Огляди літератури, ***оригінальні дослідження,*** *погляд на проблему*
УДК 577.21.004+579.843:616.34(477)

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА V.cholerae O1, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ НА ГОСТРІ КИШКОВІ ІНФЕКЦІЇ В УКРАЇНІ

©*О. В. Петренко, **О. Б. Хайтович, **Н. Н. Підченко, **Ю. О. Ільїчов

**Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України, м. Київ*
***Українська протичумна станція МОЗ України, м. Сімферополь*

РЕЗЮМЕ. Молекулярно-генетична характеристика штамів V.cholerae O1, виділених від людей, хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ) в різні роки в Україні, показала відсутність у їхньому геномі основних генів патогенності – ctxA, tcpAE, zot, ace, wbfR, rstR, rstC, що притаманні вірулентним холерним вібріонам. В геномі досліджуваних штамів холерних вібріонів виявлені гени Hly, rtxC, hapA, які відповідають за продукування гемолізинів, цитотоксинів, гемаглютинін/протеазу, а також регуляторний ген toxR. Холероподібні діареї, скоріш за все, пов'язані з гемолізинами та цитотоксинами, які продукуються холерними вібріонами та контролюються відповідними генами. Відсутність у деяких штамів холерного вібріона гена wbeT вказує на структурні зміни в генетичному локусі, який контролює формування O1-антигену. Третина досліджуваних штамів холерних вібріонів не мали гена mshA. Відсутність гена mshA призводить до неспроможності холерних вібріонів утворювати повноцінну біоплівку, тим самим ускладнюючи їх виживання у різних біологічних нішах. Холерні вібріони, які не несуть у своєму геномі основних генів патогенності та персистенції, не спроможні викликати клінічні прояви холери і їх можна віднести до авірулентних вібріонів.
КЛЮЧОВІ СЛОВА: холерний вібріон, гени патогенності, вірулентність, гемолізини, цитотоксини.

Відомо, що ключовим фактором патогенності збудника холери є холерний токсин, який відіграє провідну роль у розвитку основного клінічного симптому холери – діареї, а також з ним пов'язують і епідемічну небезпечність збудника [9]. Але останнім часом все частіше стали виділяти від хворих на ГКІ штами V.cholerae O1, які не мають холерного токсину, але спроможні викликати у людей холероподібні діареї різного ступеня тяжкості. Напевно у холерних вібріонів, які не спроможні до продукції холерогену, є можливість до реалізації інших токсичних факторів і не виключається наявність діарейних токсинів [6, 7, 8]. Захворювання проходять як спорадичні випадки або локальні спалахи і реєструються практично у всіх країнах світу [3, 10]. В південних регіонах України майже щорічно відмічають поодинокі випадки ГКІ у людей, викликані штамами V.cholerae O1 [1, 4]. Вивчення біологічних властивостей даних вібріонів на молекулярно-генетичному рівні практично не проводилось, що й стало приводом для проведення даних досліджень.

Мета дослідження. Провести молекулярно-генетичний аналіз геному штамів V.cholerae O1, виділених від хворих на ГКІ в різні роки в Україні.

Об'єкт і методи дослідження. У роботі були використані 27 штамів V.cholerae O1, виділених від людей в Україні в різні роки, які зберігалися в Національній колекції збудників холери O1 та не O1 серогрупи ДЗ «Українська протичумна станція МОЗ України». Визначення культурально-морфологічних та серологічних властивостей, відношення до діагностичних фагів та вивчення біохімічних властивостей проводили за загальноприйнятими методами [2]. Молекулярно-генетичні властивості вивчали за допомогою методу ПЛР з послідовністю праймерів (табл.1). Праймери синтезовані на фірмі «Синтол» (Росія).

Таблиця 1. Праймери для виявлення генів патогенності

№ з/п	Гени	Нуклеотидна послідовність праймерів 5'-3'	Розмір амплікону (п.н.)	Посилання
1	2	3	4	5
1.	zot 1 zot 2	tcg-ctt-aac-gat-ggc-gcg-ttt-t aac-ccc-gtt-tca-ctt-cta-ccc-a	947	Singh D. V. et al., 2001
2.	ctxA1 ctxA2	cgg-gca-gat-tct-aga-cct-cct-g cga-tga-tct-tgg-agc-att-ccc-ac	564	Горяєв А.А., 2008
3.	ace1 ace2	taa-gga-tgt-gct-tat-gat-gga-cac-c ccg-tga-tga-ata-aag-ata-ctc-ata-gg	289	Trucksis M. el al., 1993
4.	tcpAE1 tcpAE2	gaa-gaa-gtt-tgt-aaa-aga-aga-aca gaa-agg-acc-ttc-ttt-cac-gtt-g	471	Keasler S.P., 1993.
5.	hapA 1 hapA 2	tca-act-aca-aca-ccg-cag-ac gac-gac-aat-ccc-aag-aag-ag	270	Челдышова Н. Б., 2002
6.	toxR1 toxR2	atg-act-ttg-ttt-ggc-gag-ag gat-tgg-ctt-ggg-tta-gtg-ag	397	Челдышова Н. Б., 2002

Продовження табл. 1

1	2	3	4	5
7.	mshA1 mshA2	acg-cta-gtg-gga-ttg-gga-tg gca-taa-agt-tgt-aca-gtc-cc	398	Toma C. et al., 2002
8.	wbeT1 wbeT2	ata-atc-gaa-act-tca-ttt-aca-atg-gag-ag cac-aga-aag-ttc-caa-cgt-ttg-cac-cga	614	Смирнова Н.И., 2007
9.	rstR1 rstR2	gca-cca-tga-ttt-aag-atg-ctc tcg-agt-tgt-aat-tca-tca-aga-gtg	501	Bhattacharya et al., 2006
10.	rstC1 rstC2	aac-agc-tac-ggg-ctt-att-c tga-gtt-gcg-gat-tta-ggc	238	WaldorM.K.et al., 1997.
11.	rtxC1 rtxC2	cga-cga-aga-tca-ttg-acg-ac cat-cgt-cgt-tat-gtg-gtt-gc	263	Chow et al., 2001

Виділення ДНК вібріонів проводили за допомогою системи «ДНК-сорб-АМ» (Росія). Ампліфікація проходила на апараті «Perkin Elmer–2400» за таких умов: 95 °С – 5 хв. – 1 цикл; 95 °С – 10 с., 57 °С – 10 с., 72 °С – 10 с. – 30 циклів; 72 °С – 2 хв – 1 цикл. Для кожного праймера розраховувався свій температурний відпал. Зокрема для праймерів під гени toxR, tcpA, zot, ace, hapA, ctxA температура відпалу становила 57 °С, а для праймерів під гени wbeT, rstR, rtxC, mshA, rstC – 55 °С.

Результати ампліфікації фіксували електрофоретичним методом у 2 % агарозному гелі. Візуально під УФ-опромінюванням на трансілюмінаторі фіксували наявність або відсутність смуги продукції ампліфікації [5]. Гени wbfR та Hly виявляли за допомогою тест-систем фірми «Амплисенс Vibrio cholerae-FL» (Росія), у режимі реального часу на «Rotor Gene-3000» (Австралія).

Результати й обговорення. Проведені дослідження показали, що 27 досліджуваних штамів, які були виділені від хворих на ГКІ в Україні, за своїми біологічними властивостями належать до виду V.cholerae. «Генетичний портрет» досліджуваних холерних вібріонів визначався за такими основними генами патогенності та персистенції, як ctxA, ace, zot, rstR, rstC, rtxC, tcpAE, toxR, mshA, wbeT, wbfR, hapA, Hly.

У результаті молекулярно-генетичних досліджень було встановлено, що холерні вібріони не мали у своєму геномі основних генів патогенності – ctxA, ace, zot, які входять до нитчатого фагу СТХф і створюють так звану «касету вірулентності» (табл. 2). Ген ctxA відповідає за продукування холерного токсину СТ, а гени zot та ace за секрецію білків Zot і Ace, які є додатковими токсинами, що також можуть викликати розвиток помірної діареї.

Таблиця 2. Виявлення генів патогенності у штамах V.cholerae O1, виділених від хворих на ГКІ в Україні

Рік і місце виділення	К–сть штамів	Гени												
		ctxA	zot	ace	rstR	rstC	tcpAE	wbfR	wbeT	mshA	toxR	Hly	hapA	rtxC
1996, Запорізька обл.	2	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
–«–	2	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
–«–	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
Миколаївська обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
1997, Харківська обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
–«–	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
2000, Запорізька обл.	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
Одеська обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
2001, Дніпропетровська обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
АР Крим	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
Запорізька обл.	3	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
2003, АР Крим	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
2006, АР Крим	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
2007, Запорізька обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
2009, Одеська обл.	3	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+	+	+
2010, АР Крим	1	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	+	+	+
Одеська обл.	2	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
Запорізька обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+
2012, Одеська обл.	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	+	+	+

Примітка: наявність – «+», відсутність – «–».

Не виявлено в геномі вібріонів і гена rstR з ділянки RS2, яка входить до складу нитчастого фагу CTXф, що контролює регуляцію, реплікацію та інтеграцію цього фагу. Також не було виявлено гена rstC з профагу RS1, який фланкує з двох боків профаг CTXф та підсилює продукування холерного токсину, а також забезпечує секрецію фагових частинок у навколишнє середовище.

Відсутність у геномі вібріонів гена tcpAE свідчить про те, що досліджувані штами не мають токсинкоригуючих пілей адгезії TCP, які виступають як основний фактор колонізації холерними вібріонами тонкого кишечника людини. Штами холерного вібріона, які не здатні до колонізації кишечника людини, практично є авірулентними, тому очевидно, що гени tcp розглядають в якості другого генетичного маркера епідемічно небезпечних штамів. Водночас TCP є рецептором для нитчастого фага CTXφ.

Не виявлено в геномі холерних вібріонів і гена wbfR, який свідчить про належність їх до O139 серогрупи. Але був виявлений ген wbeT, що дає можливість говорити про належність вібріонів до O1 серогрупи.

Проте в усіх досліджуваних штамах були виявлені гени, які належать до життєвозабезпечуючих генів, а саме – hapA, toxR, Hly, rtxC. Видоспецифічний ген hapA обумовлює продукування розчинної гемаглютинін/протеази, одна з основних функцій якого – відкріплення вібріонів від епітелію тонкого кишечника на пізній стадії розвитку інфекційного процесу, а також необхідний для виживання холерного вібріона в навколишньому середовищі. Ген toxR входить до глобальної регуляторної системи, яка через регуляторний каскад координовано змінює експресію близько 20 різних генів вірулентності, у тому числі гени ctxAB та tcpAE. Ген Hly контролює синтез термолабільного гемолізину. Ген rtxC входить до кластера із чотирьох генів, кодуючи біосинтез RTX-токсину, який має цитотоксичну активність.

Отже, на основі отриманих даних можна зробити висновок, що гени – hapA, toxR, rtxC, Hly є генами життєзабезпечення і становлять настільки невід'ємну частину геному холерного вібріона, що їх стабільна спадковість складає 100 %.

Проте розбіжності були виявлені серед генів mshA та wbeT. Ген wbeT входить до кластеру генів wbe, що кодують біосинтез О-антигена і входить до «острова патогенності». Результати наших досліджень показали, що у геномі 9 (33,3 %) штамів холерних вібріонів не виявлено гену wbeT, який відповідає за структуру O1-антигену. Такі штами не аглютинувалися О-холерною сироваткою, а мали аглютинацію з RO-сироваткою. Перехід холерних вібріонів у R-варіант зумовлений модифікацією у структурі O1-антигену ліпополісахариду з редукцією полісахаридних ланцюгів. Такі модифікації пов'язані з відсутністю у геномі цих штамів гена wbeT, який контролює формування O1-антигену.

Тестування на ген mshA дозволило отримати дані про наявність «острова персистенції» EPI, який відповідає не лише за гемаглютинуючи пілі адгезії IV типу, а й за секрецію білків, необхідних для утворення біоплівки.

Гени msh об'єднані в два оперони, один з яких (структурний оперон) містить гени, що контролюють біосинтез основної структурної субодиниці пілей MSHA, тоді як другий оперон (секреторний) визначає продукцію білків, необхідних для зборки і секреції MSHA на поверхні бактеріальної клітини. Наявність у вібріонах EPI пов'язано з присутністю у них пілей MSHA для прикріплення клітин до біотичних і абіотичних поверхонь, які разом з екзополісахаридом – основним компонентом позаклітинного матриксу, беруть участь в утворенні біоплівки.

Наші дослідження показали, що в геномі 16 (59,3 %) штамів холерного вібріона ген mshA не міститься. Відсутність цього гена або наявність мутацій призводить до неспроможності холерних вібріонів утворювати повноцінну біоплівку. Тому втрата повноцінних генів msh холерними вібріонами обумовлює їх слабку стійкість до умов навколишнього середовища.

У геномі 9 штамів холерних вібріонів, які не мали у своєму геномі гена wbeT, не мали і гена mshA. Тобто в геномі відсутні як «острів патогенності», так і «острів персистенції», що унеможливлює розвиток клінічних проявів холери цими ембріонами.

Водночас, 7 штамів холерних вібріонів мали ген wbeT і не мали гена mshA. Вони аглютинувалися О-сироваткою до ДРТ, але не утворювали біоплівки. Втрата або репресування гена mshA ускладнює його виживання в різних біологічних нішах та, в свою чергу, вказує на генетичні зміни у геномі холерних вібріонів в процесі свого розвитку.

Молекулярно-генетичні дослідження штамів V.cholerae O1 показали, що за структурою геному вони не спроможні колонізувати тонкий кишечник людини, оскільки позбавлені пілей TCP, і продукувати холерогенний токсин, оскільки не мають гена ctxA. Такі вібріони не мають у своєму геномі двох основних генів вірулентності. Отже, можна зробити висновок, що такі штами V.cholerae O1 не здатні викликати холеру, тому їх можна віднести до авірулентних холерних вібріонів.

Виникає питання, за рахунок чого виникла колонізація такими вібріонами кишечника людини та дія яких токсинів викликала у людей діарею? Можливо, заселення кишечника було пов'язано з продукцією вібріонами додаткових факторів колонізації, пошуком яких нині зайнято багато вчених. Наявність у геномі вібріонів гена rtxC з кластеру генів rtx, що відповідає за RTX-токсин та гену Hly, який контролює продукування гемолізину, дає

можливість стверджувати, що діарея у хворих була викликана саме цими токсинами. Проведені дослідження підтверджують той факт, що дія додаткових факторів токсигенності – гемолізинів, цитотоксинів та інших токсинів, які на сьогоднішній день є малодослідженими, здатні викликати діареї у людей.

Висновок. Проведені молекулярно-генетичні дослідження показали, що штами V.cholerae O1, які були виділені від людей з ГКІ в різні роки в Україні, не мають у своєму геномі основних генів патогенності. Такі штами холерних вібріонів не спроможні викликати клінічні прояви холери і їх можна віднести до авірулентних штамів. Але наявність в геномі холерних вібріонів генів – Hly та rtxC, які відповідають за продукування гемолізинів та цитотоксинів, що виступають додатковими факторами токсигенності у вірулентних холерних вібріонів, можуть призводити до виникнення холероподібних діарей. Різні комбінації наявності генів wbeT та mshA у геномі холерних вібріонів, вказують на структурні зміни в О-антигену та з ускладненням їх виживання у різних біологічних нішах.

З огляду на надзвичайно високий рівень варіабельності структури і функції геному холерного вібріона та наявність профагів патогенності у водних екосистемах, неможливо не визнати, що в ході еволюційних змін у межах виду існує велика ймовірність виникнення нових, більш вдалих з точки зору пандемічного потенціалу патогенних варіантів. Тому авірулентні холерні вібріони, які циркулюють в південних регіонах України, потребують постійного нагляду.

Перспективи подальших досліджень. Для більш поглибленого вивчення молекулярно-біологічних властивостей авірулентних холерних вібріонів О1 планується провести секвенування варіабельних генетичних локусів wbeT та mshA.

ЛІТЕРАТУРА

1. Біологічні властивості холерних вібріонів, виділених на території України у 2012 році / Інформаційно-аналітичне повідомлення ДЗ «Українська протичумна станція МОЗ України». – Сімферополь. – 2013. – 13 с.

2. 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).

3. Информация о биологических свойствах холерных вибрионов О1 и О139 серогрупп, изолированных от людей и из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации в 2010 году / С. М. Иванова, Г. В. Титов, В. Е. Безсмерный [и др.] // Холера и патогенные для человека вибрионы: матер. Пробл. Комиссии. – Ростов н/Д., 2011 – Вып. 24 – С. 68–73.

4. Стеценко И. И. Изучение процесса формирования эндемичного очага холеры в Мариуполе / И. И. Стеценко // Профилактическая медицина. – 2009. – № 2. – С. 37–41.

5. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. ; пер. с англ. А. А. Баева и К. Г. Скрябина. – М. : Мир, 1984. – 479 с.

6. Эволюция генома Vibrio choierae: пути формирования атипичных штаммов / Н. И. Смирнова, Н. Б. Челдышова, А. А. Горяев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций – 2008. – Вып. 3 – С. 5–11.

7. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the Vibrio cholerae O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India / P. Kumar, M. Jain, A. Goel [et al.] // J. Med. Microbiol. – 2009. – Vol. 58. – P. 234–238.

8. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic Vibrio cholerae / J. Chun, C. Grim, R. R. Colwell [et al.] // PNAS. – 2009. – Vol.106 (36). – P.15442–15447.

9. Evolution of new variants of Vibrio cholerae O1 / A. Safa, G. B. Nair, R. Y. Kong [et al.] // Trends in Microbiology. – 2010. – Vol. 18. – P. 46–54.

MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF V. CHOLERAE O1 ISOLATED FROM PATIENTS WITH ACCUTE ENTERIC INFECTION IN UKRAINE

***O. V. Petrenko, **O. B. Khaytovych, **N. N. Pidchenko, **Yu. O. Ilyichov**

**Institute of Epidemiology and Infectious Diseases by L. V. Hromashevsky of NAMS of Ukraine, Kyiv*
***Ukrainian Anti-Plague Station of MPH of Ukraine, Simferopol*

RESUME. Molecular-genetic characteristics of V. cholerae O1 strains isolated from people with acute enteric infections during various years in Ukraine showed no basic genes for pathogenicity typical for virulent cholera vibrios (ctxA, tcpAE, zot, ace, wbfR, rstR, rstC) in their genome. Genes Hly, rtxC, hapA, responsible for the production of hemolysins, cytotoxins, hemagglutinin/protease and regulatory toxR gene were found in the genome of the studied strains of cholera vibrios. Cholera-like diarrheas are most likely connected to hemolysins and cytotoxins that are produced by cholera vibrios and controlled by corresponding genes. Abscence of wbeT gene in some strains of cholera vibrios indicates structural changes in the genetic locus that controls synthesis of O1-antigene. One-third of the studied strains of cholera vibrios had no mshA gene. Absence of mshA gene renders the vibrio incapable of creating a biofilm which decreases its survivability in various biological niches. Cholera vibrios that don't have major genes for pathogenicity and persistence in their genome are unable to cause clinical symptoms of cholera and can be classified as avirulent.

KEY WORDS: cholera vibrio, genes for pathogenicity, virulence, hemolysins, cytotoxins.

Отримано 28.07.2014