генетических меток, свойственных тому или иному биовару. Поэтому в существующую схему биотипирования мы включили маркерные гены классического биовара (*ctxB*^{Cl+}, *rtxC*⁻), биовара Эль-Тор (*ctxB*^{El+}), геноварианта биовара Эль-Тор (*ctxB*^{Cl+}, *rtxC*⁺).

С целью совершенствования биотипирования *Vibrio cholerae* O1 в связи с глобальным распространением генетически измененных (гибридных) вариантов биовара Эль-Тор нами разработана схема биогенотипирования данных микроорганизмов (табл. 1).

Молекулярно-генетическая структура генома геновариантов биовара Эль-Тор

Молекулярно-генетический анализ измененных вариантов биовара Эль-Тор, выделенных в Дагестане (1993, 1994, 1998 гг.), показал, что эволюционные преобразования типичного

токсигенного биовара Эль-Тор (Кавказ, 1970–1990 гг.) в геновариант сопровождалась изменениями структуры генов токсигенности коровой области профага СТХ₀ и профага RS1₀. Так, изучаемые гибридные варианты биовара Эль-Тор в своем геноме содержат, помимо эльторовских, гены классического биовара (*ctxB^{Cl}* и/или *rstR^{Cl}*), а также, как и типичные токсигенные холерные вибрионы Эль-Тор, острова персистенции (EPI), патогенности (VPI-1,2) и пандемичности (VSP-1,2), но только у геновариантов биовара Эль-Тор обнаруживается интегративный и конъюгативный элемент SXT с генами полирезистентности к антибиотикам (табл. 2).

Особенности патогенеза и клиники холеры, обусловленной геновариантами холерного вибриона биовара Эль-Тор

Процесс инфекционного заболевания, в том числе и холеры, обусловлен специфическими свойствами возбудителя, которые напрямую связаны с эволюционными изменениями молекулярно-генетической организации типичных холерных вибрионов биовара Эль-Тор: замена аллеля В3 в опероне *ctxAB* на аллель В1 привела к большей и качественно иной продукции основного патогенетического фактора болезни — холерного энтеротоксина (СТ-1 вместо СТ-2). Вследствие этого эпидемические вспышки хо-

Таблица 1. Схема биогенотипирования *Vibrio cholerae* O1

Table 1. A scheme of *Vibrio cholerae* O1 bio-genotyping

Фенотипические и генотипические тесты Phenotypic and genotypic tests	Биовары <i>Vibrio cholerae</i> O1 <i>Vibrio cholerae</i> O1 biovars							
	Классический Koch, 1883 Classical, Koch, 1883	El Tor, нетоксигенный, Gotschich, 1905 El Tor, Non-toxigenic, Gotschich, 1905	El Tor, типичный токсигенный, De Moor, 1963 El Tor, Typical toxigenic, De Moor, 1963	El Tor, генетически измененный, Nair, Nusrin, Safa, 2002–2005 El Tor, Genetically modified, Nair, Nusrin, Safa, 2002–2005				
Реакция Фогеса–Проскауера Voges–Proskauer reaction	–	+	+	+-	+-	+-	+-	
Чувствительность к 50 ед. полимиксина Sensitivity to 50 units of polymyxin	+	–	–	-+	-+	-+	-+	
Агглютинация эритроцитов морской свинки Agglutination of guinea pig erythrocytes	–	+	+	+-	+-	+-	+-	
Фаг Эль Тор II/Phage El Tor II	–	+	+	+-	+-	+-	+-	
Фаг классический/Phage classic	+	–	–	-+	-+	-+	-+	
Гемолиз/Hemolysis	–	+	–	–	–	–	–	
Маркеры биовара Classical Biovar Classical markers <i>ctxB^{Cl}</i> + <i>rtxC</i> –	+	–	–	–	–	–	–	
Маркеры типичного токсигенного биовара Эль-Тор Typical toxigenic El Tor biovar markers <i>ctxB^{El}</i>	–	–	+	–	–	–	–	
Маркеры геноварианта Эль-Тор El Tor genovariant markers <i>ctxB^{Cl}</i> +, <i>rtxC</i> +	–	–	–	+	+	+	+	
Маркеры генотипов Эль-Тор El Tor genotype markers								
– <i>ctxB^{Cl}</i> , <i>rstR^{Cl}</i> , <i>rstREI</i> , <i>rtxC</i>	–	–	–	+	–	–	–	
– <i>ctxB^{Cl}</i> , <i>rstREI</i> , <i>rtxC</i>	–	–	–	–	+	–	–	
– <i>ctxB^{Cl}</i> , <i>rstR^{Cl}</i> , <i>rtxC</i>	–	–	–	–	–	+	–	
– <i>ctxB^{Cl}</i> , <i>rtxC</i>	–	–	–	–	–	–	+	
Холерный токсин (СТ1)/Cholera toxin (CT1)	+	–	–	+	+	+	+	
Холерный токсин (СТ2)/Cholera toxin (CT2)	–	–	+	–	–	–	–	
Генотип/Genotype	I	–	II	III	IV	V	VI	

Примечание. Данные, представленные в табл. 1, позволяют подразделять *V. cholerae* O1, с учетом значения традиционных фенотипических тестов и маркерных генов, на биовары: классический, Эль-Тор и генетически измененный (гибридный) биовар Эль-Тор с определением его генотипов.

Note. The data presented allow to assign *V. cholerae* O1 to various biovars based on using data on routine phenotypic tests and gene markers: classical, El Tor and genetically modified (hybrid) El Tor biovar with its genotypes defined.

леры, обусловленные геновариантами биовара Эль-Тор, имевшие место в Дагестане (1993–1998), во Владивостоке (1999 г.), на Украине (1994, 2011 гг.), характеризовались преобладанием тяжелых форм течения болезни с выраженным обезвоживанием (III–IV степень), которые отмечены соответственно у 49,15, 65,2 и 68,8% больных, то есть холера, обусловленная геновариантами холерного вибриона биовара Эль-Тор, по своему течению соответствует классической (азиатской) холере. Патогенетические особенности типичного (действие на энтероциты тонкой кишки холерного токсина второго типа) и гибридного варианта холерного вибриона Эль-Тор (действие на энтероциты тонкой кишки холерного токсина первого типа) определили характер и выраженность клинических проявлений инфекционного процесса (табл. 3).

Источником холеры, обусловленной типичными холерными вибрионами биовара Эль-Тор или его геновариантами, является человек. Механизм заражения един — фекально-оральный. Однако основной путь реализации этого

механизма для типичного холерного вибриона Эль-Тор — водный (97% в г. Ставрополе в 1990 г. и 80% в Дагестане в 1970–1981 гг.), а для геноварианта Эль-Тор — контактно-бытовой (58,3% в Дагестане в 1994 г.). Первичные заражения при употреблении для питья и хозяйственно-бытовых нужд воды поверхностных водоемов, зараженных типичными вибрионами Эль-Тор, реализуются за пределами семейного очага. При холере, вызванной гибридными вариантами Эль-Тор, осуществляется занос инфекции в семью с последующим распространением среди ее членов при реализации бытовых факторов передачи в условиях низкого санитарного уровня проживающих: в очагах инфекции гибридный вариант Эль-Тор обнаруживается в смывах с кухонного стола, умывальника, унитаза, ручек дверей туалета, что способствует формированию значительного процента очагов с двумя и более случаями заболеваний (табл. 4). Изучая зависимость характера эпидемического процесса от биологических свойств различных вариантов токсигенных вибрионов Эль-Тор (табл. 4),

Таблица 2. Структура генома типичных и измененных холерных вибрионов биовара Эль-Тор, выделенных от больных на Кавказе, по результатам ПЦР-анализа

Table 2. PCR-based genome structure for typical and altered EI Tor biovar cholera vibrio isolated from patients in the Caucasus Region

Гены <i>Vibrio cholerae</i> O1 <i>Vibrio cholerae</i> O1 genes	Биовары <i>Vibrio cholerae</i> O1 <i>Vibrio cholerae</i> O1 biovars			
	Гибридный вариант биовара Эль-Тор Hybrid variant of EI Tor biovar n = 50	Типичный токсигенный биовар Эль-Тор Typical toxigenic EI Tor biovar n = 50	Типичный токсигенный биовар Эль-Тор Typical toxigenic EI Tor biovar 16961 GenBank	Классический биовар Classical biovar 569 GenBank
CTXϕ коровая область CTX ϕ core region <i>cep</i> — <i>zot</i> ; <i>ctxA</i> ; <i>ctxB</i> ^{CL} ; <i>ctxB</i> ^{EL}	+ , + + , + –	+ , + + , – +	+ , + + , – +	+ , + + , + –
RS2-область RS2-region <i>rstA</i> ; <i>rstB</i> ; <i>rstR</i> ^{CL} ; <i>rstR</i> ^{EL}	+ , + + – , ++	+ , + – , +	+ , + – , +	+ , + + , –
RS1₀ <i>rstC</i>	+	+	+	–
RTX <i>rtxA</i>, <i>rtxC</i>	+ , +	+ , +	+ , +	– , –
EPI <i>mshQ</i>, <i>ompW</i>	+ , +	+ , +	+ , +	– , –
VPI-1 <i>tcpA</i>^{EL}, <i>tcpA</i>^{CL}	+ , –	+ , –	+ , –	– , –
VPI-2 VC1758, VC1760	+ , +	+ , +	+ , +	– , –
VSP-I VC0175, VC0185	+ , +	+ , +	+ , +	– , –
VSP-II VC0490	+	+	+	– , –
SXT <i>strB</i>, <i>sullI</i> <i>dfrA1</i>, <i>dfr18</i>	+ , + + , +	– , – – , –	– , – – , –	– , – – , –
Нуклеотидная/ аминокислотная последовательность Nucleotide/amino acid sequence	115(T/C), 203 (T/C)/39 (H), 68 (T)	115 (T), 203 (T)/39 (Y), 68 (I)	115 (T), 203 (T)/39 (Y), 68 (I)	115 (C), 203 (C)/39 (H), 68 (T)

Таблица 3. Количество случаев и тяжесть течения холеры, вызванной типичными (1) и гибридными вариантами (2) холерного вибриона Эль-Тор

Table 3. Incidence rate and severity of cholera course caused by typical (1) and hybrid (2) El Tor cholera vibrio variants

Тяжесть течения холеры Эль-Тор, исходы Severity of El Tor cholera course, outcomes	Количество случаев Number of cases				Достоверность разницы показателей P-value
	1		2		
	г. Ставрополь City of Stavropol 1990		Дагестан Dagestan 1994		
	абс./abs.	P±m%	абс./abs.	P±m%	
Всего случаев инфицирования Total incidence rate	70		2369		
Число больных Number of patients	49		1129		
Легкое течение (дегидратация I–II) Mild course (dehydration I–II)	44	89,8±4,56	687	60,85±1,86	P < 0,001
Средне тяжелое (дегидратация II–III) Moderate course (dehydration II–III)	4	8,2±15,8	241	21,35±2,6	
Тяжелое течение (дегидратация III–IV) Severe course (dehydration III–IV)	1	2,0±14,0	201	17,8±1,7	
Число вибрионосителей Number of vibriocarriers	21	30,0±5,1	1240	52,3±1,0	P < 0,01
Число летальных исходов Number of lethal outcomes	–	–	24	2,13±3,0	

мы пришли к выводу, что эпидемический тип проявления холеры Эль-Тор обуславливается как типичным *V. cholerae* O1 биотипа Эль-Тор (*Hly*⁺ *ctx*⁺), так и гибридными вариантами холерного вибриона Эль-Тор. При этом показатели заболеваемости и инфицированности при холере, вызванной типичными токсигенными холерными вибрионами Эль-Тор, колебались соответственно от 0,5 до 19,6 на 100 тыс. населения (Ставропольский край, 1970–1975, 1990 гг.) 2,5 (Дагестан, 1970–1981) и от 0,5 до 28, 12,8 на 100 тыс. населения, а обусловленные гибридными вариантами холерного вибриона Эль-Тор — соответственно 55,8 и 117,6 (Дагестан, 1994) на 100 тыс. населения. В некоторых районах Дагестана в 1994 г. показатели инфицированности населения гибридными вариантами Эль-Тор были еще выше: 568,1 на 100 тыс. населения (г. Избербаш) и 697,5 на 100 тыс. населения (Каякентский район) [5].

Механизм заражения типичным или гибридным вариантом холерного вибриона Эль-Тор один — фекально-оральный. Однако основной путь реализации этого механизма для типичного холерного вибриона Эль-Тор — водный (97,0% в г. Ставрополе в 1990 г. и 80,0% в Дагестане в 1970–1981 гг.), а для гибридного варианта Эль-Тор — контактно-бытовой (58,3% в Дагестане в 1994 г.). Контактной-бытовой путь передачи возбудителя болезни был доминирующим в горных районах Дагестана в 1994 г., его удельный вес достигал 64,6–96,4% (Шалинский, Тляртинский

районы) [5]. При этом процент очагов с двумя и более случаями холеры, обусловленной типичными холерными вибрионами Эль-Тор, составил 22,0% (г. Ставрополь, 1990 г.). Первичные заражения здесь имели место непосредственно в семьях, все члены которых находились в одинаковых условиях водопользования родниковой водой, зараженной типичными холерными вибрионами Эль-Тор. Этот показатель оказался значительно более низким (12,0%) в Дагестане в 1970–1981 гг., когда первичные заражения реализовывались за пределами семейного очага при употреблении для питья и хозяйственно-бытовых нужд воды поверхностных водоемов, зараженных типичными вибрионами Эль-Тор.

Семейные очаги вообще не были зарегистрированы при спорадической заболеваемости холерой, вызванной типичными вибрионами Эль-Тор.

В период эпидемии холеры в 1994 г. в Дагестане, вызванной гибридными вариантами Эль-Тор, осуществлялся занос холеры в семью с последующим распространением среди ее членов при реализации бытовых факторов передачи. Анализ 84 очагов холеры в Дербенте и 38 очагов в сельской местности Дербентского и Каякентского районов показал, что процент очагов с двумя и более случаями инфицированности (больные и вибрионосители) оказался довольно высоким и составил в Дербенте 37,6%, а в сельской местности — 43,3%. Имели место и очаги с 4–7 случаями [1].

В целом по республике очаговость составила на трех административных территориях 25,1%, на четырех — 41,8%, на двадцати четырех 50,2–94,7% [1].

Инфицированность в семьях типичным холерным вибрионом Эль-Тор составила 22,0% в Ставрополе в 1990 г. и 10–12,0% в Дагестане

в 1970–1981 гг., а гибридным вариантом холерного вибриона Эль-Тор в Дагестане в 1994 г. — 40,3%. В отличие от холеры, обусловленной типичными холерными вибрионами Эль-Тор, контактных и больных холерой, вызванной геновариантами биовара Эль Тор, выявляли в Дагестане в 1994 г. по месту работы (27,2%),

Таблица 4. Характеристика некоторых показателей эпидемического процесса холеры, обусловленной типичными (1) и гибридными (2) вариантами холерного вибриона O1 Эль-Тор

Table 4. Characterization of some indicators of cholera epidemic process caused by typical (1) and hybrid (2) *V. cholerae* O1 El Tor variants

Место, годы проявления холеры, возбудитель Region, years of outbreak pathogen	Ставропольский край Stavropol Krai		Дагестан Dagestan	
	1970–1975	1990	1970–1981	1994
Показатели Parameters	1	1	1	2
Абсолютное число больных/вибрионосителей Absolute number of patients/vibriocarriers	10/0	49/21	60/196	1119/1240
Заболееваемость на 100 тыс. населения Morbidity rate per 100,000 population	0,5–1,5	19,6	2,5	55,8
Инфицированность на 100 тыс. населения Infection rate per 100,000 population	0,5–1,5	28	12,8	117,9
Очаговость (доля очагов с 2 и более случаями) Focality rate (percentage of foci with 2 or more cases)	0	22%	12%	67%
Инфицированность контактных (в семье, на работе, по месту учебы и т. д.) Infection rate of contact persons (family, workplace, educational facility etc.)	0	в семье in family 22%	в семье in family 10–12,0%	в семье — 40%, на работе — 27,2%, по месту учебы — 36% in family — 40%, workplace — 27.2%, educational facility — 36%
Факторы передачи возбудителя Factors of pathogen transmission	вода водоемов water body	вода родника spring water	вода водоемов water body	к-б факторы, пища, вода hc factors, food, water
Пути передачи возбудителя Routes of pathogen transmission	водный waterborne 100%	водный waterborne 97%	водный — 80%, пищевой — 15%, к-б — 5,0% waterborne — 80%, food — 15%, hc — 5.0%	к-б — 58,3%, пищевой — 15%, водный — 3,3% hc — 58.3%, food — 15%, water — 3.3%
Характер заболеваемости (форма реализации эпидпроцесса) Type of infectious process (enabled epidemiological process)	спорадическая sporadic	эпидемическая epidemic	спорадическая sporadic	эпидемическая epidemic
Выявление первого случая холеры Detected first cholera case	манифестация manifestation			
Генез случаев холеры Origin of cholera outbreak	завоз imported			

Примечание. К-б — контактно-бытовой путь.

Note. hc — household contact.

учебы (1,36%), в холерных госпиталях (4,4%), в режимном учреждении (0,99%).

Первые выявленные случаи холеры, вызванной типичными или гибридными вариантами холерного вибриона Эль-Тор, были завозными и манифестными.

Лабораторная диагностика современной холеры Эль-Тор

Эволюционные преобразования генома возбудителя холеры, начавшиеся в девятые годы прошлого столетия, продолжаются, в связи с чем программа эпидемиологического надзора должна включать постоянный молекулярно-генетический мониторинг за изменениями генома холерных вибрионов, обнаруживаемых у человека или в объектах окружающей среды. С этой целью ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора разработана и рекомендована к применению на учрежденческом уровне ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB*–*rstR*–*rstC*, РЭФ», позволяющая идентифицировать штаммы *Vibrio cholerae* O1 с определением биовара и дифференцировать биовар Эль-Тор на типичные токсигенные и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов.

Выводы

1. Штаммы *V. cholerae* O1, выделенные в 1993, 1994, 1998 гг. в Дагестане, по основным фенотипическим свойствам не отличаются от типичного токсигенного холерного вибриона биовара Эль-Тор. Вместе с тем 48,7% изученных штаммов геновариантов холерного вибриона имели смешанные фенотипические свойства Эль-Тор и классического биоваров, что диктует необходимость в существующую схему биотипирования включить маркерные гены классического биовара (*ctxB^{Cl}+*, *rtxC*–), биовара Эль-Тор (*ctxBEI+*), геновариантов биовара Эль-Тор (*ctxB^{Cl}+*, *rtxC+*), выявляемые в ДНК холерных вибрионов методом ПЦР.

2. Молекулярно-генетический анализ штаммов биовара Эль-Тор, выделенных в Дагестане (1993, 1994, 1998 гг.), показал, что структура их генома претерпела эволюционные преобразования в коровой области профага CTX_{ϕ} и профага $RS1_{\phi}$: изучаемые штаммы биовара Эль-Тор в своем геноме содержат, помимо эльторовских, гены классического биовара (*ctxB^{Cl}* и/или *rstR^{Cl}*). Такие штаммы получили название «гибридные», или «генетически измененные», варианты холерного вибриона биовара Эль-Тор. Как и типичные токсигенные холерные вибрионы Эль-Тор, они имеют острова персистенции

(EPI), патогенности (VPI-1,2) и пандемичности (VSP-I,II), но только у геновариантов биовара Эль-Тор обнаруживается интегративный и конъюгативный элемент SXT с генами полирезистентности к антибиотикам.

3. Особенности процесса инфекционного заболевания, в том числе и холеры, обусловлены специфическими свойствами возбудителя, которые напрямую связаны с эволюционными изменениями молекулярно-генетической организации типичных холерных вибрионов биовара Эль-Тор: замена аллеля В3 в опероне *ctxAB* (штаммы холерного вибриона, выделенные на Кавказе с 1970 по 1990 гг.) на аллель В1 (штаммы геновариантов холерного вибриона, выделенные на Кавказе в 1993, 1994, 1998 гг.) привела к большей и качественно иной продукции основного патогенетического фактора болезни — холерного энтеротоксина (СТ-1 вместо СТ-2). Вследствие этого эпидемические вспышки холеры, обусловленные геновариантами биовара Эль-Тор, по своему течению соответствуют вспышкам классической (азиатской) холеры.

4. Выявлены эпидемиологические особенности современной холеры. Источником холеры, обусловленной типичными холерными вибрионами биовара Эль-Тор или его геновариантами является человек. Механизм заражения един — фекально-оральный. Однако основной путь реализации этого механизма для типичного холерного вибриона Эль-Тор (штаммы холерного вибриона, выделенные на Кавказе с 1970 по 1990 гг.) — водный, а для геноварианта Эль-Тор (штаммы геновариантов холерного вибриона, выделенные на Кавказе в 1993, 1994, 1998 гг.) — контактно-бытовой. Первичные заражения при употреблении для питья и хозяйственно-бытовых нужд воды поверхностных водоемов, зараженных типичными вибрионами Эль-Тор, реализуются за пределами семейного очага. При холере, вызванной гибридными вариантами Эль-Тор, осуществляется занос инфекции в семью с последующим распространением среди ее членов при реализации бытовых факторов передачи в условиях низкого санитарного уровня проживающих.

5. В основе совершенствования лабораторной диагностики и эпидемиологического надзора за современной холерой Эль-Тор лежит использование ПЦР-тест-систем с учетом эволюционных преобразований генома типичного токсигенного холерного вибриона в геновариант биовара Эль-Тор. Эволюционные преобразования генома возбудителя холеры, начавшиеся в девятые годы прошлого столетия, продолжают, возможно формирование других генетически измененных вариантов холерного вибриона биовара Эль-Тор, но эпидемический потенциал их будет определяться продукци-

ей энтеротоксина первого типа. В связи с этим программа эпидемиологического надзора должна включать постоянный молекулярно-генетический мониторинг за изменениями генома холерных вибрионов различных серологических

групп, обнаруживаемых у человека или в объектах окружающей среды, что позволит своевременно прогнозировать появление генетически измененных вариантов с продукцией холерного токсина классического типа.

Список литературы/References

1. Грижебовский Г.М., Асваров Б.М., Попов В.А., Евченко Ю.М., Савельев В.Н., Ефременко В.И., Ляховер М.Л., Рахоев М.-Р.А., Кадиев Ш.З., Сеидова М.М., Таран О.И. О механизмах внутриочагового и территориального распространения холеры в Республике Дагестан // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, приложение. 1995. № 2. С. 27–30. [Grizhebovskiy G.M., Asvarov B.M., Popov V.A., Evchenko Yu.M., Savel'ev V.N., Efremenko V.I., Lyakhover M.L., Rakhoev M.-R.A., Kadiev Sh.Z., Seidova M.M., Taran O.I. About the mechanisms of intrafocal and territorial spreading of cholera in Dagestan Republic. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii, prilozhenie* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology (Suppl.)*, 1995, no. 2, pp. 27–30. (In Russ.)]
2. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. № 1 (111). С. 57–61. [Zadnova S.P., Shashkova A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Phenotypic and Genetic Analysis of Altered Variants of *Vibrio cholerae* Biovar El Tor. *Problemy osobo opasnykh infektsiy* = *Problems of Particularly Dangerous Infections, Saratov*, 2012, no. 1 (111), pp. 57–61 (In Russ.)] doi: 10.21055/0370-1069-2012-1(111)-57-61
3. Клименко Е.П., Попов В.Ф., Степанов Г.П. Эпидемиологический анализ. М.: Медицина, 1983. 192 с. [Klimenko E.P., Popov V.F., Stepanov G.P. Epidemiological analysis. M.: *Medicine*, 1983. 192 p. (In Russ.)]
4. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания. МУК 4.2.2218-07. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. 87 с. [Cholera laboratory diagnostics. Methodical guidelines. MG 4.2.2218-07. M.: *Federal Centre of Hygiene and u Epidemiology of Rospotrebnadzor*, 2007. 87 p. (In Russ.)]
5. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Чебуряев В.И., Ляховер М.Л., Рахоев М.-Р.А., Терентьев А.Н., Асваров Б.М., Чернышов С.Н., Гаджиева С.З., Исмаилов Ф.М., Бугаков Н.П. Холера в начале века. Прогноз // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, приложение. 2005, № 3. С. 44–48. [Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Cheburaev V.I., Lyakhover M.L., Rakhoev M.-R.A., Terent'ev A.N., Asvarov B.M., Chernyshov S.N., Gadzhieva S.Z., Ismailov F.M., Bugakov N.P. Cholera at the beginning of the XXI century. Prognosis. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2005, no. 3, pp. 43–48 (In Russ.)]
6. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: методические указания. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. 51 с. [Arrangement of work of laboratories using Nucleic Acid Amplification Techniques on materials containing microorganisms of I–IV pathogenic risk groups: methodical guidelines. M.: *Federal Centre of Hygiene and u Epidemiology of Rospotrebnadzor*, 2010. 51 p. (In Russ.)]
7. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.П., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011, № 3. С. 11–17. [Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.P., Kutyrev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya* = *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2011, no. 3, pp. 11–17. (In Russ.)]
8. Шаханина И.Л., Чернова Г.П., Ивлиева И.М. Современный эпидемиологический анализ: обзорная информация. М.: ВНИИМИ, 1987. 71 с. [Shakhanina I.L., Chernova G.P., Ivlieva I.M. *Modern epidemiological analysis: survey information*. M.: *VNIIMI*, 1987. 71 p. (In Russ.)]
9. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asacura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 11, pp. 4283–4286. doi: 10.1128/JCM.00799-10
10. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E. Hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS 101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 45, pp. 2991–3000. doi: 10.1128/JB.00040-10
11. Haan J., Hirst N.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.*, 2004, vol. 21, no. 2, pp. 77–92. doi: 10.1080/09687680410001663267
12. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, vol. 99, no. 3, pp. 1556–1561. doi: 10.1073/pnas.042667999
13. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J. Cholerae due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, pp. 4211–4213. doi: 10.1128/JCM.01304-06
14. Nguyen B.M., Lee J.H., Cuong N.T. Cholerae outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor strain producing classical cholera toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, no. 5, pp. 1568–1571. doi: 10.1128/JCM.02040-08
15. Pradhan S., Baidya A.K., Ghosh A., Paul K., Chowdhury R. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype. *J. Bacteriol.*, 2010, vol. 192, no. 4, pp. 955–963. doi: 10.1128/JB.01180-09
16. Raychoudhuri A., Patra T., Ramamurthy T., Nandy R., Takeda Y., Nair G.B., Mukhopadhyay A.K. Classical ctxB in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, vol. 15, no. 1, pp. 131–132. doi: 10.3201/eid1501.080543

17. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y.C. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.*, 2008, vol. 15, no. 6, pp. 987–988. doi: 10.3201/eid1406.080129
18. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.*, 2010, vol. 18, pp. 46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003
19. Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Hug A., Nizam A., Longini I.M., Qadri M., Faruque S.M., Colwell R.R., Ahmed S., Iqbal A., Bhuiyan N.A., Sack R.B. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and Benond. *Epidemiol. Infect.*, 2010, vol. 138, no. 3, pp. 346–352. doi: 10.1017/S0950268809990550

Авторы:

Савельева И.В., к.м.н., врач-бактериолог научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Куличенко А.Н., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, директор ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Савельев В.Н., д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Ковалев Д.А., к.х.н., зав. лабораторией биохимии, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Таран Т.В., д.м.н., зав. лабораторией подготовки специалистов, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Подопригора Е.И., младший научный сотрудник лаборатории подготовки специалистов, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Васильева О.В., к.м.н., врач-бактериолог лаборатории диагностики холеры и других кишечных инфекций, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия;

Шапаков Н.А., специалист по технической документации лаборатории биохимии, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия.

Authors:

Savelyeva I.V., PhD (Medicine), Bacteriologist of the Scientific and Production Laboratory of Preparations for the Diagnosis of Highly Dangerous and Other Infections, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Kulichenko A.N., RAS Corresponding Member, PhD, MD (Medicine), Professor, Director of the Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Saveliev V.N., PhD, MD (Medicine), Senior Researcher, Head of the Laboratory for the Diagnostics of Cholera and Other Intestinal Infections, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Kovalev D.A., PhD (Chemistry), Head of the Biochemistry Laboratory, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Taran T.V., PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory for Specialist Training, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Podoprighora E.I., Junior Researcher, Laboratory for Specialist Training, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Vasilieva O.V., PhD (Medicine), Bacteriologist, Laboratory for the Diagnostics of Cholera and Other Intestinal Infections, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation;

Shapakov N.A., Specialist in Technical Documentation, Biochemistry Laboratory, Stavropol Research Institute for Plague Control, Stavropol, Russian Federation.