

УДК 616.932(471.61)

Л.В.Григоренко, В.Д.Кругликов, А.Б.Мазрухо, И.В.Архангельская, Д.А.Зубкова, Н.Б.Непомнящая, И.С.Шестиалтынова

ХОЛЕРНЫЕ ВИБРИОНЫ НЕ O1/НЕ O139, ВЫДЕЛЕННЫЕ В ХОДЕ МОНИТОРИНГА ВОДОЕМОВ И СТОКОВ РОСТОВА-НА-ДОНУ С 2009 ПО 2011 ГОД

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

Изучены биологические свойства холерных вибрионов не O1/не O139, циркулирующих в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год. Подавляющее большинство изолятов были типичны по фенотипу. Из 280 штаммов у 90 выделенных штаммов (21 %) выявлена атипичность по агглютинабельности в реакции слайд-агглютинации на стекле и в развернутой РА с холерными диагностическими сыворотками. Даны рекомендации по дифференциации *V. cholerae* non O1/ non O139 от *V. cholerae* O1 и O139. Установлены доминирующие серогруппы (O16, O53, O76 и O67), которые за указанный период не менялись. Определена вариабельность генотипов штаммов и низкая вероятность проявления вирулентности. Показана нецелесообразность проведения сплошного гено- и серологического типирования водных штаммов.

Ключевые слова: холерные вибрионы не O1/не O139, фенотип, агглютинабельность, атипичность, серогруппы, генотип.

L.V.Grigorenko, V.D.Kruglikov, A.B.Mazrukho, I.V.Arkhangel'skaya, D.A.Zubkova, N.B.Nepomnyashchaya, I.S.Shestialtynova

Cholera Vibrios non-O1/non-O139 Isolated in the Process of Epidemiological Monitoring over Rostov-on-Don Water Basins and Drain Sewage System within the Period of 2009–2011

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

Studied have been biological properties of cholera vibrios non-O1/non-O139 circulating in the Rostov-on-Don surface waters and drain sewage system within the period of 2009–2011. Overwhelming majority of the isolates have been classified as typical ones in terms of their phenotype. However 90 strains (21 %) out of total 280 have been identified as atypical ones against agglutinability in the slide-agglutination and full-scale agglutination reaction to diagnostic cholera sera. Put forward are recommendations on performance of the differentiation between *V. cholerae* non-O1/non-O139 and *V. cholerae* O1/O139. Specified are predominant serogroups of the strains which turned to be unchanged within the stated period (O16, O53, O76, and O67). Revealed is the strain genotype variability and low probability of virulence manifestations. Demonstrated is the futility of the blind gene- and serological typing of aquatic strains.

Key words: cholera vibrios non-O1/nonO139, phenotype, agglutinability, typicality, serogroup, genotype.

Со времени установления того, что *Vibrio cholerae* O139 серогруппы («Бенгал») являются новым вариантом возбудителя холеры, внимание многих исследователей усилилось к изучению холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп [5].

Известно, что представители этой группы микроорганизмов могут стать причиной острых кишечных инфекций, не имеющих тенденции к эпидемическому распространению. В процессе проведения мониторинга за холерой на территории Российской Федерации холерные вибрионы не O1/не O139 серогруппы в подавляющем большинстве обнаруживаются в водных объектах окружающей среды, а также имеют место случаи выделения штаммов от больных, носителей и контактных лиц. В период 2003–2008 гг. нами осуществлялось предметное изучение штаммов *Vibrio cholerae* non O1/non O139, которые выделялись из водных объектов Ростова-на-Дону [4].

Цель настоящего исследования – сравнительное изучение биологических свойств холерных вибрионов не O1/не O139, циркулирующих в поверхностных водоемах и стоках Ростова-на-Дону с 2009 по 2011 год.

Объектами исследования являлись штаммы холерных вибрионов не O1/не O139, обнаруженных с 2009 по 2011 год в пробах воды из стационарных точек, закрепленных за Ростовским-на-Дону противочумным институтом.

Выделение и идентификацию штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2218-07. Дифференциацию водных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139 проводили с помощью моноклональных антител в реакции слайд-агглютинации [2] и иммунохроматографического теста для выявления холерных вибрионов O1, представленного Государственным научным цен-

тром прикладной микробиологии и биотехнологии (Оболенск). Серологическую принадлежность устанавливали с помощью реакции слайд-агглютинации, с использованием набора сывороток диагностических холерных не O1/не O139 серогрупп моноспецифических кроличьих сухих против типовых штаммов 80 серогрупп, разработанных в РостНИПЧИ [1].

Штаммы *V. cholerae* non O1/non O139 были исследованы в ПЦР с использованием специфических праймеров для детекции 24 нуклеотидных последовательностей генов, связанных с патогенностью *V. cholerae* [6].

В ходе мониторинга за наличием холерных вибрионов в поверхностных водоемах и хозяйственно-бытовых стоках Ростова-на-Дону в период 2009–2011 гг. было выделено 280 штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп.

Анализ динамики выделения штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп свидетельствовал о некотором количественном увеличении изолированных штаммов в 2009 г. (91 штамм) и о снижении их числа в 2011 г. (63 штамма). При сравнении с данными, полученными в 2003–2008 гг., выявилась тенденция уменьшения количества выделяемых водных штаммов *V. cholerae* non O1/non O139. Наибольшее количество штаммов в изучаемый период было обнаружено в пробах из рек Дон и Темерник, в июле и августе месяцах, что соответствовало сезонности выделения этих микроорганизмов в предшествующие пять лет [4].

Большинство из изолированных штаммов обладали типичными для рода *Vibrio* и вида *V. cholerae* морфологическими, культуральными, биохимическими свойствами. Вместе с тем среди изученных было обнаружено 90 (21 %) штаммов, атипичных по признаку агглютинабельности.

У 161 (57,5 %) штамма была установлена принадлежность к определенной серологической группе. При сравнительном анализе полученных результатов серологической идентификации с данными 2003–2008 гг. были отмечены незначительные изменения в составе доминирующих серогрупп вибрионов, циркулирующих в воде поверхностных водоемов в Ростова-на-Дону, и если в вышеуказанный период среди штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 преобладали представители O53, O67, O75, O76 серогрупп, то среди штаммов, выделенных в период с 2009 по 2011 год, повторялись штаммы O53, O67, O76 серогрупп, а также встречались вибрионы O2, O8, O16, O65 серогрупп. Остальные серогруппы были представлены единичными штаммами. Следовательно, за изучаемый период не отмечено резкой смены серологического пейзажа, по сравнению с предшествующим временем.

Все штаммы были атоксигенными (в ПЦР не содержали генов *ctxA* и *tcpA*). Расширенную генотипическую характеристику определяли у 120 водных штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* не O1/не O139, отобранных методом репрезентативной вы-

борки. У всех изученных штаммов отсутствовали гены профагов CTX, pre- CTX и RS1, острова патогенности VPI, гены термостабильного и шигаподобного токсина, гемолизина *V. parahaemolyticus*, но выявлены гены *hapA*, *cef*, *toxR*. У исследуемых штаммов были также обнаружены в различных сочетаниях гены, ассоциированные с другими факторами патогенности: *rtx*, гены VPI-2, *mshA*. Вместе с тем штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп отличались от таковых O1 серогруппы меньшими наборами перечисленных генов, что свидетельствовало в пользу более низкой, но возможной вероятности проявления ими вирулентности. В то же время ни один из штаммов не O1/не O139 не имел генотипа, совпадающего с таковым одного из представителей O1 серогруппы [4]. Несмотря на малое количество генов, детерминирующих дополнительные факторы патогенности холерных вибрионов, штаммы *V. cholerae* не O1/не O139, с нашей точки зрения, могут рассматриваться как резервуар генов патогенности холерных вибрионов. В этой связи, в случае возникновения спорадического заболевания или вспышки, вызванных этими микроорганизмами, целесообразно проводить серо- и генотипическое типирование штаммов, выделенных возбудителей, а также штаммов из объектов окружающей среды в очагах. Кроме того, необходимо отметить, что штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенные нами из водных объектов и относящиеся к одной серологической группе, имели разные генотипы.

В ходе нашего исследования было выделено 90 атипичных по агглютинабельности штаммов, и их свойства были изучены в динамике. В 2010 г. среди 81 выделенного штамма холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп были отмечены 40 штаммов (49,4 %), дававших положительный результат в реакции слайд-агглютинации на стекле с диагностической O1 холерной сывороткой, свечение в МФА на 1–2 креста, а у 12 штаммов из них была выявлена агглютинабельность и в развернутой реакции агглютинации с O1 холерной и типоспецифическими сыворотками в различных титрах. Было отмечено, что из одной и той же точки (и даже из одной и той же пробы) были выделены холерные вибрионы, принадлежащие к различным серогруппам. Данные штаммы были идентифицированы как *V. cholerae* не O1/не O139 как в реакции слайд-агглютинации с моноклональными антителами, так и при использовании иммунохроматографического теста, а также с помощью серотипирования и в ПЦР на O1 антиген. В ходе мониторинга в 2011 г. были изучены 50 (79,4 %) штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 из общего числа выделенных в этом году штаммов (63 штамма), у которых был отмечен положительный результат в реакции слайд-агглютинации на стекле. В результате исследования у 15 штаммов из 50 агглютинабельность была выявлена и в развернутой реакции агглютинации с O1 холерной и типоспеци-

фическими сыворотками в различных титрах. Все культуры давали свечение на два креста при обработке люминесцирующими O1 холерными антителами холерных вибрионов.

Полученные результаты свидетельствовали о необходимости своевременной дифференциации данных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139, несмотря на утрату этими штаммами агглютинабельности при последующих пассажах. При этом возможно использование следующих методов: реакция слайд-агглютинации с моноклональными антителами к *V. cholerae* O1 на основе гибридов E9 и F8G12 [2], определение принадлежности к определенным серогруппам у атипичных штаммов, а также реакция МФА и ПЦР. В этой связи становится очевидной необходимость внедрения в схему лабораторной диагностики холеры новых методов для надежной дифференциации холерных вибрионов O1, O139 от не O1/не O139 серогрупп, что диктуется быстротой, удобством постановки реакций и визуального учета результатов.

Мы считаем, что работа в данном направлении требует своего продолжения, т.к. выявленный факт наличия изменчивости по признаку агглютинабельности у водных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139 не исключает возможности диагностических ошибок в работе лабораторий практического здравоохранения территориального уровня, которые проводят исследования до этапа слайд-агглютинации с холерными диагностическими сыворотками. Такие ошибки могут повлечь за собой необходимость последующего проведения идентификации выделенных культур бактериологическими лабораториями регионального уровня с соответствующими затратами сил и средств. Так, использование МФА для баклабораторий территориального уровня нашло уже свое отражение в МУК 4.2.2870-11.

Таким образом, результаты проведенных исследований позволили определить доминирующие серогруппы холерных вибрионов не O1/не O139, выявить незначительные изменения в их составе, установить низкую вероятность проявления вирулентности данных штаммов, показали вариабельность их генотипов, подтвердили отсутствие связи последних с принадлежностью к определенным серогруппам. а также продемонстрировали нецелесообразность проведения сплошного гено- и серологического типирования водных штаммов *V. cholerae* не O1/не O139, выделенных при мониторинге.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Авдеева Е.П., Мазрухо Б.Л., Ишина Е.В., Воронежская Л.Г. Оценка метода серологической идентификации *Vibrio cholerae* не O1. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2001; 4:75–8.
2. Алексеева Л.П., Кругликов В.Д., Телесманич Н.Р., Ломов Ю.М., Евдокимова В.В., Авдеева Е.П., Фатеева О.Ф., Яговкин М.Э. Идентификация холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп с помощью моноклональных антител в реакции слайд-агглютинации. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2010; 11: 53–6.
3. Ерошенко Г.А., Кутырев В.В., Фадеева А.В., Шавина Н.Ю., Степанов А.В. Распространение генов системы секреции III типа у холерных вибрионов различных серогрупп. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2008; 4: 23–7.
4. Кругликов В.Д., Ломов Ю.М., Авдеева Е.П., Монахова Е.В., Ежова М.И., Архангельская И.В., Шестиалтынова И.С., Дедова Э.Г., Шалу О.А., Ускова Н.Н., Григоренко Л.В. Серологическое типирование и генотипическая характеристика холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных из воды поверхностных водоемов и стоков Ростова-на-Дону в 2003–2008 гг. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2010; 21:3–8.
5. Онищенко Г.Г., Ганин В.С., Голубинский Е.П. Вибрионы не O1 серологической группы и их значение в патологии человека. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2001. 384 с.
6. Monakhova E.V. Phenotypic and molecular characteristics of epidemic and non-epidemic *Vibrio cholerae* strains isolated in Russia and certain countries of Commonwealth of Independent States (CIS). In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and molecular aspects on cholera.* Springer Science+Business Media; 2010. P. 51–78.

References

1. Avdeeva E.P., Mazrukho B.L., Ishina E.V., Voronezhskaya L.G. [Evaluation of the methodology for serological *Vibrio cholerae* non-O1 identification]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2001; 4:75–8.
2. Alekseeva L.P., Kruglikov V.D., Telesmanich N.R., Lomov Yu.M., Evdokimova V.V., Avdeeva E.P., Fateeva O.F., Yagovkin M.E. [Cholera vibrio O1/O139 identification by means of slide agglutination using monoclonal antibodies]. *Klinich. Lab. Diagnost.* 2010; 11:53–6.
3. Eroshenko G.A., Kutyrev V.V., Fadeeva A.V., Shavina N.Yu., Stepanov A.V. [Distribution of the secretion systems (type III) genes in cholera vibrios of various serogroups]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2008; 4:23–7.
4. Kruglikov V.D., Lomov Yu.M., Avdeeva E.P., Monakhova E.V., Ezhova M.I., Arkhangel'skaya I.V., Shestialtynova I.S., Dedova E.G., Shalu O.A., Uskova N.N., Grigorenko L.V. [Serological typing and genotype characteristics of cholera vibrios non-O1/non-O139 serogroups, isolated from the Rostov-on-Don surface and sewage waters in 2003–2008]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2010; 21:3–8.
5. Onishchenko G.G., Ganin V.S., Golubinsky E.P. [Vibrios of Non-O1 Serological Group and Their Significance in Human Pathology]. М.: 2001. 384 p.
6. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Mikhas' N.K. [Studies of genome polymorphism among ctxAB⁺ cholera vibrio strains]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2004; 1:23–9.

Authors:

Grigorenko L.V., Kruglikov V.D., Mazrukho A.B., Arkhangel'skaya I.V., Zubkova D.A., Nepomnyashchaya N.B., Shestialtynova I.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M.Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaaanet.ru

Об авторах:

Григоренко Л.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Архангельская И.В., Зубкова Д.А., Непомнящая Н.Б., Шестиалтынова И.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. 344002, Ростов-на-Дону, ул. М.Горького, 117/40, Российская Федерация. E-mail: plague@aaaanet.ru

Поступила 28.10.13.