

METHOD OF INDICATION OF GENE THERMOSTABLE ENTEROTOXINS OF ESCHERICHIA COLI

Sukharev Yu.S.

СПОСІБ ІНДИКАЦІЇ ГЕНІВ ТЕРМОСТАБІЛЬНИХ ЕНТЕРОТОКСИНІВ ESCHERICHIA COLI



СУХАРЄВ Ю.С.

Харківська державна зооветеринарна академія

УДК

619;616.98:579.842.11:631.147

Сучасні системи контролю інфекційних кишкових захворювань, продовольчої безпеки, збереження та раціонального використання генетичних ресурсів, об'єктів міжнародної торгівлі тваринного походження та ветеринарних імунобіологічних препаратів мають бути на належному рівні забезпечені засобами моніторингу та надійними засобами діагностики [1-3].

Провідна роль у розшифровці етіології інфекції належить лабораторним методам. У зв'язку з цим щороку збільшується арсенал діагностичних тестів, які впроваджуються у повсякденну практику [4, 5]. У сучасних умовах все більшого значення набувають експрес-тести, які здатні за короткий час забезпечити постановку первинного діагнозу, що значно збільшує ефективність реагування, особливо коли йдеться про емерджентні інфекції.

Численні дослідження показують [6, 7], що етіологічна структура гострих кишкових захворювань в останні десятиліття зазнає змін і може істотно відрізнятися у різних географічних зонах. Так, зо-

крема, у ряді економічно розвинених країн рідше стали виділятися під час обстеження хворих на діарею інфекційної природи *Shigella* spp. та *Salmonella* spp., тоді як питома вага токсигенних *Escherichia coli* значно зросла.

За даними світової літератури, провідним елементом оцінки патогенності *E. coli* є наявність у них генів, що детермінують синтез ентеротоксинів термостабільного (ST) і термолабільного (LT), з експресією яких і пов'язаний розвиток діарейного синдрому [8-10].

Відомо, що найчастіше (у 40-50% випадків) ентеротоксигенні *E. coli* синтезують ST-ентеротоксин або ST⁺ та LT⁺ (30-40%), рідше — лише LT⁻ (20-30%) [11]. Описано дві родини термостабільних токсинів, які є причиною діареї: STa (або STI) та STb (або STII) [12].

У зв'язку з цим особливої актуальності набуває створення способів генетичного типування ентеротоксигенних *E. coli*, їх апробація та адаптація до практики. Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР), яка заснована на виявленні унікальних фрагментів геномів інфекційних агентів, істотно розширює можливість діагностики кишкових захворювань і моніторингу за їхніми збудниками.

Мета досліджень. Розробити спосіб індикації генів термостабільних ентеротоксинів *E. coli* у клінічному матеріалі у процесі розшифровки етіології гострих кишкових захворювань, а також для прогностичного скринінгу епізоотичної ситуації у тваринництві.

СПОСОБ ИНДИКАЦИИ ГЕНОВ ТЕРМОСТАБИЛЬНЫХ ЭНТЕРОТОКСИНОВ ESCHERICHIA COLI

Сухарев Ю.С.

Впервые на основе оригинального олигонуклеотидного праймера разработан способ одновременной индикации генов STa (STI) и STb (STII) энтеротоксинов E. coli в клиническом материале для расшифровки этиологии острых кишечных заболеваний и прогностического скрининга эпизоотической ситуации в животноводстве.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, энтеротоксины, острые кишечные заболевания, полимеразная цепная реакция.

© Сухарев Ю.С.. СТАТТЯ, 2012.

Матеріали і методи. В якості досліджуваного матеріалу для індикації ентеротоксинів використовували фекалії хворих на колідіарею телят ($n=100$).

Методика проведення ПЛР містила виділення ДНК генів ST з фекалій телят з клінічними ознаками діареї; ампліфікацію специфічних фрагментів генів та детекцію продуктів ампліфікації.

На першій стадії проведення аналізу клінічна проба фекалій піддавалася спеціальній обробці, у результаті якої відбувався лізис бактерійних клітин *E. coli*, що містилися у ній, видалення білкових і полісахаридних фракцій та отримання розчину ДНК, вільного від інгібіторів і готового для подальшої ампліфікації. При цьому використовували комерційний набір реагентів для виділення ДНК з біопроб "ДНК-експрес", (виробник — "Сіместа-ВААЛ", м. Одеса, Україна).

На другій стадії відбувалося накопичення коротких специфічних фрагментів ДНК (амплікон) ентеротоксинів у кількості, необхідній для їх подальшої детекції.

На третьому етапі проводили розділення суміші продуктів ампліфікації, отриманої на другій стадії, методом горизонтального електрофореза в агарозному гелі. До проведення електрофоретичного розділення до ампліфікаційної суміші або до агарозного гелю додавали 1% розчин бромистого етидію, який утворював з дволанцюжковими фрагментами ДНК міцні сполуки, які під дією УФ-опромінення флуоресцювали, що реєструвалося у вигляді помаранчевих смуг після електрофоретичного розділення.

До пробірок для позитивних контрольних зразків вносили 5 мм³ відповідного позитивного контрольного зразка ДНК ST-ентеротоксину, а до пробірки для негативного контрольного зразка (нетоксигенний штам *E. coli* M-17) — 5 мм³ розріджувача, використовуючи індивідуальні наконечники з фільтрами.



БИОЛОГІЧНІ ФАКТОРИ ДОВКІЛЛЯ

Після чого переносили до програмованого термостату (ампліфікатора), прогрітого до температури 93°C (стабільна температура у режимі "пауза"), і проводили ампліфікацію за схемою.

У кишені гелю вносили по 10-15 мм³ ампліфікату у послідовності, що відповідала нумерації проб. Наносили позитивні і негативні контролю.

Підключали електрофоретичну камеру до джерела живлення і задавали напругу, що відповідала напружено-

часно гомологічний висококонсервативним ділянкам генів двох родин термостабільних ентеротоксинів *E. coli* STa (або STI) і STb (або STII): 5'-TGCTGTGAA-ATATGTTGTAATCCTGCCTGT-3', що істотно розширило спектр їх виявлення.

Фрагменти аналізованої ДНК ентеротоксинів виявлялися у вигляді помаранчевих смуг при опроміненні УФ-випромінюванням з довжиною хвилі 310 нм. Специфічність смуги визначалася її положенням щодо ДНК-маркера

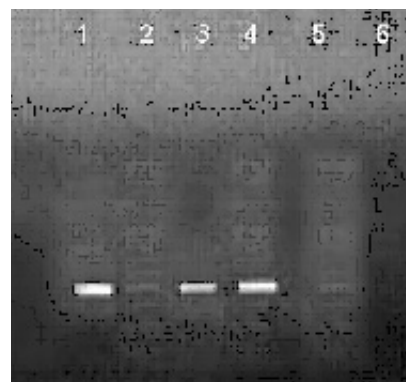
Таблиця

Схема ампліфікації

Концентрація Mg ²⁺	1,5-3,0 мМ
Кількість Taq-полімерази	0,5-3,0 Ед
Концентрація праймера	0,2-2,0 мкМ
Денатурація	95°C - 30 с
Віджиг праймера	60°C - 30 с
Полімеризація	72°C - 30 с

Рисунок

ПЛР-аналіз генетичних детермінант ST-ентеротоксину *E. coli*



Примітка:

- 1 — позитивний контроль (K^+),
- 2 — негативний контроль (K^-),
- 3 — STb (STII),
- 4 — STa (STI),
- 5 — ДНК-маркер (ST),
- 6 — негативний контроль.

METHOD OF INDICATION OF GENE THERMOSTABLE
ENTEROTOXINS OF ESCHERICHIA COLI
Sukharev Yu. S.

For the first time on the basis of the original oligonucleotide primer, developed a method for the simultaneous display of genes STa (STI) and STb (STII) enterotoxins E.coli in clinical material for deciphering the etiology of acute intestinal diseases and predictive screening of the epizootic situation in animal husbandry.

Keywords: Escherichia coli, enterotoxins, acute intestinal diseases, polymerase chain reaction.

та позитивного контролю. Смуги у негативному контролі (K⁻) були відсутніми. У позитивному контролі (K⁺) виявлялася одна смуга помаранчевого кольору. Відсутність смуги на рівні позитивного контролю свідчила про відсутність ДНК ентеротоксинів E. coli в аналізованих пробах, тоді як наявність смуги, відповідної позитивному контролю, — про їхню присутність. В усіх негативних зразках виявлялася смуга помаранчевого кольору, відповідна внутрішньому контролю (рис.).

Встановлено, що у фекаліях телят з клінічними ознаками діареї у 78,0±8,3% випадків виявлялися специфічні нуклеотидні послідовності, гомологічні до консервативних ділянок генів ST-ентеротоксинів E. coli.

Таким чином, проста програма ампліфікації фрагмента ДНК (3 етапи), універсальний набір для обробки проб і нетривалість аналізу (4,0-4,5 години) дозволили отримати стабільний результат під час дослідження клінічного матеріалу хворих тварин. Чутливість даного тесту становила 2,5x10² — 2,5x10³ КУО E. coli/см³. Ефективність виявлення ентеротоксигенних E. coli, порівняно з бактеріологічним методом, була достовірно вищою більш ніж у 2,5 рази. Для проведення ПЛР-аналізу не потрібно було виділення та вирощування культури токсигенних E. coli, що потребує великої кількості часу. Операційна стабільність тесту склала 100-200 зразків на день.

Висновки

1. Розроблено оптимальні алгоритми застосування

ПЛР-детекції генів STa (або STI) та STb (або STII) E. coli у клінічному матеріалі.

2. Отримано нову об'єктивну інформацію про поширеність та особливості циркуляції ентеротоксигенних E. coli у випадках неонатальних діарей телят.

3. Зменшено часові та матеріальні витрати, значно підвищено інформативність та діагностичну цінність експрес-тестів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Qadri F. Prevalence of toxin types and coionization factors in enterotoxigenic Escherichia coli isolated during a 2-year period from diarrheal patients in Bangladesh / F. Qadri, S.K. Das, A.S. Farugue et al. // J. Clin. Microbiol. — 2000. — № 38 (1). — P. 27-31.

2. Sivapalasingam S. Fresh produce: a growing cause of outbreaks of food borne illness in the United States, 1973 through 1997 / S. Sivapalasingam, C.R. Friedman, L. Cohen, R.V. Tauxe // J. Food Prot. — 2004. — V. 67. — P. 2342-2353.

3. Taylor D.N. A randomized, double-blind, multicenter study of rifaximin compared with placebo and with ciprofloxacin in the treatment of travelers' diarrhea / D.N. Taylor, A.L. Bourgeois, C.D. Ericsson et al. // Am. J. Trop. Med. Hyg. — 2006. — V. 74. — P. 1060-1066.

4. De Wit M.A.S. Etiology of Gastroenteritis in Sentinel General Practices in The Netherlands / M.A.S. De Wit, M.P.G. Koopmans, L.M. Kortbeek et al. // Clin. Infect. Dis. — 2001. — V. 33 (3). — P. 280-288.

5. Подколзин А.Т. Сезонность и возрастная структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории РФ / А.Т. Подкол-

зин, Е.Б. Фенске, Н.Ю. Абрамычев и др. // Терапевтический архив. — 2007. — № 11. — С. 10-16.

6. Shaheen H.I. Phenotypic Profiles of Enterotoxigenic Escherichia coli Associated with Early Childhood Diarrhea in Rural Egypt / H.I. Shaheen, S.B. Khalil, M.R. Rao et al. // J. Clin. Microbiol. — 2004. — V. 42. — P. 5588-5595.

7. Herikstad H. A population-based estimate of the burden of diarrhoeal illness in the United States: FoodNet, 1996-1997 / H. Herikstad, S. Yang, T.J. Van Gilder // Epidemiol. Infect. — 2002. — V. 129 (1). — P. 9-17.

8. Орлова К.А. Выявление генов факторов патогенности в клинических изолятах энтеробактерий / К.А. Орлова, В.Н. Мазепа, М.А. Махова // Сб. трудов Всероссийской V науч.-практ. конф. "Генодиагностика инфекционных заболеваний". — М., 2004. — № 2. — С. 96-97.

9. Donnenberg M.S. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli / M.S. Donnenberg, T.S. Whittam // J. Clin. Investig. — 2001. — V. 107. — P. 539-548.

10. Олійник Л.В. Розповсюдження ешерихій та оцінка їхнього патогенного потенціалу / Л.В. Олійник // Ветеринарна медицина: міжвід. тематич. наук. зб. — Х., 2004. — № 83. — С. 167-170.

11. Биланов Ф.С. Некоторые факторы патогенности E. coli, выделенных от онкологических больных с инфекционными осложнениями / Ф.С. Биланов, З.Г. Габидуллин, М.М. Туйгунов // ГОУ ВПО Башкирский гос. мед. универ. Росздрава. — Уфа, 2006. — С. 123-126.

12. Osek J. Detection of the enteroaggregative Escherichia coli heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in E. coli isolates from pigs with diarrhea / J. Osek // Vet. Microbiol. — 2003. — 91, № 1. — P. 65-72.

Надійшла до редакції 16.01.2011.