

УДК 579.25:579.843](477)

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ ПАТОГЕННОСТІ В *V.PARAHAEMOLYTICUS*, ВИДІЛЕНИХ В ПІВДЕННИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ

Петренко О.В., Алексеєнко В.В., Лисенко З.А.
Інститут епідеміології та інфекційних хвороб
ім. Л.В.Громашевського НАМН України, вул. М.
Амосова, 5, м. Київ, 03680, e-mail:epidemics@ukr.net

Vibrio parahaemolyticus є представником галофільних вібріонів, який давно признаний як людський патоген, так як викликає гастроентерити у людей (галофільози), а інколи і раневі інфекції та сепсис у імунокомпроментованих пацієнтів [1,2]. Парагемолітичні вібріони є ведучим етіологічним фактором при харчових токсикоінфекціях, пов'язаних з вживанням морепродуктів або води, контамінованих даними мікроорганізмами на Азіатському, Африканському, Американському та Європейському континентах. З 1996 року в світі набув розповсюдженості *V.parahaemolyticus* серотипу O3:K6, який був вперше виділений від хворих на гострі кишкові інфекції (ГКІ) в Калькутті в Індії [3,4,5]. Значні спалахи галофільозу в Азіатському регіоні, якими охоплені тисячі хворих, призвели до швидкого розповсюдження збудника на інші континенти. Останнім часом гастроентерити, викликані *V.parahaemolyticus* серотипу O3:K6, набули пандемічного характеру. Так, в 2005 році цей штам, завезений в Чілі та в Перу, викликав діарейні розлади більше ніж у 10 000 чоловік [6].

Патогенні властивості парагемолітичних вібріонів пов'язані з продукуванням токсинів, які й викликають різноманітну клінічну картину захворювання. Одним із основних токсинів *V.parahaemolyticus* є прямий термостабільний гемолізін TDH (thermostable direct hemolysin), детермінований геном *tdh*, який і проявляє ентеротоксичну та кардіотоксичну дію. Термостабільний гемолізін виявляють за допомогою методу Канагава на кров'яному середовищі Вагацума. Критерієм патогенності парагемолітичних вібріонів є виявлення гемолізу позитивних (канагавапозитивних) вібріонів, що підтверджує їхні вірулентні властивості [7].

В 80-х роках від хворих гастроентеритом в різних географічних регіонах були виділені канагаванегативні парагемолітичні вібріони. Такі штами мають інший гемолізін –TDH-подібний (TDH-related hemolysin) або TRH, в якому ген *trh* має до 80 % гомології з *tdh*, що відповідає за ентеротоксигенність. Отже, вірулентні властивості парагемолітичних вібріонів пов'язані з наявністю або відсутністю в їхньому геномі генів токсигенності *tdh* або *trh*, які здатні до продукування гемолізину [8,9].

В південних регіонах України періодично виділяють з об'єктів навколишнього середовища парагемолітичні вібріони та реєструються поодинокі випадки або спалахи галофільозу [10]. Найбільші спалахи були зареєстровані в 1984 році в містах Бердянськ, Керч, Маріуполь, Миколаїв, коли захворіло 750 чол. [11]. В останні

роки випадки захворювання на галофільоз реєструвались в Одеській області в 2006 - 2008 роках. Такі періодичні спалахи галофільозу можна розцінювати як випадкові випадки потрапляння патогенних штамів в водні акваторії України, що здатні викликати захворювання.

Штами *V.parahaemolyticus*, які циркулюють в навколишньому середовищі в південних регіонах України, не мають патогенних властивостей. Між тим розповсюдження вібріонів з різним патогенним потенціалом в навколишньому середовищі та існування їх в різних екосистемах (морська вода, гідробіоти, людина), зміна кліматичних умов в сторону потепління, створює умови для формування клонів парагемолітичних вібріонів з різними патогенними властивостями. Тому парагемолітичні вібріони, як і багато інших патогенів для людини, також заслуговують на пильну увагу.

Слід зауважити, що на практиці визначення вірулентних властивостей парагемолітичних вібріонів проводять на рівні фенотипових ознак вібріонів, тому **метою даної роботи** було вивчення гено- і фенотипової характеристики *V.parahaemolyticus*, виділених від хворих та з об'єктів навколишнього середовища.

Матеріали та методи

Для досліджень було взято 40 штамів парагемолітичних вібріонів - 20 від хворих, які були виділені в 2006 році в Одесі, та по 10 штамів від людей і з навколишнього середовища, виділених в попередні роки. Культури зберігалися в напіврідкому 0,3% лужному агарі з 3% NaCl та в ліофільному стані. Ідентифікацію штамів проводили за загально прийнятими методами. Підрошували культури на 1% пептонній воді з 3% NaCl з послідовним висівом на лужний агар з 3% NaCl і подальшою експозицією в термостаті при 37°C. Біохімічні властивості парагемолітичних вібріонів вивчали за допомогою тестового набору системи індикаторних дисків (СІБ) для *Vibrionaceae*. Облік проводили з урахуванням зміни кольору середовища.

Гідроліз сечовини перевіряли на середовищі Крістенсена. В пробірці з 0,5 мл середовища Крістенсена вносили 0,1 мл 1 млрд. зависі добової культури *V.parahaemolyticus*. Зміна кольору середовища через 18 годин інкубації при 37°C вказувала на наявність гідролізу сечовини.

Визначення гемолітичної активності вібріонів проводили на кров'яному середовищі Вагацума [12]. На чашки з агаром наносили добову культуру вібріонів і через 18 годин культивування в термостаті при 37°C враховували наявність зони лізису еритроцитів.

Молекулярно-генетичні властивості вивчали за допомогою ПЛР з послідовністю праймерів 5'-3': *tdh1-ggtactaatggctgacatc*, *tdh2-ccactaccactctcatatgc* ; *trh1-ggtcaaatggtaagcg*, *trh2-catttccgctctcatatgc* [13,14]. Виділення ДНК вібріонів проводили за допомогою кип'ятіння. Готували 0,5 мл 1 млрд. зависі вібріонів і прогрівали в твердотільному термостаті при 100°C протягом 5 хвилин. Після чого пробірці центрифугували при 10 000 тис/об. 10 хвилин, супернатант переносили в нову пробірку і зберігали при -20°C до постановки ПЛР.

Реакційну суміш готували в режимі «hot start», яку розділяли воском: нижня реакційна суміш: деіонізована вода - 10μ, дНТФ 2,5 мМ – 2,5μ, праймери 10 пкмоль/мкл - по 1μ кожного, зверху вносили по 7 μ воску для ампліфікації; верхня реакційна суміш: 10хПЦР буфер Б – 2,5 μ, MgCl₂ 25мМ – 1,5μ, Tag ДНК-полімераза 5 Е/мкл – 0,2μ, деіонізована вода - 5μ, масло. Досліджувану ДНК вносили по 5μ під масло. Ампліфікація проходила на апараті «Percin Elmer» при умовах ампліфікації: 95°C - 5 хв.–1 цикл; 95°C - 10сек., 59°C - 10 сек., 72°C - 10 сек. – 40 циклів; 72°C - 2 хв. – 1 цикл.

Облік результатів ампліфікації проводили електрофоретичним методом в 2% агарозному гелі [15]. Візуально під УФ-опромінюванням на транслюмінаторі фіксували наявність або відсутність полоси продукції ампліфікації.

Результати та обговорення

Досліджувані штами за своїми культуральними, морфологічними та біохімічними властивостями відповідали виду *V.parahaemolyticus*.

Молекулярно-генетичні дослідження показали, що всі парагемолітичні вібріони, які були виділені від людей, несли в своєму геномі ген патогенності *tdh*, який відповідає за прямий термостабільний гемолізін TDH

(табл.). Інший ген патогенності - *trh*, який відповідає за продукування TRH гемолізіну, не був виділений ні в одному з 40 досліджуваних штамів. Так, штами, виділені в Одеській області на одній території в літній період часу, за генетичними дослідженнями показали, що дані штами напевно мають одне джерело інфекції і походять від одного патогенного штаму. Одеська область є портовим регіоном і можливо, що патогенні штами парагемолітичних вібріонів були завезені на дану територію, що і спричинило спалах галофільозу.

В геномах клінічних штамів, виділених від хворих в південних областях України з 1985 по 1988 роки, виявили такий самий генетичний набір генів патогенності - *tdh+ trh-*, що й в останні роки. Порівнюючи геноми клінічних штамів вібріонів з інтервалом в 25 років, бачимо, що набір генів патогенності залишився незмінним, тобто патогенний потенціал залишився той самий. Наявність однакових генетичних детермінант *tdh+ trh-* в геномі клінічних штамів говорить про їхнє спільне походження. Можна зробити припущення, що наявність у парагемолітичних вібріонів однакових генів патогенності та періодичні спалахи галофільозу в різні роки можливі не тільки за рахунок збудника, який завезений, а і за рахунок штамів, які здатні зберігатися та виживати в умовах навколишнього середовища.

Таблиця .- Результати виявлення ознак патогенності в штаммах *V.parahaemolyticus*

№ п/п	Об'єкт виділення	Кількість штамів	Рік і місце виділення	Гідроліз сечовини	Гемолітична активність	Гени патогенності	
						ген <i>tdh</i>	ген <i>trh</i>
1	хворий	20	Одеса 2006	—	+	+	—
2	«-»	1	Керч 1985	—	+	+	—
3	«-»	1	Бердянськ 1985	—	+	+	—
4	«-»	1	Мелітополь 1987	—	+	+	—
5	«-»	2	Запоріжжя 1987	—	+	+	—
6	«-»	1	Бердянськ 1987	—	+	+	—
7	«-»	1	Запоріжжя 1988	—	+	+	—
8	«-»	1	Мелітополь 1988	—	+	+	—
9	«-»	1	Бердянськ 1988	—	+	+	—
10	«-»	1	Маріуполь 1988	—	+	+	—
11	морська вода	1	Євпаторія 1985	—	—	—	—
12	«-»	1	Алушта 1986	—	—	—	—
13	«-»	1	Севастополь 1986	—	—	—	—
14	«-»	1	Керч 1987	—	—	—	—
15	«-»	1	Севастополь 1987	—	—	—	—
16	«-»	1	Севастополь 1988	—	—	—	—
17	«-»	1	Бердянськ 1988	—	—	—	—
18	«-»	3	Запоріжжя 1988	—	—	—	—

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

Вивчення останнім часом біологічних властивостей *V.parahaemolyticus* вказують на здатність вібріонів при певних умовах розмножуватися і накопичуватися в організмах гідробіонтів, що в свою чергу формує в вібріонах стійкість до травної системи найпростіших та є резервуаром вібріонів при несприятливих умовах навколишнього середовища [1]. Такі вібріони більш пристосовані до умов морської екосистеми і можуть довго перебувати в об'єктах довкілля. Можливо патогенні

парагемолітичні вібріони після спалахів, які закінчуються з початком осені, накопичуються в організмах гідробіонтів, де переживають несприятливі для них умови навколишнього середовища. Тому можливість виявити патогенні штами *V.parahaemolyticus* у гідробіонтах значно вища, ніж в морській воді. Необхідно продовжити дослідження по виявленню *V.parahaemolyticus* не тільки з морської води, а і з гідробіонтів, які заселяють морське узбережжя в

південних регіонах України та розширити генетичний спектр досліджень по виявленню спорідненості геномів.

В той же час культури, виділені з морської води в 1985-1988 роках, не мали в своєму геномі генів патогенності *tdh* і *trh*, що дає можливість віднести їх до авірулентних штамів. Відсутність генів патогенності в циркулюючих в навколишньому середовищі парагемолітичних вібріонів вказує на їхню безпечність.

Зарубіжними вченими було встановлено, що ген патогенності *trh* пов'язаний з кластером генів уреазини на малій хромосомі [9]. Таке сусідство двох кластерів генів призвело до активізації уреазної активності, тобто всі штами, які мають ген *trh*, дають гідроліз сечовини. Наші дослідження показали, що всі досліджувані штами не гідролізують сечовину, що було підтверджено паралельними дослідженнями з дисками СІБама та на середовищі Крістенсена. Ці дані підтверджуються і генетичними дослідженнями, які приведені в таблиці, бо парагемолітичні вібріони, які дають гідроліз сечовини, несуть в своєму геномі ген *trh*, а ми таких штамів не виявили. Базуючись уреазним тестом можна передбачити, який ген патогенності буде виявлений в досліджуваному штамі - *trh* чи *tdh*. Проте за останніми науковими повідомленнями стало відомо, що не всі уреазопозитивні парагемолітичні вібріони здатні до продукування TRH-гемолізину *in vitro*, що підтверджує існуючу думку про незалежну експресію генів *trh* і уреазного кластера [2]. Поки ведуться більш глибокі наукові дослідження з даного питання, то на сьогоднішній день уреазний тест залишається необхідним в диференціації парагемолітичних вібріонів.

Головним критерієм патогенності парагемолітичних вібріонів на сьогоднішній день залишається гемолітична активність на середовищі Вагацума, так званий феномен Канагава, що дає можливість диференціювати патогенні штами від непатогенних. Основними компонентами середовища є дефібріновані еритроцити людини та висока концентрація хлориду натрія. Сутність феномена полягає в тому, що патогенні для людини *V. parahaemolyticus* викликають чіткий гемоліз на кров'яному агарі з 7% NaCl. В даних умовах гемоліз викликають тільки штами з ентеропатогенними властивостями.

Вивчення нами гемолітичної активності парагемолітичних вібріонів, які були виділені від людей в різні роки, показало, що всі штами дають зону лізису на середовищі Вагацума, тобто є канагавопозитивними. Всі інші штами, виділені з навколишнього середовища, виявилися канагавонегативними, тобто вони не мають гемолізинів і це дає можливість стверджувати, що вони не володіють патогенними властивостями. Тест Канагава і на сьогоднішній день залишається актуальним в диференціації патогенних штамів *V. parahaemolyticus*, але потреба в еритроцитах людини з кожним днем ускладнює постановку метода в лабораторіях, тому необхідно знаходити альтернативні тести по визначенню вірулентних властивостей вібріонів. Саме ПЛР метод дає можливість замінити рутинні бактеріологічні методи та значно скоротити строки виявлення патогенних властивостей досліджуваних культур вібріонів.

Отже, за результатами наших досліджень по виявленню патогенних властивостей парагемолітичних вібріонів встановлено, що всі штами, які були виділені від людей, проявляли свої вірулентні властивості незалежно від часу виділення вібріонів, а саме, вони продукували прямий термостабільний TDH гемолізін, за який відповідає ген *tdh*, але не мали гену *trh*, який відповідає за продукування TRH гемолізину, та проявляли позитивну гемолітичну активність в тесті Канагава. Штами ж, виділені з навколишнього середовища, не мали в своєму геномі генів патогенності *tdh* або *trh*, не давали гемолізу на середовищі Вагацума, отже були канагавонегативні. Всі досліджені штами не давали гідролізу сечовини.

Проведені дослідження показали взаємозв'язок між geno- та фенотиповими властивостями парагемолітичних вібріонів, що в свою чергу дає можливість стверджувати, що для прискорення диференціації патогенних парагемолітичних вібріонів від непатогенних достатньо провести молекулярно-генетичні дослідження по виявленню генів патогенності *tdh* та *trh*.

Висновок

Для проведення диференціації патогенних і непатогенних парагемолітичних вібріонів паралельно з визначенням фенотипових ознак можна застосовувати молекулярно-генетичні дослідження по виявленню генів патогенності методом ПЛР, що дає можливість протягом 3-5 годин говорити про наявні або відсутні вірулентні властивості *V. parahaemolyticus*. Виявлення генетичних детермінант дає можливість прискорити ідентифікацію *V. parahaemolyticus*.

References

1. Deepanjali A., Sanath Kumar H. Seasonal Variation in Abundance of Total and Pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* Bacteria in Oysters along the Southwest Coast of India // *Appl Environ Microbiol.* – 2005. – Vol. 71. – N 7. – P. 3575-3580.
2. Park K.-S., Iida T., Yamaichi Y. Genetic characterization of DNA region containing the *trh* and *ure* genes of *Vibrio parahaemolyticus* // *Infect. Immun.* – 2000. – Vol. 68. – N 10. – P. 5742-5748.
3. Nair GB, Hormazabal JC. The *Vibrio parahaemolyticus* pandemic // *Rev Chilena Infectol.* – 2005. – V. 22. – N 2. – P. 125-130.
4. Nair G.B., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K. Global dissemination of *Vibrio parahaemolyticus* serotype O3:K6 and its serovariants // *Clin Microbiol Rev.* – 2007. – V. 20. – N 1. – P. 39-48.
5. Yuansha C., Colin S., Badger J. Comparative genomic analysis of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence // *BMC Genomics.* - 2011. - 12:294. - P. 1186 – 1199.
6. Tada J., Ohashi T. Detection of the thermostable direct hemolysin gene (*tdh*) and the thermostable direct hemolysin-related hemolysin gene (*trh*) of *Vibrio parahaemolyticus* by polymerase chain reaction // *Mol Cell Probes.* – 1992. – N6. – P. 477-87.

7. Honda T., Ni Y., Miwatani T. Purification and characterization of a hemolysin produced by a clinical isolate of Kanagawa phenomenon-negative *Vibrio parahaemolyticus* and related to the thermostable direct hemolysin // *Infect. Immun.* – 1988. – Vol. 56. – N 4. – P. 961-965.
8. Smolikova L. M., Golenischeva E. N. et al. Production of hemolysin TRH by urease-positive *Vibrio parahaemolyticus* in vitro. // *Materials of the Cholera Problem Committee.* – Rostov-on-Don. – 2011. – Vol. 24. – P. 138-142.
9. Nakaguchi Y., Okuda J., Iida T., Nishibuchi M. The urease gene cluster of *Vibrio parahaemolyticus* does not influence the expression of the thermostable direct hemolysin (TDH) gene or the TDH-related hemolysin gene // *Microbiol. Immunol.* – 2003. – Vol. 47. – N 3. – P. 233-239.
10. Golubyatnikov M. I., Zakharova V. A. et al. Decades of observation of the circulation of halophilic vibrios isolated by bacteriological laboratory CSES on WT in Illychivsk. // *Materials of science-practical conference.* – Illychivsk. - 2005. – P. 136-140
11. Padchenko A. G. Epidemiology of vibrioses and specific features of vibrio flora circulation on the territory of Ukrainian SSR. // *Autoref. thesis of cand. of med. sciences.* - Kiev. – 1986.
12. Microbiology and laboratory diagnostics of cholera, edited by M. S. Drozhevkin and V. N. Miliutin. - Rostov-on-Don, Rostov Book Press. – 1975. – P. 136.
13. Khaytovych A.B., Pidchenko N.N., Illychev Y.A. PCR in study of parahemolytic vibrios virulence // *From the materials of Russian academic and research conference on 110th anniversary of infectious diseases department of S. M. Kirov Military Medical Academy.* - St. Petersburg. - 2006. – P. 307-308.
14. Zulkifli Y., Alitheen N., Son R. Identification of *Vibrio parahaemolyticus* isolates by PCR targeted to the *toxR* gene and detection of virulence genes // *Intern. Food Research J.* – 2009. – Vol. 16. – P. 289-296.
15. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. *Molecular Biology.* - Moscow, Mir Press – 1984. – P. 479.

УДК 579.25:579.843](477)

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ПАТОГЕННОСТИ В *V. PARAHAEMOLYTICUS*, ВЫДЕЛЕННЫХ В ЮЖНЫХ РЕГИОНАХ УКРАИНЫ

Петренко Е.В., Алексеенко В.В., Лысенко З.А.

Изучение генетических детерминант *V. parahaemolyticus* показало взаимосвязь между гено- и фенотипическими свойствами парагемолитических вибрионов. Наличие в

геноме парагемолитических вибрионов генов патогенности *tdh* или *trh*, которые отвечают за продукцию гемолизина TDH и TRH, указывает на их вирулентные свойства, что в свою очередь проявляется вибрионами в гемолитической активности. Использование молекулярно-генетических исследований наравне с другими методами дифференциации *V. parahaemolyticus* дает возможность ускорить и усовершенствовать лабораторную диагностику вибрионов.

Ключевые слова: вибрионы, *V. parahaemolyticus*, галофилезы, гемолизины, гены патогенности.

RECOGNITION OF PATHOGENIC GENES IN *V. PARAHAEMOLYTICUS*, ISOLATED IN SOUTHERN REGIONS OF UKRAINE

Petrenko O. V., Alekseenko V. V., Lysenko Z. A.

Study of genetic determinants of *V. parahaemolyticus* showed a correlation between geno- and phenotypic attributes of parahemolytic vibrios. Presence of pathogenic genes *tdh* or *trh* in parahemolytic vibrios genome, which are responsible for TDH and TRH hemolysins production, indicates their virulent properties, which in turn are exhibited by vibrios in haemolytic activity. Application of molecular-genetic studies along with other methods of differentiation of *V. parahaemolyticus* allows for accelerating and improving its laboratory diagnostics.

Keywords: vibrios, *V. parahaemolyticus*, halophiloses, hemolysins, pathogenic genes.

УДК 579.25:579.843](477)

ВИЯВЛЕННЯ ГЕНІВ ПАТОГЕННОСТІ В *V. PARAHAEMOLYTICUS*, ВИДІЛЕНИХ В ПІВДЕННИХ РЕГІОНАХ УКРАЇНИ

Петренко О.В., Алексеєнко В.В., Лисенко З.А.

Вивчення генетичних детермінант *V. parahaemolyticus* показало взаємозв'язок між гено- та фенотиповими ознаками парагемолітичних вібрионів. Наявність в геномі парагемолітичних вібрионів генів патогенності *tdh* або *trh*, які відповідають за продукування гемолізинів TDH та TRH, вказує на їхні вірулентні властивості, що в свою чергу проявляється вібрионами в гемолітичній активності. Застосування молекулярно-генетичних досліджень поряд з іншими методами диференціації *V. parahaemolyticus* дає можливість прискорити та удосконалити їх лабораторну діагностику.

Ключові слова: вібриони, *V. parahaemolyticus*, галофільози, гемолізини, гени патогенності.