

Е.И. Иванова, С.М. Попкова, Ю.П. Джиоев, Е.Б. Ракова

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНОВ ПАТОГЕННОСТИ, КОДИРУЮЩИХ СПОСОБНОСТЬ К ТОКСИНООБРАЗОВАНИЮ, У ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI*, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КИШЕЧНОГО БИОТОПА ДЕТЕЙ

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН (Иркутск)

Шига токсины (*stxs*) – факторы патогенности энтерогеморрагических *E.coli*. Шига-токсин продуцирующие кишечные палочки признаны в качестве главного пищевого патогена, который вызывает тяжелые заболевания, такие как гемолитико-уремический синдром (ГУС). В статье представлены сведения о видовом составе основных условно-патогенных микроорганизмов, населяющих кишечный биотоп. С помощью ПЦР исследовали 96 штаммов разных типов *E. coli*, выделенных у обследованных детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, на наличие генов, кодирующих способность к токсинообразованию. Оба гена патогенности чаще присутствовали в геноме *E. coli* с нормальной ферментативной активностью (*stx1* – 24,2 %, *stx2* – 9,1 %). Присутствие генов *stx1* и *stx2* в разных биохимических вариантах *E. coli* позволяет констатировать факт наличия резервуара потенциальной патогенности в непатогенных формах *E. coli*. Кишечная микрофлора – неотъемлемая часть каждого индивидуума. Необходимо дальнейшее изучение ее функций, состояний, приводящих к нарушению качественного и количественного состава микроорганизмов, заселяющих желудочно-кишечный тракт человека, а также исследование их патогенного потенциала.

Ключевые слова: микробиоценоз, шига-подобный токсин, *Escherichia coli*, гены патогенности

DETECTION OF PATHOGENICITY GENES ENCODING ABILITY TO TOXIGENESIS IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATED FROM THE CHILDREN INTESTINAL BIOTOPE

E.I. Ivanova, S.M. Popkova, Yu.P. Dzhioyev, E.B. Rakova

Scientific Centre of Family Health and Human Reproduction Problems SB RAMS, Irkutsk

Shiga toxins (*stxs*) are the virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* has been recognized as an important food-borne pathogen that causes severe diseases such as a hemolytic uremic syndrome (HUS). Provides information about the species composition of the major opportunistic organisms that inhabit this biotope. Using polymerase chain reaction (PCR) 96 strains of *E. coli* were examined for the presence of genes *stx1* and *stx2* coding the ability to toxigenesis. They were isolated from the children with functional disorders of the gastro-intestinal tract. Both pathogenicity genes present in the genome of *E. coli* with normal enzyme activity more often (*stx1* in 24,2 % of genomes, *stx2* in 9,1 %). The presence of *stx1* and *stx2* genes in different biochemical variants of *E. coli* allows to ascertain the fact of presence of a potentially pathogenicity reservoir in non-pathogenic forms of *E. coli*. Intestinal microflora is integral part of each individual. Further studying of its functions, the states interfering qualitative and quantitative composition of microorganisms, colonizing human gastrointestinal tract, as well as the pathogenic potential.

Key words: microbiocenosis, shiga-like toxin, *Escherichia coli*, pathogenicity genes

Популяции микроорганизмов, вступая в сложные взаимоотношения, конкурентные или кооперативные, при заселении различных частей органов, тканей макроорганизма формируют его специфический «микросимбиоз» [2, 10]. Изменения важных характеристик вирулентности участников микросимбиоза, наряду с их количественной оценкой, может существенно сказаться на течении заболеваний, осложненных дисбиозом кишечника [3, 9].

Escherichia coli, являясь постоянным обитателем кишечника человека, входит в состав его микробиоценоза. В норме кишечная палочка выполняет ряд полезных для хозяина функций: синтезирует витамины и аминокислоты, поддерживает колониальную резистентность кишечника, обеспечивает антигенную стимуляцию местного иммунитета [1, 5]. Между тем, при нарушениях микрoэкологического характера *E. coli* способна резко наращивать не только свое количественное присутствие, но и проявлять патогенные свойства, что играет важную роль в патогенезе развития дисбиоза кишечника. Постоянный антигенный дрейф, наличие или приобретение раз-

личных факторов патогенности (токсины, гемолизин, некротизирующий и гемолитический факторы, сидерофоры) затрудняют проведение эффективной специфической профилактики эшерихиоза, что побуждает не только постоянно осуществлять мониторинг данной инфекции, но изучать и контролировать биологические свойства возбудителя (прежде всего его антибиотикорезистентность и наличие различных маркеров патогенности) [6, 11].

Для эшерихий патогенность не является видовым признаком и не связана с конкретной серогруппой. Они способны реализовать свой патогенный потенциал и вызывать нарушения в организме человека, ограниченные только теми генетическими детерминантами патогенности, которыми обладает конкретный штамм *E. coli* [7]. Так, известно, что ключевым поражающим фактором энтерогеморрагических эшерихий являются шигатоксины – *stx1* и *stx2* [13].

В связи с этим, **цель исследования** – выявление генов, кодирующих способность к шигатоксинообразованию у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и атипичных ее форм, как резервуара

потенциальной патогенности в составе индигенной микробиоты кишечника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На дисбиоз кишечника было обследовано 72 ребенка (от рождения до 13 лет) с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта (абдоминальный синдром, расстройства дефекации, расстройства билиарного тракта в течение более двух недель). При микробиологическом анализе копрологических проб использовали общепринятый метод [8]. Для исследования были выделены разные типы *E. coli*: с нормальной ферментативной активностью (66 аутоштаммов), со слабой ферментативной активностью (18 аутоштаммов) и с гемолитической активностью (12 аутоштаммов). По культурально-ферментативным свойствам и антигенным характеристикам исследуемые штаммы *E. coli* являлись типичными представителями индигенной микрофлоры рода *Escherichia*. Всего исследовано 96 культур *E. coli*.

Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры, выращенной при 37 °С на среде Мюллера – Хинтона (НИИ центр фармакотерапии, ЗАО, г. Санкт-Петербург). Материал, полученный в результате нескольких касаний газона петлей, помещали в 200 мкл Tris-EDTA (TE) буфера в пробирки типа «Eppendorf» и ресуспендировали с помощью вортекса. Выделение ДНК из суспензии осуществляли с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (Россия, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В пробирки «Eppendorf» вносили сорбент универсальный и лизирующий раствор в необходимых количествах согласно инструкции. После чего вносили 100 мкл образца, перемешивали на вортексе и инкубировали 5 мин в термостате при 65 °С. После окончания инкубации содержимое повторно перемешивали на вортексе и оставляли при комнатной температуре на 2 мин. Далее осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 10 тыс. об/мин в течение 30 сек. Надосадочную жидкость удаляли в колбу-ловушку с помощью вакуумного отсасывателя. После чего в пробы добавляли 1 мл отмывочного раствора, перемешивали на вортексе, вновь центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Затем помещали пробирки с открытыми крышками в термостат на 5–10 мин для подсушивания сорбента, добавляли 100 мкл TE-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента и помещали в термостат на 5 мин. Последний этап – центрифугирование при 12 тыс. об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК.

Аmplification проводили с использованием коммерческого набора AmpliSens-200-1 (Россия, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Реакционную смесь доводили до объема 15 мкл, которая включала: 3 мкл 5 × ПЦР буфера, 1,5 мкл MgSO₄, 0,3 мкл dNTPmix, 7,2 мкл H₂O, по 1 мкл F-R-праймеров, 0,05 мкл Taq-полимеразы и 2 мкл хромосомной ДНК исследуемого микроорганизма. ПЦР проводили с двумя парами специфических праймеров, определяющими наличие генов, ассоциированных с «островами» патогенности:

stx1 и stx2 (отвечающих за продукцию шига-подобных токсинов), иначе называемых веро-токсинами (Vero-toxin I и II, VT1 и VT2). Характеристика и структура праймеров взята из литературных источников (табл. 1) [15].

Таблица 1
Характеристика праймеров, используемых в работе [15]

Ген		Олигонуклеотидные последовательности (5'–3')	Размер ампликона (п.н)	Температура отжига (°С)
stx1	F	CGCTGAATGTCATTCCGCTCTGC	302	55
	R	CGTGGTATAGCTACTGTCAACC		
stx2	F	CTTCGGTATCCTATTCCCGG	516	55
	R	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC		

Термическая программа цикла амплификации проводилась на амплификаторе (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycles) и осуществлялась методом определения оптимальных программ после обработки условий, при которых результат был наиболее четким. Ниже приведен обобщенный протокол амплификации: 1) первоначальная денатурация 94 °С 2 мин; 2) 35 циклов: 94 °С 1 мин, 55 °С 1 мин, 72 °С 1 мин; 3) финальная элонгация 72 °С 3 мин; 4) охлаждение до 4 °С.

Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве буферной системы использовали трис-ацетатный буфер. Электрофорез проводили при следующем режиме: 100 В, 50 мА, 40–50 мин. В качестве маркера использовали O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder («Fermentas», Литва), в качестве отрицательного контроля использовали реакционную смесь, не содержащую ДНК. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете и документировали с помощью программы inVCR на трансиллюминаторе UVT 1 biokom. Для выявления долевого участия разных видов в структуре биоценоза использовали показатель постоянства (с), определяемый по формуле $c = (p/P) \times 100 \%$, где: с – показатель постоянства; p – число наблюдений, содержащих изучаемый вид; P – общее число наблюдений. При $c > 50 \%$ вид относится к разряду постоянных; при $c = 25-50 \%$ – к добавочным; $c < 25 \%$ – к случайным [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Спектр кишечной микробиоты обследованных детей был представлен различными видами микроорганизмов с показателем постоянства (с): для *Enterococcus spp.* – 62,5 %, *Klebsiella spp.* – 47,2 %, *Staphylococcus spp.* – 27,8 %, *E. coli* со слабой ферментативной активностью – 26,4 %, *Candida spp.* – 19,4 %, *E. coli* с гемолитической активностью – 16,7 %, *Clostridium spp.* – 15,3 %, *Enterobacter spp.* – 7,0 %, *Proteus spp.* – 4,2 %, *Citrobacter spp.* – 2,8 % и *Pseudomonas spp.* – 1,4 %. Таким образом, для детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта

отмечается наиболее значимая роль энтерококков в составе микробиоценоза ($c = 62,5 \%$) по сравнению с другими условно-патогенными микроорганизмами, которые в большинстве случаев попадают в категорию случайных видов ($c = 19,4-1,4 \%$), за исключением *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.* и *E. coli* со слабой ферментативной активностью, попадающих в группу добавочных видов. В группе обследованных детей оказалась довольно значимой доля лиц (48,6 %) с дефицитом бифидобактерий (титр $< 10^{7-6}$ КОЕ/мл). Каждый десятый ребенок (9,7 %) имел дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, а дефицит лактобактерий был отмечен только в 2,8 % случаев.

Из 96 образцов культур *E. coli*, исследованных в ПЦР, только 19 (19,8 %) проб оказались положительными на наличие гена *stx1* и 8 (8,3 %) – на наличие гена *stx2*.

Оба гена патогенности чаще присутствовали в геноме *E. coli* с нормальной ферментативной активностью (*stx1* – 24,2 %, *stx2* – 9,1 %) по сравнению с атипичными ее формами (для вариантов со слабой ферментативной активностью *stx1* определялся в 11,1 %, *stx2* в 5,5 %; для форм с гемолитической активностью *stx1* – 8,3 %, *stx2* – 8,3 %) (рис. 1).

Одновременное присутствие данных генов патогенности у одного типа микроорганизма не наблюдалось. Но у одного ребенка в кишечнике определялись одновременно веротоксин 1 у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и у *E. coli* со слабой ферментативной активностью; у другого – веротоксин 1 у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и у *E. coli* с гемолитической активностью.

Чаще всего (84,2 % случаев) веротоксин 1 в образцах *E. coli* выявлялся на фоне повышенной плотности представителей условно-патогенной микрофлоры в биотопе, в 10,5 % – при микрoэкологической норме и в 5,3 % – при отсутствии условно-патогенной микрофлоры, но на фоне дефицита индигенной флоры. Веротоксин 2 чаще встречался в кишечнике при отсутствии условно-патогенной микрофлоры (62,5 %), чем при ее индикации (25,0 %) и еще реже при зубиозе (12,5 %)

Наличие гена веротоксина 1 у *E. coli*, выделенной от детей первого года жизни, регистрировалось в 31 % случаев, что почти в 2 раза чаще, чем у детей старшей возрастной группы. При этом частота встречаемости веротоксина 2 у *E. coli*, изолированных от детей старше года была выше в 4 раза (14 %) по сравнению с детьми до года (табл. 2).

Таблица 2
Частота встречаемости веротоксина в зависимости от возраста детей

Выборка детей	Гены патогенности	
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>
Дети до года (29 чел.)	31 %	3,5 %
Дети после года (43 чел.)	19 %	14 %

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Острые кишечные инфекции, обусловленные вегетацией шигатоксин-продуцирующих кишечных палочек различных серогрупп, включая *E. coli* O157:H7, регистрируются практически повсеместно [14]. Однако кроме *E. coli* O157:H7 группа шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli* включает большое количество шигатоксин-продуцирующих кишечных палочек других серотипов, частота встречаемости и генетическая характеристика которых на территории РФ практически не изучена [12]. Данные, полученные в ходе нашей работы по изучению вышеперечисленных факторов вирулентности в исследованной нами региональной выборке аутоштаммов, свидетельствуют о циркуляции шигатоксин-продуцирующих штаммов *E. coli*, при этом не относящихся к серогруппе O157, а являющихся представителями индигенной микрофлоры, но при этом обладающих набором изученных генов патогенности.

Наличие одного гена (веротоксин 1) в разных типах *E. coli*, выделенных из одного биотопа, свидетельствует о возможной горизонтальной передаче хромосомного генетического материала в кишечном микробиотопе.

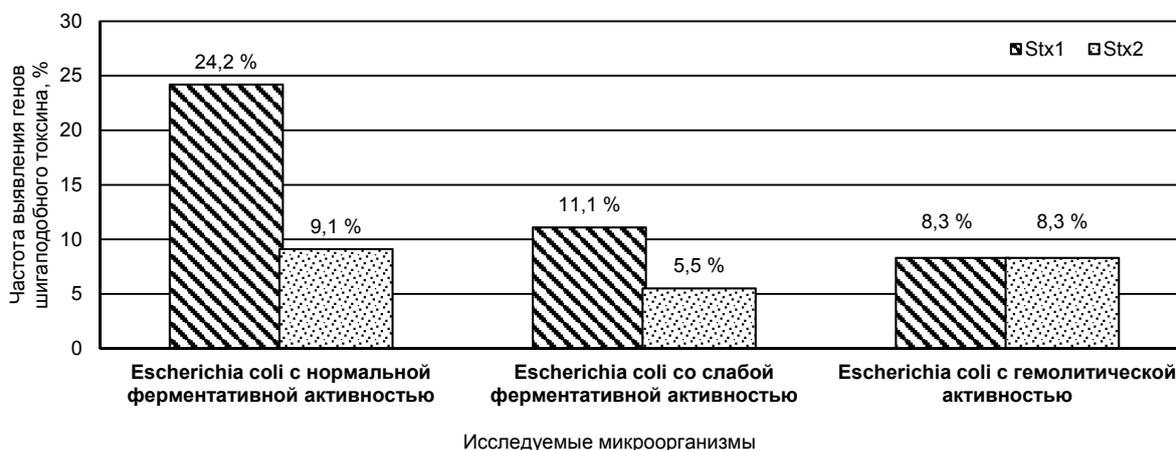


Рис. 1. Выявление генов шигаподобного токсина в разных типах *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей.

Штаммы с наличием исследуемых генов, выявленные при зубиозе кишечной биоты, по всей видимости, способны к персистенции в кишечнике человека без развития патологического процесса, но могут быть потенциальными возбудителями, например, урологических заболеваний.

Таким образом, присутствие генов *stx1* и *stx2* в разных биохимических вариантах *E. coli*, как по отдельности, так и в сочетаниях, позволяет констатировать факт наличия резервуара патогенности у непатогенных эшерихий, о и чем свидетельствует обнаружение у них, данных генетических маркеров.

Выявляемость исследуемых генов у детей в зависимости от возраста требует дальнейшего изучения.

Накопленные данные свидетельствуют о необходимости расширения спектра исследований для максимально полного выявления патогенного потенциала микроорганизмов при исследовании на дисбиоз у лиц с любой патологией.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ассоциации видов и генов патогенности бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из разных биотопов у жителей г. Иркутска / С.М. Попкова [и др.] // Известия ИГУ, Серия «Биология. Экология». – 2011. – Т. 4, № 1. – С. 14–24.
2. Ассоциативный симбиоз / О.В. Бухарин [и др.]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2007. – 260 с.
3. Аклан Набила Ш.М. Распространенность и биологические свойства клебсиелл в условиях техногенной нагрузки крупного промышленного города: автореф. дис. ... канд. биол. наук. – Волгоград, 2006. – 23 с.
4. Захарова Е.А., Азизов И.С. Микроэкологическая характеристика кишечного микробиоценоза часто болеющих детей // Журн. микробиол. – 2012. – № 2. – С. 63–68.
5. Караев Я.М. Протективные и иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина: автореф. дис. ... канд. ветерин. наук. – Краснодар, 2008. – 25 с.
6. Мамбетова Э.Ф. Сравнительная характеристика некоторых биологических свойств монокультур и сокультивируемых вариаций бактерий рода *Serratia* и *Staphylococcus aureus*: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Челябинск, 2007. – 21 с.
7. Молекулярно-генетическая характеристика факторов патогенности *E. coli*, выделенных из операционных ран различных классов / Е.Ф. Лайман [и др.] // Междунар. журн. эксперимент. образования. – 2012. – № 5. – С. 84–85.
8. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004-2003. Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника». Утв. 09.06.03.
9. Постникова Е.А. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте // Журн. микробиол. – 2004. – № 1. – С. 62–67.
10. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе // Журн. общ. биол., 2001. – Т. 62, № 6. – С. 472–495.
11. Характеристика генов патогенности популяций *Escherichia coli*, выделенных от детей г. Иркутска / Е.И. Иванова [и др.] // Матер. III междунар. научно-практич. конф. «Экология, здоровье, спорт» – Чита: ЗабГУ, 2011. – С. 110–111.
12. Шабанова Н.А., Бондаренко В.М. Различия по набору генов патогенности у штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих шига-подобные токсины // Журн. микробиол. – 2009. – № 5. – С. 4–8.
13. A Case of a shiga toxin producing *Escherichia coli* / Seung-Hak Cho [et al.] // *Yonsei Med. J.*, 2011. – Vol. 52 (6). – P. 1039–1043.
14. Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview // *J. Anim. Sci.* – 2007. – Vol. 85. – P. 45–62.
15. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain / M. Blanco [et al.] // *J. of clinical microbiology.* – 2003. – Vol. 41, N 4. – P. 1351–1356.

Сведения об авторах

Иванова Елена Иннокентьевна – младший научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3; e-mail: ivanova.iem@gmail.com)

Попкова София Марковна – д.б.н., зав. лабораторией микроэкологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3)

Джиоев Юрий Павлович – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии и генетической диагностики ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3)

Ракова Елена Борисовна – к.б.н., научный сотрудник лаборатории микроэкологии ФГБУ «НЦ ПЗСРЧ» СО РАМН (664025, г. Иркутск, ул. Карла Маркса, 3)