

**ДЕТЕКЦИЯ НЕКОТОРЫХ ГЕНОВ *ESCHERICHIA COLI*, КОДИРУЮЩИХ
ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ**

**Иванова Е.И., Долгих В.В., Джюев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М.,
научный руководитель д-р биол. наук Попкова С.М.**

**Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр проблем
здоровья семьи и репродукции человека» Сибирского отделения Российской академии
наук**

Желудочно-кишечные заболевания остаются серьезной проблемой общественного здравоохранения в развивающихся странах. Штаммы кишечной палочки являются одними из наиболее важных причин бактериальных диарей у детей. По крайней мере, пять категорий диареогенных штаммов *E.coli* являются общепризнанными на основании различных эпидемиологических и клинических особенностей, специфических детерминант вирулентности.

Шига-токсин продуцирующие кишечные палочки (STEC), также называемые веротоксин продуцирующие кишечные палочки (VTEC), возникли как возбудители, которые способны вызывать пищевые отравления и тяжелые и потенциально смертельные болезни. Они являются основной причиной гастроэнтерита, которые могут быть осложнены геморрагическим колитом или гемолитико-уремическим синдромом, который является основной причиной острой почечной недостаточности у детей.

Энтероагрегативные *E.coli* также связаны с затяжной диареей во многих развивающихся странах и идентифицируются по их способности производить агрегационное прикрепление (AA) на поверхности Hep-2 и HeLa клеток. У них обнаружены специфичные для агрегационной адгезии плазмиды (рекомбинантные), рестриционным сайтом которых является *EcoRI-PstI*.

На основании выше изложенного, цель исследования – выявление генов, кодирующих шига-подобные токсины (*stx1* и *stx2*) и *EcoRI-PstI* фрагмент плазмиды *pCVD432* у разных фенотипических вариантов *E.coli*, выделенных у детей с функциональными нарушениями (ФН) желудочно-кишечного тракта (ЖКТ).

Для выявления данных генов использовали выборку из 202 образцов *E.coli* с нормальной ферментативной активностью (НФА), 60 – *E.coli* со слабой ферментативной активностью (СФА) и 24 – *E.coli* с гемолитической активностью (ГА). Культивированные образцы, выделенные от детей (225 чел.) в возрасте от рождения до 15 лет с признаками ФН ЖКТ. Из 286 образцов ДНК, выделенных из аутоштаммов культур *E.coli*, и исследованных в ПЦР, 32 пробы (11,2±1,8%) оказались положительными на наличие гена *stx1*, 14 (5,0±1,3%) – на наличие гена *stx2* и 10 (3,5±1,1%) – на наличие гена фрагмента плазмиды *pCVD432*. Данные гены патогенности, чаще присутствовали в геноме *E.coli* с НФА, вегетирующей в биотопе детей с ФН (*stx1* – 12,9±2,4%, *stx2* – 5,0±1,5%, *pCVD432* – 5,0±1,5%) по сравнению с атипичными ее формами. Для форм со СФА *stx1* определялся в 8,3±3,5%, *stx2* в 5,0±2,8%; для форм с ГА *stx1* – 4,2±4,1%, *stx2* – 4,2±4,1%. Ген фрагмента плазмиды *pCVD432* в геноме атипичных *E.coli* не обнаруживался (рис. 1).

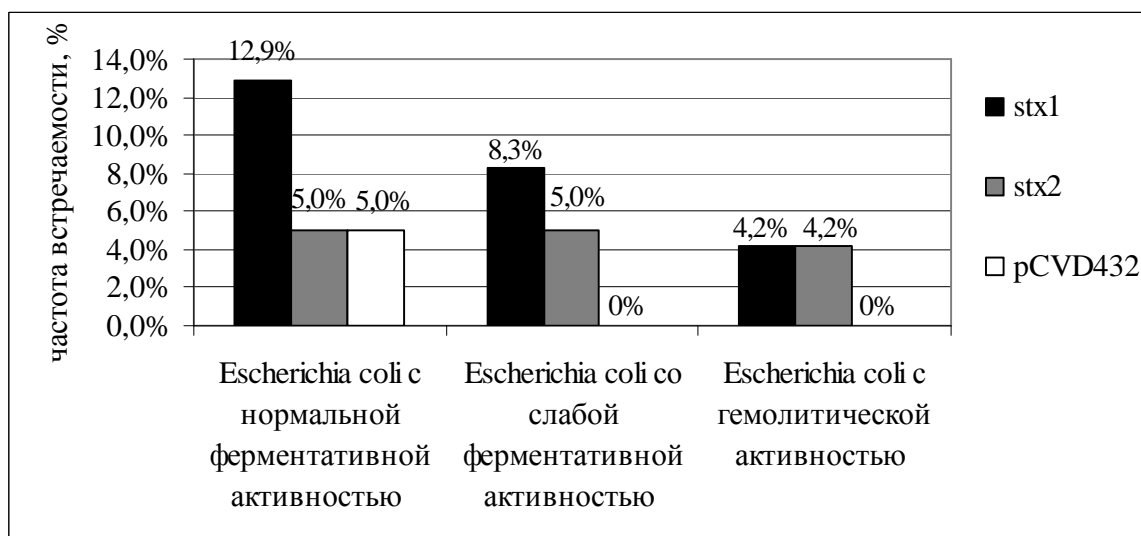


Рис. 1. Частота встречаемости генов патогенности в различных фенотипических группах *E.coli*

Далее мы провели анализ выявляемости изучаемых генов патогенности в геноме *E.coli* в зависимости от плотности популяции данного микроорганизма в кишечном биотопе индивида. Как правило, изучаемые гены патогенности чаще определялись на фоне высокой популяционной плотности эшерихий ($10^7 - 10^8$ КОЕ/г), на 2-3 порядка превышающих зарегистрированную нами их низкую концентрацию [ОСТ, 2003]. Было установлено, что для *E.coli* с НФА при концентрации микроорганизма в кишечнике детей ниже нормы ($10^5 - 10^6$ КОЕ/мл) выявляемость *stx1* и *stx2* в геноме данных микроорганизмов составляло 1,0% соответственно. Однако при повышенной на 2-3 порядка концентрации *E.coli* с НФА в кишечнике детей ($10^7 - 10^8$ КОЕ/мл) частота определения веротоксина 1 и 2 типа увеличивалась и составляла для *stx1* – 5,5 - 6,4%, *stx2* – 1,5 - 2,5%, частота выявления гена *pCVD432* при этом составляла 2, 0% - 3,0%.

В двух случаях в одном биотопе определялся одновременно *stx1* как у *E.coli* с НФА, так и у *E.coli* СФА; в другом биотопе – *stx1* у *E.coli* с НФА и с ГА, что, возможно, свидетельствует о горизонтальной передаче генетического материала.

Из всех изученных генов, детерминирующих патогенность, 90,2% обнаружены в виде одиночных генов, 9,8% – в сочетании по два гена. Так 2-х компонентные ассоциации (*stx1* + *pCVD423* – 5,9%, *stx2* + *pCVD423* – 3,9%) регистрировались только у *E.coli* с НФА.

Частота распространения генов анализировалась в зависимости от микробиологического статуса кишечного биотопа. Ген *stx1* выявлялся при микробиологическом равновесии в кишечнике в 6,7% случаев, что в 2 раза реже, чем *stx2* (14,2%, $p < 0,05$). При движении от состояния сбалансированного микробиологического статуса к дисбиотическому частота встречаемости веротоксинов в геноме *E.coli* возрастала. Так, частота встречаемости гена *stx1* увеличилась в 3 раза в ДНК *E.coli*, вегетирующей в кишечнике на фоне дефицита бифидобактерий, и в 11 раз при более глубоком дисбиозе с присутствием в биотопе условно-патогенной биоты (от 6,7% при эубиозе, $p < 0,05$). Выявляемость ампликонов, специфичных гену *stx2* была в 2 раза выше, чем гена *stx1* при дефицитном состоянии индигенной биоты, но в 1,7 раз ниже частоты детекции веротоксина 1 на фоне индикации в биотопе условно-патогенной микробиоты в

диагностически значимой концентрации ($>10^4$ КОЕ/г). Число штаммов, содержащих *EcoRI-PstI* - фрагмент плазмиды *pCVD432* (*pCVD432*) было одинаковым как при отсутствии микробиологических нарушениях (эубиозе), так и при неглубоких микробиологических отклонениях (по 20,0%). Однако при более серьезных нарушениях микробиоты частота их резко возрастала до 60,0%.

Частота встречаемости генов патогенности в геномах разных фенотипических вариантов эшерихий анализировалась также в зависимости от возраста детей. Так, наличие гена веротоксина 1 у *E.coli*, выделенной от детей до года, определялось в 15,3% случаев, что почти совпадало с таковой у детей старшей возрастной группы. При этом частота встречаемости веротоксина 2 у *E.coli* в группе детей старше года была выше в 2 раза (7,9%) по сравнению с группой детей до года (3,5%, $p < 0,05$). У детей до года, выявление *stx1* регистрировалось значительно чаще по сравнению с *stx2*, что, вероятно, можно объяснить следствием формирования микробиоценоза кишечника в условиях сукцессии кишечного тракта (последовательной сменой видов и штаммов бактерий). У детей старшего возраста оба веротоксина определялись с частотой, достоверно не отличающейся друг от друга (12,1% и 7,9%), что, возможно, обусловлено более стабильной видовой структурой кишечной микробиоты. Выявление веротоксинов в геноме аутоштаммов *E.coli*, выделенных у детей в разного возраста, является также одним из обоснованием проявления ФН ЖКТ у детей. Частота встречаемости искомым ампликонов в геноме кишечных палочек, выделенных от детей младшей и старшей возрастных групп, при использовании праймеров к *pCVD432* была низкой и составляла: 4,7% и 2,9% соответственно по группам.

Данные, полученные в ходе работы по изучению факторов патогенности у аутоштаммов *E.coli*, свидетельствуют о циркуляции различных детерминант патогенности у *E.coli*, не относящейся к патогенным серогруппам, но обладающих набором генов патогенности. Возможно, это связано с тем, что рутинная лабораторная диагностика, основанная на определении принадлежности к определенной серологической группе, не позволяет достоверно оценить этиологическую значимость изолятов *E.coli*.

Особый интерес в данной работе представляет выявление веротоксинов (1 и 2 типа) в аутоштаммах типичных *E.coli*. Так, острые кишечные инфекции, обусловленные вегетацией шигатоксин-продуцирующих кишечных палочек (STEC) различных серогрупп, включая *E.coli* O157:H7, регистрируются практически повсеместно. Однако, кроме *E.coli* O157:H7, в группу шигатоксин-продуцирующих штаммов *E.coli* включают большее количество шигатоксин-продуцирующих кишечных палочек других серотипов, частота встречаемости и генетическая характеристика которых на территории РФ практически не изучена. Интерес научной и практической медицинской общественности к шигатоксин-продуцирующим *E.coli* резко возрос в 2011 году, когда Германия пережила крупнейшую вспышку STEC - случаев за всю историю. Как показали эпидемиологические и генетические исследования, штаммы, выделенные при этой вспышке, относились к энтероагрегативной геморрагической кишечной палочке (ЕАНЕС) O104:H4, продуцирующей шига-токсин 2 (*stx2*). Расшифровка последовательностей генома возбудителя показала, что произошла клональная вспышка ЕАНЕС, в штаммах которых носителями факторов вирулентности являлись плазида *rAA* и умеренные лямбдовидные фаги. Предполагается, что из неизвестного источника эпидемические штаммы приобрели лямбдовидный профаг, несущий ген шига токсина, и одновременное обладание двумя этими мобильными элементами могло способствовать существенному повышению факторов вирулентности ЕАНЕС.

Выявляемость ассоциаций генов в *E.coli* с нормальной ферментативной активностью и в атипичных *E.coli* на фоне дефицитного состояния индигенных представителей микроорганизмов, с преобладанием условно-патогенной биоты, вероятно, связана с особенностями изучаемого биотопа детей с ФН ЖКТ. И именно при таких микрoэкологических состояниях частота встречаемости генов патогенности, по нашим данным, выше, нежели при эубиозе. Так же возможно, *E.coli* с ассоциацией генов патогенности имели селективное преимущество в условиях дефицита бифидобактерий, т.е. в условиях сниженной популяционной антагонистической активности бифидобактерий.

Генетические маркеры веротоксинов у детей с ФН ЖКТ распространяются быстрее, чем плазида (*pCVD432*) или ее фрагмент (*EcoRI-PstI*), что возможно связано с большей возможностью фагов интегрироваться в геном и распространяться с помощью горизонтального переноса от условно-патогенных микроорганизмов (которые не выделяются у здоровых детей) в геном нормальной *E.coli*. Либо это связано с относительно простой генетической организацией плазмид (неконъюгативные плазмиды), что отличает их от конъюгативных плазмид, которые имеют более крупные размеры и наряду с генетической областью, контролирующей их репликацию, содержат также так называемую *tra*-область (англ. transfer – перенос). Эта область определяет способность клетки, содержащей плазмиду, быть генетическим донором, т.е. вступать в конъюгацию с другой клеткой (реципиентом) и передавать ей свой генетический материал (плазмидную либо хромосомную ДНК). Под контролем *tra*-генов синтезируются поверхностные «половые» ворсинки (F-пили) клетки-донора, необходимые для ее конъюгации с клеткой-реципиентом, а также ферменты, обеспечивающие метаболизм ДНК в процессе конъюгации. Неконъюгативные плазмиды обычно не содержат *tra*-области и поэтому не могут самостоятельно передаваться из одной клетки в другую.

Обнаружение генетических детерминант *stx1*, *stx2*, *pCVD432* и появление комбинаций генов позволяет обсуждать наличие потенциальной патогенности данных аутоштаммов *E.coli* и участие их в усугублении функциональных нарушений ЖКТ, прогнозировать появление штаммов с новыми свойствами. Что говорит о важности проведения дифференциальной молекулярно-генетической диагностики штаммов *E.coli* даже в случаях отсутствия явных микробиологических нарушений, но с функциональными нарушениями ЖКТ.