

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.34-008.87-053.2-092-078

Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б., Немченко У.М., Рычкова Л.В.

## ВЫЯВЛЕНИЕ ШИГАТОКСИНПРОДУЦИРУЮЩИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* В ПОПУЛЯЦИЯХ НОРМАЛЬНОЙ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

ФГБУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека» СО РАМН, 664003, Иркутск

*Обмен генетическим материалом разных типов бактерий между собой и с другими представителями семейства Enterobacteriaceae в кишечной экосистеме ведет к появлению вариантов нормальной кишечной палочки с генетическими признаками патогенности, что может служить теоретическим обоснованием для отнесения таких штаммов к патобионтам. С помощью полимеразной цепной реакции исследовали 96 штаммов разных типов Escherichia coli (с нормальной ферментативной активностью, слабой ферментативной активностью и с гемолитической активностью), выделенных у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, на наличие генов, кодирующих способность к токсинообразованию (stx1, stx2). В кишечном биотопе детей выявлена циркуляция шигатоксинпродуцирующих штаммов E.coli, не относящихся к патогенной группе, а являющихся представителями нормальной индигенной микробиоты. Присутствие генов stx1 и stx2 в разных биохимических вариантах E.coli позволяет констатировать факт формирования резервуара потенциальной патогенности в непатогенных формах E.coli. Наличие гена (веротоксин 1) в геноме разных типов E.coli, выделенных из одного биотопа, свидетельствует о возможной горизонтальной передаче факторов патогенности в кишечном микробиотопе.*

**Ключевые слова:** микробиоценоз; шигаподобный токсин, Escherichia coli; гены патогенности.

*E.I. Ivanova, S.M. Popkova, Yu.P. Djioev, E.B. Rakova, U.M. Nemchenko, L.V. Rychkova*

### THE DETECTION OF STRAINS OF ESHERICHIA COLI PRODUCING SHIGA TOXIN IN POPULATIONS OF NORMAL INTESTINAL MICROBIOTA IN CHILDREN WITH FUNCTIONAL DISORDERS OF GASTROINTESTINAL TRACT

The research center of problems of family health and human reproduction of the Siberian branch of the Russian academy of medical sciences, 664003 Irkutsk, Russia

*In intestinal ecosystem, interchange of genetic material between different types of bacteria and other representatives of family Enterobacteriaceae results in development of types of normal colibacillus with genetic characteristics of pathogenicity. This occurrence can be considered as a theoretical substantiation for labeling such strains as pathobionts. The polymerase chain reaction was implemented to analyze 96 strains of different types of Escherichia coli (with normal and weak zymogenic activity and hemolytic activity) isolated from children with functional disorders of gastrointestinal tract. The purpose was to detect presence of gens coding capacity of toxin production (stx1, stx2). In intestinal biotope of children, circulation of strains of Escherichia coli producing shiga toxin having no relation to pathogenic group being representatives of normal indigenous microbiota. The presence of gens stx1 and stx2 in various biochemical types of Escherichia coli permits establishing fact of forming of reservoir of potential pathogenicity in non-pathogenic forms of Escherichia coli. The presence of gen (verotoxin 1) in genome of various types of Escherichia coli isolated from one single biotope testifies possible horizontal transmission of factors of pathogenicity in intestinal biotope.*

**Key words:** microbiocenosis; shiga similar toxin; Escherichia coli; gens of pathogenicity

Введение. Популяции микроорганизмов, вступая в сложные взаимоотношения, конкурентные или кооперативные, при заселении различных частей органов, тканей макроорганизма формируют его специфический микросимбиоз [1, 2]. Изменение важных характеристик вирулентности участников микросимбиоза наряду с их количественной оценкой может существенно сказаться на течении заболеваний, осложненных дисбиозом кишечника [3, 4].

*Escherichia coli*, являясь постоянным обитателем кишечника человека, входит в состав его микробиоценоза. В норме кишечная палочка выполняет ряд полезных для хозяина функций: синтезирует витамины и аминокислоты, поддерживает колонизационную резистентность кишечника, обеспечивает антигенную стимуляцию местного иммунитета [5, 6]. При нарушении микробиологического характера *E. coli* способна резко не только наращивать свое количественное

присутствие, но и проявлять патогенные свойства, что играет важную роль в патогенезе развития дисбиоза кишечника. Постоянный антигенный дрейф, наличие или приобретение различных факторов патогенности (токсины, гемолизины, некротизирующий и гемолитический факторы, сидерофоры) затрудняют проведение эффективной специфической профилактики эшерихиоза, что побуждает не только постоянно осуществлять мониторинг указанной инфекции, но изучать и контролировать биологические свойства возбудителя (прежде всего его антибиотикорезистентность и наличие маркеров патогенности) [7, 8]. Для эшерихий патогенность не является видовым признаком и не связана с конкретной серогруппой. Они способны реализовать свой патогенный потенциал и вызывать нарушения в организме человека, ограниченные только теми генетическими детерминантами патогенности, которыми обладает конкретный штамм *E.coli* [9]. Ключевым поражающим фактором энтерогеморрагических эшерихий являются шигатоксины – stx1 и stx2 [10]. Шигатоксинпродуцирующие кишечные палочки (STEC) являются важными пищевыми патогенами, ответственными за целый ряд болезней – от легкой диареи до тяжелых осложнений, развивающихся в почках и центральной нервной системе [11]. Более тяжелые

Для корреспонденции:

Иванова Елена Иннокентьевна, науч. сотр.  
Адрес: 664033, Иркутск, ул. Тимирязева, 16  
E-mail: ivanova.iem@gmail.com

Таблица 1

## Характеристика праймеров, используемых в работе [15]

Ген		Олигонуклеотидные последовательности (5' – 3')	Размер ампликона, п.н.	Температура отжига, °С
stx1	F	CGTGGAATGTCATTCGCTCTGC	302	55
	R	CGTGGTATAGCTACTGTCCAC		
stx2	F	CTTCGGTATCCTATTCGCCGG	516	55
	R	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC		

Примечание. F – форвард, прямой праймер; R – реверс, обратный праймер.

последствия вызываются энтерогеморрагической кишечной палочкой (ЕНЕС), которая включает в себя серогруппы O157: H7. ЕНЕС обладают множеством факторов вирулентности, которые повышают выживаемость и вторжение в кишечник, но главным фактором, связанным с наиболее тяжелыми последствиями, является производство шигатоксина (stx). Шигатоксины кодируются и распространяются путем преобразования лямбдоподобных бактериофагов, называемыми Stx-фагами. Они в дополнение к повышению патогенных профилей вирулентных штаммов *E. coli* могут за счет горизонтального переноса и встраивания в геном бактерии превратить комменсальных членов семейства *Enterobacteriaceae* в кишечнике в производителей огромного количества разнообразных токсинов [12, 13].

Целью исследования являлось выявление генов, кодирующих способность к образованию шигатоксина, у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и атипичных ее форм.

**Материалы и методы.** На дисбиоз кишечника обследовано 72 ребенка (от рождения до 13 лет) с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта (абдоминальный синдром, расстройства дефекации, расстройства билиарного тракта в течение более 2 нед). При микробиологическом анализе копрологической пробы использовали общепринятый метод [14]. Для исследования идентифицированы и выделены разные типы *E. coli*: с нормальной ферментативной активностью (66 аутоштаммов), со слабой ферментативной активностью (18 аутоштаммов) и с гемолитической активностью (12 аутоштаммов). По культурально-ферментативным свойствам и антигенным характеристикам исследуемые штаммы *E. coli* являлись типичными представителями индигенной микрофлоры рода *Escherichia*. Всего исследовано 96 культур *E. coli*.

Бактериальную ДНК выделяли из суточной культуры, выращенной при 37°C в среде Мюллера–Хинтона (ЗАО «НИ центр фармакотерапии», Санкт-Петербург). Материал, полученный в результате нескольких касаний газона петлей, помещали в 200 мкл буфера Tris-EDTA (TE) в пробирки типа Eppendorf и ресуспендировали с помощью вортекса. Выделение ДНК из суспензии осуществляли с помощью комплекта реагентов «ДНК-сорб-АМ» (Россия, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). В пробирки Eppendorf вносили универсальный сорбент и лизирующий раствор в необходимых количествах в соответствии с инструкцией. После этого вносили 100 мкл образца, перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 мин в термостате при 65°C. После окончания инкубации содержимое повторно перемешивали на вортексе и оставляли при комнатной температуре на 2 мин. Далее осаждали сорбент в пробирках центрифугированием при 10 000 об/мин в течение 30 с. Надосадочную жидкость удаляли в колбуловушку с помощью вакуумного отсасывателя. После этого в пробы добавляли 1 мл отмывочного раствора, перемешивали на вортексе, вновь центрифугировали и удаляли надосадочную жидкость. Затем помещали пробирки с открытыми крышками в термостат на 5–10 мин для подсушивания сорбента, добавляли 100 мкл TE-буфера для элюции ДНК, перемешивали на вортексе до полного ресуспендирования сорбента и помещали в термостат на 5 мин. Последний этап – центрифугирование при 12 000 об/мин в течение 1 мин на микроцентрифуге. Надосадочная жидкость содержала очищенную ДНК.

Амплификацию проводили с использованием коммерческого набора AmpliSens-200-1 (Россия, ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). Реакционную смесь доводили до объема 15 мкл; смесь включала 3 мкл 5×ПЦР-буфера, 1,5 мкл MgSO<sub>4</sub>, 0,3 мкл dNTPmix, 7,2 мкл H<sub>2</sub>O, по 1 мкл F-R-праймеров, 0,05 мкл Taq-полимеразы и 2 мкл хромосомной ДНК исследуемого микроорганизма. Полимеразную цепную реакцию проводили с двумя парами специфических праймеров, опре-

деляющими наличие генов, ассоциированных с «островами» патогенности. Оба гена, отвечающие за продукцию шигаподобных токсинов, иначе называют веротоксинами (Verotoxin I и II, VT1 и VT2). Характеристика и структура праймеров подобраны из источников литературы (табл. 1) [15].

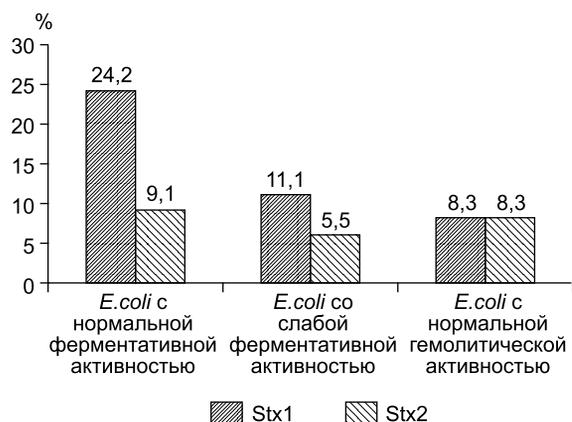
Термическую программу цикла амплификации проводили на амплификаторе (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycles) и определяли методом подбора оптимальных программ после отработки условий, при которых результат был наиболее четким. Обобщенный протокол амплификации состоял из следующих этапов: 1) первоначальная денатурация при 94°C в течение 2 мин; 2) 35 циклов: при 94°C в течение 1 мин, при 55°C в течение 1 мин, при 72°C в течение 1 мин; 3) финальная элонгация при 72°C в течение 3 мин; 4) охлаждение до 4°C.

Продукты амплификации анализировали путем электрофоретического разделения в 1% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. В качестве буферной системы использовали трис-ацетатный буфер. Электрофорез проводили в следующем режиме: 100 В, 50 мА, 40–50 мин. В качестве маркера использовали O'RangeRuler 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва), в качестве отрицательного контроля – реакционную смесь, не содержащую ДНК. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете и документировали с помощью программы inVCR на трансиллюминаторе UVT 1 biokom. Для выявления долевого участия разных видов в структуре биоценоза использовали показатель постоянства (с), определяемый по формуле  $c = (p / P) \cdot 100\%$ , где с – показатель постоянства; p – число наблюдений, содержащих изучаемый вид; P – общее число наблюдений. При с > 50% вид относится к разряду постоянных, при с 25–50% – к добавочным, при < 25% – к случайным [16].

**Результаты и обсуждение.** Спектр кишечной микрофлоры обследованных детей представлен различными видами микроорганизмов: для *Enterococcus* spp. показатель постоянства составлял 62,5%, для *Klebsiella* spp. – 47,2%, для *Staphylococcus* spp. – 27,8%, для *E. coli* со слабой ферментативной активностью – 26,4%, для *Candida* spp. – 19,4%, для *E. coli* с гемолитической активностью – 16,7%, для *Clostridium* spp. – 15,3%, для *Enterobacter* spp. – 7%, для *Proteus* spp. – 4,2%, для *Citrobacter* spp. – 2,8% и для *Pseudomonas* spp. – 1,4%. У детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта отмечается наиболее значимая роль энтерококков в составе микробиоценоза (с=62,5%) по сравнению с другими условно-патогенными микроорганизмами, которые в большинстве случаев попадают в категорию случайных видов (с=19,4 – 1,4%), за исключением *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp. и *E. coli* со слабой ферментативной активностью, попадающих в группу добавочных видов.

Практически у каждого второго обследованного ребенка (48,6%) регистрировался дефицит бифидобактерий (титр < 10<sup>7-6</sup> КОЕ/мл). Каждый десятый ребенок (9,7%) имел дефицит *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, а дефицит лактобактерий отмечен только в 2,8% случаев.

Из 96 образцов культур *E. coli*, исследованных в ПЦР, 19 (19,8%) проб оказались положительными на наличие гена stx1 и 8 (8,3%) – на наличие гена stx2. Оба гена патогенности



Выявление генов шигаподобного токсина в разных типах *E. coli*, выделенных из кишечного биотопа детей.

чаще присутствовали в геноме *E. coli* с нормальной ферментативной активностью (stx1 – 24,2%, stx2 – 9,1%) по сравнению с атипичными ее формами (для форм со слабой ферментативной активностью stx1 определялся в 11,1% случаев, stx2 – в 5,5%, для форм с гемолитической активностью: stx1 – 8,3%, stx2 – 8,3%; см. рисунок) [17].

Одновременное присутствие указанных генов патогенности у одного фенотипического варианта микроорганизма не наблюдалось. Отмечены факты одновременного присутствия одного из двух маркеров токсинов в штаммах *E. coli* с разными фенотипическими характеристиками у одного индивида. У одного ребенка веротоксин 1 определялся одновременно как у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью, так и у *E. coli* со слабой ферментативной активностью, у другого (в одном биотопе) веротоксин 1 определялся у *E. coli* с нормальной ферментативной активностью и у *E. coli* с гемолитической активностью.

Частоту распространения двух генов анализировали в зависимости от микробиологического статуса кишечного биотопа. Отмечено, что если в условиях зубиоза (микробиологического гомеостаза) оба гена выявлялись в геноме *E. coli* примерно с близкой частотой (веротоксин 1 – 10,5% и веротоксин 2 – 12,5%), то в условиях нарушения микробиологического равновесия (дефицит лакто- и бифидобактерий) их «поведение» различалось. При дефиците индигенной микробиоты выявляемость веротоксина 1 незначительно уменьшалась (с 10,5 до 5,3%), а доля аутоштаммов с наличием веротоксина 2 значительно возросла (с 12,5 до 62,5%). В условиях же более глубокого дисбаланса кишечной микробиоты с вегетацией условно-патогенной микробиоты соотношение аутоштаммов с разными веротоксинами менялось на противоположное. При этом доля аутоштаммов с stx1 резко возрастала до 84,2% (от 10,5% при зубиозе), а аутоштаммов с stx2 – снижалась, приближаясь к ситуации при зубиозе. Однотипное «поведение» двух генов мы наблюдали только в условиях зубиоза, тогда как при разных статусах микробиологического дисбаланса в кишечном биотопе преобладают аутоштаммы *E. coli* преимущественно с одним из двух исследуемых генов патогенности.

Таблица 2

Частота встречаемости веротоксина (в процентах) в зависимости от возраста детей

Выборка	Число детей	Ген патогенности	
		stx1	stx2
Дети в возрасте до 1 года	29	31	3,5
Дети старше 1 года	43	19	14

Наличие гена веротоксина 1 у *E. coli*, выделенной от детей в возрасте до 1 года, определялось в 31% случаев, т. е. почти в 2 раза чаще, чем у детей старшей возрастной группы. При этом частота встречаемости веротоксина 2 у *E. coli* детей старше 1 года в 4 раза (14%) выше, чем у детей в возрасте до 1 года (табл. 2).

Острые кишечные инфекции, обусловленные вегетацией шигатоксинпродуцирующими кишечными палочками (STEC) разных серогрупп, включая *E. coli* O157:H7, регистрируются практически повсеместно [11]. Кроме *E. coli* O157:H7, в группу шигатоксинпродуцирующих штаммов *E. coli* включают большее количество шигатоксинпродуцирующих кишечных палочек других серотипов, частота встречаемости и генетическая характеристика которых на территории РФ практически не изучена [18].

Интерес научной и практической медицинской общности к шигатоксинпродуцирующим *E. coli* резко возрос в 2011 г., когда Германия пережила крупнейшую вспышку STEC-инфекции за всю историю: зарегистрировано в общей сложности около 4000 случаев и 50 летальных исходов [19, 20]. Штаммы, выделенные при этой вспышке, относились к энтероагрегативной гемолитической кишечной палочке (ЕАНЕС) O104: H4, продуцирующей stx2 [20].

Штаммы ЕАНЕС впервые определены в качестве агентов болезней человека и стали новым патотипом кишечной палочки. Эволюционная история этого патотипа начинается в Центральной Африке и оттуда распространяется в Европу и Азию. Человек является единственным известным природным резервуаром серотипа ЕАНЕС [20]. Расшифровка последовательностей генома возбудителя показала, что произошла клональная вспышка ЕАНЕС-инфекции; при этом носителями факторов вирулентности являлись плазмиды rAA и умеренные лямбдовидные фаги. Предполагается, что из неизвестного источника эпидемические штаммы приобрели лямбдовидный профаг, несущий ген шигатоксина, и одновременно обладание двумя этими мобильными элементами могло способствовать существенному повышению факторов вирулентности ЕАНЕС [12, 13, 19]. Гены, кодирующие Stxs, как правило, укрываясь в умеренных STX-фагах, могут интегрироваться в геномы таких патогенных штаммов кишечной палочки, что делает их зависимыми от горизонтального переноса генов [21]. Распространяясь таким образом, Stx-фаги в дополнение к повышению патогенного профиля вирулентных штаммов *E. coli*, могут превратить многих комменсальных членов семейства Enterobacteriaceae кишечника в токсинопроизводителей с дополнительными последствиями для прогрессирования разных форм заболеваний (от диарейных до смертельно опасного гемолитико-уремического синдрома) [12]. Среди пациентов, инфицированных бактериями ЕНЕС, дети в возрасте до 5 лет и пожилые люди являются группами высокого риска, а у 3–15% детей, страдающих от диареи, развивается гемолитический уремический синдром. Этот синдром характеризуется острой почечной недостаточностью, гемолитической анемией и тромбоцитопенией. Другие органы, такие как легкие, поджелудочная железа и сердце, также могут быть повреждены патологическими последствиями. Смертность больных со STEC-инфекцией с гемолитическим уремическим синдромом по оценкам доходит до 10% [22].

Глобальное распространение STEC является новой угрозой для здоровья людей, в большей мере проживающих в развитых странах, где массовое применение лекарственных препаратов и антибиотиков способствует формированию новых патотипов в тех микробных сообществах, которые ранее были в большей мере комменсалами и мутуалистами. Исследования по изучению структуры и распространения STEC, являются актуальными и вносят существенный вклад в разработку тактики и стратегии профилактических и лечебных мероприятий, позволяющих снизить проблемность подобных заболеваний.

Полученные нами данные о циркуляции шигатоксин-

продуцирующих штаммов *E. coli*, при этом не относящихся к серогруппе O157, а расцениваемых как представители нормальной микрофлоры, свидетельствуют о гетерогенности указанной группы микроорганизмов по факторам патогенности и, следовательно, о необходимости расширения спектра исследований для максимально полного выявления патогенного потенциала микроорганизмов при обследовании на дисбиоз у пациентов с любой патологией.

#### Выводы

1. У детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта, проживающих в Иркутске, впервые выявлена циркуляция шига-токсины продуцирующих штаммов *E. coli*, по фенотипическим признакам не относящихся к патогенной группе, а являющихся представителями «нормальной» индигенной микрофлоры.

2. Присутствие факторов патогенности stx1 и stx2 в разных биохимических вариантах *E. coli* позволяет констатировать факт формирования резервуара генетических детерминант патогенности у непатогенных эшерихий, о чем свидетельствует обнаружение у них указанных генетических маркеров.

3. Наличие гена (веротоксин 1) в геноме разных биохимических вариантах *E. coli*, выделенных из одного биотопа, свидетельствует о возможной горизонтальной передаче факторов патогенности в кишечном микробиоценозе.

4. В условиях эубиоза частота встречаемости двух веротоксинов одинаково низка (10,5–12,5%). Разнонаправленная распространенность генов патогенности в геноме *E. coli* у детей с функциональными нарушениями желудочно-кишечного тракта зависит от характера дисбиотических нарушений кишечника: в условиях дефицита индигенной микрофлоры организм «отбирает» популяции микроорганизмов с преобладанием веротоксина 2, при вегетации условно-патогенной микрофлоры – с преобладанием веротоксина 1.

5. Штаммы с наличием исследуемых генов, выявленные при эубиозе кишечной биоты, вероятно, способны к персистенции в кишечнике человека без развития патологического процесса, но могут быть потенциальными возбудителями, например, урологических заболеваний.

6. У детей в возрасте до 1 года частота выявления веротоксина 1 значительно выше, что, возможно, является следствием процессов сукцессии при формировании микробиологического равновесия кишечного биотопа (последовательной сменой видов и штаммов бактерий). У детей старшего возраста частота аутоштаммов с наличием веротоксинов примерно одинаковая, что может быть связано с более стабильной видовой структурой микрофлоры.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Бухарин О.В., Лобакова Е.С., Немцева Н.В., Черкасов С.В. Ассоциативный симбиоз. Екатеринбург: УрО РАН; 2007.
2. Проворов Н.А. Генетико-эволюционные основы учения о симбиозе. *Журнал общей биологии*. 2001; 62 (6): 472-95.
3. Аклан Набила Ш.М. *Распространенность и биологические свойства клебсиелл* в условиях техногенной нагрузки крупного промышленного города: автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Волгоград; 2006.
4. Постникова Е.А. Изучение качественного и количественного состава микрофлоры кишечника у клинически здоровых детей в раннем возрасте. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2004; 1: 62-7.
5. Попкова С.М., Волокитина А.С., Джиоев Ю.П., Медведева П.А., Козлова Л.С., Немченко У.М. и др. Ассоциации видов и генов патогенности бактерий рода *Enterococcus*, выделенных из разных биотопов у жителей г. Иркутска. *Известия ИГУ. Серия: Биология. Экология*. 2011; 4 (1): 14-24.
6. Караев Я.М. *Протективные и иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина*: автореф. дисс. ... канд. вет. наук. Краснодар; 2008.
7. Мамбетова Э.Ф. *Сравнительная характеристика некоторых*

*биологических свойств монокультур и сокультивируемых вариаций бактерий рода Serratia и Staphylococcus aureus*: автореф. дисс. ... канд. мед. наук. Челябинск; 2007.

8. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Пилуева А.И. Характеристика генов патогенности популяций *Escherichia coli*, выделенных от детей г. Иркутска. В кн.: *Материалы III международной научно-практической конференции "Экология, здоровье, спорт"*. 27-28 сентября 2011 г. Чита: ЗабГУ; 2011.
9. Лайман Е.Ф., Шаркова В.А., Мазур М.Е., Просяникова М.Н. Молекулярно-генетическая характеристика факторов патогенности *E. coli*, выделенных из операционных ран различных классов. *Международный журнал экспериментального образования*. 2012; 5: 84-5.
10. Seung-Hak Cho, Jung-Beom Kim, Yong-Bae Park, Mi-Sun Park, Hiun Suk Chae, Hae Kyung Lee. A Case of a shiga toxin producing *Escherichia coli*. *Yonsei Med. J.* 2011; 52 (6): 1039-43.
11. Gyles C.L. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: E45-E62.
12. Fogg P.C., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2012; 58 (2): 488-97.
13. Melton-Celsa A., Mohawk K., Teel L., O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012; 357: 67-103.
14. Отраслевой стандарт ОСТ 91500.11.0004-2003. *Протокол ведения больных. Дисбактериоз кишечника*. Утвержден 09.06.03.
15. Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Rey J., Alonso J. M., Hermoso M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4): 1351-6.
16. Захарова Е.А., Азизов И.С. Микробиологическая характеристика кишечного микробиоценоза часто болеющих детей. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2012; 2: 63-8.
17. Иванова Е.И., Попкова С.М., Джиоев Ю.П., Ракова Е.Б. Выявление генов патогенности, кодирующих способность к токсинообразованию, у штаммов *Escherichia coli*, выделенных из кишечного биотопа детей г. Иркутска. *Инфекция и иммунитет*. 2013; 3 (2): 132-3.
18. Шабанова Н.А., Бондаренко В.М. Различия по набору генов патогенности у штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих шига-подобные токсины. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2009; 5: 4-8.
19. Muniesa M., Hammerl J.A., Hertwig S., Appel B., Brüssow H. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78 (12): 4065-73.
20. Beutin L., Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot.* 2012; 75 (2): 408-18.
21. Moons P., Faster D., Aertsen A. Lysogenic conversion and phage resistance development in phage exposed *Escherichia coli* biofilms. *Viruses*. 2013; 5 (1): 150-61.
22. Loś J.M., Loś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G. Altruism of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: recent hypothesis versus experimental results. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2: 166.

#### REFERENCES

1. Bukharin O.V., Lobakova E.S., Nemtseva N.V., Cherkasov S.V. *Associative symbiosis*. Ekaterinburg; 2007. (in Russian)
2. Provorov N.A. Genetic and evolutionary foundations of the theory of symbiosis. *Zhurnal obshchey biologii*. 2001; 62 (6): 472-95. (in Russian)
3. Aklan Nabila Sh.M. *Prevalence and biological properties of Klebsiella in development pressure of a large industrial city*. Diss. Volgograd; 2006. (in Russian)
4. Postnikova E.A. The study of the qualitative and quantitative composition of intestinal microflora in clinically healthy children at an early age. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2004; 1: 62-7. (in Russian)
5. Popkova S.M., Volokitina A.S., Dzhioev Yu.P., Medvedeva P.A., Kozlova L.S., Nemchenko U.M. et al. Association of species and genes of pathogenic bacteria genus *Enterococcus*, isolated from

- different biotopes to residents of the Irkutsk. *Izvestiya IGU. Seriya: Biologiya. Ekologiya*. 2011; 4 (1): 14–24. (in Russian)
6. Karaev Ya.M. *Protective and immunogenic properties of intestinal toxoid*. Dis. Krasnodar; 2008. (in Russian)
  7. Mambetova E.F. *Comparative characteristics of some biological properties of monocultures and sokultiviruemih variations of bacteria of the genus Serratia, and Staphylococcus aureus*. Diss. Chelyabinsk; 2007. (in Russian)
  8. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Yu.P., Pilueva A.I. Characteristics of pathogenicity genes populations Escherichia coli, isolated from children in Irkutsk. In: *Materialy III mezhdunarodnoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Ekologiya, zdorov'e, sport"*. 27–28 Semterber 2011. Chita: ZabGU; 2011. (in Russian)
  9. Lajman E.F., Sharkova V.A., Mazur M.E., Prosjannikova M.N. Molecular genetic characterization of pathogenicity factors E.coli, isolated from surgical wounds of various classes. *Mezhdunarodniy zhurnal Eksperimentalnogo obrazovaniya*. 2012; 5: 84-5. (in Russian)
  10. Seung-Hak Cho, Jung-Beom Kim, Yong-Bae Park, Mi-Sun Park, Hiun Suk Chae, Hae Kyung Lee. *A Case of a shiga toxin producing Escherichia coli*. *Yonsei Med. J.* 2011; 52 (6): 1039-43.
  11. Gyles C.L. Shiga toxin-producing Escherichia coli: an overview. *J. Anim. Sci.* 2007; 85: E45–E62.
  12. Fogg P.C., Saunders J.R., McCarthy A.J., Allison H.E. Cumulative effect of prophage burden on Shiga toxin production in Escherichia coli. *Microbiology*. 2012; 58 (2): 488-97.
  13. Melton-Celsa A., Mohawk K., Teel L., O'Brien A. Pathogenesis of Shiga-toxin producing Escherichia coli. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2012; 357: 67–103.
  14. Industry Standard OST 91500.11.0004-2003. Treatment protocol. "Intestinal dysbiosis". Utverzhden 09.06.03. (in Russian)
  15. Blanco M., Blanco J. E., Mora A., Rey J., Alonso J. M., Hermoso M. et al. Serotypes, virulence genes, and intimin types of shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from healthy sheep in Spain. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(4): 1351-6.
  16. Zkharova E.A., Azizov I.S. Microecological characterization of the intestinal microbiota of sickly children. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2012; 2: 63-8. (in Russian)
  17. Ivanova E.I., Popkova S.M., Dzhioev Ju.P., Rakova E.B. Identification of pathogenicity genes encoding the ability to toxin, strains Escherichia coli, isolated from the intestinal habitat of children in Irkutsk. *Infektsiya i immunitet*. 2013; 3 (2): 132-3. (in Russian)
  18. Shabanova N.A., Bondarenko V.M. Differences over a set of genes in pathogenic strains of Escherichia coli, producing Shiga-like toxins. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2009; 5: 4–8. (in Russian)
  19. Muniesa M., Hammerl J.A., Hertwig S., Appel B., Brüssow H. Shiga toxin-producing Escherichia coli O104:H4: a new challenge for microbiology. *Appl. Environ. Microbiol.* 2012; 78 (12): 4065-73.
  20. Beutin L., Martin A. Outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 infection in Germany causes a paradigm shift with regard to human pathogenicity of STEC strains. *J. Food Prot.* 2012; 75 (2): 408-18.
  21. Moons P., Fester D., Aertsen A. Lysogenic conversion and phage resistance development in phage exposed Escherichia coli biofilms. *Viruses*. 2013; 5 (1): 150-61.
  22. Łoś J.M., Łoś M., Węgrzyn A., Węgrzyn G. Altruism of Shiga toxin-producing Escherichia coli: recent hypothesis versus experimental results. *Front Cell. Infect. Microbiol.* 2012; 2: 166.

Поступила 09.01.14

Received 09.01.14

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.155.191+616.155.294+616.419-004;575.08

Дунаева Е.А.<sup>1</sup>, Миронов К.О.<sup>1</sup>, Дрибноходова О.П.<sup>1</sup>, Субботина Т.Н.<sup>2,3</sup>, Башмакова Е.Е.<sup>2</sup>, Ольховский И.А.<sup>3,4</sup>, Шипулин Г.А.<sup>1</sup>

## КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МУТАЦИИ V617F В ГЕНЕ JAK2 МЕТОДОМ ПИРОСЕКВЕНИРОВАНИЯ

<sup>1</sup>ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, Москва; <sup>2</sup>ФГАУ ВПО «Сибирский федеральный университет», 660041, Красноярск; <sup>3</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Гематологический научный центр» Минздрава России, 660036, Красноярск; <sup>4</sup>ФГБУН «Красноярский научный центр» СО РАН, 660036, Красноярск

*Соматическая мутация V617F в гене JAK2 является частой причиной хронических миелопролиферативных заболеваний, не обусловленных мутацией BCR/ABL. Количественное определение относительной доли мутантного аллеля может быть использовано для определения тяжести течения и прогноза заболевания, а также при назначении лекарств, ингибирующих активность JAK2. Для количественного определения мутации использован метод пиросеквенирования. Разработанная методика позволяет детектировать и количественно определять долю мутантной фракции начиная от 7%. "Серую зону" представляют образцы, имеющие долю мутантного аллеля от 4 до 7%. Зависимость ожидаемой доли мутантной фракции в анализируемом образце от наблюдаемого значения сигнала описывается уравнением прямой с коэффициентами регрессии:  $y=0,97x-1,32$ , при этом погрешность измерения составляет  $\pm 0,7$ . Разработанная методика апробирована на клиническом материале от 192 пациентов с основными формами миелопролиферативных заболеваний, не обусловленных мутацией BCR/ABL. Обнаружено 64 образца, содержащих мутантную фракцию в количестве от 13 до 91%. Разработанная методика позволяет проводить мониторинг терапии миелопролиферативных заболеваний и помогает оптимизировать тактику лечения.*

Ключевые слова: JAK2; хронические миелопролиферативные заболевания; пиросеквенирование.

Для корреспонденции:

Миронов Константин Олегович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр.

Адрес: 111123, Москва, ул. Новогириевская, д. 3А.

E-mail: mironov@pcr.ru