

## ВИЗНАЧЕННЯ НАЯВНОСТІ ОЗНАК ПАТОГЕННОСТІ У ПАРАГЕМОЛІТИЧНИХ ВІБРІОНІВ

<sup>1</sup>Петренко О.В., <sup>1</sup>Алексєнко В.В., <sup>2</sup>Хайтович О.Б.,  
<sup>2</sup>Підченко Н.Н., <sup>1</sup>Лисенко З.А.

<sup>1</sup>Інститут епідеміології та інфекційних хвороб  
ім.Л.В.Громашевського НАМН України, м. Київ  
<sup>2</sup>Українська протичумна станція МОЗ України, м. Симферополь

**Резюме.** *V.parahaemolyticus* проявляють свої патогенні властивості при наявності в їхньому геномі гену патогенності *tdh*, який відповідає за термостабільний гемолізін (ТДН), що підтверджується гемолітичною активністю. Такі штами вважаються епідемічно небезпечними і здатні викликати ГКІ.

**Ключові слова:** *V.parahaemolyticus*, гемолізینی, вібріони, гени патогенності.

**Вступ.** Останнім часом в світі спостерігається ріст захворюваності на гострі кишкові інфекції, викликані галофільними паратегемолітичними вібріонами [5]. *Vibrio parahaemolyticus* – патогенний для людини мікроорганізм, який здебільшого є чинником спалахів харчових токсикоінфекцій при споживанні продуктів морського походження. В зв'язку з глобальним характером спалахів, які зареєстровані після 1995 р., штами *V.parahaemolyticus* серогрупи О3:К6, в літературі отримали назву “пандемічні”, хоча цей термін неприйнятний до таких мікроорганізмів, як *V.parahaemolyticus* [6].

Патогенні властивості паратегемолітичних вібріонів пов'язані з продукуванням гемолізинів: термостабільного прямого гемолізину ТДН (thermostable direct hemolysin) та ТДН-подібного (ТДН-related hemolysin) або ТРН гемолізину, які контролюються відповідно генами *tdh* та *trh* [7]. В Україні паратегемолітичні вібріони вперше були виділені із води та риб Чорного моря в 1972 році, а від хворих людей на ГКІ в 1973 р. [1] і з того часу почали

практично щорічно реєструватися як спорадичні випадки, так і спалахи ГКІ пов'язані з даними вібріонами.

**Метою** роботи було виявлення генів патогенності у парагемолітичних вібріонів, які були виділені в різні роки в Україні від хворих та з об'єктів навколишнього середовища.

**Матеріали та методи.** Для досліджень було взято 30 штамів парагемолітичних вібріонів – 21 від хворих та 9 штамів з навколишнього середовища, виділених в 2001–2012 роки. Культури зберігалися в ліофільному стані в ДЗ “Українська протичумна станція МОЗ України”. Для культивування штамів використовували 1% пептону воду та лужний агар з вмістом 3% NaCl. Ідентифікацію штамів проводили за загально прийнятими методами. Підрошували культури на 1% пептонній воді з послідуочим висівом на лужний агар і подальшою експозицією в термостаті при 37°C. Біохімічні властивості парагемолітичних вібріонів вивчали за допомогою 18 тестів для сімейства *Vibrionaceae* з додаванням індикатору [3]. Облік проводили з урахуванням зміни кольору середовища.

Визначення гемолітичної активності вібріонів проводили на кров'яному агарі, виготовленому на основі середовища Вагацума [3]. На чашки з агаром наносили добову культуру вібріонів і через 24 години культивування в термостаті при 37°C враховували наявність зони лізису еритроцитів. Дослідження проводили використовуючи контрольні штами *V.parahaemolyticus* tdh+ №2448 та *V.parahaemolyticus* tdh- №2451 [4], які запатентовано в Україні та депоновано в колекції ДЗ “Українська протичумна станція МОЗ України”.

Молекулярно-генетичні властивості вивчали за допомогою ПЛР з послідовністю праймерів 5'-3': tdh1-ggtactaaatggctgacatc, tdh2-ccactaccactctcatatgc; trh1- ggtcaaaatggtaagcg, trh2-catttccgctctcatatgc [8]. Виділення ДНК вібріонів проводили за допомогою кип'ятіння. Готували 0,5 мл 1 млрд. зависі вібріонів і прогрівали в твердотільному термостаті при 100°C протягом 5 хвилин. Після чого пробірки центрифугували при 10 000 тис/об. 10 хвилин, супернатант переносили в нову пробірку і зберігали при -20°C до постановки ПЛР. Реакційну суміш готували в ре-

жимі “hot start”, яку розділяли воском. Нижня реакційна суміш: деіонізована вода – 10μ, дНТФ 2,5 мМ – 2,5μ, праймери 10 пкмоль/мкл – по 1μ кожного, зверху вносили по 7 μ воску для ампліфікації; верхня реакційна суміш: 10xПЦР буфер Б – 2,5 μ, MgCl<sub>2</sub> 25мМ – 1,5μ, Tag ДНК-полімераза 5 Е/мкл – 0,2μ, деіонізована вода – 5μ, масло. Досліджувану ДНК вносили по 5μ під масло. Ампліфікація проходила на апараті “Percin Elmer” при умовах ампліфікації: 95°C – 5 хв.–1 цикл; 95°C – 10сек., 57°C – 10 сек., 72°C – 10 сек. – 40 циклів; 72°C – 2 хв. – 1 цикл.

Облік результатів ампліфікації проводили електрофоретичним методом в 2% агарозному гелі [2]. Візуально під УФ-опромінюванням на транслюмінаторі фіксували наявність або відсутність полоси продукції ампліфікації.

**Результати дослідження та їх обговорення.** За своїми морфологічними, тінкторіальними, культуральними та біохімічними властивостями досліджувані 30 штамів вібріонів були віднесені до роду *Vibrio*, виду *V.parahaemolyticus*. За своїми видовими ознаками всі штами вібріонів окислювали і ферментували глюкозу, були позитивні в оксидазній пробі, мали декарбоксилазу лізину та орнітину та дегідралазу аргініну, утворювали індол. Ферментували манозу і маніт та арабінозу з утворенням кислоти, були негативні по відношенню до лактози та сахарози, володіли здатністю до роїння.

Проведені дослідження по виявленню гемолітичної активності на середовищі Вагацума (феномен Канагава), що дає можливість диференціювати патогенні штами від непатогенних, показали, що 18 штамів парагемолітичних вібріонів, які виділені від хворих на ГКІ, давали лізис еритроцитів, тобто володіли феноменом Канагава, і їх можна віднести до вірулентних штамів. Три штами від хворих не давали лізису еритроцитів, що дає можливість віднести їх до канагаванегативних, тобто авірулентних штамів. Штами, які були виділені з риби, також дали розбіжності – 6 штамів володіли гемолітичною активністю, а 3 штами не визивали лізис еритроцитів на середовищі Вагацума (табл.1).

Молекулярно-генетичні дослідження дали можливість виявити, що всі парагемолітичні вібріони, які визивали лізис еритро-

цитів на середовищі Вагацума, несли в своєму геномі ген патогенності *tdh*, який відповідає за прямий термостабільний гемолізін TDH. Інший ген патогенності – *trh*, який відповідає за продукування TRH гемолізіну, не був виділений ні в одному із досліджуваних штамів. За літературними даними [8] в геномі параземолітичних вібріонів зустрічається або ген *tdh*, або *trh*, разом вони, як правило, виявляються дуже рідко.

Таблиця 1

**Наявність патогенних властивостей в штаммах  
*V.parahaemolyticus***

№ п/п	Об'єкт виділення	Кількість штамів	Місце виділення	Рік виділення	Гемолітична активність	Гени патогенності	
						ген <i>tdh</i>	ген <i>trh</i>
1.	хворий	15	Запорізька обл.	2001	+	+	-
2.	хворий	1	Запорізька обл.	2001	-	-	-
3.	риба	6	м.Запоріжжя	2001	+	+	-
4.	риба	2	м.Запоріжжя	2001	-	-	-
5.	хворий	2	м.Дніпропетровськ	2007	+	+	-
6.	хворий	1	Запорізька обл.	2011	+	+	-
7.	хворий	2	Запорізька обл.	2012	-	-	-
8.	риба	1	Запорізька обл.	2012	-	-	-

Примітка: відсутність – “-”, наявність – “+”.

Як бачимо з таблиці патогенних властивостей параземолітичних вібріонів, штами, які були виділені в 2001 році в Запорізькій обл. і в м.Запоріжжя, можна віднести до одного джерела інфекції, так як вони виділені в один період і на одній території, та ідентичні за своїми біологічними властивостями. П'ятнадцять штамів, які були виділені від хворих, несли в своєму геномі основні ознаки патогенності, тобто володіли гемолітичною активністю на середовищі Вагацума, були канагавапозитивні і в своє-

му геномі мали ген патогенності *tdh*. Тільки у одного хворого був виділений штам парагемолітичного вібріону, який не проявляв ознак патогенності. Можливо у хворого був знижений імунний статус організму, при якому навіть авірулентний штам парагемолітичного вібріону, який не є супутньою флорою шлунково-кишкового тракту людини, зміг викликати діарею. Вірогідно, джерелом інфекції в Запорізькій обл. стала риба, так як з 8 штамів виділених з риби, у 6 виявлений ген патогенності *tdh*, і вони володіли гемолітичними властивостями.

Два штами, виділені від хворих в 2007 році в м. Дніпропетровську і один в 2011 році в Запорізькій обл., були патогенними. В той же час, два штами вібріонів від хворих з Запорізької обл. в 2012 році не володіли патогенними властивостями. Можна зробити припущення: авірулентні штами парагемолітичних вібріонів, які були виділені від хворих на ГКІ, мають інші, ще не визначені на сучасному етапі патогенні властивості, або хворі мають знижений захисний бар'єр організму, при якому будь-яка флора непритаманна для організму і викликає захворювання, або вібріони проходили як супутня флора і не мали ніякого відношення до ГКІ, а захворювання викликали інші мікроорганізми або віруси.

Аналізуючи ГКІ, викликані *V.parahaemolyticus*, за роками можна сказати, що спалахи інфекцій пов'язані з завозними випадками мікроорганізму на певну територію. Південні регіони України межують з Чорним і Азовським морем, через які проходять транспортні морські шляхи, що ймовірно призводить до завозу в морські акваторії України різної мікрофлори в тому числі і патогенних штамів парагемолітичних вібріонів. Але не виключається можливість і формування місцевого штаму *V.parahaemolyticus* з високим патогенним потенціалом. Дані припущення потребують більш поглиблених молекулярно-генетичних досліджень.

Таким чином, отримані нами дані дають можливість стверджувати, що патогенні властивості *V.parahaemolyticus* пов'язані з наявністю в їхньому геномі основного гену патогенності *tdh*, який відповідає за продукування гемолізину TDH, що і проявляє

ентеротоксичну дію в організмі людини. Штами парагемолітичних вібрионів від хворих, які не проявляли ознак патогенності в лабораторних умовах, заслуговують на більш розширений спектр досліджень по визначенню токсигенних властивостей. Штами вібрионів з об'єктів навколишнього середовища завжди авірулентні, але в період епідемічного неблагополуччя виділяються вірулентні штами, особливо з морської води та морепродуктів.

### **Висновки:**

1. Штами *V.parahaemolyticus*, які несуть в своєму геномі ген патогенності *tdh*, який відповідає за ентеротоксичну дію, є вірулентними і здатні викликати ГКІ.

2. З метою ефективного проведення лабораторних досліджень по виявленню вірулентних властивостей в парагемолітичних вібрионів необхідно в практичній діяльності застосовувати молекулярно-генетичні методи, які дають можливість прискорити ідентифікацію вібрионів.

### **Література:**

1. Либинзон А.Е., Демина А.И., Кулов Г.И. и др. Галофильные вибрионы, выделенные из Азовского моря//ЖМЭИ. – Москва. – Медицина. – №6. – 1977. – С.77–80.

2. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярная биология. – Москва. – Мир. – 1984. – 479 с.

3. Микробиология и лабораторная диагностика холеры // Под. ред. М.С.Дрожевкина, В.Н.Милютинина. – Ростов-на-Дону: Рост. кн. изд-во. – 1975. – 136 с.

4. Хайтович А.Б., Пидченко Н.Н., Ильичев Ю.А. ПЦР для изучения вирулентности парагемолитических вибрионов//Материалы Рос. науч-практ. конф., посвящ. 110-летию кафедры инф. бол. Военно-мед. академии им. С.М Кирова. – Санкт-Петербург. – 2006. – С.307–308.

5. Deeranjali A., Sanath Kumar H. Seasonal Variation in Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters along the Southwest Coast of India//Appl Environ Microbiol. – 2005. – Vol. 71. – N 7. – P. 3575–3580.

6. Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K. et al. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants. *Clin.Microbiol. Rev.* 2007. – 20 (1): 39–48.

7. Nakaguchi Y., Okuda J., Iida T., Nishibuchi M. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene// *Microbiol.Immunol.* – 2003. – Vol. 47. – N 3. – P. 233–239.

8. Zulkifli Y., Alitheen N. , Son R. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes// *Intern. Food Research J.* – 2009. – Vol. 16. – P. 289–296

## **ВЫЯВЛЕНИЕ НАЛИЧИЯ ПРИЗНАКОВ ПАТОГЕННОСТИ В ПАРАГЕМОЛИТИЧЕСКИХ ВИБРИОНАХ**

**Петренко Е.В., Алексеенко В.В., Хайтович А.Б.,  
Пидченко Н.Н., Лысенко З.А.**

**Резюме.** *V.parahaemolyticus* проявляют свои патогенные свойства при наличии в их геноме гена патогенности *tdh*, который отвечает за термостабильный гемолизин (TDH), что и подтверждается гемолитической активностью. Такие штаммы являются эпидемически опасными и способными вызывать ОКИ.

**Ключевые слова:** *V.parahaemolyticus*, гемолизины, вибрионы, гены патогенности.

## **DEFINITION OF PRESENCE OF PATHOGENIC PROPERTIES IN PARAHEMOLYTIC VIBRIOS**

**O. Petrenko V. Alekseenko, A.Khaytovych,  
N.Pidchenko, Z.Lysenko**

**Summary.** *V.parahaemolyticus* exhibit pathogenic properties in the presence of pathogenic gene *tdh* in the genome responsible for thermostable hemolysin (TDH), which is confirmed by hemolytic activity. Such strains are considered to be virulent and are capable of inducing AEI.

**Keywords:** *V.parahaemolyticus*, hemolysins, vibrios, pathogenic genes.