

## ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА *V. cholerae* O1 ВИДІЛЕНИХ ВІД ЛЮДЕЙ ПРИ СПАЛАХАХ ХОЛЕРИ В УКРАЇНІ

Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України  
(м. Київ)

\*Українська протичумна станція МОЗ України

(м. Сімферополь)

Дана робота є фрагментом НДР «Вплив водного фактору на розповсюдження кишкових інфекцій та інвазій в Україні в сучасних умовах», № держ. реєстрації 0114U000386, шифр 136.

**Вступ.** Холера на сучасному етапі залишається пріоритетною проблемою в світі, що пов'язано з епідеміями та спалахами холери на різних континентах [5]. З розвитком економічних зв'язків та міграцією населення періодично відбувається занесення патогенних штамів холерних вібріонів на територію України, що призводить до спалахів холери. Так в 1991, 1994, 1995, 2011 роках в південних регіонах України були зареєстровані спалахи холери, що привело до сотні захворювань [1].

Не дивлячись на те, що зібрано багато фактичного матеріалу про збудник холери, інтерес до холерного вібріона значно виріс за останні роки оскільки, по-перше, встановлено, що поява змінених форм пов'язано з процесом виживання холерного вібріона в навколишньому середовищі, по-друге, з'явилися нові підходи до більш глибокого аналізу даних форм, оснований на використанні геномних технологій.

Останнім часом, широке використання методу ПЛР дозволило показати генетичну неоднорідність епідемічних варіантів *V. cholerae* O1 ельтор, виділених в період сьомої пандемії на території 45 країн Азії, Африки, Латинської Америки [4,7,9]. На теперішній час стало вже явно, що значний вклад в еволюцію патогенності збудника холери вніс горизонтальний переніс генів, обумовлений мобільними генетичними елементами (МГЕ), до складу яких входять гени вірулентності та пандемічності [6,8].

Що стосується холерних вібріонів, які викликають холеру на території України, то по даному питанню є лише незначні повідомлення.

**Мета дослідження.** Провести молекулярно-генетичний аналіз геному штамів *V. cholerae* O1 виділених від людей при спалахах холери в різні роки в Україні.

**Об'єкт і методи дослідження.** В роботі були використані 67 штамів *V. cholerae* O1 виділених від людей в Україні в різні роки, які зберігалися в Національній колекції збудників холери O1 та не O1 серогрупи Державного закладу «Українська протичумна станція МОЗ України». Визначення

культурально-морфологічних та серологічних властивостей, відношення до діагностичних фагів та вивчення біохімічних властивостей проводили за загально прийнятими методами [2].

Молекулярно-генетичні властивості вивчали за допомогою методу ПЛР з послідовністю праймерів (табл. 1). Праймери синтезовані на фірмі «Синтол», Росія. Ген *wbfR* виявляли за допомогою тест-систем фірми «Амплиценс *Vibrio cholerae*-FL», Росія.

Ампліфікація проходила на апараті «Percin Elmer» при умовах ампліфікації: 95°C – 5 хв. – 1 цикл; 95°C – 10сек., 57°C – 10 сек., 72°C – 10 сек. – 30 циклів; 72°C – 2 хв. – 1 цикл. Для кожного праймеру вивчався свій температурний віджиг. Так для праймерів під гени – *toxR*, *tcpA*, *zot*, *ace*, *hapA*, *ctxA* – температура віджигу 57°C, а для *wbeT*, *hlyA*, *rstR*, *rtxC*, *mshA*, *rstC* – 55°C.

Виділення ДНК вібріонів проводили за допомогою кип'ятіння [3].

Облік результатів ампліфікації проводили електрофоретичним методом в 2% агарозному гелі [3]. Візуально під УФ-опромінюванням на транслюмінаторі фіксували наявність або відсутність полоси продукції ампліфікації.

### Результати досліджень та їх обговорення.

Проведені дослідження показали, що всі досліджувані штами, які були виділені від хворих на холеру в Україні, за своїми біологічними властивостями відносяться до виду *V. cholerae* O1 біовару *eltor*.

Останнім часом, для диференціації холерних вібріонів, виділених на території України, стали впроваджувати в лабораторну практику тестування за допомогою методу ПЛР на наявність в їх геномі основних генів патогенності *ctx* та *tcp*. Робота охопила більш широкий спектр генів, які до цього часу не вивчали в штамів холерних вібріонів, які були виділені в Україні.

Оскільки збудник холери здатний існувати, як в природних екосистемах, так і в організмі людини (тонкий кишечник), то даному мікроорганізму властиве поєднання генів, притаманні, як патогенним так і «вільноіснуючим» видам. Крім того, проведені генетичні дослідження показали відмінності в геномній організації класичного холерного вібріону і ельтор

вібріону. Пандемічний потенціал ельтор вібріонів, які викликали сьому пандемію холери, пов'язані з присутністю в їхньому геномі 22 чужерідних генів, яких немає ні у класичних, ні у вірулентних ельтор вібріонів, виділених до початку пандемії [4]. Це побудило нас за допомогою ПЛР виявити наявність в геномі вивчаємих штамів двох групів генів, які пов'язані з вірулентністю.

Впершу групу входили основні гени патогенності локалізовані на МГЕ, профагах, які холерний вібріон набув в процесі своєї еволюції. Для виявлення наявності в геномі вивчаємих штамів профага СТХф тестувалися гени корової області – *ctxA*, *zot*, *ace*, які кодують біосинтез різних токсинів в тому числі і холероген. Наявність профага RS1 виявляли по гену *rstC*, а профага RS2 по гену *rstR-eltor*.

До другої групи входили гени життєзабезпечення або «домашнього господарства», персистенції та видоспецифічності, які майже не зазнають мутаційних змін і розміщені, як правило, на еволюційно давніх ділянках хромосом: видоспецифічний ген *hapA*, що обумовлює продукцію розчинної гемоглютинин/протеази, одна із основних функцій, яких відкріплення вібріонів від епітелія тонкого кишечника на пізній стадії розвитку інфекційного процесу, а також необхідний для виживання холерного вібріона в навколишньому середовищі; *toxR*, який контролює експресію ключових генів вірулентності та життєзабезпечення; гени *wbeT* та *wbfR*, які дають можливість стверджувати про належність вібріона до O1 або до O139 серогруп. Генетичним маркером, який вказував на наявність в геномі вібріонів острова VPI,

служив структурний ген *tcpAE*, який відповідає за основний фактор колонізації кишечника. Тестування на ген *mshA*, дозволяло отримати відомості про наявність «острова персистенції» EPI, який відповідає не тільки за гемаглютинуючи пілі адгезії IV типу, а і за секрецію білків необхідних для утворення біоплівки. Також проведені дослідження по визначенню розповсюдженості генів, які відповідають за гемолітичну та цитотоксичну активність, що зустрічаються в різних видах вібріонів – ген *hlyA*, який контролює синтез термолабільного гемолізіну та ген *rtxC*, який входить до кластеру із чотирьох генів, кодуючи біосинтез RTX-токсина, який володіє цитотоксичною активністю.

ПЛР тестування показало, що незалежно від місця і часу виділення в геномах вірулентних штамів були виявлені основні гени патогенності та персистенції. Як бачимо з **таблиці 2**, всі штамів мали профаг СТХф з локусом RS2, в який входили гени – *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*. Крім того, як і прогнозувалося, в їхній геном входить і профаг RS1 з геном *rstC*-антирепресором, який здатний підсилювати транскрипцію генів вірулентності профага СТХф. Регуляторний ген *toxR* показав, що вібріони володіють регуляторною системою, яка контролює активність біля 20 генів серед яких і оперон *ctxA*. Також в усіх штамів холерних вібріонів був виявлений маркет «острова персистенції» фрагмент гену *mshA* необхідних для утворення біоплівки. Наявність гену *wbeT* і відсутність *wbfR* в геномі вивчаємих холерних вібріонів, говорить про їхню належність до O1 серогрупи. В той же час, виявлення генів, які відповідають за секрецію гемолізінів

Таблиця 1

Праймери для виявлення генів патогенності

№п/п	Гени	Нуклеотидна послідовність праймерів 5'-3'	Розмір амплікону (п. н.)	Посилання
1.	<i>zot</i> 1 <i>zot</i> 2	tgc-ctt-aac-gat-ggc-gcg-ttt-t aac-ccc-gtt-tca-ctt-cta-ccc-a	947	Singh D. V. <i>et al.</i> , 2001
2.	<i>ctxA</i> 1 <i>ctxA</i> 2	cgg-gca-gat-tct-aga-cct-cct-g cga-tga-tct-tgg-agc-att-ccc-ac	564	Горяев А. А., 2008
3.	<i>ace</i> 1 <i>ace</i> 2	taa-gga-tgt-gct-tat-gat-gga-cac-c ccg-tga-tga-ata-aag-ata-ctc-ata-gg	289	Trucksis M. <i>et al.</i> , 1993
4.	<i>tcpAE</i> 1 <i>tcpAE</i> 2	gaa-gaa-gtt-tgt-aaa-aga-aga-aca gaa-agg-acc-ttc-ttt-cac-gtt-g	471	Keasler S. P., 1993.
5.	<i>hapA</i> 1 <i>hapA</i> 2	tca-act-aca-aca-ccg-cag-ac gac-gac-aat-ccc-aag-aag-ag	270	Челдышова Н. Б., 2002
6.	<i>toxR</i> 1 <i>toxR</i> 2	atg-act-ttg-ttt-ggc-gag-ag gat-tgg-ctt-ggg-tta-gtg-ag	397	Челдышова Н. Б., 2002
7.	<i>mshA</i> 1 <i>mshA</i> 2	acg-cta-gtg-gga-ttg-gga-tg gca-taa-agt-tgt-aca-gtc-cc	398	Toma C. <i>et al.</i> , 2002
8.	<i>hlyA</i> 1 <i>hlyA</i> 2	ctt-agc-tga-gct-gcg-cga-ttt-g gag-ttg-atc-att-cag-a	540	Singh <i>et al.</i> , 2002
9.	<i>wbeT</i> 1 <i>wbeT</i> 2	ata-atc-gaa-act-tca-ttt-aca-atg-gag-ag cac-aga-aag-ttc-caa-cgt-ttg-cac-cga	614	Смирнова Н. И., 2007
10.	<i>rstR</i> 1 <i>rstR</i> 2	gca-cca-tga-ttt-aag-atg-ctc tcg-agt-tgt-aat-tca-tca-aga-gtg	501	Bhattacharya <i>et al.</i> , 2006
11.	<i>rstC</i> 1 <i>rstC</i> 2	aac-agc-tac-ggg-ctt-att-c tga-gtt-gcg-gat-tta-ggc	238	Waldor M. K. <i>et al.</i> , 1997.
12.	<i>rtxC</i> 1 <i>rtxC</i> 2	cga-cga-aga-tca-ttg-acg-ac cat-cgt-cgt-tat-gtg-gtt-gc	263	Chow <i>et al.</i> , 2001

Генетична карта генома штамів *V. cholerae* O1 виділених від хворих на холеру в Україні

Місце виділення	Рік виділення	К-сть штамів	Гени												
			ctxA	zot	ace	rstR	rstC	tcpAE	wbeT	wbfR	toxR	mshA	hlyA	hapA	rtxC
Одеська обл.	1991	10	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
АР Крим	1994	33	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
-"-	-"-	4	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+
-"-	-"-	1	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
-"-	-"-	1	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+
-"-	-"-	1	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+
Миколаївська обл.	1995	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
-"-	-"-	1	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+
м. Маріуполь	2011	14	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

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

та цитотоксинів показав, що дані штами *V. cholerae* O1 містять ген *rtxC*, який виступає координатором RTX-токсина та видовий ген *hlyA* виступаючий за гемолітичну активність вібріонів.

Результати досліджень показали однорідність клінічних штамів *V. cholerae* O1, які були виділені в Одеській обл. в 1991 р., АР Крим в 1994 р., в Миколаївській обл. в 1995 р. та в м. Маріуполі в 2011 р., що є відображенням певних закономірностей, одна з яких полягає в тому, що встановлений набір генів проявляє їх функціональну перевагу в розвитку інфекційного процесу в організмі людини. Тобто холера розвивається тільки в тому випадку, коли збудник інфекції *V. cholerae* O1 містить в своєму геномі основні гени патогенності – *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *rtxC*, *tcpAE*, *toxR*, *mshA*, *wbeT*, *hapA*, *hlyA*.

В той же час в 7 штамів холерних вібріонів, які були виділені в 1994 році в АР Крим та в одному 1995 року в Миколаївській обл. (на момент дослідження) не було виявлено по декілька генів. Так в одному з штамів холерного вібріону 1994 року не було виявлено трьох генів – *rstR*, *rstC*, *tcpAE*, в 4 штамів – генів *rstR* та *rstC*, в двох штамів холерного вібріону по одному з генів *tcpAE* та *rstC*. Також в одному з штамів, який був виділений в 1995 році не виявлявся ген *rstR*.

Молекулярно-генетичні дослідження показали, що в геномах холерних вібріонів в значній мірі не виявляються гени *rstR* та *rstC*, які входять до двох профагів – RS1 та RS2, які фланкують корову частину генома вібріона. Результати досліджень дають можливість зробити припущення, що холерні вібріони можуть втрачати гени без шкоди для свого існування. Штами уже біля 20 років зберігаються в лабораторних умовах, отже такі несприятливі умови існування для вібріону могли і призвести до втрати або репресування генів, які виконують «другорядну» роль в життєдіяльності вібріонів. Як бачимо, в першу чергу втрачаються гени, які знаходяться на мобільних геномних елементах – профагах і їхня функція полягає в підсилюванні функцій основних генів

патогенності. Також можлива точечна мутація генів із змінюванням порядку нуклеотидів, що не дозволяє праймерам приєднуватись до даного участка, але змінений ген існує і для підтвердження або заперечення факту необхідно секвенування.

В той же час, в двох штамів не виявлявся ген *tcp* і це наводить на думку, що при довгостроковому зберіганні ген, який відповідає за адгезивні властивості вібріона може репресуватися. Холера, як антропонозне захворювання і його збудник повинен проходити через організм людини. Якщо вірулентні холерні вібріони довгий період часу не мають свого біологічного об'єкта і перебувають в несприятливих умовах існування, то й одна з основних властивостей холерних вібріонів, здатність до адгезії, може також втрачатися.

Взагалі довгострокове зберігання в штучних умовах є несприятливими умовами для любого мікроорганізму, не тільки для холерного вібріону. Це дає можливість зробити припущення, що коли в природних умовах холерні вібріони потрапляють в несприятливі для них умови існування, то вони можливо починають втрачати гени, функції яких в даних умовах не важливі. Холерний вібріон, для свого життєзабезпечення може втрачати частину свого генома, намагаючись таким чином зберегтися як вид, що ще раз підтверджує аксіому про неймовірну мінливість холерного вібріону. В той же час при сприятливих кліматичних умовах, періодичних пасажах холерного вібріону через організм людини та наявність МГЕ в навколишньому середовищі, може призводити і до включення процесу придбання генів, як це проходить в Індійському регіоні на батьківщині холерного вібріону.

Постійний моніторинг за холерним вібріоном в Україні показав, що кліматичні умови в південних регіонах України, коротке жарке літо та холодна зима, несприятливі для життєдіяльності вірулентних холерних вібріонів, що й призводить до втрати вібріонами своїх вірулентних властивостей, які з часом

скоріш за все переходять в авірулентні форми або взагалі припиняють своє існування. Тому вважати джерелом інфекції холери в Україні водні об'єкти навколишнього середовища є мало ймовірно, але не можна і спростувати даний факт, так як авірулентні варіанти *V. cholerae* O1 укорінилися в водних екосистемах Донецького регіону.

**Висновок.** На підставі результатів ПЛР досліджень проаналізовані патогенні властивості холерних вібріонів, які були виділені від хворих на холеру в Україні в різні роки при різних епідемічних ситуаціях, що не тільки розширили наші знання про геном збудника холери, але й підтвердили характер мінливості

вібріону та велику роль МГЕ в еволюції його патогенності. Встановлена нестабільність геному вірулентних холерних вібріонів, що вказує на можливість формування різних варіантів холерних вібріонів з новими властивостями, що може призводити до ускладнення їх диференціації. Створена генетична карта геному вірулентних штамів холерного вібріону за основними генами патогенності, персистенції та життєзабезпечення.

**Перспективи подальших досліджень.** В подальших дослідженнях планується провести експерименти на крольчатах-сосунків з можливістю відтворення втрачених генів холерними вібріонами та проведення секвенування даних ділянок геному.

### Література

1. Алексеенко В. В. Холера в Украине (история и современность) / Владимир Алексеенко. – Кировоград : Центр. -Укр. изд-во, 2007. – 171 с.
2. Інструкція по організації та проведення протихолерних заходів, клініці та лабораторній діагностиці холери / МОЗ України № 167. – Офіц. вид. – К.: Полімед, 1997. – 123 с. – (Нормативний документ МОЗ України).
3. Маниатис Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук; пер. с англ. А. А. Баева и К. Г. Скрыбина. – Москва : Мир, 1984. – 479 с.
4. Осин А. В. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры / А. В. Осин, К. С. Нефедов, Г. А. Ерошенко, Н. И. Смирнова // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 53-62.
5. Характеристика эпидемиологической обстановки по холере в мире (2003-2012 гг.) и прогноз на 2013 г. / Э. А. Москвитина, А. Б. Мазрухо, О. Л. Адаменко [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 1 – С. 11-17.
6. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов / Н. И. Смирнова, Н. Б. Челдышова, А. А. Горяев [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций – 2008. – Вып. 3 – С. 5-11.
7. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa / A. R. Reimer, G. V. Domselaar, S. Stroika [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17(11). – P. 2113-21.
8. Goel A. K. A new variant of *Vibrio cholera* O1 El Tor causing cholera in India / A. K. Goel, M. Jain, P. Kumar, S. Bhadayria // Letterl. J. Infect. – 2008. –Vol. 57(3). – P. 280-81.
9. Safa A Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 / A. Safa, G. B. Nair, R. Y. Kong // Trends in Microbiology. – 2010. – Vol. 18. – P. 46-54.

УДК 575. 113. 004. 12+579. 843(477)

#### ГЕНЕТИЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА *V. cholerae* O1 ВИДІЛЕНИХ ВІД ЛЮДЕЙ ПРИ СПАЛАХАХ ХОЛЕРИ В УКРАЇНІ

Петренко О. В., Хайтович О. Б., Підченко Н. Н., Ільчюв Ю. О.

**Резюме.** Молекулярно-генетичні дослідження геному холерних вібріонів, виділених в Україні в різні роки при різних епідемічних ситуаціях підтвердили характер мінливості вібріону та велику роль МГЕ в еволюції його патогенності. Вперше в Україні створено геномний «портрет» штамів холерних вібріонів за основними генами патогенності, що в подальшому надає можливості для вивчення мінливості біологічних властивостей даних вібріонів.

**Ключові слова:** холерний вібріон, гени патогенності, вірулентність.

УДК 575. 113. 004. 12+579. 843(477)

#### ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНОМА *V. cholerae* O1 ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ ЛЮДЕЙ ПРИ ВСПЫШКАХ ХОЛЕРЫ В УКРАИНЕ

Петренко Е. В., Хайтович А. Б., Пидченко Н. Н., Ильичев Ю. А.

**Резюме.** Молекулярно-генетические исследования генома холерных вибрионов, выделенных в Украине в разные годы и при различных эпидемических ситуациях, подтвердили характер изменчивости вибриона и большую роль МГЭ в эволюции его патогенности. Впервые в Украине созданы геномные «портреты» штаммов холерных вибрионов по основным генам патогенности, что в дальнейшем дает возможность изучения изменчивости их биологических свойств.

**Ключевые слова:** холерный вибрион, гены патогенности, вирулентность.

UDC 575. 113. 004. 12+579. 843(477)

### **Genetic Characteristics of *V. cholerae* O1 Genome Isolated from People in Ukraine during Cholera Outbreaks**

**Petrenko O. V., Khaytovych O. B., Pidchenko N. N., Illychov Y. O.**

**Abstract.** As for now, cholera remains a priority problem in the world. Economics growth and population migration occasionally introduced new pathogenic strains of *V. cholerae* O1 to southern regions of Ukraine causing cholera outbreaks. They occurred in 1991 in Odesa region, in 1994 in Crimea, in 1995 in Mykolayiv region and in 2011 in Mariupol with about a hundred infected persons. Comparative study of 67 strains of *V. cholerae* O1 in Ukraine indicated that all of them belong to *V. cholerae* O1 biovar eltor strain. Molecular-genetic analysis indicated that regardless of the time and place of isolation their genome contained common genes for pathogenicity and persistence – *ctxA*, *ace*, *zot*, *rstR*, *rstC*, *rtxC*, *tcpAE*, *toxR*, *mshA*, *wbeT*, *hapA*, *hlyA*. Results of this study indicate the homogeneity of strains of *V. cholerae* O1 isolated from infected people in Ukraine during various years. At the same time, 7 strains isolated in 1994 missed several of the mentioned genes: one of the strains lacked *rstR*, *rstC* and *tcpAE* genes, four of them lacked both *rstR* and *rstC* and two lacked either *tcpAE* or *rstC*. There was also one strain isolated in 1995 that had no *rstR* gene. PCR testing showed that genomes of cholera vibrios mostly contain no *rstR* or *rstC* genes, which are part of prophages RS1 and RS2, the flanking core genomic sequence of the vibrio. Conducted study allows to conclude that cholera vibrios can lose genes without serious negative consequences. The strains were contained for about 20 years in laboratory conditions, such stress could easily result in loss or suppression of genes that are not critical for survival. At first vibrio loses genes that are located on prophages – mobile genomic elements which amplify the functions of pathogenic genes. This also could be explained by a point mutation with the change of nucleotide sequence which won't allow primers to attach to given part of the genome, yet confirmation of this hypothesis requires genome sequencing.

Two strains had no *tcp* gene and this could mean that long-term storage could lead to suppression of a gene that is responsible for adhesive properties of the vibrio. Results of this study allow to assume that being exposed to negative environmental factors under natural conditions, cholera vibrios can lose genes which are not critical for their existence in the given environment, and try to survive as a species. This assumption explains the extreme variability in cholera vibrios. At the same time, favorable climate, occasional passages of cholera vibrios through human body and presence of MGE in the environment creates conditions for activation of the process of gene acquisition similar to that of the Indian region, home of *V. cholerae*, which causes the formation of cholera vibrios with new properties.

In general, climate in Ukraine is adverse for *V. cholerae* and causes them to gradually lose their virulent properties and transform to avirulent forms or even become extinct. Therefore, the genome of virulent cholera vibrios is unstable, which indicates the possibility of formation of different strains of *V. cholerae* with new biological properties that can complicate their differentiation. The genetic map of the main pathogenic genes in the genome of *V. cholerae* created in Ukraine offers new opportunities to study the variability of biological properties of cholera vibrios.

**Key words:** *Vibrio cholerae*, pathogenic genes, virulence.

*Рецензент – проф. Лобань Г. А.*

*Стаття надійшла 15. 05. 2014 р.*