

*Hanna Stypulkowska-Misiurewicz, Jan Stasiak, Malgorzata Janczyk,  
Ewa Tomaszewska, Katarzyna Pancer*

**PRZECINKOWCE CHOLERY (*VIBRIO CHOLERAE* NON-01)  
IZOLOWANE W POLSCE Z WODY RZEKI BUG**

Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny w Warszawie  
Kierownik: prof. dr hab. *S. Kaluzewski*  
Wojewódzka Stacja Sanitarno-Epidemiologiczna w Zamościu  
Dyrektor: mgr *J. Stasiak*

*W okresie jesienno-zimowym 1994/95 po raz pierwszy w Polsce wykryto *V. cholerae* w wodzie rzecznej. Były to szczepy nie należące do pandemicznego serotypu 01. Stwierdzano je w wielu próbach wody pobieranych z Bugu w kilku miejscowościach woj. zamojskiego. Szczepy określono jako potencjalnie patogenne dla człowieka, WSSE w Zamościu nie obserwowala w tym czasie wśród ludzi wzrostu liczby zachorowań z objawami charakterystycznymi dla cholery.*

Publikacje o występowaniu przecinkowca cholery – *Vibrio cholerae* – jako składnika flory właściwej dla zarośniętych wód przybrzeżnych (4, 7) wywołały na całym świecie zainteresowanie rozprzestrzenieniem tego mikroorganizmu w naturalnym środowisku wodnym. W październiku 1994 r. po raz pierwszy w Polsce stwierdzono wystąpienie przecinkowca cholery w wodzie śródlądowej rzeki nizinnej, a mianowicie w Bugu. Do podjęcia badań w tym kierunku przyczyniły się informacje o wystąpieniu zachorowań na cholere w Rosji i na Ukrainie, i dyskusje dotyczące bezpieczeństwa korzystania z wody rzeki Bug. Przepływa ona przez znaczną część Ukrainy zbierając ścieki z kilku miast i wpływa na teren pograniczny w woj. zamojskim.

Wyizolowanie z wody przecinkowca cholery nie należącego do pandemicznego typu 01 wobec informacji Światowej Organizacji Zdrowia o wystąpieniu w Azji zachorowań epidemicznych wywołanych przez *V. cholerae* non-01, a oznaczonego później jako typ 0139 lub Bengal (1, 5, 12) zachęciły nas do zebrania dokładniejszych danych o występowaniu przecinkowca cholery w wodach rzecznych województwa zamojskiego, jego zróżnicowaniu antygenowym i ewentualnej chorobotwórczości.

W aktualnej publikacji przedstawiamy wyniki bakteriologicznego badania wody Bugu w kierunku *V. cholerae* w okresie jesienno-zimowym na przełomie lat 1994/95 i dane o właściwościach wyizolowanych z wody szczepów.



Ryc. 1. Szkic sytuacyjny miejsc pobrania wody z Bugu z której wyhodowano *Vibrio cholerae*.

## MATERIAŁ I METODY

Próbki wody pochodziły z nurtu rzeki Bug, jego dopływów z terenu woj. zamojskiego oraz jednego stawu na terenie przygranicznym.

Szczep standardowy *V. cholerae* El Tor 01 użyty do badań porównawczych otrzymano z Biura Regionalnego ŚOZ w Kopenhadze.

Podłoża i testy bakteriologiczne do badań wstępnych przygotowano w WSSE w Zamościu, do badań referencyjnych w Pracowni Pożywek Zakładu Bakteriologii PZH.

Surowice diagnostyczne do aglutynacji szkieletowej *V. cholerae* 01 użyte w WSSE pochodziły z Instytutu Medycyny Morskiej i Tropikalnej w Gdyni, w PZH z Wytwórni Surowic i Szczepionek w Krakowie.

Surowicę diagnostyczną dla *V. cholerae* serotyp 0 139 uzyskano z Instytutu Roberta Kocha w Berlinie.

Surowice diagnostyczne dla antygeny 0 wybranych szczepów izolowanych z Bugu uzyskano w sposób typowy szczepiąc króliki zawiesinami tych szczepów.

Pobieranie próbek wody wykonywano zgodnie z metodyką obowiązującą Dział Higieny Komunalnej WSSE przy badaniach rutynowych. Terminy i miejsca poboru wody podano w tabeli I, ich usytuowanie na ryc. 1.

Bakteriologiczne badanie próbek wody wykonano zgodnie z obowiązującą stacją sanitarno-epidemiologiczną metodą dla badań w kierunku przecinkowca cholery (10, 13). Zastosowano metodę podwójnego wzbogacania próbki. Posiewano 900 ml wody do 100 ml dziesięciokrotnie stężonej alkalicznej wody peptonowej (AWP). Po 6 godz. inkubacji w temperaturze 37°C material z powierzchni hodowli pobierano esz do 10 ml normalnej AWP, namnażając go przez 24 godz. w cieplarni i przesiewając na silnie wybiórcze podłoże stałe TCBS i agar alkaliczny (AA).

Izolację kolonii bakteryjnych, ich biochemiczną i serologiczną identyfikację wstępną wykonała bakteriologiczna pracownia Działu Epidemiologii WSSE zgodnie z metodą bakteriologicznego badania w kierunku cholery opracowaną przez PZH (10).

W Krajowym Ośrodku Shigella będącym pracownią referencyjną dla Przecinkowca Cholery, na podstawie poszerzonych badań laboratoryjnych potwierdzono rozpoznanie postawione przez WSSE.

### WYNIKI BADAŃ I DYSKUSJA

Badanie wody pobranej z rzeki Bug na obecność przecinkowca cholery prowadzono w okresie od września 1994 r. do stycznia 1995 r. We wrześniu nie wykryto *V. cholerae* w żadnej z 11 próbek wody. Obecność przecinkowca cholery stwierdzono dopiero w październiku w 3 próbkach na 6 zbadanych. W listopadzie i grudniu prawie wszystkie próbki wody (15 na 17 pobranych) zawierały *V. cholerae*. Ogółem przecinkowca cholery wykryto w 19 próbkach wody na 39 pobranych (tab. I).

Stwierdzono, że przecinkowiec utrzymywał się w rzece nawet w styczniu pomimo niskiej temperatury wody (1°C) pobieranej z przerebli. Przeczy to dotychczasowym obserwacjom podawanym w piśmiennictwie, że przecinkowiec cholery zanika przy temperaturze wody poniżej 10°C (8). W listopadzie i grudniu temperatura wody wynosiła ok. 5°C. W styczniu wykrywalność zmniejszyła się znacznie, *V. cholerae* wykryto już tylko w jednej próbce wody na 5 zbadanych.

Rozprzestrzenienie *V. cholerae* w Bugu nie było równomierne. Pierwsze szczepy przecinkowca cholery wykryto w wodzie pobranej w Strzyżowie, w środkowym biegu rzeki poprzez województwo, a nie jak zakładano z wody przyptywającej z terenu Ukrainy w pobliżu miejscowości Gołębie i Kryłów. W okolicach Strzyżowa przecinkowiec utrzymał się aż do stycznia. Również najczęściej przecinkowiec był wykrywany w próbkach wody pobranej w Strzyżowie. Obecny był w 8 próbkach na 15 zbadanych podczas gdy w próbkach wody z Gołębia, podobnie jak z Kryłowa tylko w 2 na 8 zbadanych.

W listopadzie i w grudniu *V. cholerae* wystąpił na całym obszarze Bugu na terenie województwa od miejscowości Gołębie na południu po Matcze na północy.

Trudno jest określić jakie warunki ekologiczne spowodowały ujawnienie się przecinkowców w Bugu – ingerencja człowieka (prace rolne, ścieki miejskie np. z Nowowolińska, rozpoczęcie kampanii cukrowniczej) czy naturalne warunki – niezwykle ciepłe lato, a nawet jesień, rozrost planktonu, a następnie stopniowe ochłodzenie wód i stopniowe wymieranie planktonu.

Nie stwierdzono występowania *V. cholerae* w próbkach pobranych z innych wód: ze stawu przy przejściu granicznym w Hrebennem, ani z żadnej z rzek wpadających

Tabela I. Wykaz prób z rzeki Bug badanych w kierunku *Vibrio cholerae*

Data pobrania próby	Temperatura wody	Miejscowość	Liczba prób	Liczba prób z obecnością <i>V. cholerae</i> non 01
27.09.94	ok. 10 – 12°C	Gołębie	3	0
		Kryłów	3	0
29.09.94	ok. 10 – 12°C	Gołębie	3	0
		Kryłów	2	0
13.10.94	ok. 10°C	Strzyżów	4	3
19.10.94	ok. 8°C	Strzyżów	2	0
09.11.94	ok. 5°C	Gołębie	1	1
		Kryłów	1	1
		Husynne	1	1
		Strzyżów	3	2
		Zosin	1	1
		Horodło	1	1
		Matcze	1	1
06.12.94	ok. 5°C	Gołębie	1	1
		Kryłów	1	1
		Husynne	1	0
		Strzyżów	2	2
		Zosin	1	1
		Horodło	1	1
		Matcze	1	1
16.01.95	woda z przerębli 1°C	Kryłów	1	0
		Strzyżów	4	1

Ponadto:

- w dniu 27.09.1994 r. pobrano próby z wody ze stawu przy przejściu granicznym w Hrebennem, a w dniu 18.11.1994 r. z innych rzek województwa – dopływu Huczwy w Teptiukowie k/Hrubieszowa, Huczwy w Hrubieszowie i Werbkowicach, Łabuńki w Zamościu – w w/w próbach nie wyizolowano *V. cholerae*,
- w dniu 03.01.1995 r. wykonano posiewy materiału pobranego z 4 ryb złowionych w Bugu. Badano wymazy ze skóry oraz wycinki skrzelu, układu pokarmowego, ikry, mięśni. *V. cholerae* nie stwierdzono, mięśnie i ikra były jałowe.

do Bugu na obszarze województwa zamojskiego, a mianowicie rzeki – dopływu Huczwy w Teptiukowie, rzeki Huczwy w Hrubieszowie i Werbkowicach oraz Łabuńki w Zamościu.

W okresie zmniejszania się liczby przecinkowców w wodzie rzecznej w styczniu 1995 zbadano bakteriologicznie próbki pobrane z 4 ryb złowionych w Bugu. Zbadano wymazy ze skóry, skrzelu, układ pokarmowy, ikrę i mięśnie nie stwierdzając w nich *V. cholerae*.

W tabeli II wymieniono wszystkie cechy zalecane do identyfikacji *V. cholerae* przez Komitet Taksonomii Przecinkowców Międzynarodowego Zrzeszenia Towarzystw Mikrobiologicznych. Są one szczególnie przydatne dla rozpoznawania szczepu zawleczonego na obszar nieendemiczny dla cholery lub kiedy *V. cholerae* izolowany jest z nietypowego środowiska.

Tabela II. Właściwości szczepów *Vibrio cholerae* non-01 wyizolowanych z wody Bugu

Test lub Substrat	<i>V. cholerae</i> El Tor	Badane szczepy (n=22)		Test lub substrat	<i>V. cholerae</i> El Tor	Badane szczepy (n=22)	
		znak	% +			znak	% +
Glukoza	+	+	100	Wzrost na TCBS kolor kolonii	żółte	żółte	100
Gaz	-	-	0	Wzrost w żółci pełnej	+	+	100
H <sub>2</sub> S	-	-	0	Wzrost bez podwyższonego stęż. NaCl	+	+	100
Mocznik	-	-	100	Wzrost wobec 1% NaCl	+	+	100
Indol	+	+	100	Wzrost wobec 6% NaCl	+	-	0
Laktoza 10%	-	-	0	Wrażliwość na: 0/129 10 µg	+	+	100
Oksydaza	+	+	100	150 µg	+	+	100
KCN	-	-	0	na: polimyksynę B	-	-	0
Lizyna	+	+	100	Aglutynacja z surowicą 01	+	-	0
Arginina	-	-	0	z surowicą 0139	-	-	0
Ornityna	+	+	100	Hemoliza krwinek baranich	+	+	100
Ruch	+	+	100				
Arabinoza	-	-	0				
Sacharoza	+	+	100				
Inozytol	-	-	0				
Dulcytol	-	-	0				
Mannitol	+	+	100				
Cytryniany wg. Simonsa +	+	+	100				
redukcja azotanów	+	+	100				
Voges-Proscauer	+	+	100				
Żelatynaza	+	+	100				
Proteaza	+	+	100				

Oznaczenia: + reakcja dodatnia w ciągu 1 doby

- reakcja ujemna

W diagnostycznych badaniach ukierunkowanych eksperci ŚOZ zalecają wykonywanie tylko niewielkiej liczby testów, które ograniczają się do testu na obecność oksydazy indofenolowej, testów t.zw. szeregu izolacyjnego identycznego jak przy badaniach w kierunku *Salmonella* - *Shigella*, zdolności rozkładania wymienionych w tabeli trzech aminokwasów, fermentacji mannitolu i inozytu oraz wykonania aglutynacyjnego testu serologicznego dla określenia przynależności do typu 01. Charakterystyczny wzrost na stosowanych podłożach stałych AA i TCBS oraz w postaci błonki na powierzchni podłoży płynnych stanowi dobrą cechę orientacyjną przy identyfikacji *Vibrio*.

O przynależności *Vibrio cholerae* do biotypu El Tor decyduje odporność na polimyksynę lub kolistynę, zdolność do hemolizy krwinek baranich i dodatnia reakcja Voges-Proskauera (VP).

Określenie wrażliwości na vibriostatyczny czynnik 0/129 jest szczególnie zalecane do różnicowania szczepów *Vibrio* i *Aeromonas* obficie występujących w naturalnej florze bakteryjnej wód (3).

Porównanie właściwości 22 szczepów izolowanych przez WSSE w Zamościu i standardowego szczepu *Vibrio cholerae* El Tor 01 Ogawa wykazało, że posiadając identyczne właściwości biochemiczne różniły się budową antygenową, a mianowicie nie aglutynowały w surowicy dla epidemiczno-pandemicznego typu 01. Stwierdzono również, że nie należą do serotypu 0139 Bengal. Izolowane z Bugu szczepy wykazują zróżnicowanie antygenowe różniąc się zdolnością do aglutynacji w diagnostycznych surowicach króliczych przygotowanych z użyciem wybranych szczepów wodnych *V. cholerae*. Izolowane przez WSSE szczepy należą do gatunku *V. cholerae* non-01 powodującego endemiczne zachorowania w krajach europejskich i w USA (1, 2, 6, 11, 12), określane jako choleropodobne w odróżnieniu od zawlekaney do tych krajów cholery azjatyckiej wywoływanej przez *V. cholerae* 01.

Zdolność namnażania się w 37°C, oraz znaczna odporność na sole żółciowe świadczy o zdolności wyizolowanych z wody Bugu szczepów do przełamywania naturalnej, nieswoistej odporności układu pokarmowego człowieka. Zdolność do wzrostu na podłożu TCBS przez wielu autorów przyjmowana jest jako kryterium różnicujące przecinkowce chorobotwórcze *V. cholerae* i *V. parahaemoliticus* od niechorobotwórczych przecinkowców wodnych *V. fluvialis* i in. oraz szczepów *Aeromonas*, *Pseudomonas* i in. (3).

Zdolność do wytwarzania enterotoksyn przez *V. cholerae* ciągle jeszcze znajduje się w trakcie badań naukowych wysoko wyspecjalizowanych pracowni wymagając kosztownych badań na zwierzętach (pętla jelitowa królika) lub wybranych hodowli tkankowych (tkanka jajnika chomika chińskiego CHO), lub poszukiwania genetycznych markerów zjadliwości o nieustalonym jeszcze znaczeniu (9).

Badania dotyczące chorobotwórczych właściwości szczepów wyizolowanych z wody Bugu i ich antygenowego zróżnicowania będą kontynuowane w Krajowej Pracowni Referencyjnej.

Udowodnienie, że występujący w Bugu *V. cholerae* wywołuje zachorowania ludzi może być jedynie dziełem przypadku i dobrze zaplanowanych badań prospektywnych. W okresie zimowym kontakt człowieka z wodą rzeczną jest znikomy, a usytuowanie rzeki na granicy państwa skutecznie ogranicza korzystanie z niej również w okresie letnim. Do zakażenia człowieka mogłoby teoretyczne dojść przy użyciu wody dla potrzeb gospodarczych lub przemysłowych i przeniesieniu przez nią czynnika zakaźnego do gotowych produktów żywnościowych. Informacje dotyczące zachorowań z objawami biegunki na terenie woj. zamojskiego w okresie jesienno-zimowym zbierane przez pracowników Działu Epidemiologii WSSE nie wykazały wzrostu liczby zachorowań z charakterystycznymi dla cholery objawami.

Przedstawione badania nasuwają następujące wnioski:

1. W wodzie rzeki Bug stwierdzono występowanie przecinkowca zaliczanego do gatunku *V. cholerae* biotypu El Tor antygenowo odmiennego od aktualnie pandemicznego typu 01.

2. Stwierdzono w praktyce, że metodyka badania wody opracowana w PZH zdała egzamin praktyczny t.j. zastosowanie tej metody umożliwi wykrycie *V. cholerae* w wodzie rzecznej.

3. W dochodzeniach epidemiologicznych należałoby brać pod uwagę *V. cholerae* non-01 jako ewentualny czynnik etiologiczny zachorowań z objawami biegunki, jeżeli wywiad wskazywałby na korzystanie z wody rzecznej w celach gospodarczych lub rekreacyjnych.

*H. Stypulkowska-Misiurewicz, J. Stasiak, E. Tomaszewska, K. Pancer*

#### VIBRIO CHOLERAЕ NON-01 ISOLATED IN POLAND FROM THE BUG RIVER

##### SUMMARY

Non-01 cholera vibrios for the first time has been isolated from freshwater in Poland. In October 1994 during bacteriological examination of Bug water by a two-step enrichment method in alkaline peptone water at pH 8.6 and TCBS. Repeated examination in November, December and January in the same and other locations among the polish-ukrainian borderline revealed persistence of *V. cholerae* in the river; 22 strains were isolated. All 22 strains were identical to *V. cholerae* El Tor 01 Ogawa reference strain except to antigens 0. The strains isolated from water were no agglutinable by standard 01 serum neither by 0139 serum. Determination of their antigens 0 is under investigations. They might be pathogenic for people as it could be judged by their high resistance to bile, proteolytic and haemolytic activity. No cholera-like cases were notified on the polish side of the river.

##### PIŚMIENICTWO

1. *Albert M.J.*: J. Clin. Microbiol., 1994, 34, 2345. – 2. *Aldowa E., Laznickova K., Stepankova E.* i in.: J. Infect. Dis., 1968, 118, 25. – 3. *Baumann P., Schubert R.H.W.*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, red. *Krieg N.R., Holt J.G.*, Williams and Wilkins, Baltimore, London, 1984, vol. 1, 516. – 4. *Colwell R.*: Culture, 1991, 12. – 5. *Crowcroft N.S.*: CDR Review, 1994, 4, 13. – 6. *Morris J.G., Wilson R., Davis B.R.* i in.: Ann. Intern. Med., 1981, 94, 656. – 7. *Nair G.B., Misra S., Bhandra R.K., Pal S.C.*: Appl. Environm. Microbiol., 1987, 53, 1203. – 8. *Pollitzer B.*: Le Cholera, OMS Genewa, 1960. – 9. *Ramamurthy T., Bag P.K., Pal A., Bhattacharya S.K., Bhattacharya M.K., Shimada T., Takeda T., Karasawa T. Kurazono H., Takeda Y., Nair G.B.*: J. Med. Microbiol., 1993, 39, 310. – 10. *Stypulkowska-Misiurewicz H.*: Laboratoryjna diagnostyka cholery. PZH, Warszawa, 1991.
11. WHO, Wkly Epidemiol. Rec., Genewa, 1993, 68, 141. – 12. WHO, Wkly Epidemiol. Rec., Genewa 1993, 68, 141. – 13. WHO Manual for Laboratory Investigations of Acute Enteric Infections, CDD/833.

Adres: Zakład Bakteriologii Państwowego Zakładu Higieny,  
00-791 Warszawa, ul. Chocimska 24