

Л.Г.Гриднева<sup>1</sup>, Ю.С.Мусатов<sup>1</sup>, Т.В.Громова<sup>1</sup>, Н.М.Пуховская<sup>1</sup>, Н.Б.Белозерова<sup>1</sup>, О.М.Уткина<sup>1</sup>,  
Л.И.Иванов<sup>1</sup>, А.Г.Ковальский<sup>1</sup>, Л.В.Миронова<sup>2</sup>, Е.С.Куликалова<sup>2</sup>, Ж.Ю.Хунхеева<sup>2</sup>, С.В.Балахонов<sup>2</sup>

## РЕЗУЛЬТАТЫ МОНИТОРИНГА И БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ИЗОЛИРОВАННЫХ ИЗ ОБЪЕКТОВ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ НА ТЕРРИТОРИИ ХАБАРОВСКОГО КРАЯ

<sup>1</sup>ФКУЗ «Хабаровская противочумная станция», Хабаровск, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

С целью оценки ситуации по холере на территории Хабаровского края в предпаводковый и паводковый периоды 2013 г. проведен анализ результатов микробиологического мониторинга объектов окружающей среды на наличие холерного вибриона. Охарактеризованы показатели высеваемости *V. cholerae* из объектов окружающей среды Хабаровского края в динамике, осуществлена комплексная микробиологическая, молекулярно-генетическая характеристика и MLVA типирование штаммов *V. cholerae* eltor. Установлено, что наибольший удельный вес в структуре изолированных штаммов холерного вибриона приходится на вибрионы не O1/O139 серогрупп (97,3 %) с максимальным их выделением в период паводка. Наряду с обнаружением *V. cholerae* не O1/O139, впервые в регионе в предпаводковый период изолированы потенциально эпидемически опасные штаммы *V. cholerae* eltor O1 серогруппы с генотипом *ctxAB<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup>* и уникальным MLVA профилем. Результаты мониторинга свидетельствуют о наличии в поверхностных водоемах региона оптимальных для накопления *V. cholerae* условий и определяют необходимость усиления мероприятий по профилактике холеры в послепаводковый период.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, мониторинг, объекты окружающей среды, биологические свойства, MLVA-типирование.

L.G.Gridneva<sup>1</sup>, Yu.S.Musatov<sup>1</sup>, T.V.Gromova<sup>1</sup>, N.M.Pukhovskaya<sup>1</sup>, N.B.Belozerova<sup>1</sup>, O.M.Utkina<sup>1</sup>, L.I.Ivanov<sup>1</sup>,  
A.G.Koval'sky<sup>1</sup>, L.V.Mironova<sup>2</sup>, E.S.Kulikhalova<sup>2</sup>, Zh.Yu.Khunkheeva<sup>2</sup>, S.V.Balakhonov<sup>2</sup>

## Results of Monitoring over and Biological Properties of *Vibrio cholerae* Isolated from Ambient Environment Objects in the Khabarovsk Territory

<sup>1</sup>Khabarovsk Plague Control Station, Khabarovsk, Russian Federation; <sup>2</sup>Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Results of microbiological monitoring of the environment objects for the presence of *Vibrio cholerae* were analyzed to estimate epidemiological situation on cholera in the Khabarovsk Territory in the pre-flood and flood periods in 2013. *V. cholerae* isolation rate, collected from environment objects of the Khabarovsk territory, was studied in dynamics. Carried out was complex microbiological molecular-genetic characteristics and MLVA-typing of *V. cholerae* El Tor. It was established that the greatest relative density in the structure of the isolated *V. cholerae* strains belonged to non-O1/O139 serogroup (97,3 %) with its maximum rate of isolation in the high water period. In pre-flood period, 2013 for the first time ever in the Khabarovsk Territory along with *V. cholerae* non-O1/O139, isolated were potentially hazardous epidemic *V. cholerae* El Tor serogroup O1 with *ctxAB<sup>-</sup> tcpA<sup>+</sup>* genotype and a unique MLVA profile. The results of the monitoring indicated that there were optimal for *V. cholerae* accumulation in surface water reservoirs conditions and it was necessary to enhance measures for cholera prophylaxis in the post-flood period.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, monitoring, ambient environment objects, biological properties, MLVA-typing.

Первое десятилетие XXI века характеризуется крупными эпидемиями и вспышками холеры и устойчивой тенденцией роста мировой заболеваемости [2]. Эволюция возбудителя холеры в эндемичных странах привела к появлению новых вариантов вибриона эльтор, сочетающих в себе признаки классического и эльтор биоваров, которые получили дополнительные селективные преимущества для проникновения и закрепления их на новых территориях [2, 4, 6]. О масштабах эпидемических осложнений, которые могут вызывать такие атипичные штаммы с измененным геномом, свидетельствуют продолжающиеся с 2010 г. эпидемические осложнения по холере в регионе Карибского бассейна, охватившие о. Гаити, Доминиканскую Республику, Кубу, Мексику [5, 7]. Ежегодно регистрируются заносы холеры из эндемичных и вновь вовлеченных в эпидпроцесс стран

на свободные от холеры территории [2, 7].

В таких условиях мониторинг вибриофлоры имеет важное эпидемиологическое значение, поскольку доказана роль поверхностных водоемов в накоплении возбудителя холеры (в случае заноса его на территорию) и формировании местных очагов, связанных с водопользованием населения [3]. Актуальность этому на территории Хабаровского края придает эпидемическое неблагополучие по холере на сопредельной территории (КНР), постоянная миграция населения, высокая вероятность завоза холеры через речные порты и международные аэропорты Хабаровского края, массивное загрязнение пограничной р. Амур водами рек (притоков р. Амур) Китая. Все это обуславливает высокую вероятность заноса возбудителя холеры на территорию и развития эпидемических осложнений по холере, связанных, прежде всего, с реализацией

водного пути передачи инфекции.

В системе эпиднадзора за холерой для прогнозирования эпидемиологической обстановки на каждой конкретной административной территории важнейшее значение приобретает наличие многолетних данных о циркуляции в объектах окружающей среды холерных вибрионов и их биологических свойствах. Хабаровская противочумная станция проводит наблюдение за вибриофлорой поверхностных водоемов на территории Хабаровска с 1958 г. Результаты этого мониторинга свидетельствуют о постоянном обнаружении холерных вибрионов не O1/O139 серогрупп в воде поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых сточных водах города. Выявление *V. cholerae* O1 серогруппы в 1995–2006 гг. из воды р. Амур свидетельствовало о наличии благоприятных экологических условий для персистенции холерного вибриона. Эпидемиологическое благополучие на территории объяснялось тем, что все культуры O1 серогруппы были авирулентными по фаговому тесту и пробе Грейга (т.е. вызывали гемолиз эритроцитов барана) и не содержали генов *ctxAB* и *tcpA* при тестировании в ПЦР. Лишь у одного штамма, изолированного из воды р. Амур в августе 1999 г., в первых генерациях был выявлен ген, кодирующий синтез холерного токсина (*ctxAB*), и по результатам изучения вирулентности штамма на модели кроликов-сосунков он был отнесен к слабовирулентным.

Целью настоящего исследования является анализ результатов мониторинга контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов в Хабаровском крае за 2013 год.

### Материалы и методы

В работе использовано 72 штамма *Vibrio cholerae* не O1/O139 и 2 – *V. cholerae eltor* Ogava, выделенные из поверхностных водоемов и сточной воды на территории Хабаровского края в 2013 г.

Отбор проб проводился с мая по октябрь еженедельно в 20 эпидемиологически обоснованных точках стационарного наблюдения девяти поверхностных водоемов. Кроме этого, на исследование доставлялась сточная вода с двух городских канализационных станций. В период паводка (август–сентябрь

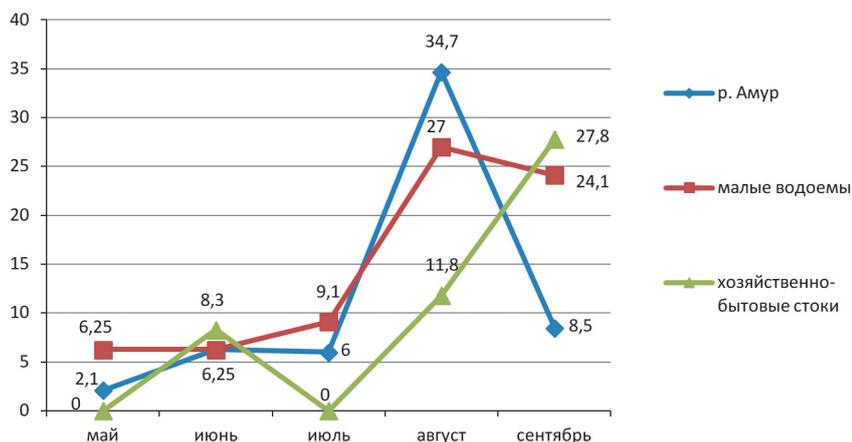
2013 г.) в целях усиления бактериологического контроля количество точек отбора проб воды и их география были расширены.

Изучение культурально-морфологических, биохимических и серологических свойств выделенных холерных вибрионов, а также их чувствительность к бактериофагам *C. eltor* проводили в соответствии с МУК [1]. Для молекулярно-генетической идентификации и обнаружения маркеров токсигенности штаммов использовали тест-систему АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL (ИнтерЛабСервис, Москва) в соответствии с наставлением производителя. Таксономическую принадлежность исследуемых культур к *V. cholerae* дополнительно определяли на основании MALDI-TOF масс-спектрометрического анализа с применением расширенной базы данных MALDI Biotyper 3,0 на масс-спектрометре Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Германия), а также секвенированием участка гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК, с помощью набора «MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification Kit». Мультилокусный анализ числа вариабельных тандемных повторов в штаммах *V. cholerae eltor* (MLVA-типирование) проводили на основании определения структуры пяти локусов – VcA, VcB, VcC, VcD, VcG с идентификацией их размеров посредством капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

### Результаты и обсуждение

При проведении эпиднадзора за холерой в Хабаровском крае осуществлялся бактериологический контроль объектов окружающей среды: р. Амур, малые реки и озера, хозяйственно-бытовые сточные воды (12, 8, 2 стационарные точки наблюдения соответственно). В течение мая–сентября 2013 г. было исследовано 310 проб воды из р. Амур (изолировано 39 культур), 228 проб из малых водоемов (выделено 33 культуры *V. cholerae* не O1/O139 и 2 штамма *Vibrio cholerae eltor*), 101 проба сточной воды (9 штаммов не O1/O139). Результаты сезонной динамики высеваемости объектов окружающей среды представлены на рисунке.

Первые находки холерного вибриона не O1/O139



Выделение *Vibrio cholerae* не O1/O139 на территории Хабаровского края

| Объект                  | Период        | Показатель       | Месяц |      |       |      |      | Всего за сезон |
|-------------------------|---------------|------------------|-------|------|-------|------|------|----------------|
|                         |               |                  | V     | VI   | VII   | VIII | IX   |                |
| р. Амур                 | 2008–2012 гг. | Исследовано проб | 246   | 249  | 328   | 360  | 244  | 1427           |
|                         |               | Выделено штаммов | 5     | 17   | 41    | 60   | 19   | 142            |
|                         |               | %                | 2     | 6,8  | 12,5  | 16,6 | 7,8  | 9,95           |
|                         | 2013 г.       | Исследовано проб | 48    | 48   | 81    | 73   | 59   | 309            |
|                         |               | Выделено штаммов | 1     | 3    | 5     | 25   | 5    | 39             |
|                         |               | %                | 2,1   | 6,25 | 6,2   | 34,2 | 8,5  | 12,6           |
| Малые водоемы           | 2008–2012 гг. | Исследовано проб | 85    | 167  | 319   | 322  | 108  | 1001           |
|                         |               | Выделено штаммов | 7     | 16   | 18    | 32   | 13   | 86             |
|                         |               | %                | 8,25  | 9,6  | 5,65  | 9,9  | 12   | 8,6            |
|                         | 2013 г.       | Исследовано проб | 16    | 32   | 88    | 62   | 29   | 227            |
|                         |               | Выделено штаммов | 1     | 2    | 6(+2) | 17   | 7    | 33(+2)         |
|                         |               | %                | 6,25  | 6,25 | 9,1   | 27,4 | 24,1 | 15,4           |
| Канализационные системы | 2008–2012 гг. | Исследовано проб | 58    | 76   | 110   | 91   | 86   | 421            |
|                         |               | Выделено штаммов | 4     | 8    | 15    | 14   | 6    | 47             |
|                         |               | %                | 6,9   | 10,5 | 13,6  | 15,4 | 7    | 11,2           |
|                         | 2013          | Исследовано проб | 12    | 24   | 30    | 17   | 18   | 101            |
|                         |               | Выделено штаммов | –0    | 2    | 0     | 2    | 5    | 9              |
|                         |               | %                | 0     | 8,3  | 0     | 11,8 | 27,8 | 8,9            |

серогрупп в воде поверхностных водоемов (р. Амур) зарегистрированы во второй декаде мая при температуре воды 12–15 °С и pH 7,0. В предпаводковый период процент высеваемости *V. cholerae* не O1/O139 группы из проб воды поверхностных водоемов составил 4,7 %, хозяйственно-бытовых сточных вод – 5,5 %. При повышении температуры (до 21–27 °С) и уровня воды в водоемах в августе–сентябре (период паводка) зарегистрирована и максимальная загрязненность холерным вибрионом воды поверхностных водоемов – 24,2 %, сточных вод – 20,0 %.

Сопоставление данных мониторинга вибриофлоры объектов окружающей среды в 2013 г. со среднемесячной частотой обнаружения *V. cholerae*, рассчитанной за 5 лет (2008–2012 гг.), свидетельствует о значительном увеличении показателя высеваемости холерного вибриона (в два и более раза) из проб воды поверхностных водоемов в пик паводка (август–сентябрь 2013 г.), таблица.

Изучение биологических свойств выделенных холерных вибрионов не O1/O139 показало, что все они были типичными по культурально-морфологическим свойствам. Штаммы *V. cholerae* не O1/O139, выделенные из различных объектов, практически не отличались по биохимической активности. Все они характеризовались принадлежностью к первой группе Хейберга, ферментировали до кислоты глюкозу, сахарозу, маннозу, маннит, не разлагали инозит, арабинозу, содержали декарбоксилазу лизина и орнитина, не обладали дегидролазой аргинина и уреазой, расщепляли крахмал, образовывали ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра.

Штаммы холерного вибриона не O1/O139 группы не агглютинировались специфическими холерными сыворотками O1, Инаба, Огава, RO и O139, были резистентны к фагам C, *eltor*, ХДФ-3,4,5.

Помимо вибрионов не O1/O139 серогруппы, из

проб воды, отобранных 16.07.2013 г. в стационарной точке р. Черная у п. Черная речка, было изолировано две культуры, идентифицированные как *Vibrio cholerae eltor Ogava*. Обе культуры типичны по тинкториальным, культурально-морфологическим, биохимическим свойствам, агглютинируются до титра холерными O1 и Огава сыворотками, дают специфическое свечение в реакции иммунофлуоресценции, вызывают гемолиз эритроцитов барана в пробе Грейга. Оба штамма лизируются классическим холерным фагом в разведении 10<sup>-1</sup>, тогда как при оценке чувствительности к диагностическому фагу эльтор один из штаммов (*V. cholerae eltor* № 286) лизировался только цельным фагом, второй (*V. cholerae eltor* № 287) – в разведении 10<sup>-2</sup>.

Углубленное изучение указанных штаммов в Региональном центре по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней I–II групп патогенности на базе ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора подтвердило их таксономическую принадлежность к *V. cholerae* на основании определения спектра константных белков («достоверная идентификация до вида» max score 2,546 и 2,580) и структуры фрагмента гена 16S rDNA (100 % соответствие нуклеотидной последовательности указанного гена исследуемых штаммов *V. cholerae* с нуклеотидной последовательностью референсного штамма из базы данных программы MicroSEQ® ID 16S rDNA 500 Library v2.1).

Оценка эпидемической значимости в ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени показала наличие в геноме штаммов *V. cholerae eltor* O1 гена *tcpA*, детерминирующего биосинтез основной структурной субъединицы токсин-регулируемых пилей адгезии холерного вибриона, при отсутствии гена холерного токсина *ctxA*, что дает основание расценить данные штаммы как потенциально эпидемически

опасные. При MLVA типировании выявлен не характерный для изолируемых из поверхностных водоемов на фоне эпидемиологического благополучия штаммов холерного вибриона локус VcB с уникальной структурой, характеризующейся большим количеством повторов. В целом аллельный профиль обоих штаммов определен как VcA18, VcB30, VcC12, VcD9, VcG6.

Профиль чувствительности штаммов к антибиотикам оказался вариабельным: один из них чувствителен к левомицетину, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу, норфлоксацину, азитромицину, имипенему, меропинему; второй – отличается по антибиотико-чувствительности к гентамицину, ципрофлоксацину, ко-тримоксазолу.

Таким образом, данные микробиологического мониторинга поверхностных водоемов Хабаровского края в 2013 г. свидетельствуют о том, что вибриофлора их представлена преимущественно вибрионами не O1/O139 серогрупп (97,3 %). При этом анализ сезонной динамики выделения *V. cholerae* из поверхностных водоемов показал значительное повышение уровня контаминации проб воды в паводковый период 2013 г. Обнаружение впервые в гидросфере Амурского бассейна в предпаводковый период потенциально эпидемически опасных вариантов *V. cholerae* eltor, содержащих ген токсин-корегулируемых пилей адгезии, и однократность их выделения позволяют предполагать возможность заноса указанного варианта холерного вибриона в водоем Хабаровска. Все это свидетельствует о наличии в поверхностных водоемах региона оптимальных для накопления *V. cholerae* условий и определяет необходимость усиления мероприятий по профилактике холеры в послепаводковый период.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Лабораторная диагностика холеры: Методические рекомендации МУК 4.2.2218-07. М.; 2007 87 с.

2. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Арешина О.А., Адаменко О.Л. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):16–9.

3. Марамонович А.С., Урбанович Л.Я., Миронова Л.В., Куликалова Е.С. Эволюция эпидемиологии холеры. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2006; 6:63–71.

4. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4:11–9.

5. Pun S.B. Understanding the Cholera Epidemic, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2178–9.

6. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010, 18(1):46–4.

7. Weekly epidemiological record. 2013; 88(31):321–36. <http://www.who.int/wer/2013/wer8831.pdf>

#### References

1. [Laboratory Diagnostics of Cholera. Methodological Regulations]. MR 4.2.2218-07. M.; 2007. 87 p.

2. Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Arëshina O.A., Adamenko O.L. [Assessment of cholera epidemiological situation in the world in the present period. Prognosis]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):16–9.

3. Maramovich A.S., Urbanovich L.Ya., Mironova L.V., Kulikalova E.S. [Evolution of cholera epidemiology]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2006; 6:63–71.

4. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V. [Evolution of the cholera agent genome in the modern period]. *Mol. Genet.* 2010; 4:11–9.

5. Pun S.B. Understanding the Cholera Epidemic, Haiti. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2178–9.

6. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010, 18(1):46–4.

7. Weekly epidemiological record. 2013; 88(31):321–36. <http://www.who.int/wer/2013/wer8831.pdf>

#### Authors:

Gridneva L.G., Musatov Yu.S., Gromova T.V., Pukhovskaya N.M., Belozeroва N.B., Utkina O.M., Ivanov L.I., Koval'sky A.G. Khabarovsk Plague Control Station. 7, Sanitarny Line, Khabarovsk, 680031, Russian Federation. E-mail: chum@chum.khv.ru

Mironova L.V., Kulikalova E.S., Khunkheeva Zh.Yu., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russia. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru

#### Об авторах:

Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г. Хабаровская противочумная станция. Российская Федерация, 680031, Хабаровск, Санитарный переулок, 7. E-mail: chum@chum.khv.ru

Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru