

of the study. Of course, still requires further additional studies to determine the spectral properties of major crops and determine when it becomes noticeable stress from lack of nutrients, pests, pathogens and more.

It remains an open question how the technology will work if the analysis of entire plants that grow in greenhouses and under in vitro. In the case of positive results, we get an effective, convenient and inexpensive technology that can quickly assess the physiological status of plants under different growth conditions.

Key words: vegetation index, the NDVI, light reflection, leaves the reflection spectra, fluorescence of chlorophyll, chlorophyll fluorescence induction

Рекомендує до друку

Надійшла 26.05.2016

В. В. Грубінко

УДК 579.843+577.21.004

О. В. ПЕТРЕНКО, В. В. АЛЕКСЕЄНКО

ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб імені Л. В. Громашевського НАМН України»
вул. М. Амосова, 5, Київ, 03680

УДОСКОНАЛЕННЯ ЛАБОРАТОРНОЇ ДІАГНОСТИКИ V. CHOLERAЕ O1/NON O1 НА ОСНОВІ МОЛЕКУЛЯРНО- ГЕНЕТИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Швидка етіологічна діагностика гострих кишкових інфекцій (ГКІ) залишається серйозною проблемою в системі охорони здоров'я. Для підвищення ефективності лабораторної діагностики вібриозів людини та визначення етіологічного агента проведені молекулярно-генетичні дослідження методом полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР). Використання видоспецифічних праймерів під гени холерних вібріонів, які розкривають їх патогенний потенціал та видову приналежність, дало можливість за короткий термін часу розшифрувати їх біологічні властивості. Порівняння генома штамів *V. cholerae* O1/nonO1 за основними генами патогенності показало їх спорідненість та визначило відмінність у видовій складовій вібріонів. Застосування ПЛР методу у лабораторній практиці забезпечує швидку та надійну ідентифікацію холерного вібріона і насамперед у визначенні його вірулентності.

Ключові слова: V. cholerae O1/nonO1, гени патогенності, вірулентність, ПЛР-діагностика

Холерні вібріони розповсюджені в природі і є природними мешканцями водоймищ в різних географічних зонах, особливо з жарким та помірним кліматом. Вібріони можуть викликати у людей різні хвороби починаючи від ранових інфекцій, циститів, гострих кишкових інфекцій (ГКІ) і закінчуючи особливо небезпечною інфекцією – холерою. Найбільший інтерес прикутий до збудників діареєгенних вібриозів, якими є *Vibrio cholerae* O1, *V. cholerae* O139, *V. cholerae* non O1, які здатні викликати холеру та ГКІ з різними проявами клінічної картини [11, 12]. Основні біологічні властивості холерні вібріони проявляють більш стало, але зі змінами екологічних умов постійно зростає частота виділення атипових холерних вібріонів та все частіше реєструються діареї у людей з «тертою» клінічною картиною, що в свою чергу ускладнює визначення збудника інфекції [1].

Клінічний поліморфізм ГКІ обумовлює першочергове значення лабораторних методів діагностики у визначенні етіологічного агента. Найбільш поширений метод діагностики є бактеріологічний, проте його довгостроковість та ресурсоемність створюють передумови для впровадження нових та інформативних методів досліджень. На сучасному рівні перспективними виступають молекулярно-генетичні методи, серед яких більш швидким,

дешевим та надійним методом є полімеразно-ланцюгова реакція (ПЛР) з використанням високоспецифічних праймерів.

У південних регіонах України періодично виявляють від людей *V. cholerae O1* серогрупи та щорічно виділяють від хворих з діареями *V. cholerae non O1* [2].

У зв'язку з цим **метою** даної роботи було вивчення молекулярно-генетичних властивостей штамів *V. cholerae O1/non O1*, виділених від людей в Україні з послідуочим удосконаленням лабораторної діагностики на основі молекулярно-генетичних досліджень.

Матеріал і методи досліджень

У роботі використано 35 штамів *V. cholerae O1* та 100 штамів *V. cholerae non O1*, виділених від людей в різні роки в Україні. Вивчення біологічних властивостей холерних вібріонів проводили відповідно Інструкції МОЗ України №167 1997 року «Інструкція по організації та проведенню протихолерних заходів, клініці та лабораторній діагностиці холери» [5]. Виявлення генів патогенності проводили з використанням олігонуклетидних праймерів, наведених у таблиці. Праймери синтезували на фірмі «Синтол» (Росія). Виділення ДНК холерних вібріонів проводилося за допомогою системи «ДНК-сорб-АМ» (Росія). Ампліфікація проходила на апараті «Perkin Elmer-2400» (США). Температурний віджиг для праймерів під гени - *toxR*, *tcpAE*, *zot*, *ace*, *hapA*, *ctxA* - становив 57°C, а для праймерів під гени - *rstR*, *rtxC*, *mshA*, *rstC* - 55°C.

Таблиця

Праймери для виявлення генів холерного вібріона

№ з/п	Гени	Нуклеотидна послідовність праймерів 5'-3'	Розмір амплікону (п.н.)	Посилання
1	<i>ctxA</i>	cgggcagattctagacctcctg cggatgatcttggagcattccac	564	[6]
2	<i>ace</i>	taaggatgtgcttatgatggacacc cgtgatgaataaagatactcatagg	289	[6]
3	<i>zot</i>	tcgcttaacgatggcgctgtt aaccctgttcacttctacca	947	[6]
4	<i>rstR</i>	gcaccatgatttaagatgctc tcgagttgtaattcatcaagagtg	501	[7]
5	<i>rstC</i>	aacagctacgggcttattc tgagttgctggatttaggc	238	[8]
6	<i>rtxC</i>	cgacgaagatcattgacgac catcgtcgttatgtggtgc	263	[7]
7	<i>tcpAE</i>	gaagaagttgtaaaagaagaacac gaaaggaccttcttccagttg	471	[9]
8	<i>hapA</i>	tcaactacaacaccgcagac gaccgacaatcccaagaagag	270	[10]
9	<i>toxR</i>	atgactttgttggcgagag gattggcttgggttagtgag	397	[10]
10	<i>mshA</i>	acgctagtgggattgggatg gcataaagttgtacagtccc	398	[11]

Облік результатів ампліфікації проводили електрофоретичним методом у 2% агарозному гелі. Візуально під УФ-опромінуванням на транслюмінаторі фіксували наявність або відсутність полоси продукції ампліфікації. Гени *wbeT*, *wbfR* та *Hly* виявляли за допомогою тест-систем фірми «Амплиценс *Vibrio cholerae*-FL» (Росія) у режимі реального часу на ампліфікаторі «Rotor Gene RG-3000» (Австралія). Проведена статистична обробка результатів досліджень [6].

Результати досліджень та їх обговорення

На теперішній час для більшості видів холерних вібріонів секвенований геном, що розкриває генетичну структуру генома та розширює можливості у вивченні біологічних властивостей вібріонів. Знання структури генома дало можливість запровадити в лабораторну практику ПЛР

метод, що дає перевагу у вивченні генетичних детермінант мікроорганізмів, включно холерних вібріонів. Для ідентифікації видового складу холерних вібріонів методом ПЛР використовують специфічні праймери, які виявляють консервативні ділянки діагностично значущих генів та генів вірулентності.

Нами для роботи були використані праймери під гени холерного вібріона, які розкривають вірулентні властивості та видоспецифічність холерного вібріона, а також приймають участь в забезпеченні життєдіяльності і персистенції вібріона. Ключовим фактором вірулентності *V. cholerae* є холерний екзотоксин, який викликає тяжку діарею – основний клінічний симптом при холері. Біосинтез холерного токсина кодується геном *ctxA*, який входить до нитчатого фагу СТХ.

Для виявлення у геномі вивчаємих штамів фага СТХφ, проводили дослідження на наявність генів – *ctxA*, *zot*, *ace* або їх ще називають гени «касети вірулентності», які відповідають за біосинтез різних токсинів. Ген *ctxA*, кодує холерний токсин СТ; ген *ace*, кодує синтез АСЕ токсин; ген *zot*, кодує токсин зонального поглинання ZOT. Наявність профага RS2, який входить до складу нитчатого фага СТХ, виявляли за допомогою гена *rstR*. Профаг RS1, який фланкує з двох сторін фаг СТХ, виявляли за геном *rstC*. Генетичним маркером, який вказував на наявність у геномі вібріонів острова VPI, слугував структурний ген *tcpAE*, який відповідає за токсин корегулюючи пілі адгезії, що виступають основним фактором колонізації кишечника. Належність вібріона до O1 серогрупи виявляли за геном *wbeT*, а до O139 серогрупи - за геном *wbfR*. Тестування на ген *mshA* дозволило отримати відомості про наявність «острова персистенції» EPI, який відповідає не тільки за гемаглютинуючи пілі адгезії IV типу, а й за секрецію білків, необхідних для утворення біоплівки. Ген *hapA*, який кодує продукцію розчинної гемаглютинин/протеази, вказує на здатність вібріонів відкріплюватись від епітелію тонкого кишечника. Ген *toxR*, виступає координатором регуляторної системи, яка контролює експресію ключових генів вірулентності та життєзабезпечення. Видовий ген *Hly*, вказує на наявність в геномі гемолітичного локуса, який контролює синтез термолабільного гемолізину. Ген *rtxC*, який входить до *rtx*-кластеру, що кодує біосинтез RTX-токсина та проявляє цитотоксичну активність. Таким чином, відомості про наявність або відсутність у геномі вивчаємих штамів *V. cholerae* 13 генів з різними функціями та походженням, можуть надати інформацію про особливості структури їх генома та розширити відомості про їх біологічні властивості, а також удосконалити лабораторну діагностику.

Проведені нами ПЛР дослідження 35 штамів *V. cholerae* O1 показали, що 3 (8,6%) штами *V. cholerae* O1, один виділений у 1992 році, а 2 штами у 1993 році, несли у своєму геномі 12 основних генів патогенності, а саме: *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *tcpAE*, *rtxC*, *toxR*, *mshA*, *wbeT*, *hapA*, *Hly* (рис. 1).

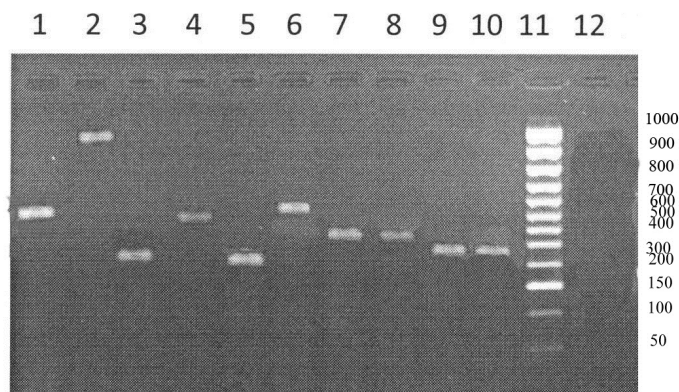


Рис. 1. Наявність генів патогенності в геномі штама №346 *V. cholerae* O1, виділеного у 1992 р.: 1 – *rstR*(501), 2 – *zot*(947), 3 – *rtxC*(263), 4 – *tcpA*(471), 5 – *rstC*(238), 6 – *ctxA*(564), 7 – *toxR*(397), 8 – *mshA*(398), 9 – *ace*(289), 10 – *hapA*(270), 11 – маркер молекулярних мас (50-1000 пар нуклеотидів), 12 – К – негативний контроль.

У геномі даних штамів не було виявлено лише гена *wbfR*, який визначає генетичний локус O139 серогрупи, що було підтверджено серологічними дослідженнями. Виявлення у геномі штамів *V. cholerae* O1 основних генів вірулентності - гена *ctxA* та гена *tcpAE*, вказує на їх здатність викликати холеру.

Слід відмітити, що поява хворих, від яких виділяють холерні вібріони, які мають основні гени патогенності, при відсутності в даний період спалаху холери в Україні, вказує на завезені випадки холери. В даній ситуації були вчасно виявлені хворі і швидко проведена ідентифікація збудника інфекції, що дало можливість провести протиепідемічні заходи з локалізації джерела інфекції. Отже, виявлення холерних вібріонів чи від людей, чи з навколишнього середовища, потребує проведення якомога швидшої ідентифікації, щоб визначити їх вірулентні властивості, які відповідно і вплинуть на проведення протиепідемічних заходів.

Подальші генетичні дослідження 32 штамів *V. cholerae* O1, які були виділені з 1996 по 2012 рік (період без спалахів холери) показали, що вони не мали у своєму геномі основних генів патогенності – *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *wbfR*. Проте в усіх досліджуваних штамів були виявлені гени, які відносяться до так званих життєзабезпечуючих та видоспецифічних генів, а саме гени – *hapA*, *toxR*, *Hly*, *rtxC*, які складають 100% спадковості.

У 5 штамів *V. cholerae* O1, виділених у 1999 році, виявлено ген *tcpAE*, який відповідає за токсин корегулюючи пілі адгезії, тобто дані вібріони здатні колонізувати кишечник людини. Штами *V. cholerae* O1 з набором генів - *ctxA*⁻ *tcpAE*⁺ є потенційно епідемічно небезпечними, тому що наявність на бактеріальній поверхні токсин корегулюючих пілей, які є рецептором для фага СТХф, можуть зумовити їх перетворення в вірулентні в результаті фагової конверсії. Більш того, холерні вібріони *ctxA*⁻ *tcpAE*⁺ можуть бути цінним матеріалом для наступних еволюційних перетворень збудника холери, на основі яких ймовірно виникнення штамів з новими властивостями. Такі холерні вібріони потребують постійного епіднадзора за зміною їх біологічних властивостей.

Водночас, в досліджуваних штамів *V. cholerae* O1 виявлена нестабільність генів *mshA* та *wbeT*. У геномі 9 (28,1%) штамів не виявлено гена *wbeT*, який відповідає за структуру O1-антигену, а у 16 (50,0%) штамів не виявлено гена *mshA*, який відповідає за секрецію білків, необхідних для утворення біоплівки (рис. 2). Також спостерігається різна комбінація даних генів у досліджуваних штамів. У геномі 9 (28,1%) штамів *V. cholerae* O1 не виявлялись водночас два гени *wbeT* і *mshA*, тобто в геномі відсутні як «острів патогенності», так і «острів персистенції». Проте у 7 (21,9%) штамів *V. cholerae* O1 виявлено ген *wbeT*, але ген *mshA* був відсутній, тобто генетичний локус, який відповідає за O1-серогрупу в геномі холерного вібріона виявився більш сталим за генетичний локус, який відповідає за біоплівку і входить до «острова персистенції».

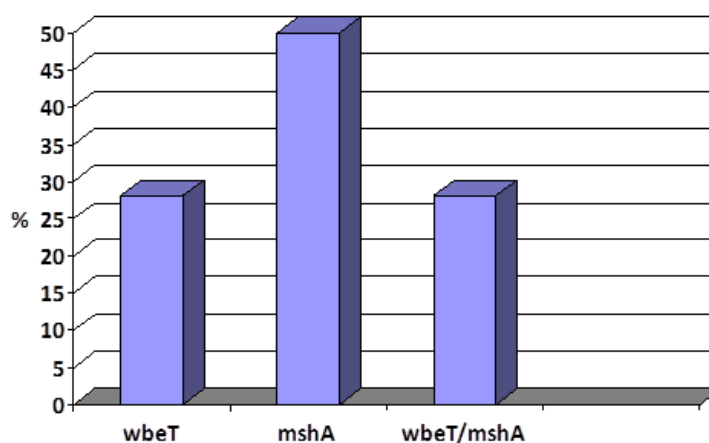


Рис. 2. Відсутність генів *wbeT* та *mshA* в геномі штамів *V. cholerae* O1

Таким чином, молекулярно-генетичні дослідження 32 штамів *V. cholerae O1* показали відсутність в їх геномі основних генів патогенності, що дає можливість віднести їх до авірулентних варіантів *V.cholerae O1*. Відповідно такі холерні вібріони O1 серогрупи не можуть викликати спалах холери, тому вони є безпечними з епідемічної точки зору. Використання ПЛР метода дало значну перевагу перед іншими діагностичними методами у визначенні патогенних властивостей холерних вібріонів.

Крім *V. cholerae O1*, на території України від людей з ознаками діареї, виділяють холерні вібріони які не відносяться до O1 серогрупи, а мають іншу серогрупу. На сьогоднішній день виявлено близько 200 серогруп холерних вібріонів, які різняться між собою за структурою O-антигену. Поширення таких вібріонів, зазвичай, не набуває епідемічного характеру, але вони пов'язані з виникненням гострих кишкових інфекцій у людей і таким чином заслуговують на пристальну увагу у зв'язку з матеріальними витратами на проведення відповідних лікувальних та санітарно-профілактичних заходів. Тому виникає необхідність вивчення молекулярно-генетичної структури геному *V. cholerae non O1* за основними генами патогенності. У зв'язку з цим проведені дослідження дозволили виявити гени патогенності у 100 штамів *V. cholerae non O1*, ізольованих від людей в Україні у 2011–2013 роках.

Результати ПЛР тестування показали, що у геномі усіх штамів *V. cholerae non O1*, незалежно від року їх виділення, не виявлено генів - *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *tcpAE*, *wbeT*, *wbfR*. Лише у геномі 15 (15 %) штамів *V. cholerae non O1* виявлено ген *mshA*, який пов'язують з утворенням біоплівки. У 95 (95%) штамів виявлено ген *hapA*, який відповідає за здатність продукувати розчинну ГА/протеазу та ген *toxR*, який виступає координатором регуляторної системи, яка контролює експресію ключових генів вірулентності та життєзабезпечення. Найбільш консервативними генами у штамів *V. cholerae non O1* виявились гени *Hly* і *rtxC*, які виявляються у 100%. Ген *Hly* контролює синтез гемолізину і існує в геномі вібріонів незалежно від їх серогруп та біоварів. Водночас ген *rtxC*, який входить до RTX кластеру, що кодує біосинтез RTX-токсина та проявляє цитотоксичну дію, також є невід'ємною складовою генома холерних вібріонів.

Варто зауважити, що наявність генів *Hly* і *rtxC* у геномі *V. cholerae non O1* та вірулентних/авірулентних *V. cholerae O1* засвідчує той факт, що ці гени є життєвонеобхідними для холерних вібріонів. Крім того, результати досліджень показали, що до життєвонеобхідних можна віднести і гени *hapA* та *toxR*, адже вони виявлені у 95 % штамів *V. cholerae non O1* та у 100% *V. cholerae O1*.

Якщо провести порівняння структури геному штамів *V. cholerae non O1* з геномом вірулентних/авірулентних штамів *V. cholerae O1* за основними генами патогенності, то можна відмітити, що він суттєво відрізняється від вірулентних штамів холерних вібріонів і незначно від авірулентних штамів (рис. 3).

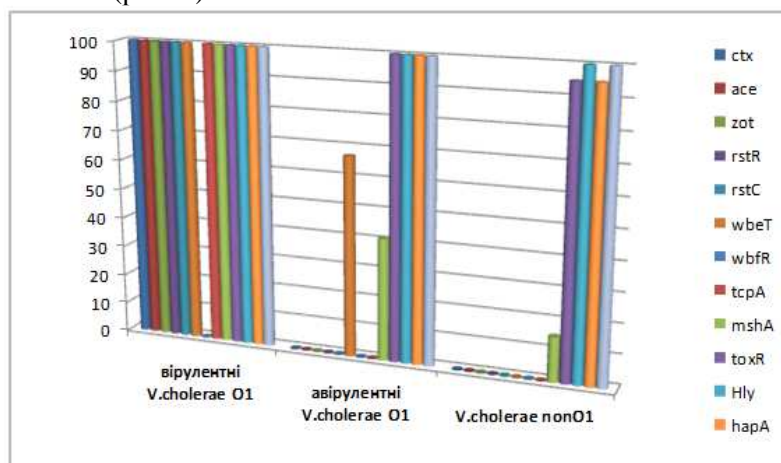


Рис. 3. Наявність генів патогенності у геномі вірулентних/авірулентних *V. cholerae O1* та *V. cholerae non O1*.

Так, геном авірулентних штамів *V. cholerae O1* та *V. cholerae non O1* не мають у своєму складі основних генетичних локусів вірулентності – СТХф, RS2ф, RS1ф, TCP, що притаманні геному вірулентних холерних вібріонів. Відповідно такі холерні вібріони не можуть викликати спалах холери, тому вони є безпечними з епідемічної точки зору.

Водночас, геном авірулентних штамів *V. cholerae O1* та *V. cholerae non O1* виявляється значно ближчими за наявністю генів, які пов'язані з видоспецифічністю та персистенцією – *rtxC*, *toxR*, *mshA*, *hapA*, *Hly*. Наявність генетичного локуса *wbe* у геномі холерних вібріонів виступає розподільною межею між *V. cholerae O1* та *V. cholerae non O1*, так як він притаманний лише для холерних вібріонів O1 серогрупи.

Отже, результати досліджень показали, що використовуючи лише ПЛР метод можна чітко визначити, якими біологічними властивостями володіють досліджувані штами холерних вібріонів, включно і їх патогенний потенціал.

Висновки

Молекулярно-генетична характеристика штамів *V. cholerae O1* та *V. cholerae non O1*, які були виділені від хворих в Україні, дозволила створити їх «геномний портрет», який розкриває спорідненість та відмінність вібріонів за основними генами патогенності і видоспецифічності. Це дає можливість застосовувати ПЛР метод як провідний в лабораторній практиці і тим самим пришвидчити проведення ідентифікації холерних вібріонів і забезпечити проведення лабораторного моніторингу за біологічними властивостями *V. cholerae O1/nonO1* на молекулярно-генетичному рівні.

1. *Атипичные штаммы холерного вибриона Эль-Тор, выделенные от людей* / [Н. И. Смирнова, В. В. Кутырев, Е. А. Костромитина и др.] // Эпидем. и инфекц. болезни. — 2005. — № 5. — С. 15—20.
2. *Біологічні властивості холерних вібріонів, виділених на території України у 2011 році* / Інформаційно-аналітичне повідомлення ДЗ "Українська протичумна станція МОЗ України". — Сімферополь. — 2012. — 19 с.
3. *Вариабельность генома измененных вариантов Vibrio cholerae биовара эль-тор, изолированных на территории России в современный период* / [Н.И. Смирнова, С.П. Заднова, А.В. Шашкова и др.] // Мол. генет., микробиол. и вирусол. — 2011. — № 3. — С. 11—17.
4. *Изучение распространенности основных генов вирулентности среди различных штаммов Vibrio cholera El-Tor для определения их эпидемической значимости* / [Н. И. Смирнова, О. А. Кириллина, Н. Б. Челдышова и др.] // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2001. — N. 3. — С. 23—28.
5. *Інструкція по організації та проведення протихолерних заходів, клініці та лабораторній діагностиці холери* / МОЗ України №167. — Офіц. вид. — К.: Полімед, 1997. — 123 с. — (Нормативний документ МОЗ України).
6. *Стрелков Р. Б.* Статистические таблицы для экспресс-обработки экспериментального и клинического материала / Р. Б. Стрелков / Методические рекомендации. — Обнинск. 1980. — 19 с.
7. *Evolutionary Genetic Analysis of the Emergence of Epidemic Vibrio cholerae Isolates on the Basis of Comparative Nucleotide Sequence Analysis and Multilocus Virulence Gene Profiles* / [Y. A. O'Shea, F.J. Reen, A. M. Quirke et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2004. — Vol. 42(10). — P. 4657—4671.
8. *Minor pilin subunits are conserved in Vibrio cholerae type IV pili* / [C. Toma, H. Kuroki, N. Nakasono et al.] // FEMS Immun. Med. Microbiol. — 2002. — Vol. 33. — P. 35—40.
9. *Molecular Analysis of non-O1, non-O139 Vibrio cholerae associated with an unusual upsurge in the incidence of cholera-like disease in Calcutta, India* / [C. Sharma, M. Thungapathra, A. Ghosh et al.] // J. Clin. Microbiology. — 1998. — Vol. 36, No. 3. — P. 756—763.
10. *Molecular analyses of Vibrio cholerae O1, O139, non-O1 and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates* / D.V. Singh, H.M. Matte, G.R. Matte [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. — 2001. — Vol. 67, No 2. — P. 910—921.
11. *Morris J. G.* Non-O group 1 Vibrio cholerae: a look at the epidemiology of an occasional pathogen / J. G. Morris // Epidemiol Rev. — 1990. — Vol. 12. — P. 179—191.
12. *Reidl J.* Vibrio cholerae and cholera: out of the water and into the host / Joachim Reidl, Karl E. Klose // FEMS Microbiol. Rev. — 2002. — Vol. 26. — P. 125—139.

Е. В. Петренко, В. В. Алексеенко

ГУ «Институт эпидемиологии и инфекционных болезней имени Л. В. Громашевского НАМН Украины», Киев

СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *V. CHOLERAЕ O1 / NON O1* НА ОСНОВЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Быстрая этиологическая диагностика острых кишечных инфекций (ОКИ) остается серьезной проблемой в системе охраны здоровья людей. Для повышения эффективности лабораторной диагностики вибриозов человека и определения этиологического агента проведены молекулярно-генетические исследования методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР). Использование видоспецифичных праймеров под гены холерных вибрионов, которые раскрывают их патогенный потенциал и видовую принадлежность, дало возможность за короткий срок времени расшифровать их биологические свойства. Сравнение генома штаммов *V. cholerae O1/nonO1* за основными генами патогенности показало их родство и определило отличие в видовой составляющей вибрионов. Применение ПЦР метода в лабораторной практике обеспечивает быструю и надежную идентификацию холерного вибриона и в первую очередь в определении его вирулентности.

Ключевые слова: *V. cholerae O1/nonO1*, гены патогенности, вирулентность, ПЦР-диагностика

O. V. Petrenko, V. V. Alekseenko

Gromashevsky Institute of Epidemiology and Infectious Diseases of NAMS in Ukraine

ENHANCED LABORATORY DIAGNOSTICS OF *V. CHOLERAЕ O1/NON O1* BASED ON MOLECULAR-GENETIC RESEARCH

Prompt etiological diagnosis of acute enteric infections (AEI) remains a major concern in public health. Clinical polymorphism of AEI emphasizes role of laboratory diagnostics in etiological agent identification. Bacteriological method of diagnostics is most common, but its high time and resources cost creates favorable conditions for new informative research methods. One of the state-of-the-art promising methods is molecular genetic, with polymerase chain reaction (PCR) using highly specific primers being most rapid, low cost and reliable. In order to enhance laboratory diagnostics of human vibrioses and to study biological properties of cholera vibrios, PCR studies of 35 strains of *V. cholerae O1* and 100 strains of *V. cholerae non O1* isolated from patients in Ukraine in various years were conducted. Research to identify species of cholera vibrios was performed by testing the genome of all studied *V. cholerae* strains for presence of 13 genes with different functions and origin.

Study of 35 strains of *V. cholerae O1* indicated that 3 (8,6%) strains *V. cholerae O1* (one strain was isolated in 1992, and two strains in 1993) had 12 major pathogenic genes: *ctxA*, which produces cholera toxin; *ace* and *zot*, which produce Ace and Zot toxins; *rstR*, repressor of *rstA* gene from RS2 prophage, which is responsible for phage CTX ϕ replication; *rstC*, gene from RS1 prophage, antirepressor of *rstR* gene; *tcpAE*, responsible for coregulated pili toxin, which is an essential intestinal colonization factor; *rtxC*, regulatory gene from *rtx* cluster that encodes synthesis of RTX toxin; *toxR*, major gene of regulatory system that controls expression of key virulence and vital functions genes; *mshA*, which encodes mannose-sensitive hemagglutinin pilus IV adhesion type; *wbeT*, which is responsible for biosynthesis of O1 serogroup; *hapA*, which encodes soluble hemagglutinin/protease; structural gene *Hly*, for Hly haemolysin synthesis. Genomes of these strains did not contain only the *wbfR* gene which indicates genetic locus of O139 serogroup. Presence of 12 major pathogenic genes in *V. cholerae O1*, especially genes *ctxA* and *tcpAE*, indicates their virulent properties, which allows them to cause cholera.

It is worth mentioning that appearance of patients from which cholera vibrios with major pathogenic genes were isolated during a non-outbreak period in Ukraine is an indication of endemic cases of cholera. Under the circumstances, patients were timely diagnosed and etiological agent was identified, which offered the opportunity to conduct epidemic countermeasures and locate source of infection.

Further genetic research of 32 *V. cholerae O1* strains isolated from 1996 to 2012 (non-outbreak years) has shown that they had no major pathogenic genes in their genome – *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*,

wbfR. On the other hand, all researched strains contained vital functions and species-specific genes, notably *hapA*, *toxR*, *Hly*, *rtxC* which are 100% inherited. 5 strains of *V.cholerae O1* isolated in 1999 had *tcpAE* gene which is responsible for coregulated pili toxin adhesion. There was no *wbeT* gene present in the genome of 9 (28,1%) strains, and 16 (50,0%) strains had no *mshA* gene. Genome of 9 (28,1%) *V.cholerae O1* strains lacked both *wbeT* and *mshA* genes.

Therefore, molecular genetic study of 32 *V.cholerae O1* strains indicated absence of major pathogenic genes in their genome, which allows to classify them as avirulent variants of *V.cholerae O1*. Therefore, such cholera vibrios of O1 serogroup can't cause cholera outbreak so they are safe from epidemiological point of view.

The results of PCR testing of 100 *V.cholerae non O1* strains isolated from patients in Ukraine in 2011-2013 indicated that genomes of all studied strains contained no *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *tcpAE*, *wbeT*, *wbfR* genes. Only 15% strains of *V.cholerae non O1* contained gene *mshA*, and 95% strains had genes *hapA* and *toxR*. Most conservative genes of *V.cholerae non O1* strains are genes *Hly* and *rtxC*, which were found in 100% of studied strains.

It is worth mentioning that presence of *Hly* and *rtxC* genes in the genomes of *V.cholerae non O1* and virulent/avirulent *V.cholerae O1* proves that they are critically important for functioning of cholera vibrios. The results obtained also indicate high importance of genes *hapA* and *toxR*, since they were found in 95 % of *V.cholerae non O1* strains and in 100% of *V.cholerae O1* strains.

After comparing the genome structure of *V.cholerae non O1* with the genomes of virulent/avirulent strains of *V.cholerae O1* by major pathogenic genes, a significant difference from virulent strains and insignificant difference from avirulent strains was found. Both avirulent *V.cholerae O1* strains and *V.cholerae non O1* strains don't have major virulence locuses CTX ϕ , RS2 ϕ , RS1 ϕ , TCP which are typical of virulent strains. Therefore such cholera vibrios can't cause cholera outbreak so they are epidemiologically safe. At the same time, genomes of avirulent strains of *V.cholerae O1* and *V.cholerae non O1* were found very similar by presence of genes responsible for type specificity and persistency – *rtxC*, *toxR*, *mshA*, *hapA*, *Hly*.

It is also important to mention that presence of *wbe* locus in the genome of cholera vibrios is a decisive factor between *V.cholerae O1* and *V.cholerae non O1*, because it is present only in the vibrios of O1 serogroup. Therefore, research indicates that biological properties and pathogenic potential of studied cholera vibrio strains can be clearly determined using only PCR method. This allows PCR to be used as primary method in laboratory practice and increase the speed of cholera vibrio identification.

Key words: V. cholerae O1/nonO1, pathogenic genes, virulence, PCR diagnostics

Рекомендує до друку

В. В. Грубінко

Надійшла 29.04.2016

УДК 58.02:582.683.2:577.152

С. М. РОМАНЧУК

Інститут ботаніки імені М. Г. Холодного НАН України
вул. Терещенківська, 2, Київ, 01601

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА АКТИВНІСТЬ β - ГЛЮКОЗИДАЗИ В ПРОРОСТКАХ *ARABIDOPSIS THALIANA* (L.) HEYNH.

Досліджено вплив рентгенівських променів в дозах 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 та 12 Гр на активність β -глюкозидази в проростках *Arabidopsis thaliana*. Показано, що рентгенівське випромінювання