

УДК: 001.53+004.12+57.02:579.843.+477

Порівняльна характеристика біологічних властивостей *Vibrio cholerae* O1, виділених від хворих під час спалахів холери та в міжспалаховий період в Україні

О.В.Петренко, О.Б.Хайтович, В.В.Алексєнко

¹Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л.В.Громашевського НАМН (Київ, Україна)
epidemics@ukr.net; Khaytovych@rambler.ru

Vibrio cholerae O1, виділені від хворих під час спалахів холери та в міжспалаховий період в Україні, показали мінливість своїх фенотипових властивостей. Зазвичай у період спалахів холери реєструють холерні вібриони O1 з вірулентними властивостями, а в міжспалаховий період – авірулентні холерні вібриони. На відміну від вірулентних холерних вібрионів, котрі проявляють фенотипові ознаки більш стало, авірулентні холерні вібриони демонструють суттєву різноманітність. Серед авірулентних холерних вібрионів реєструють як гемолізпозитивні, так і гемолізнегативні варіанти. Зниження чутливості до діагностичних сироваток та фагів у діагностичному робочому титрі відмічають як у вірулентних, так і у авірулентних холерних вібрионів. Наявність у холерних вібрионів мінливості фенотипових властивостей ускладнює їх ідентифікацію. Тому для їх виявлення потрібно проводити молекулярно-генетичні дослідження.

Ключові слова: холерні вібриони O1, діагностичні сироватки, бактеріофаги, фенотипові властивості.

Сравнительная характеристика биологических свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных от больных при вспышках холеры и в межвспышечный период в Украине

Е.В.Петренко, А.Б.Хайтович, В.В.Алексєнко

Vibrio cholerae O1, выделенные от людей при вспышках холеры и в межвспышечный период в Украине, показали свою изменчивость относительно различных фенотипических свойств. Обычно в период вспышек холеры регистрируют холерные вибрионы O1 с вирулентными свойствами, а в межвспышечный период – авирулентные холерные вибрионы. Вирулентные холерные вибрионы проявляют более стабильно свои фенотипические признаки. В отличие от них, авирулентные холерные вибрионы проявляют существенное разнообразие. Среди авирулентных холерных вибрионов регистрируют как гемолитические, так и негемолитические варианты. Снижение чувствительности к диагностическим сывороткам и фагам в диагностическом рабочем титре отмечается как у вирулентных холерных вибрионов, так и у авирулентных. Наличие у холерных вибрионов изменчивости фенотипических свойств усложняет их идентификацию, в связи с этим необходимо проводить молекулярно-генетические исследования.

Ключевые слова: холерные вибрионы O1, диагностические сыворотки, бактериофаги, фенотипические свойства.

Comparative characteristics of biological properties of *Vibrio cholerae* O1 isolated from people during cholera outbreaks and non-outbreak periods in Ukraine

O.V.Petrenko, O.B.Khaytovych, V.V.Alekseenko

Vibrio cholerae O1, isolated from people during cholera outbreaks and non-outbreak periods in Ukraine showed variability in different phenotypic traits. Usually, during cholera outbreaks virulent cholera vibrios O1 are registered, and during non-outbreak periods there are records of avirulent vibrios. Virulent cholera vibrios exhibit their phenotypic traits more consistently. Unlike virulent vibrios, avirulent ones display significant diversity. Among avirulent cholera vibrios there are hemolysin-positive, as well as hemolysin-negative variants registered. Also both virulent and avirulent cholera vibrios show decrease in sensitivity to diagnostic serums and bacteriophages in the titer. Variability of phenotypic traits complicates their identification, which requires molecular-genetic research.

Key words: cholera vibrios O1, diagnostic serums, bacteriophages, phenotypic traits.

Вступ

Мінливість патогенних бактерій залишається однією з найважливіших проблем мікробіології. Нині встановлено, що популяція холерних вібріонів, виділених від хворих на холеру, вібриононосіїв та з навколишнього середовища, є гетерогенною (Иванова и др., 2011; Актуальные проблемы ..., 2000; Safa et al., 2010). Мінливість біологічних властивостей *Vibrio cholerae* O1 (Кох, 1883) відносно різних фенотипових ознак пов'язана із впливом різноманітних факторів навколишнього середовища (Милютин и др., 1981; Mercy et al., 2014).

В Україні періодично реєструються як спалахи холери, так і поодинокі випадки захворювання на холеру (Алексеевко, 2007). Зазвичай спалахи пов'язані із завезенням на територію збудника холери *Vibrio cholerae* O1, але не виключено, що захворювання викликають і місцеві клони (Стеценко, 2009). У зв'язку з цим біологічна характеристика штамів *Vibrio cholerae* O1, виділених під час спалахів холери та в міжспалаховий період, є важливим критерієм для ідентифікації збудника та визначення протиепідемічних заходів. Тому потрібно постійно проводити моніторинг біологічних властивостей холерних вібріонів O1, виділених на території України.

Мета проведеної роботи полягала у дослідженні фенотипових властивостей *Vibrio cholerae* O1, виділених від хворих під час спалахів холери та в міжспалаховий період в Україні.

Матеріали та методи дослідження

Досліджено 69 штамів холерних вібріонів, виділених від хворих під час спалахів холери: у Херсонській обл. (1991 р.) – 10 штамів; в АР Крим (1994 р.) – 28 штамів; у Запорізькій обл. (1994 р.) – 2 штами; у Херсонській обл. (1994 р.) – 6 штамів; у Донецькій обл. (1994 р.) – 4 штами; у Дніпропетровській обл. (1994 р.) – 2 штами; у Миколаївській обл. (1995 р.) – 3 штами; у Донецькій обл. (2011 р.) – 14 штамів. А також 34 штами холерних вібріонів, виділених від хворих в міжспалаховий період в південних регіонах України з 1996 до 2012 року. Штами зберігалися у Національній колекції збудників холери O1 та не O1 серогрупи у ДЗ «Українська протичумна станція МОЗ України».

Вивчення культурально-морфологічних, тинкторіальних, серологічних та біохімічних властивостей, відношення до діагностичних фагів та сироваток проводили за Інструкцією з організації та проведення протихолерних заходів, клініки та лабораторної діагностики холери (Інструкція, 1997).

Статистичну обробку результатів проводили за загальноприйнятими методами варіаційної статистики (Ашмарин, Воробьев, 1962). Вірогідність різниці між штамми оцінювали за критерієм Стьюдента (t).

Результати та обговорення

Проведені дослідження з ідентифікації штамів холерних вібріонів, виділених від хворих у різні роки, за основними біологічними властивостями показали, що незалежно від періоду виділення усі досліджувані штами холерних вібріонів за своїми морфологічними, тинкторіальними, біохімічними та серологічними властивостями належать до виду *Vibrio cholerae* O1.

Одним із основних критеріїв лабораторної діагностики холерних вібріонів є визначення їхніх вірулентних властивостей. Однією з ранніх ознак наявності вірулентних властивостей у холерних вібріонів є здатність до окислення маніту. Якщо окислення проходить до 5 годин, то такі холерні вібріони відносяться до авірулентних штамів, а якщо після 5 годин – до вірулентних (Інструкція, 1997).

Виявлення холерогенності у 69 штамів *V. cholerae* O1 за манітом показало, що вібріони, виділені від хворих під час спалахів холери, у 100% випадків окислювали маніт після 5 годин, що дає можливість віднести їх до вірулентних варіантів. Водночас 34 штами холерних вібріонів, виділених у міжспалаховий період, віднесені до авірулентних варіантів, оскільки окислення маніту у 100% відмічалось до 5 годин.

Таким чином, результати дослідження показали, що окислення маніту є показовим тестом для виявлення холерогенності у холерних вібріонів.

Іншим важливим критерієм визначення вірулентності у *V. cholerae* O1 є гемолітична активність. Ця ознака використовується у лабораторній діагностиці для визначення вірулентних і авірулентних варіантів вібріонів, що виявляється у реакції за Грейгом (Милютин и др., 1981). Але в останні роки діагностичне значення цієї ознаки змінилося, оскільки серед холерних вібріонів, виділених від хворих у міжспалаховий період, виявляють як гемолізпозитивні, так і гемолізнегативні культури (Меньшикова, 2003).

Досліджені нами штами холерних вібріонів, які були виділені від хворих під час спалахів холери, не проявляли гемолітичної активності за Грейгом, що дає можливість віднести їх до вірулентних варіантів. Проте із 34 штамів холерних вібріонів, виділених у міжспалаховий період, гемолітичну активність проявили 76,5±7,3 %, що дозволило їх віднести до авірулентних холерних вібріонів. Інші 23,5±7,3 % штамів холерних вібріонів не викликали гемолізу. Гемолізнегативні холерні вібріони можна було віднести до вірулентних, але за окисненням маніту, ці вібріони віднесені до авірулентних. У зв'язку з цим неможливо провести чітку ідентифікацію досліджуваних вібріонів щодо належності їх до вірулентних чи авірулентних варіантів, тому такі штами холерних вібріонів потребують додаткових методів дослідження.

Вивчення серологічних властивостей холерних вібріонів показало, що холерні вібріони, виділені при спалахах холери, аглютинувались з видоспецифічною холерною O1 сироваткою на слайд-аглютинації у 100% випадків. Водночас аглютинацію з холерною O1 сироваткою у розгорнутій реакції аглютинації до ідентифікаційного титру давали 95,7±2,4% штамів. Три штами давали аглютинацію, але у нижчих титрах. Наявність аглютинації холерних вібріонів з O1 сироваткою свідчить про належність вібріонів до O1 серогрупи.

Проведені дослідження з визначення серовару холерних вібріонів за допомогою типоспецифічних сироваток Ogava та Inaba показали, що аглютинацію із сироваткою Ogava на слайд-аглютинації давали 94,2±2,8 % штамів холерних вібріонів, виділених під час спалахів холери, а з Inaba – 36,2±5,8 %, але до ідентифікаційного титру аглютинувались штами відповідно з Ogava – 89,9±3,6 %, з Inaba – 8,7±3,4 % (рис. 1). Серед досліджуваних штамів було виділено 2 штами, які аглютинувались типоспецифічними сироватками, як Ogava, так і Inaba, що дає можливість віднести їх до серовару Hikoshima, вони складають 1,9±1,6 %. Холерні вібріони проявили аглютинацію з холерною видоспецифічною RO сироваткою лише на слайд-аглютинації, з якою відреагувало 15,9±4,4 % штамів. Відомо, що антигенна мінливість пов'язана з модифікацією у структурі O-антигену (Актуальные проблемы..., 2000). За несприятливих умов у холерних вібріонів порушуються насамперед бокові полісахаридні ланцюги, які відповідають за серологічну специфічність холерних вібріонів. Коли бокові ланцюги частково або повністю редукуються, спостерігається зниження або втрата вібріонами аглютинабельності майже до R-варіантів. У досліджуваних штамів холерних вібріонів спостерігалися незначні зміни в антигенному складі, тому вони аглютинувались як O1, так і RO сироваткою.

Серологічні властивості 34 штамів холерних вібріонів, які були виділені від хворих у міжспалаховий період в Україні, свідчать, що 91,2±5,2 % штамів холерних вібріонів аглютинувались O1 сироваткою на слайд-аглютинації, але у ідентифікаційному титрі давали аглютинацію 61,8±8,7 % штамів. За здатністю до аглютинації типоспецифічними сироватками для визначення серовару визначено, що 76,5±7,3 % штамів холерних вібріонів аглютинувались із сироваткою Ogava на слайд-аглютинації, а з Inaba – 50,0±8,6 %. Проте до серовару Ogava віднесені лише 52,9±8,4 % штамів холерних вібріонів, а до серовару Inaba – 20,6±6,9 %, у зв'язку з проявленням аглютинації цих штамів у ідентифікаційному титрі (рис. 1).

Таким чином, порівняльний аналіз результатів серологічних досліджень штамів вібріонів, виділених під час спалахів холери та в міжспалаховий період, показав, що у міжспалаховий період у холерних вібріонів знижується аглютинація з O1 сироваткою відповідно з 95,7±2,4% до 61,8±8,7 % ($p<0,001$), а із сироваткою Ogava – з 89,9±3,6 % до 52,9±8,4 % ($p<0,001$). Проте кількість штамів, які аглютинуються із сироваткою Inaba, збільшується з 8,7±3,4% до 20,6±6,9 % ($p>0,05$), але ці дані не є вірогідними і потребують подальших досліджень.

Треба відзначити, що холерні вібріони, виділені у міжспалаховий період, частіше дають аглютинацію з RO сироваткою, ніж штами при спалахах холери. Так, на слайд-аглютинації проявили аглютинацію 26,5±7,6 % штамів, а у діагностичному робочому титрі – лише 11,8±5,5 %. У 2000 році були виділені 3 штами холерних вібріонів, які не давали аглютинацію з O1 сироваткою, проте вони аглютинувались RO сироваткою. З них аглютинацію з RO сироваткою в ідентифікаційному титрі давали 2 штами і 1 штам – у половинному титрі, що дає можливість віднести їх до R-варіанту. У 2010 році виділені також 3 штами холерних вібріонів, з яких 2 штами давали аглютинацію з RO сироваткою у ідентифікаційному титрі та 1 штам – у половинному титрі. Проте вони аглютинувались із O1 сироваткою на слайд-аглютинації, тому їх можна віднести до *V. cholerae* O1-RO варіанту. Мінливість за SR-типом, тобто коли спостерігається аглютинабельність всіма холерними сироватками у різних комбінаціях, – такий тип антигенної модифікації найбільш нестабільний та найменш вивчений.

Слід зауважити, що одним із важливих діагностичних критеріїв в вивченні біологічних властивостей холерних вібріонів є чутливість до холерних бактеріофагів. У лабораторній діагностиці холерних вібріонів використовують холерні біовароспецифічні фаги – класичний «С» та ельтор, а також холерні діагностичні фаги (ХДФ) 3, 4, 5. Результати досліджень показали, що холерні вібріони, виділені під час спалахів, давали лізис з бактеріофагом ельтор у $94,2 \pm 2,8$ % випадків, але до діагностичного робочого титру (ДРТ) лізувались $71,0 \pm 5,5$ % штамів. Водночас з класичним фагом «С» проявили лізис $46,4 \pm 6,0$ % штамів вібріонів у цільному розведенні, але у діагностичному титрі жоден із штамів не проявив лізис. Лізабельність холерних вібріонів бактеріофагом ельтор дає можливість говорити про те, що під час спалахів холери в Україні виявляють холерні вібріони біовару ельтор.

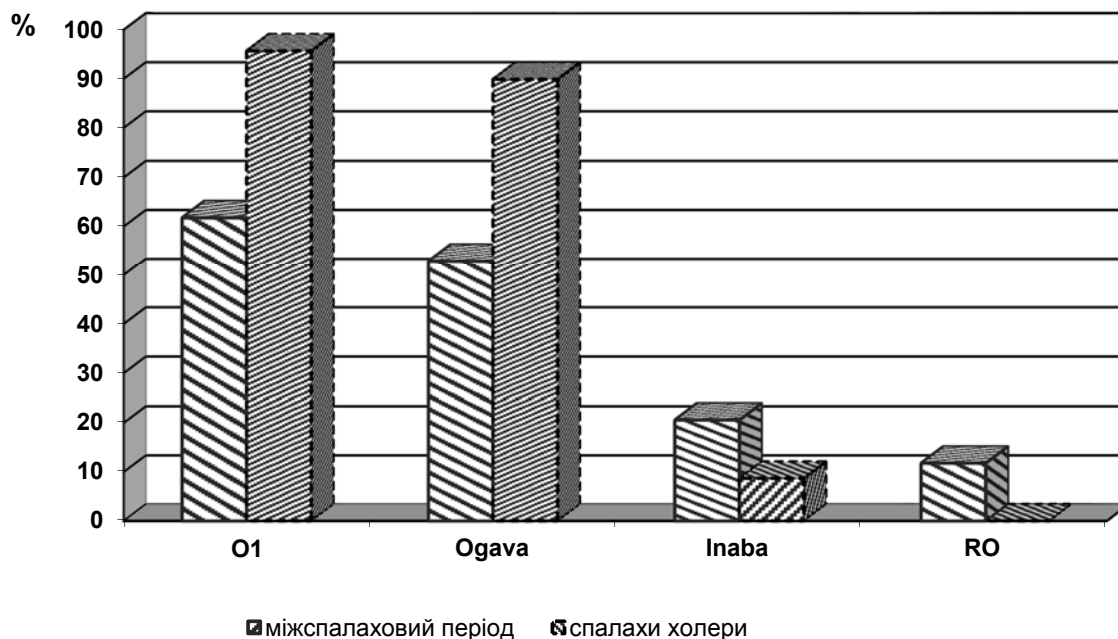


Рис. 1. Серологічні властивості штамів холерних вібріонів, виділених під час спалахів холери та у міжспалаховий період в Україні

Вивчення фаголізабельності холерних вібріонів, виділених в міжспалаховий період, показало їх мінливість. Так, з бактеріофагом ельтор давали лізис $44,1 \pm 8,5$ % штамів холерних вібріонів, але до ДРТ лізувались $29,4 \pm 7,8$ % штамів (рис. 2). З класичним бактеріофагом «С» проявили лізис $41,2 \pm 8,4$ % штамів, проте у 1 штаму виявлено лізис у діагностичному робочому титрі, що становить $2,9 \pm 2,9$ %. Зауважимо, що цей штам холерного вібріону (був виділений у 2001 році) проявив лізис у ДРТ як з бактеріофагом «С», так і з бактеріофагом ельтор. Отже, у міжспалаховий період знижується чутливість до бактеріофагу ельтор у порівнянні з періодом спалахів холери з $71,0 \pm 5,5$ % до $2,9 \pm 2,9$ % ($p < 0,001$), а також виявляють штами, спроможні лізуватись двома біоварофагами.

Крім того, діагностичне значення для холерних вібріонів має визначення чутливості до холерних діагностичних фагів ХДФ. Результати досліджень показали, що штами холерних вібріонів, виділені під час спалахів холери, проявили чутливість до ХДФ-3 у $69,6 \pm 5,5$ % випадків, до ХДФ-4 – $39,1 \pm 5,9$ %, до ХДФ-5 – 100 %. Проте до діагностичного робочого титру вібріони лізувались з ХДФ-3 – $10,1 \pm 3,6$ %, ХДФ-4 – $2,9 \pm 2,0$ %, ХДФ-5 – $55,1 \pm 6,0$ %. Результати досліджень дають можливість стверджувати, що під час спалахів холери від хворих виділяють холерні вібріони, у яких переважає лізис з ХДФ-5 та у незначних відсотках – з ХДФ-3 та ХДФ-4 (рис. 2).

Визначена чутливість до фагів ХДФ-3, 4, 5 у штамів холерних вібріонів, виділених у міжспалаховий період, показала зміну фаголізабельності до типу фага. З фагом ХДФ-3 лізувались вище діагностично робочого титру $61,8 \pm 8,3$ % штамів, з ХДФ-4 – $41,2 \pm 8,4$ %, з ХДФ-5 – $53,0 \pm 8,6$ %. Водночас досліджувані штами холерних вібріонів проявили лізис у діагностичному робочому титрі з

ХДФ-3 – $41,2 \pm 8,4$ %, з ХДФ-4 – $8,8 \pm 4,9$ %, з ХДФ-5 – $26,5 \pm 7,6$ %. Вкотре відмічається зниження чутливості до фагів у діагностичному титрі у порівнянні з цільним розведенням. Також слід зазначити, що в штаммах холерних вібріонів, виділених у міжспалаховий період, збільшується фаголізабельність з ХДФ-3 з $10,1 \pm 3,6$ % до $41,2 \pm 8,4$ % ($p < 0,001$) і знижується з ХДФ-5 з $55,1 \pm 6,0$ % до $26,5 \pm 7,6$ % ($p < 0,05$) у порівнянні зі штаммами, виділеними під час спалахів холери. Результати досліджень свідчать про те, що у міжспалаховий період у холерних вібріонів переважає лізис із ХДФ-3, а при спалахах холери – з ХДФ-5.

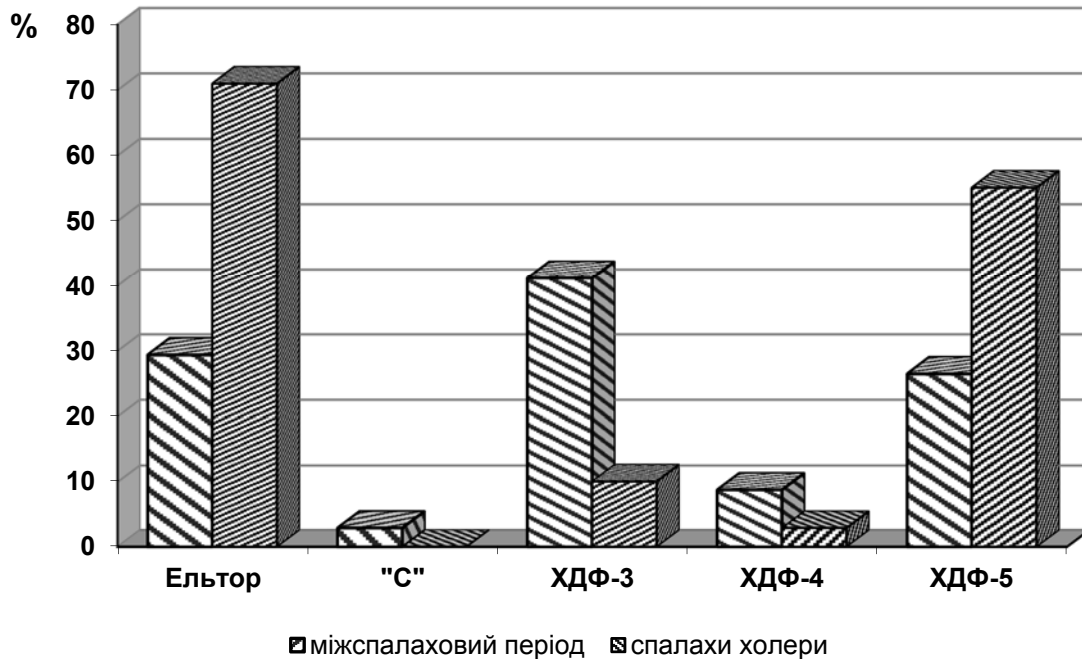


Рис. 2. Співвідношення штамів холерних вібріонів, виділених у різні періоди, до лізису холерних фагів

Таким чином, холерні вібріони O1, виділені у міжспалаховий період, відрізняються за серологічними властивостями від вібріонів, виділених під час спалахів холери, що може ускладнювати їх лабораторну діагностику. Крім того, застосування висвітлених діагностичних критеріїв в ідентифікації холерних вібріонів показує їх низьку діагностичну цінність. Тому в світовій лабораторній практиці застосовують молекулярно-генетичні дослідження, які на теперішній час є більш точними і інформативними (Mercy et al., 2014; Safa et al., 2010).

Висновки

1. Проведені дослідження дають можливість стверджувати, що за своїми фенотиповими властивостями штамми *V. cholerae* O1, виділені під час спалахів холери в Україні, проявляють свої властивості більш стало і за діагностичними критеріями віднесені до вірулентних варіантів.

2. *V. cholerae* O1, виділені від хворих на холеру у міжспалаховий період, демонструють мінливість за гемолітичними, серологічними та фаголізабельними властивостями, що ускладнює їх ідентифікацію.

3. Для проведення ідентифікації холерних вібріонів із зміненими біологічними властивостями необхідно проводити додаткові дослідження, зокрема молекулярно-генетичні.

Список літератури

Алексеенко В.В. Холера в Украине (история и современность). – Кировоград: Центр.-Укр. изд-во, 2007. – 171с. /Alekseyenko V.V. Cholera v Ukraine (istoriya i sovremennost' – Kirovograd: Tsentr.-Ukr. izd-vo, 2007. – 171s./

- Актуальные проблемы холеры / Под ред. В.И.Покровского и Г.Г.Онищенко. – М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ, 2000. – 384с. /Aktual'nyye problemy kholery / Pod red. V.I.Pokrovskogo i G.G.Onishchenko. – M.: GOU VUNMTS MZ RF, 2000. – 384s./
- Ашмарин И.П., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. – М.: Медгиз, 1962. – 180с. /Ashmarin I.P., Vorob'yev A.A. Statisticheskiye metody v mikrobiologicheskikh issledovaniyakh. – M.: Medgiz, 1962. – 180s./
- Інструкція з організації та проведення протихолерних заходів, клініки та лабораторної діагностики холери / МОЗ України №167. Офіц. вид. – К.: Полімед, 1997. – 123с. (нормативний документ МОЗ України). /Instryksiya z organizatsii ta provedennya protykholerlykh zakhodiv, kliniky ta laboratornoyi diagnostyky kholery / MOZ Ukrainy N167. Ofits. vyd. – K.: Polimed, 1997. – 123s. (normatyvnyy document MOZ Ukrainy)./
- Меньшикова Е.А. Гемолитическая активность токсигенных и нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различных серогрупп. Автореф. дисс. ... канд. биол. наук. – Ростов-на-Дону, 2003. – 27с. /Men'shykova Ye.A. Gemoliticheskaya aktivnost' toksigennykh i netoksigennykh shtammov kholerlykh vibrienov razlichnykh serogrupp. Avtoref. diss. ... kand. biol. nauk. – Rostov-na-Donu, 2003. – 27s./
- Милютин В.Н., Дрожжевникова М.С., Ломов Ю.М. и др. Механизмы и диапазон изменчивости холерных вибрионов. – Ростов-на-Дону: Ростовское книжное изд-во, 1981. – 176с. /Milyutin V.N., Drozhevnikova M.S., Lomov Yu.M. i dr. Mekhanizmy i diapazon izmenchivosti kholerlykh vibrienov. – Rostov-na-Donu: Rostovskoye knizhnoye izd-vo, 1981. – 176s./
- Стеценко И.И. Изучение процесса формирования эндемичного очага холеры в Мариуполе // Профилактическая медицина. – 2009. – №2. – С. 37–41. /Stetsenko I.I. Izucheniye protsessy formirovaniya endemichnogo ochaga kholery v Mariupole // Profilakticheskaya meditsyna. – 2009. – N2. – S. 37–41./
- Иванова С.М., Титов Г.В., Безсмертный В.Е. и др. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2010 году // Материалы проблемной комиссии. – Ростов-на-Дону, 2011. – Вып.24. – С. 66–71. /Ivanova S.M., Titov G.V., Bezsmertnyy V.Ye. i dr. Informatsiya o biologicheskikh svoystvakh kholerlykh vibrienov O1 i O139 serogrupp, izolirovannykh ot lyudey i iz ob'yektov okruzhayushchey sredy na territorii Rossiyskoy Federatsii v 2010 godu // Materialy problemnoy komissii. – Rostov-na-Donu, 2011. – Vyp.24. – S. 66–71./
- Mercy N., Mohamed A.A., Zipporah N. et al. Phenotypic and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolated from various regions of Kenya between 2007 and 2010 // Pan. Afr. Med. J. – 2014. – №4. – P. 8–19.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 // Trends in Microbiology. – 2010. – Vol.18. – P. 46–54.

Представлено: В.М.Благодатний / Presented by: V.M.Blagodatny

Рецензент: Н.В.Багацька / Reviewer: N.V.Bagatska

Подано до редакції / Received: 08.04.2015