

# СЕРОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА СОВРЕМЕННОЙ ХОЛЕРЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЛИПОСОМАЛЬНОГО ЭНТЕРОТОКСИЧЕСКОГО ДИАГНОСТИКУМА В РЕАКЦИИ СВЯЗЫВАНИЯ КОМПЛЕМЕНТА

И.В. Савельева<sup>1</sup>, В.Е. Безсмертный<sup>2</sup>, В.Н. Савельев<sup>1</sup>, Ю.М. Федоров<sup>2</sup>,  
С.М. Иванова<sup>2</sup>, В.В. Иванников<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

<sup>2</sup>ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва, Россия

**Резюме.** Показана возможность серологической диагностики холеры путем применения липосомального холерного энтеротоксического диагностикума в реакции связывания комплемента с целью определения анти-энтеротоксических антител в сыворотке крови больных холерой, обусловленной гибридными вариантами биовара эльтор. Так, при легком течении болезни холерные антиэнтеротоксические антитела выявлены в парных сыворотках крови, взятой на 7 и 14 дни болезни, в титрах соответственно 1:50 и 1:200 (4-кратное увеличение титра), при среднетяжелом течении — 1:100 (пятый день болезни) и 1:3200 (двенадцатый день болезни) (32-кратное увеличение титра). У двух больных на 6-й день со среднетяжелым течением болезни антитела выявлены в титрах 1:1600 (у взрослого) и 1:800 (у ребенка 10 месяцев).

**Ключевые слова:** серологическая диагностика, холера, липосомальный диагностикум, РСК.

## Введение

Проблема холеры для России актуальна в связи с расширением угрозы завоза этой инфекции вследствие выноса холеры из Индии в район Карибского бассейна и продолжающейся, таким образом, вот уже более 50 лет седьмой пандемии холеры эльтор. За этот период времени холерный вибрион эльтор, являясь доминантным возбудителем холеры в мире, претерпел серьезные эволюционные изменения, касающиеся, прежде всего, его эпидемического и пандемического потенциала, устойчивости к обычно применяемым для лечения данного заболевания антибиотикам, повышения выживаемости

в объектах окружающей человека среды. Так, если в первые 3 десятилетия шестивия седьмой пандемии холеры эльтор, начавшейся на о. Сулавеси (Индонезия) в 1961 г., заболевания людей были обусловлены типичными токсигенными холерными вибрионами биовара эльтор (*Vibrio cholera* biotype *eltor*, Hly–, геном которого включает гены *rstR<sup>El</sup>*, *ctxA*, *ctxB<sup>El</sup>*, *rstC*), то в настоящее время в этиологии холеры основную роль играют генетически измененные варианты биовара эльтор, содержащие в своем геноме, помимо эльторовских, гены классического холерного вибриона. Основой разнообразия генетических вариантов биовара эльтор является вариабельность профага CTX<sub>phi</sub>, геном которого содержит

### Авторы:

**Савельева И.В.**, к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории питательных сред для культивирования микроорганизмов I–IV групп патогенности, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь;

**Безсмертный В.Е.**, к.м.н., директор ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, г. Ставрополь;

**Савельев В.Н.**, д.м.н., старший научный сотрудник, зав. лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций, ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Ставрополь;

**Федоров Ю.М.**, д.м.н., профессор, заместитель директора ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, г. Ставрополь;

**Иванова С.М.**, заместитель директора ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва;

**Иванников В.В.**, зав. бактериологической лабораторией ФКУЗ Противочумный центр Роспотребнадзора, Москва.

### Адрес для переписки:

Савельева Ирина Вилорьевна  
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13–15,  
ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора.  
Тел.: (8652) 26-48-19; 8 962 000-59-18 (моб.). Факс: (8652) 26-03-12.  
E-mail: snipchi@mail.stv.ru

поступила в редакцию 26.12.2012  
принята к печати 13.05.2013

© Савельева И.В. и соавт., 2013

основные гены патогенности данных вибрионов. Согласно исследованиям Н.И. Смирновой с соавт. [3], А.В. Шашковой, Я.М. Краснова [4], геноварианты биовара эльтор подразделяются на четыре генотипа: *ctxB<sup>Cl</sup>, rstR<sup>El</sup>, trp3; ctxB<sup>Cl</sup>, rstR<sup>El</sup>, trp4; ctxB<sup>Cl</sup>, rstR<sup>El</sup>/rstR<sup>Cl</sup>, trp4; ctxB<sup>Cl</sup>(B7), rstR<sup>El</sup>/rstR<sup>Cl</sup>, trp5*. Вместе с тем, как у типичных, так и у генетически измененных холерных вибрионов биовара эльтор, основным патогенетическим фактором остается энтеротоксин, на который организм человека отвечает выработкой антитоксических (антиэнтеротоксических) антител. При этом следует учесть, что геноварианты продуцируют энтеротоксин классического типа, который кодируется геном *ctxB<sup>Cl</sup>*, и в значительно большем количестве, вследствие чего можно ожидать более сильный иммунологический ответ при возникновении инфекционного процесса в организме человека.

В ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора сконструирована липосомальная диагностическая тест-система на основе липосомального энтеротоксического диагностикума (ЛХЭД), лиофильно высушенного, в 1 мл которого содержится 200 мг ганглиозидсодержащих липосом, связанных с 11,6 КЕ чистого энтеротоксина классического типа. Ингредиенты, входящие в состав тест-системы, обеспечивают постановку реакции связывания комплемента ЛХЭД с сывороткой крови больного (подозрительного на заболевание) холерой для выявления антиэнтеротоксических антител и выдачу ответа через 5–6 ч.

Данная тест-система апробирована в экспериментальных условиях [1], и показано, что ЛХЭД четко выявляет в РСК холерные антиэнтеротоксические антитела в кроличьих антитоксических сыворотках, разведенных от 1:5 до 1:160–1:320; ни в одном случае диагностикум не реагировал с 25 сыворотками здоровых людей. Диагностикум хранится в лиофильно высушенном состоянии в условиях холодильника (4°C).

В свете вышеизложенного целью настоящей работы явилось изучение возможности серологической диагностики холеры путем использования липосомальной диагностической тест-системы для выявления антиэнтеротоксических антител в сыворотке крови больных холерой, обусловленной генетически измененными (гибридными) вариантами биовара эльтор.

## Материалы и методы

В работе использованы сыворотки крови больных холерой, выявленных в авиалайнерах, прибывших в Москву из Индии в 2010 г. (трое больных) и в 2012 г. (один больной). Штаммы холерных вибрионов эльтор, выделенные от двух взрослых (женщины) и ребенка десяти месяцев в 2010 г. и от мужчины в 2012 г. по данным ФКУЗ Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора оказались генетически измененными вариантами биовара эльтор. Сыворотки крови вышеназванных больных холерой

**ТАБЛИЦА. СХЕМА ПОСТАНОВКИ И ОПРЕДЕЛЕНИЕ В СЫВОРОТКАХ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХОЛЕРНЫХ АНТИЭНТЕРОТОКСИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ В РСК С ЛХЭД**

Исследуемые сыворотки	Разведение сывороток и количество в них ингредиентов РСК, мл								КС 0,25	КЛ	КГС
	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400			
ЛХЭД	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25		0,25	
Комплемент*	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
ТЕРМОСТАТ 37°C 60 минут											
Гемолитическая система	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
ТЕРМОСТАТ 37°C 45 минут											
УЧЕТ РЕЗУЛЬТАТОВ											
Разведения сывороток	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	КС	КЛ	КГС
Сыворотка № 1–6д	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+
№ 2–6д	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
№ 3–7д	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
№ 3–14д	–	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+
№ 4–5д	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+
№ 4–12д	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

**Примечания.** \* Комплемент взят в рабочей дозе; № 1–6д — сыворотка № 1, шестой день болезни; КС — контроль сыворотки; КЛ — контроль ЛХЭД; КГС — контроль гемолитической системы; «–» — отсутствие гемолиза; «+» — наличие гемолиза.

обозначены как № 1–6д и № 2–6д (сыворотки крови, взятые в 2010 г. у женщины и ее десятилетнего ребенка со среднетяжелой формой болезни); № 3–7д и № 3–14д (парные сыворотки крови, взятые в 2010 г. у стюардессы соответственно на седьмой и 14 дни болезни с легким течением); № 4–5д и № 4–12д (парные сыворотки крови, взятые в 2012 г. у мужчины соответственно на пятый и двенадцатый дни пребывания в стационаре со среднетяжелым течением болезни).

Все сыворотки исследовали в РСК с ЛХЭД с целью выявления в них холерных антиэнтеротоксических антител [2].

## Результаты и обсуждение

Результаты исследования сывороток крови больных на наличие холерных антиэнтеротоксических антител в РСК с ЛХЭД представлены в таблице, из данных которой следует, что в сыворотках крови, взятых у женщины и ее ребенка на шестой день среднетяжелого течения болезни с помощью ЛХЭД в РСК выявлены холерные

антиэнтеротоксические антитела в титрах соответственно 1:1600 и 1:800, а в парных сыворотках крови, взятых у стюардессы на 7 и 14 дни с легким течением болезни, антиэнтеротоксические антитела выявлены соответственно в титрах 1:50 и 1:200, то есть отмечено 4-кратное нарастание титра. Более выраженное нарастание титра холерных антиэнтеротоксических антител отмечено при исследовании парных сывороток, взятых на 5 и 12 дни пребывания в стационаре мужчины со среднетяжелым течением холеры — соответственно 1:100 и 1:3200, то есть 32-кратное нарастание титра антител, что свидетельствует о мощном иммунологическом ответе организма человека при выраженной холерной инфекции, обусловленной гибридными вариантами биовара эльтор.

Таким образом, разработанная в ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора липосомальная диагностическая тест-система оказалась пригодной для серологической диагностики современной холеры эльтор.

## Список литературы

1. Савельева И.В. Разработка липосомального холерного энтеротоксического диагностикума // Холера и патогенные для человека вибрионы. — Ростов н/Д., 2001. — Вып. № 14. — С. 84–86.
2. Савельева И.В. Новый диагностикум для серологической диагностики холеры // Материалы VIII съезда Всерос. о-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, 26–28 марта 2002 г. — М., 2002. — Т. 3. — С. 322–323.
3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* Эль Тор, завезенных на территорию России в современный период // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2011. — № 4. — С. 11–18.
4. Шашкова А.В., Краснов Я.М. Генотипы измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенных на территории России // Материалы III науч.-практ. школы-конф. молодых ученых и специалистов науч.-исследоват. организаций Роспотребнадзора. — Протвино: ЗАО «А-ПРИНТ», 2011. — С. 145–147.

Infekciã i immunitet (Infection and Immunity)  
2013, vol. 3, no. 3, pp. 285–288

## SHORT COMMUNICATIONS

### SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF MODERN CHOLERA USING LIPOSOMAL ENTEROTOXIC DIAGNOSTICUM IN COMPLEMENT FIXATION TEST

Savelyeva I.V.<sup>a</sup>, Bezsmertnyj V.E.<sup>b</sup>, Savelyev V.N.<sup>a</sup>, Fedorov Yu.M.<sup>b</sup>, Ivanova C.M.<sup>b</sup>, Ivannikov V.V.<sup>b</sup>

<sup>a</sup> The Federal Government Public Health Institution “Stavropol Institute for Plague Control of the Rosпотребнадзор”, Stavropol, Russian Federation

<sup>b</sup> The Federal Government Public Health Institution “Anti-plague Centre of the Rosпотребнадзор”, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The possibility of serological diagnosis of cholera using cholera enterotoxic diagnostics kit in complement fixation test to detect anti-enterotoxic antibodies in sera of patients with cholera caused by hybrid variants of the El Tor biovar has been demonstrated. In patients with mild course of cholera anti-enterotoxic antibodies were detected in titres 1:50 and 1:200 in paired sera obtained on the 7th and 14th days of disease, respectively (fourfold titre increase). In patients with the course of medium severity 32-fold titre increase was recorded from the titre 1:100 in serum obtained on the fifth day of disease till the titre 1:3200 — on the twelfth day of disease. Antibodies titers reached 1:1600 and 1:800 were revealed in two medium course patients (adult and infant of 10 months) on the sixth day of disease.

**Key words:** serological diagnosis, cholera, liposomal diagnosticum, direct complement fixation test.

**Authors:**

**Savelyeva I.V.**, PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of media for cultivation of microorganisms of I–IV groups of pathogenicity, Stavropol Institute for Plague Control; 355035, Russian Federation, Stavropol, Sovetskaya Street, 13–15.

Phone: +7 (8652) 26-48-19 (office); +7 962 000-59-18 (mobile). Fax: +7 (8652) 26-03-12. E-mail: snipchi@mail.stv.ru;

**Bezsmertnyj V.E.**, PhD (Medicine), Director, Anti-plague Centre, Moscow;

**Savelyev V.N.**, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Chief, Laboratory for Diagnosis of Cholera and Other Intestinal Infections, Stavropol Institute for Plague Control;

**Fedorov Yu.M.**, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director, Anti-plague Centre, Moscow;

**Ivanova C.M.**, Deputy Director, Anti-plague Centre, Moscow;

**Ivannikov V.V.**, Chief, Bacteriological Laboratory, Anti-plague Centre, Moscow.

**References**

1. Savel'eva I.V. Razrabotka liposomal'nogo kholernogo enterotoksicheskogo diagnostikuma [The development of liposomal cholera enterotoxin diagnostics]. *Holera i patogennye dlya cheloveka vibriony* [Cholera and Pathogenic Vibrio for Human]. *Rostov on Don, 2001, no. 14, pp. 84–86.*
2. Savel'eva I.V. Novyy diagnostikum dlya serologicheskoy diagnostiki kholery [The new reagent for serological diagnostics of cholera]. *Materialy VIII s"ezda Vseros. o-va epidemiologov, mikrobiologov i parazitologov, 26–28 marta 2002* [Proc. VIII meeting of Russian Society of epidemiol. microbiol. parazitolog.]. *Moscow, 2002, vol. 3, pp. 322–323.*
3. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. Variabel'nost' genoma izmenennykh variantov Vibrio cholerae El' Tor, zavezennykh na territoriyu Rossii v sovremennyy period [Variability of genome of changed variants of Vibrio cholerae El Tor imported to the territory of Russia in modern period]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya — Molecular Genetics, Microbiology and Virology, 2011, no. 4, pp. 11–18.*
4. Shashkova A.V., Krasnov Ya.M. Genotipy izmenennykh variantov Vibrio cholerae biovara El' Tor, vydelennykh na territorii Rossii [Genotypes of changed variants of Vibrio cholerae El Tor isolated in the territory of Russia]. *Materialy III nauch.-prakt. shkoly-konf. molodykh uchenykh i spetsialistov nauch.-issledovat. organizatsiy Rospotrebnadzora* [Proc. III scientific practical school and conference of young researches and specialists of research institutions of Rospotrebnadzor]. *Protvino: A-PRINT, 2011, pp. 145–147.*

Received 26.12.2012

Accepted 13.05.2013