

СКРИНИНГ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ПАТОГЕННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ

В настоящее время для определения микробиологической безопасности объектов окружающей среды необходима экспертиза, проведение которой занимает несколько суток в случае бактериологического метода. В результате проведения исследований по существующим методикам проводится только видовая идентификация микроорганизмов или, в лучшем случае, определение факторов вирулентности, безусловно-патогенных микроорганизмов. Поэтому в настоящее время актуальной задачей становится не только выявление патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов, но и одномоментное определение их болезнетворного потенциала; прежде всего – основных факторов персистенции микроорганизмов по отношению к организму хозяина.

Проведение скрининга исследуемых генетических детерминант среди 30 штаммов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* выявило 1 штамм *Escherichia coli*, несущий оба гена детерминанты гемолитической активности, а также ген энтеротоксина С, 3 штамма *Escherichia coli*, несущих выявляемые в нашей работе маркеры продукции аэробактина и 1 штамм-носитель маркерных генов колибактина. Установлено, что три штамма *Klebsiella pneumoniae*, охарактеризованные ранее как носители мегаплазмиды вирулентности, демонстрируют одновременное наличие всех выявляемых генов трех детерминант персистенции: аэробактина, колибактина и периплазматического ингибитора лизоцима. Проведенные исследования позволили установить, что распространенность известных штаммов-носителей генетических маркеров известных детерминант персистенции и патогенности энтеробактерий в кишечной микробиоте клинически здоровых обследуемых лиц не превышает 10%. При этом наблюдается сцепленность нескольких детерминант различной природы у выявленных штаммов-носителей, включая маркер гемолитической активности. Последний факт дополняет данные, полученные в отношении факторов вирулентности диареогенных эшерихий, позволяя разделить перечень маркеров высоковирулентных и условно-патогенных генетических профилей энтеробактерий.

Кроме того, разработанная тест-система позволит одновременно выявлять генетические маркеры пяти известных детерминант персистенции условно-патогенных энтеробактерий с использованием единого алгоритма амплификации, что существенно упрощает процедуру анализа.

Ключевые слова: энтеробактерии, ПЦР-анализ, патогенный потенциал.

В настоящее время для определения микробиологической безопасности объектов окружающей среды необходима экспертиза, проведение которой занимает несколько суток в случае бактериологического метода. В результате проведения исследований по существующим методикам проводится только видовая идентификация микроорганизмов или, в лучшем случае, определение факторов вирулентности, безусловно-патогенных микроорганизмов. Поэтому существенное значение имеет как ускорение анализа, так и повышение его информативности. На сегодняшний день системы экспресс-анализа генетического профиля патогенности широко распространенных инфекционных агентов в нашей стране все еще достаточно редки. В роли экспресс-критерия отбора «подозрительных» в плане патогенности энтеробактерий в бактериологической практике традиционно применялась гемолитическая активность изолята и отсутствие у него

способности метаболизировать лактозу. В связи с этим, группой исследователей в 2010 году была произведена оценка информативности отбора штаммов *E. coli* по этим критериям в отношении диареогенных кишечных палочек, продемонстрировавшая неудовлетворительную валидность этого метода даже для цели первичного скрининга на ДГКП [1]. Вместе с тем, за последнее десятилетие был определен целый ряд генетических детерминант, обеспечивающих персистентный и патогенный потенциал условно-патогенных бактерий [2], [3]. Поэтому в настоящее время актуальной задачей становится не только выявление патогенных и условно-патогенных видов микроорганизмов, но и одномоментное определение их болезнетворного потенциала; прежде всего – основных факторов персистенции микроорганизмов по отношению к организму хозяина: сидерофоров, ингибиторов лизоцима и сериновых протеаз, их распространенности и распределения среди

штаммов, выделяемых как из окружающей среды, так и из биоматериалов обследуемых лиц.

Целью настоящего исследования стало осуществление скрининга генетических детерминант известных факторов персистенции условно-патогенных энтеробактерий методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы

Для исследования были использованы модельные штаммы и клинические изоляты наиболее часто встречающихся при дисбиозе кишечника видов энтеробактерий: *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* из коллекции штаммов Института клеточного и внутриклеточного симбиоза, ранее выделенные из кишечника клинически здоровых лиц и идентифицированные по морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам с помощью тест-системы «ENTEROtest 24» («LaChema», Чехия).

Был составлен перечень изученных генов с доказанной ролью в инфекционных процессах, но до настоящего времени не нашедших широкого применения в массовых тест-системах и в отношении которых до настоящего времени не показано влияние на секретируемые фенотипические маркеры персистенции (см. табл. 1).

Периплазматический ингибитор лизоцима инактивирует один из ключевых гуморальных (внеклеточных, растворимых) факторов врождённого иммунитета хозяина. Этот гомодимерный белок кодируется гомологами гена *pliC* хромосомы сальмонелл и мегаплазмиды вирулентности клебсиелл, сильно различающимися по первичной аминокислотной последовательности [3]. Поэтому каждый из них требует разработки специфичной праймерной пары [4].

Гемолизин – токсин, образующий поры в мембране клеток хозяина. Этот порообразующий белковый токсин кодируется генами *hlyA*

и *hlyC* хромосомы кишечной палочки, которые обеспечивают синтез токсина и выделение его из клетки [5].

Аэробактин – сидерофор, связывающий железо для дальнейшего переноса внутрь бактериальной клетки с целью его накопления в биотопах, бедных железом (таких как мочевыводящий тракт), повышая устойчивость к действию антимикробного белка лактоферрина. Аэробактин представляет собой низкомолекулярное производное лизина и лимонной кислоты, продукция которого кодируется опероном *iucABCDiutA*, локализованным в хромосоме кишечной палочки и клебсиел и включающим 5 генов, из которых два – *iucB* и *iucC* – непосредственно участвуют в синтезе сидерофора [6].

Колибактин – сидерофор поликетидной природы, способный проникать в ядро клетки хозяина и связываться там с ДНК, нарушая нормальный процесс репликации, становясь фактором риска развития злокачественных опухолей (прежде всего – прямой кишки). Синтез этого пептид-поликетид обеспечивается кластером поликетидсинтазного генного островка *pks*, первичными краевыми маркерами которого являются гены *clbB* и *clbN* [7], [8].

Энтеротоксин типа С – самотранспортирующийся токсин острой диареи, обладающий способностью инактивировать лизоцим – важный фермент защиты хозяина. Самосекретируемая сериновая протеаза кодируется гомологами гена *espC* хромосомной или плазмидной локализации кишечной палочки [9].

С целью создания экспресс тест-системы скринингового выявления вышеуказанных детерминант методом ПЦР, был осуществлен подбор праймеров видоспецифичного диапазона таким образом, чтобы их отжиг происходил при одном температурном режиме. Автоматизированный синтез праймеров и их после-

Таблица 1 – Тест-система скрининга патогенного потенциала энтеробактерий

Гены	Фенотипическая детерминанта	Виды-продуценты	Пояснение
<i>pliCp</i>	Ингибитор лизоцима	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Фактор антилизоцимной активности
<i>espP</i>	Энтеротоксин	<i>Escherichia coli</i>	
<i>hlyA</i>	Гемолизин		Фактор цитотоксичности
<i>hlyC</i>			
<i>iucB</i>	Аэробактин	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Сидерофоры
<i>iucC</i>		<i>Escherichia coli</i>	
<i>clbB</i>	Колибактин	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Фактор генотоксичности
<i>clbN</i>		<i>Escherichia coli</i>	

дующая очистка методом полиакриламидного гель-электрофореза выполнены ООО «Синтол» (Россия).

Выделение матричной ДНК для амплификации проводилось путем внесения 2–10 мкл бактериальной массы чистой культуры каждого исследуемого штамма в 0,1 мл смеси реагентов «ДНК-Экспресс» (НПФ «Литех», Россия) с последующим нагреванием до температуры 98°C в течение 20 мин в программируемом твердотельном термостате «Терцик МС-2» (НПФ «ДНК-технология», Россия). Затем от раствора ДНК отделялся осадок центрифугированием при 16100 г в течение 2 мин при комнатной температуре. Полученный супернатант вносился в предварительно подготовленную реакционную смесь для ПЦР в объеме 5 мкл [10].

Реакционная смесь для ПЦР в объеме 15 мкл готовилась из набора праймеров и реагентов ООО «Синтол» в составе: 2 мкл 25 мМ раствора магния хлорида, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б, 1,6 мкл 2,5 мМ раствора дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 0,5 мкл 10 мкМ смеси праймеров, 0,2 мкл 5 ед/мкл раствора Таq-полимеразы и 8,7 мкл деионизованной воды. С целью предотвращения испарения воды из реакционной смеси, на её поверхность наносилось 20–30 мкл стерильного парафинового масла для наборов «MIKROLATEST» («Erba Lachema», Чехия).

Реакция проводилась в ДНК-амплификаторе «Терцик МС-2» в режиме ускоренного регулирования температуры по единому оптимизированному трехфазному алгоритму с температурой отжига 65°C для праймерных пар ко всем вышеуказанным маркерным последовательностям длительностью 30 циклов (рис. 1).

Получаемые ампликоны подвергались агарозному гель-электрофорезу [11]. Регистрация результатов производилась на основе присутствия полос люминесценции бромида этидия в агарозном геле, расположенных в диапазоне молекулярных масс, соответствующих локализации маркерных фрагментов.

Результаты и обсуждение

Электрофоретическое разделение результатов реакций амплификации подтвердило работоспособность системы и специфичность получаемых результатов, выявив наличие единичных ампликонов в области ожидаемого диапазона молекулярных масс.

Проведение скрининга исследуемых генетических детерминант среди 30 штаммов *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae* выявило 1 штамм *Escherichia coli*, несущий оба гена детерминанты гемолитической активности, а также ген энтеротоксина С (рис. 2), 3 штамма *Escherichia coli*, несущих выявляемые в нашей работе маркеры продукции аэробактина (рис. 3) и 1 штамм-носитель маркерных генов коли-

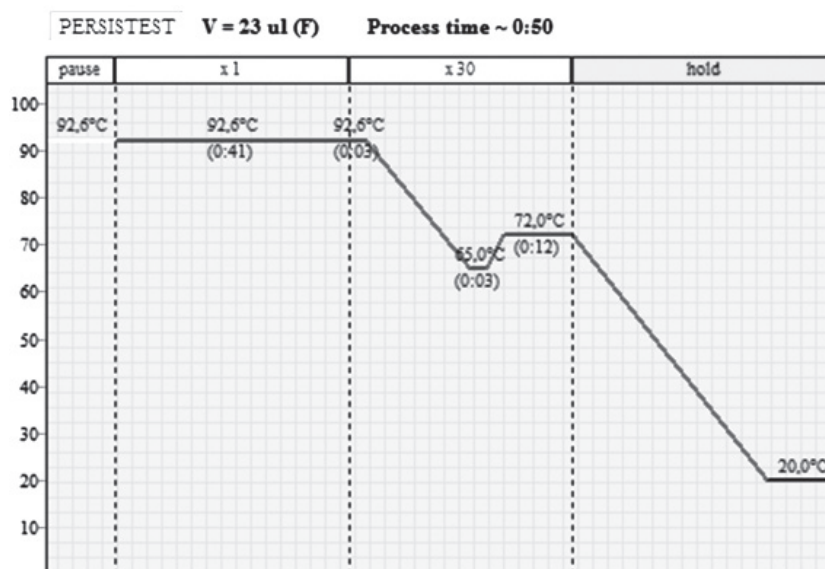


Рисунок 1 – Экспериментально подобранная программа амплификации

бактина (рис. 4). Установлено, что три штамма *Klebsiella pneumoniae*, охарактеризованные ранее как носители мегаплазмиды вирулентности, демонстрируют одновременное наличие всех выявляемых генов трех детерминант персистенции: аэробактина, колибактина и периплазматического ингибитора лизоцима.

Кроме того, в случае аэробактина удалось совместить праймеры для выявления обоих маркеров в одной пробе в виде мультиплекса (рис. 5).

Таким образом, разработанная тест-система позволит одновременно выявлять генетические маркеры пяти известных детерминант персистенции условно-патогенных энтеробактерий с использованием единого алгоритма ампли-

фикации, что существенно упрощает процедуру анализа.

Установлено, что распространенность известных штаммов-носителей генетических маркеров известных детерминант персистенции и патогенности энтеробактерий в кишечной микробиоте клинически здоровых обследуе-

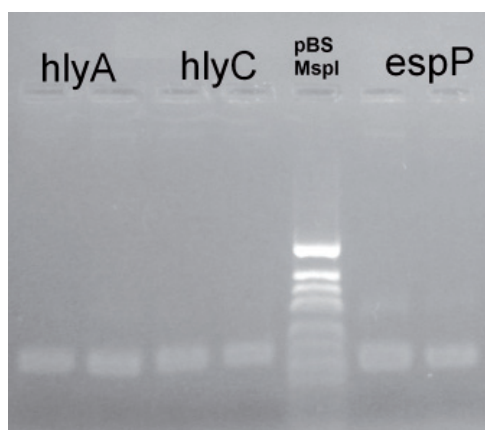


Рисунок 2 – Фореграмма результатов разделения ампликонов генов *hlyA*, *hlyC* и *espP* штамма *E. coli* ICIS-61 в агарозном геле вместе с маркером молекулярных масс pBS/MspI.

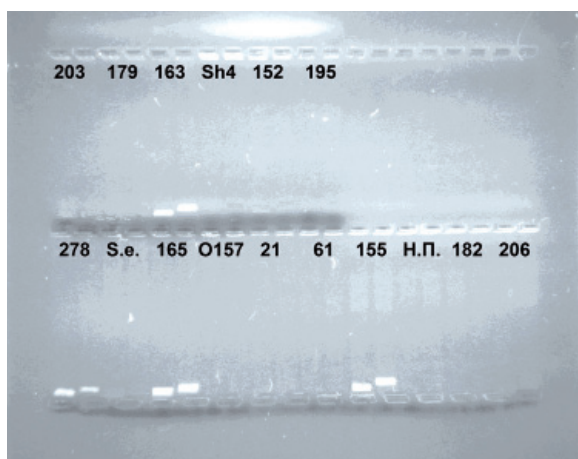


Рисунок 3 – Фореграмма результатов реакции амплификации двух гомологов генов аэробактина *iucB*, *iucC* исследуемых штаммов *E.coli*

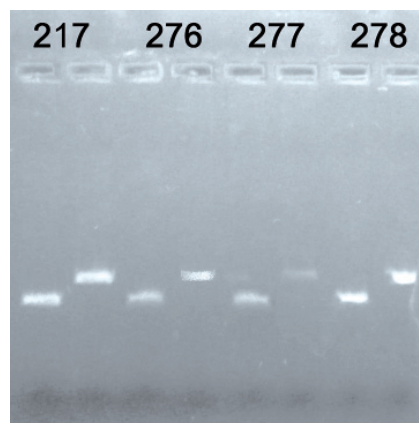


Рисунок 4 – Фореграмма результатов реакции амплификации двух маркерных генов колибактина *clbB*, *clbN* клебсиелл-носителей мегаплазмиды вирулентности и штамма *E. coli* ICIS-217.

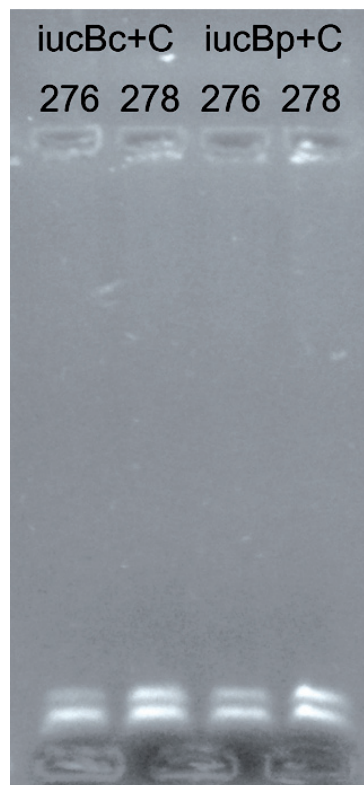


Рисунок 5 – Фореграмма результатов множественной ПЦР двух гомологов генов аэробактина *iucB*, *iucC* клебсиелл-носителей мегаплазмиды вирулентности

мых лиц не превышает 10%. При этом наблюдается сцепленность нескольких детерминант различной природы у выявленных штаммов-носителей, включая маркер гемолитической активности. Последний факт дополняет данные,

полученные в отношении факторов вирулентности диареогенных эшерихий, позволяя разделить перечень маркеров высоковирулентных и условно-патогенных генетических профилей энтеробактерий.

03.10.2017

**Работа выполнена в рамках проекта Программы УрО РАН:
«Фундаментальные науки – медицине» проект № 15-3-4-36
«Механизмы микробной регуляции ассоциативного симбиоза при инфекции»**

Список литературы:

1. Результаты применения методов амплификации нуклеиновых кислот для выявления диареогенных *E. coli* / Т.А. Коновалова, А.В. Бондарева, А.Т. Подколзин [и др.] - Молекулярная диагностика - 2010. VII Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием, Москва. - 2010. - Т. 2. - С. 348-350.
2. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo / A. Thomas, A. Russo, R. Olson [et al] // *Infection and Immunity*. - 2015. - V.83 (8) – P. 3325-3333.
3. Callewaert, L. New family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria / L. Callewaert, A. Aertsen, D. Deckers // *PLoS Pathog.*, 2008. – №3 - С.1-9.
4. Перунова, Н.Б. Генетические детерминанты секретируемых ингибиторов лизоцима и антилизоцимный фенотип энтеробактерий / Н.Б. Перунова, С.В. Андриященко, О.В. Бухарин // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. – 2012. - № 6. - С.8-12
5. Lepek, G. Relation between the hemolytic property and iron metabolism in *Escherichia coli* / G. Lepek., Hans-Martin Gruenig // *Infection and immunity*, 1985. - №3 – P. 682-686.
6. Williams, P.H. Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli* / P.H. Williams, N.H. Carbonetti // *Infect Immun*. - 1986. - Vol. 51. - No. 3. - P. 942-947.
7. Interplay between siderophores and colibactin genotoxin biosynthetic pathways in *Escherichia coli* / P. Martin, I. Marcq, G. Magistro [et al] // *PLOS Pathogens*. - 2013. - №7 - P. 1-14
8. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli* pks genomic island / R. James, J. Johnson, J. Brian [et al] // *Journal of clinical microbiology*. - 2008. – №12 - P. 3906-3911.
9. Seema, K. Identification and molecular characterization of eatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* / K. Seema, J. Dotson, P. Kenneth // *Infection and Immunity*. - 2004. - №3 - P.1786 -1794.
10. Ребриков, Д.В. ПЦР «в реальном времени» / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов [др.] / под ред. д.б.н. Д.В.Ребрикова. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. - 233 с.
11. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук. - М.: Мир, 1984. - С. 159-168.

Сведения об авторах:

Здвижкова Ирина Александровна, лаборант-исследователь Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН
460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. (3532)775417; e-mail: zdvizhkova.irina@gmail.com

Андриященко Сергей Валерьевич, старший научный сотрудник Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН; к.м.н.
460000, г. Оренбург, ул. Пионерская, 11, тел. (3532)775417; e-mail: rattus000@gmail.com