



УДК 759.843.1:616:577.1

**Н.Р. Телесманич, М.В. Полеева, Ю.М. Ломов, В.В. Агафонова**

## **СПЕКТР УГЛЕВОДНОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕЦЕПТОРОВ АДГЕЗИИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ НЕ O1/НЕ O139 СЕРОЛОГИЧЕСКИХ ГРУПП**

*ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора,  
лаборатория экологии холеры с ЦПВ*

*Россия, 344002, г. Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru*

Цель: выявление наиболее полного спектра специфичности лектиновых рецепторов штаммов вибрионов не O1/не O139, участвующих в механизмах адгезии, на модели агглютинации эритроцитов в реакции конкурентного ингибирования.

Материалы и методы: в работе исследованы атоксигенные штаммы холерных вибрионов не O1/не O139, выделенные из объектов окружающей среды, и токсигенные и атоксигенные штаммы холерных вибрионов не O1/не O139, выделенные от людей. Спектр лектиновых рецепторов определяли в реакции ингибирования гемагглютинации.

Результаты: выявлено, что штаммы вибрионов не O1/не O139 серогрупп независимо от объекта выделения обладают слабой способностью к агглютинации эритроцитов, что коррелирует с низким адгезивным потенциалом. Низкая способность к агглютинации обусловлена нестабильной от штамма к штамму экспрессией адгезинов (лектиновых рецепторов) различной специфичности. Наблюдается способность к экспрессии рецепторов очень широкого спектра, выявляющаяся на широком спектре разных видов эритроцитов с поштаммовым отличием.

Заключение: у вибрионов не O1/не O139 не выявлено различий в специфичности лектиновых рецепторов в зависимости от принадлежности к серогруппе, токсигенности, объекта выделения.

Ключевые слова: холерные вибрионы не O1/не O139 серологических групп, адгезивная активность, реакция гемагглютинации, лектиновые рецепторы.

**N.R. Telesmanich, M.V. Poleeva, Yu.M. Lomov, V.V. Agafonova**

## **A SPECTRUM OF CARBOHYDRATE SPECIFICITY OF RECEPTORS OF ADHESION OF VIBRIO CHOLERAЕ NON-O1, NON-O139**

*Control plague Research Institute*

*117 Gorky st., Rostov-on-Don, 344002, Russia. E-mail: plague@aaanet.ru*

Purpose: revealing of the fullest spectrum of specificity lectin receptors strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, participating in adhesion mechanisms, on model of agglutination of erythrocytes in reaction of competitive inhibition.

Materials and methods: in work are used strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, isolated from objects of environment and from people. Spectrum lectin receptors defined in inhibition reaction hemagglutination.

Results: it is revealed, that strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, irrespective of object of allocation possess weak ability to agglutination of erythrocytes that correlates with low adhesion. Low ability to agglutination is caused by an expression of adhesins (lectin receptors) various specificity. Ability to an expression of receptors of very wide spectrum, coming to light on a wide spectrum of different kinds of erythrocytes.

Summary: at strains of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 it is not revealed distinctions in specificity lectin receptors depending on an accessory to serogroupe, toxigenic, object of isolation.

Keywords: *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139, adhesion, hemagglutination, lectin receptors.



## Введение

**Х**олерные вибрионы не O1/не O139 серологических групп, которые распространены повсеместно и являются естественными обитателями вод поверхностных водоёмов, в то же время вызывают у людей тяжёлые гастроэнтериты и системные инфекции. Выделенные из водоёмов в процессе мониторинга холерные вибрионы не O1/не O139 представляют собой гетерогенную популяцию микроорганизмов как результат индивидуальной адаптации микробов к действию абиотических факторов конкретной экосистемы. Разнообразие серологических групп – в настоящее время их насчитывается более 200 [1], появление нового эпидемического варианта – вибрионов O139 – свидетельствуют о чрезвычайной пластичности и вариабельности поверхностных структур этой группы микроорганизмов. Познание рецепторов, участвующих в механизмах адгезии у холерных вибрионов не O1/не O139, помогло бы разобраться, почему, относясь к виду *Vibrio cholerae* и даже в некоторых случаях имея ген холерного токсина (ctx AB), они не являются возбудителями холеры [2,3]. В итоге более детальное изучение этих микроорганизмов может привести нас к формированию представлений о возможных маркерах энтеропатогенности. Наличие способности к адгезии у микроорганизмов в научной литературе связывают со способностью к гемагглютинации. Согласно литературным данным, адгезивная активность возбудителя холеры коррелирует с его способностью агглютинировать эритроциты человека и животных [4,5,6]. Чем больший спектр разных эритроцитов изучается в данном аспекте, тем больше можно получить данных об адгезивном потенциале конкретной группы микроорганизмов, спектре и специфичности поверхностных структур, участвующих в адгезии, наибольшем сродстве возбудителей инфекции к определённому виду эритроцитов, что может быть использовано в дальнейшем для диагностических целей. В адгезии микроорганизмов участвуют поверхностные белковые структуры бактериальной клетки, обладающие широкой специфичностью к углеводам клетки-мишени, что позволяет осуществлять процесс адгезии или специфического «прилипания». Эти структуры называются лектиновыми рецепторами и могут быть организованы в надмолекулярные структуры – пили или участвовать в сложном процессе адгезии как частные структуры [7,8]. Изучить спектр и специфичность белковых рецепторов холерных вибрионов, специфичных к углеводам клетки-мишени, возможно при помощи блокирования углеводами гемагглютинации наибольшего спектра различных по структуре эритроцитов в реакции конкурентного ингибирования. Ранее спектр углеводной специфичности рецепторов адгезии был нами изучен на штаммах холерных вибрионов эльтор и «Бенгал». Было показано, что ингибирующей способностью на реакцию гемагглютинации *V. cholerae* eltor с характеристикой ctx+ tcp+ обладают глюкоза, манноза, галактоза, сахароза, лактоза и D-глюкозамин; не было обнаружено рецепторов, специфичных арабинозе и аминсахарам: D-галактозамину, N-ацетил-D-галактозамину, N-ацетил-D-маннозамину. В отличие от токсигенных штаммов, у вибрионов эльтор с характеристикой ctx- tcp- выявлены лектиновые рецепторы, специфичные аминсахарам: D-галактозамину, D-глюкозамину, N-ацетил-D-галактозамину, N-ацетил-D-маннозамину. Общим характерным признаком для ток-

сигенных негемолитических и атоксигенных гемолитических штаммов явилось отсутствие рецептора, специфичного арабинозе [5,9]. Цель работы: выявление наиболее полного спектра специфичности лектиновых рецепторов штаммов холерных вибрионов не O1/не O139, участвующих в механизмах адгезии, на модели агглютинации эритроцитов в реакции конкурентного ингибирования.

## Материалы и методы

В работе были использованы штаммы *V. cholerae* non O1/non O139, выделенные из воды поверхностных водоёмов при мониторинге водных объектов г. Ростова-на-Дону – 92 штамма, а также штаммы холерных вибрионов не O1/не O139, с различным набором генов кассеты вирулентности (ctx- tcp-, ctx- tcp+, ctx+ tcp+), выделенные от больных людей и контактных с ними лиц – 40 штаммов.

Реакции гемагглютинации и ингибирования гемагглютинации проводили микрометодом в соответствии с ранее предложенной методикой [9].

## Результаты

Изучение способности к агглютинации различных видов эритроцитов человека и барана у холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных из объектов окружающей среды (ООС), показало, что наибольшим сродством они обладают к эритроцитам III группы крови человека – 51,1% изученных штаммов. Остальные виды эритроцитов (I, II, IV группы крови человека и барана) агглютинировались от 15% до 30% штаммами вибрионов не O1/не O139 в зависимости от вида эритроцитов. Однако способность незначительного количества штаммов к агглютинации каждой конкретной группы крови, вида эритроцитов помогла нам выявить наиболее полный спектр специфичности лектиновых рецепторов, который может быть выявлен именно на разных эритроцитах. При ингибировании изученной нами ранее агглютинации углеводами, у тех штаммов, которые вообще были способны к гемагглютинации хотя бы какого-либо вида эритроцитов, мы увидели чрезвычайно разноплановую картину без наличия каких-либо закономерностей (таблица 1).

Рассматривая получившийся профиль специфичности для группы *V. cholerae* non O1/non O139, выделенных из ООС, можно сказать, что специфичность рецепторов адгезии у вибрионов не O1/не O139 широкая, представленная сродством ко всем изученным углеводам. Однако экспрессия у разных штаммов различна и для данной группы вибрионов низкая. Нам не удалось выявить характерных рецепторов для конкретных серогрупп у холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных из ООС. Таким образом, мы установили низкую способность группы вибрионов не O1/не O139, выделенных из ООС, к гемагглютинации, а у гемагглютинирующих штаммов малое количество штаммов реагирующих на определённый углевод. Невысокая способность к агглютинации свидетельствует об очень низкой адгезивной активности, слабой экспрессии адгезинов, но при этом, всё же о наличии определённого адгезивного потенциала этой группы свободноживущих вибрионов не O1/не O139, проявляющейся в способности к экспрессии довольно широкого спектра углеводной специфичности лектинов.



Таблица 1

## Спектр лектиновых рецепторов холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных из ООС

| Сахара                | Реакция гемм-агглютинации | Вид эритроцитов           |                            |                             |                            |                  |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|------------------|
|                       |                           | I группа крови (абс. (%)) | II группа крови (абс. (%)) | III группа крови (абс. (%)) | IV группа крови (абс. (%)) | баран (абс. (%)) |
|                       |                           | 28* (30,4)                | 25 (27,7)                  | 47 (51,1)                   | 14 (15,2)                  | 22 (22,8)        |
| Глюкоза               |                           | 16 (57,1**)               | 10 (40,0)                  | 2 (4,3)                     | 7 (50,0)                   | 3 (13,6)         |
| Манноза               |                           | 17 (60,7)                 | 11 (44,0)                  | 18 (38,3)                   | 7 (50,0)                   | 19 (86,4)        |
| Галактоза             |                           | 9 (32,1)                  | 3 (12,0)                   | 27 (57,4)                   | 3 (21,4)                   | 17 (77,3)        |
| Арабиноза             |                           | 11 (39,3)                 | 2 (8,0)                    | 25 (53,2)                   | 2 (14,3)                   | 18 (81,8)        |
| Сахароза              |                           | 14 (50,0)                 | 11 (44,0)                  | 15 (31,9)                   | 11 (78,6)                  | 15 (68,2)        |
| Мальтоза              |                           | 13 (46,4)                 | 9 (36,0)                   | 12 (25,5)                   | 10 (71,4)                  | 2 (9,1)          |
| D-глюкозамин          |                           | 13 (46,4)                 | 10 (40,0)                  | 15 (31,9)                   | 9 (64,3)                   | 12 (54,5)        |
| N-ацетил-D-глюкозамин |                           | 10 (35,7)                 | 12 (48,0)                  | 11 (23,4)                   | 7 (50,0)                   | 4 (18,2)         |
| N-ацетил-D-маннозамин |                           | 5 (17,9)                  | 9 (36,0)                   | 5 (10,6)                    | 7 (50,0)                   | 5 (22,7)         |

\* указано количество штаммов, агглютинирующих эритроциты

\*\* указан процент штаммов, гемагглютинация которых подавляется данным углеводом

При изучении способности к агглютинации эритроцитов человека и барана клиническими штаммами холерных вибрионов не O1/не O139, нами было отмечено, что

эритроциты I группы крови человека агглютинировали 11 штаммов из 40, при этом 8 из них не обладали геном ctx AB (таблица 2).

Таблица 2

## Спектр лектиновых рецепторов холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных от людей, на эритроцитах I, II, III групп крови человека

| Сахара                | Реакция гемм-агглютинации | Вид эритроцитов     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |                     |
|-----------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                       |                           | I группа крови      |                     |                     | II группа крови     |                     |                     | III группа крови    |                     |
|                       |                           | ctx-tcp- (абс. (%)) | ctx-tcp+ (абс. (%)) | ctx+tcp+ (абс. (%)) | ctx-tcp- (абс. (%)) | ctx-tcp+ (абс. (%)) | ctx+tcp+ (абс. (%)) | ctx-tcp- (абс. (%)) | ctx-tcp+ (абс. (%)) |
|                       |                           | 8 (47)              | 0                   | 3 (15,8)            | 10 (58,8)           | 0                   | 4 (21)              | 8 (47)              | 0                   |
| Глюкоза               |                           | 2 (25)              | -                   | 2 (66,7)            | 1 (10)              | -                   | 3 (75)              | 4 (50)              | -                   |
| Манноза               |                           | 8 (100)             | -                   | 2 (66,7)            | 9 (90)              | -                   | 3 (75)              | 5 (62,5)            | -                   |
| Галактоза             |                           | 8 (100)             | -                   | 0                   | 9 (90)              | -                   | 0                   | 7 (87,5)            | -                   |
| Арабиноза             |                           | 5 (62,5)            | -                   | 0                   | 6 (60)              | -                   | 0                   | 5 (62,5)            | -                   |
| Сахароза              |                           | 5 (62,5)            | -                   | 2 (66,7)            | 4 (40)              | -                   | 4 (100)             | 4 (50)              | -                   |
| Мальтоза              |                           | 3 (37,5)            | -                   | 2 (66,7)            | 2 (20)              | -                   | 3 (75)              | 4 (50)              | -                   |
| D-глюкозамин          |                           | 5 (62,5)            | -                   | 3 (100)             | 3 (30)              | -                   | 3 (75)              | 4 (50)              | -                   |
| N-ацетил-D-глюкозамин |                           | 5 (62,5)            | -                   | 3 (100)             | 4 (40)              | -                   | 4 (100)             | 4 (50)              | -                   |
| N-ацетил-D-маннозамин |                           | 3 (37,5)            | -                   | 2 (66,7)            | 0                   | -                   | 2 (50)              | 4 (50)              | -                   |
| Всего штаммов:        |                           | 17                  | 4                   | 19                  | 17                  | 4                   | 19                  | 17                  | 4                   |

Эритроциты II группы крови человека агглютинировали 14 штаммов из 40 взятых в работу. Из них 10 штаммов были атоксигенные и 4 токсигенных штамма. Сродство к эритроцитам III группы крови проявили только 10

штаммов из 40 штаммов, из которых 8 были атоксигенных и 2 токсигенных, что отличает данную группу вибрионов, выделенных от людей, от штаммов, которые из ООС. Клинические штаммы вибрионов не O1/не O139 не обладали



сродством к эритроцитам барана и IV группы крови человека – в 100% случаев реакция гемагглютинации была отрицательна. Таким образом, атоксигенные варианты вибрионов не O1/не O139, выделенные от людей, проявили большую способность к гемагглютинации, чем токсигенные штаммы. Изучение спектра лектиновых рецепторов проводили методом конкурентного ингибирования реакции гемагглютинации. У наибольшего количества атоксигенных штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 ингибирование в данной реакции вызывали такие сахара, как галактоза и манноза. У токсигенных штаммов отсутствуют рецепторы галактозы и арабинозы.

Способность 100% клинических штаммов холерных вибрионов не O1/не O139 к агглютинации эритроцитов кролика помогла нам выявить наиболее полный спектр в реакции конкурентного ингибирования и подтвердить спектр лектинов, частично выявляемый на эритроцитах четырёх групп крови человека. Интересным является тот факт, что рецепторы галактозы и арабинозы также не участвуют в агглютинации эритроцитов кролика токсигенными клиническими штаммами вибрионов не O1/не O139. К доминирующим рецепторам, встречающимся у 60% штаммов, можно отнести глюкозу, сахарозу и мальтозу (таблица 3).

Таблица 2

Спектр лектиновых рецепторов холерных вибрионов не O1/не O139, выделенных от людей, на эритроцитах кролика

| Кол-во штаммов        | 17                      | 4                       | 19                      | Всего<br>40 штаммов: |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------|
| Генетическая хар-ка   | ctx- tcp-<br>(абс. (%)) | ctx- tcp+<br>(абс. (%)) | ctx+ tcp+<br>(абс. (%)) |                      |
| РГА                   | 16* (94,1)              | 4 (100)                 | 19 (100)                | 39 (97,5)            |
| Сахара                |                         |                         |                         |                      |
| Глюкоза               | 7 (43,75**)             | 4 (100)                 | 13 (68,4)               | 24 (61,5)            |
| Манноза               | 9 (56,25)               | 1 (25)                  | 12 (63,2)               | 22 (56,4)            |
| Галактоза             | 4 (25)                  | 1 (25)                  | 0                       | 5 (12,8)             |
| Арабиноза             | 2 (12,5)                | 1 (25)                  | 0                       | 3 (7,7)              |
| Сахароза              | 12 (75)                 | 4 (100)                 | 15 (80)                 | 31 (79,5)            |
| Мальтоза              | 10 (62,5)               | 4 (100)                 | 13 (68,4)               | 27 (69,2)            |
| D-глюкозамин          | 9 (56,25)               | 4 (100)                 | 7 (36,9)                | 20 (51,3)            |
| N-ацетил-D-глюкозамин | 8 (50)                  | 2 (50)                  | 9 (47,4)                | 19 (48,7)            |
| N-ацетил-D-маннозамин | 6 (37,5)                | 2 (50)                  | 6 (31,6)                | 14 (35,9)            |

\* указано количество штаммов, агглютинирующих эритроциты

\*\* указан процент штаммов, гемагглютинация которых подавляется данным углеводом

## Обсуждение

Ранее, в наших работах, мы определили наиболее полный спектр углеводной специфичности рецепторов адгезии возбудителей холеры O1 и O139 серогрупп [5,6], что позволило сориентироваться в разнообразии углеводной специфичности поверхностных структур клетки-патогена. Интересным было то, что наблюдалась чёткая дифференциация рецепторов адгезии у токсигенных и атоксигенных штаммов эльтор вибрионов, что позволило расширить подходы к их дифференциации. Поэтому изучение спектра углеводной специфичности рецепторов адгезии вибрионов не O1/не O139 представляет интерес, как в плане сравнения детерминант адгезии, которые могут быть характерны для конкретной серогруппы, так и в плане сравнения «профилей» специфичности со штаммами возбудителей холеры. Поэтому мы провели ингибирование изученной нами гемагглютинации углеводами у тех штаммов, которые вообще были способны к гемагглютинации хотя бы какого-либо вида эритроцитов.

Изучение способности к агглютинации различных видов эритроцитов у холерных вибрионов не O1/не O139

серологических групп, выделенных из ООС, показало, что эта группа вибрионов обладает чрезвычайно низкой способностью агглютинировать разные виды эритроцитов. Самая высокая агглютинабельность (47 штаммов из 92-х) проявилась на III группе крови; самая низкая (14 штаммов из 92-х) проявилась по отношению к эритроцитам IV группы крови. Клинические штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 характеризовались ещё более низкой способностью к агглютинации эритроцитов, чем штаммы, выделенные в ходе мониторинга водных объектов окружающей среды. Так, наибольшее сродство (14 штаммов из 40) вибрионы данной группы проявили к эритроцитам II группы крови человека и вообще не агглютинировали в 100% случаев эритроциты барана и IV группы крови человека.

Невысокая способность гемагглютинировать различные виды эритроцитов свидетельствует о низком адгезивном потенциале этой группы штаммов, что коррелирует с изученной нами ранее низкой адгезивной активностью в методе Бриллиса [10]. Однако способность незначительного количества штаммов к агглютинации разных видов эритроцитов помогла нам выявить наиболее полный спектр тех лектиновых рецепторов, которые



способны участвовать в механизмах адгезии у разных серогрупп вибрионов не O1/не O139. Специфичность рецепторов адгезии у вибрионов не O1/не O139, независимо от токсигенности, объекта выделения, принадлежности к серологической группе, широкая и представлена наличием рецепторов ко всем использованным в работе углеводам, т. е. рецепторы вибрионов не O1/не O139 представлены незакономерным широким и размытым спектром слабой специфической активности ко всем изученным углеводам.

Невысокая способность к агглютинации и большое количество рецепторов адгезии у холерных вибрионов не O1/не O139 (углеводы и аминсахара) могут являться одними из факторов, способствующих их сохранению и выживаемости в окружающей среде и организме человека. В связи с тем, что спектр углеводных рецепторов выражен слабо, но довольно разнообразен, можно предположить, что их наличие является своеобразным механизмом адаптации к условиям существования.

### Краткое заключение

Таким образом, штаммы холерных вибрионов не O1/не O139 серологических групп, независимо от объекта выделения, обладают низкой способностью к агглютинации эритроцитов, что свидетельствует о низком адгезивном потенциале и подтверждается количественными показателями при изучении адгезивных свойств по методу Брилиса. Адгезивные свойства холерных вибрионов не O1/не O139 обусловлены лектиновыми рецепторами различной углеводной специфичности и представлены сродством к моносахаридам, дисахаридам и аминсахарам. Экспрессию разных по специфичности лектинов у одного и того же штамма можно выявить на разных видах эритроцитов. У холерных вибрионов не O1/не O139 серологических групп не выявлено различий в специфичности лектиновых рецепторов в зависимости от принадлежности к серогруппе, токсигенности, объекта выделения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Faruque S. M., Nair G. B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*//Microbiol. Immunol. – 2002. – Vol. 46, N2. – P. 59-66
2. Bag P. K., Bhowmik P., Hajra T. K. et al. Putative virulence traits and pathogenicity of *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 isolated from surface waters in Kolkata, India//Appl. Environ. Microbiol. – 2008. – Vol. 74, №18. – P. 5635-5644.
3. Kumar P., Peter W. A., Thomas S. Detection of virulence genes in *Vibrio cholerae* isolated from aquatic environment in Kerala, Southern India//Appl. Biochem. Biotechnol. – 2008. – Vol. 151, №2-3. – P. 256-262.
4. Андрусенко И.Т. Исследование факторов, влияющих на вирулентность холерных вибрионов и разработка новых методов ее определения//Автореферат дисс. на соискание ученой степени докт.биол.наук – Саратов. – 1991. – 35 с.
5. Колякина А. В. Лектиновые рецепторы холерных вибрионов//Автореферат на соискание уч. степени канд. мед. наук. – Ставрополь, 2009. – 18 с.
6. Телесманич Н. Р, Колякина А. В., Ломов Ю. М. и др. Характеристика адгезивной активности холерных вибрионов на эритроцитах млекопитающих для выбора дополнительного ориентировочного теста их эпидемической значимости//Клин. лаб. диагн. – 2008. - №7. – с.45-48.
7. Лахтин В.М. Биотехнология лектинов//Биотехнология. – 1989. - Т. 5, № 6. – С. 616-691
8. Луцик М.Д., Панасюк Е.Н., Луцик А.Д. Лектины. - Львов, 1981. – 156 с.
9. Ломов Ю. М., Телесманич Н. Р, Колякина А. В. Специфичность лектиновых рецепторов холерных вибрионов//ЖМЭИ. – 2007. - №6. – с. 68-72.
10. Акулова М. В., Телесманич Н. Р., Ломов Ю. М. и др. Сравнительная характеристика способности к адгезии холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, выделенных от человека и свежесекретированных из объектов окружающей среды//Здоровье населения и среда обитания. – М, 2010. - №6 – с. 17-19.

ПОСТУПИЛА: 26.02.2013