

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА КАК МЕТОД ОЦЕНКИ ЭПИДЕМИЧЕСКОЙ ЗНАЧИМОСТИ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ХАРАКТЕРИСТИКИ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ O1, ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В УКРАИНЕ

Хайтович А.Б.^{1,2}, Кирьякова Л.С.^{1,2}, Ильичев Ю.А.¹, Шипулин Г.А.³, Яцышина С.Б.³

¹ Крымская противочумная станция Министерства здравоохранения Украины, Симферополь, Украина, ² Крымский государственный медицинский университет им. С.И. Георгиевского, Симферополь, Украина, ³ Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

Введение

Одной из существенных особенностей 7-ой пандемии является то, что циркулирующие холерные вибрионы имеют различную эпидемическую значимость, которая определяется отличиями в способности к выработке экзотоксина и адсорбции на слизистой эпителия. Реализация патогенности в организме человека возбудителем холеры определяется присутствием в геноме двух основных групп генов. Основная роль в эпидемической значимости (способности вызывать эпидемические осложнения) холерных вибрионов принадлежит генам патогенности: гену токсинообразования – stx и гену, кодирующему пили адгезии, – tcp. Ген toxR координирует экспрессию (репрессию) генов патогенности. В Украине токсигенные (содержащие stx-ген) штаммы холерных вибрионов O1 периодически выделяются от людей и параллельно из объектов окружающей среды чаще в годы эпидемических осложнений [3, 4].

Для изучения биологической характеристики и достоверности идентификации необходимо изучение генов, определяющих основные видовые признаки холерных вибрионов: Hly – ген гемолизобразования, определяющий видовую принадлежность к виду *Vibrio cholerae*, Wbet – ген, определяющий принадлежность к серогруппе O1, Wbef – ген, определяющий принадлежность к серогруппе O139.

Это указывает, что важнейшей составляющей слежения за циркуляцией холерных вибрионов является необходимость изучения молекулярно-генетической характеристики штаммов, изолированных от людей и из объектов окружающей среды.

Цель исследования

Изучение эпидемического потенциала и микробиологической характеристики холерных вибрионов O1, циркулирующих в Украине с помощью молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Определение генов *ctx*, *tcp*, *Hly*, *Wbet*, *WbeF* и *toxR* у штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы биовара эльтор проводилось методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующих праймеров.

На гены *ctx*, *tcp* и *toxR* изучено 2428 штамма холерных вибрионов O1, в том числе 1482 – от людей и 956 – из окружающей среды. На гены *Hly*, *Wbet*, *WbeF* – 74 культуры, изолированные из объектов окружающей среды.

Аmplификация осуществлялась на аппаратах: «Терцик», «Perkin Elmer» по специальным программам. Обработка проб для исследования и постановка ПЦР проводились по общепринятым методикам и регистрировались видеокамерой на ПК [1, 2].

Результаты

Изучение наличия генов патогенности (*ctx*, *tcp*) и гена, координирующего экспрессию генов патогенности (*toxR*) у штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор, выделенных в Украине от людей за период с 1991 по 2006 г., показало, что все изученные штаммы имели хотя бы один из указанных генов.

На наличие генов, определяющих принадлежность к виду *Vibrio cholerae* (*Hly*), серогруппам O1 и O139 (*Wbet*, *WbeF*) выборочно исследовано 74 штамма, изолированных из объектов окружающей среды, из числа которых ген *Hly* обнаружен у всех изученных культур, что подтверждает достоверность идентификации холерных вибрионов. Ген *Wbet* обнаружен только у 24 штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы (32 %), что свидетельствует о циркуляции в Украине измененных по биологическим свойствам холерных вибрионов. Полученные данные подтверждаются результатами изучения комплекса биологических свойств бактериологическим методом, которые определили штаммы холерных вибрионов не обладающие геном *Wbet* как RO-формы. Ген *WbeF* среди изученных штаммов выявлен у одной культуры, которая была идентифицирована как холерный вибрион O139 серогруппы.

При анализе результатов определения генов патогенности холерных вибрионов O1 серогруппы биовара эльтор, установлено, что в Украине штаммы, изолированные от людей и из объектов окружающей среды, имеют различные наборы генов. При этом культуры, изолированные от людей имели 4 варианта генетических сочетаний: *ctx*, *tcp* и *toxR* (93 %); *tcp* и *toxR* (1,8 %); *toxR* (4,3 %); *ctx*, *tcp* (0,1 %) штаммов. Ген *ctx* встречался у 93,1 % штаммов в 2-х вариантах сочетаний – *ctx*, *tcp*, *toxR* и *ctx*, *tcp*. Ген *tcp* был выявлен у 94,9 % штаммов в 3-х вариантах сочетаний – *ctx*, *tcp*, *toxR*; *ctx*, *tcp* и *tcp*, *toxR*. Ген *toxR* был выявлен у 99,1 % штаммов в 3-х вариантах сочетаний – *ctx*, *tcp*, *toxR*; *tcp*, *toxR* и *toxR*.

Культуры от людей, в которых обнаружены гены:

- *ctx*, *tcr* и *toxR* – преимущественно в годы эпидемических осложнений (1991, 1993-1995 гг.) в Херсонской, Днепропетровской, Николаевской, Запорожской, Донецкой, Луганской областях и АР Крым. У больных заболевание протекало в тяжелой форме, отмечались летальные случаи;
- *tcr* и *toxR* – в годы, когда регистрировались групповые случаи заболевания (1995, 1999 гг.) в Донецкой области;
- *toxR* – в период эпидемического благополучия и широкой циркуляции в объектах окружающей среды (1991 г., Запорожская область, (2001, 2003 гг., Запорожская, Одесская, Днепропетровская, АР Крым) выделены от людей легкими клиническими формами острых кишечных заболеваний (вибрионосители);
- *ctx*, *tcr* – штаммы с изменными свойствами, в геноме произошли мутации, о чем свидетельствует отсутствие регуляторного гена *toxR*. Вероятнее всего, это не жизнеспособные формы холерного вибриона, которые не могут адаптироваться к изменениям в окружающей среде.

Изучение аналогичных генов у штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор, выделенных из объектов окружающей среды за период с 1989 по 2006 г., показало, что в Украине циркулировали штаммы, имеющие 3 различные сочетания генов: *ctx*, *tcr* и *toxR* (12 %); *tcr*, *toxR* (11,5 %); *toxR* (73 %); не было определено ни одного гена у 3,5 %, соответственно.

Анализ показал, что штаммы, обладающие генами патогенности *ctx*, *tcr* и *toxR*, были выделены из объектов окружающей среды в АР Крым, Донецкой, Луганской, Запорожской и Днепропетровской областях в 1994-1995 гг. – в годы и на территориях эпидемических осложнений.

toxR-ген выявлялся в штаммах, циркулировавших на различных территориях, как в сочетании с генами патогенности, так и независимо от них. Годы, в течение которых выделялись атоксигенные штаммы, были эпидемически благополучными, т.к. случаев заболеваний холерой в эти периоды не зарегистрировано. Вероятно, для длительного существования в объектах окружающей среды холерным вибрионам O1 серогруппы биовара эльтор наличие генов патогенности не является необходимым.

ctx-ген в культурах, выделенных от людей, был обнаружен в 7,7 раза чаще, чем из объектов окружающей среды. При попадании в объекты окружающей среды (в результате контаминации человеком водных объектов) в условиях Украины эпидемически опасные штаммы могут утрачивать *ctx*- и *tcr*-гены и длительное время существовать в объектах окружающей среды, т.е. такие штаммы име-

ют сапронозную природу.

Изучение молекулярно-генетических маркеров эпидемической опасности и биологической характеристики холерных вибрионов O1 группы, биовара эльтор позволяет применить эти критерии для микробиологической оценки изменчивости и эпидемиологического анализа.

Литература

1. Инструкция по организации и проведению противохолерных мероприятий, клинике и лабораторной диагностике холеры / Киев. – 1998. – 168 с.

2. Методичні вказівки по застосуванню полімеразної ланцюгової реакції для виявлення збудників інфекційних захворювань. Київ. – 2003. – 29 с.

3. Хайтович А.Б., Кирьякова Л.С., Ильичев Ю.А., Андроновская И.Б. Штаммы холерных вибрионов O1, циркулирующие в Украине, и их значение в эпидемическом процессе // В сб. Материалов 4-ой Межгосударственной научно-практической конференции государств – участников СНГ “Современные технологии в диагностике опасных инфекционных болезней”. – Саратов. – 2003. – С. 190-192.

4. Хайтович А.Б., Ильичев Ю.А., Андроновская И.Б., Кирьякова Л.С. Молекулярно-генетический мониторинг холерных вибрионов O1 на Украине // В сб. материалов 1-й международной научно-практической конференции «Специфическая диагностика инфекционных болезней». – Киев. – 2004. – С. 110-112.