

ТИПИРОВАНИЕ И СУБТИПИРОВАНИЕ ШИГАТОКСИНА *E. COLI*, ВЫЗВАВШЕЙ ПОСТДИАРЕЙНЫЙ ГЕМОЛИТИКО-УРЕМИЧЕСКИЙ СИНДРОМ У ДЕТЕЙ

¹Семейко Г. В., к. м. н., g-semeiko@yandex.ru,

¹Колодкина В. Л., д. м. н., vkolodkina@gmail.com,

¹Самойлович Е. О., д. м. н., профессор, esamoilovich@gmail.com,

²Байко С. В., д. м. н., профессор, baiko@yandex.ru

¹Государственное учреждение «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии и общественного здоровья», г. Минск, Республика Беларусь,

²Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Шигатоксин-продуцирующие *Escherichia coli* (далее – STEC) – это группа патогенных штаммов *E. coli*, способных продуцировать шигатоксины, которые могут вызывать тяжелые кишечные и системные заболевания у людей. Два типа шигатоксина (*stx1* и *stx2*) связаны со штаммами, вызывающими заболевания человека. STEC являются предметом озабоченности общественного здравоохранения из-за возможности вспышек и риска серьезных осложнений. Гемолитико-уремический синдром (далее – ГУС) считается наиболее распространенной причиной острой почечной недостаточности.

Передача инфекции, вызванной STEC, в основном происходит через зараженную пищу или воду и контакт с животными. Передача от человека к человеку также возможна среди близких контактов (семьи, детские сады, дома престарелых и т. д.). Ранее во вспышках в качестве предполагаемых источников упоминалось большое количество пищевых продуктов, включая сырое (непастеризованное) молоко и сыр, недостаточно термически обработанная говядина, различные свежие продукты (например, проросшие зерна, шпинат, салат), непастеризованный яблочный сидр и т. д. Продолжают выявляться и новые источники этой инфекции. Так, недавняя вспышка, вызванная STEC O157, в Канаде и США была связана с половинками и кусочками грецких орехов, продаваемых в контейнерах для оптовых партий [1]. Различные виды животных, в частности крупный рогатый скот и другие жвачные, могут быть здоровыми носителями патогенной для человека STEC, которая может передаваться людям через фекальное загрязнение.

Инкубационный период инфекции, вызванной STEC, составляет от трех до восьми дней. Типичным проявлением ее является острый гастроэнтерит, часто сопровождающийся легкой лихорадкой и иногда рвотой. Типичная кровавистая диарея в большинстве случаев легкая и самокупирующаяся в течение пяти–семи дней. Примерно у 10–15 % детей с диагнозом инфекции, вызванной STEC, развивается тяжелое осложнение – ГУС. Доля ГУС намного ниже среди взрослых.

Тяжесть диареи, вызванной STEC, определяется несколькими факторами, включая серотип *E. coli*, тип продуцируемого шигатоксина и другие характеристики вирулентности бактерий. Возраст пациента и инфицирующая доза также играют важную роль. Дети в возрасте до 5 лет подвергаются более высокому риску развития заболевания, а младенцы подвергаются повышенному риску смерти от обезвоживания и септицемии. Лечение этой инфекции в основном основано на регидратации, в то время как применение антибиотиков часто противопоказано, поскольку оно может активировать высвобождение шигатоксина и, следовательно, вызывать клиническое ухудшение с потенциальным развитием ГУС.

По показателю регистрации ГУС Республика Беларусь находится на одном из первых мест в Европейском регионе. Ежегодно в Республике Беларусь выявляется несколько десятков случаев ГУС. Наиболее высокая заболеваемость ГУС была в 2021 г., когда в течение года было выявлено 80 случаев ГУС, из них

45 – во время вспышки в сентябре–октябре [2]. До 2021 г. молекулярная диагностика ГУС в Республике Беларусь не проводилась.

Цель работы – с использованием молекулярных методов выполнить типирование и субтипирование шигатоксина *E. coli*, вызвавшей постдиарейный ГУС у детей в Республике Беларусь в 2021–2024 гг. и оценить влияние типа шигатоксина на тяжесть течения ГУС.

В исследование включены 98 детей в возрасте 9 мес. – 12 лет с диагнозом ГУС, заболевшие в течение 2021–2024 гг. (4 мес.) (из них 54 – в 2021 г., 18 – в 2022 г., 25 – в 2023 г., 1 – в 2024 г. (4 мес.)). Пациенты поступили в Республиканский центр детской нефрологии и заместительной почечной терапии на базе учреждения здравоохранения «2-я городская детская клиническая больница» г. Минска (далее – 2 ГДКБ). У всех детей, включенных в исследование, проведен сбор образца кала для исследования на энтеропатогены в ПЦР реального времени с использованием технологии TaqMan Array Card (TAC). До начала исследования образцы хранились при температуре минус 80 °С.

Выделение тотальной нуклеиновой кислоты (РНК и ДНК) проводили с использованием набора QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Германия) с модификациями, включавшими предварительное механическое измельчение пробы при помощи стеклянных бусин и дополнительный этап инкубации в течение 5 мин при 95 °С. В качестве внешних контролей экстракции ДНК и РНК во все образцы вносили вирус герпеса тюленей (Phocine Herpes virus) и фаг MS2 соответственно. Каждая партия образцов для экстракции также включала одну пробу отрицательного контроля для мониторинга загрязнения.

Детекцию ДНК/РНК кишечных патогенов выполняли с использованием набора реагентов AgPath-ID One Step RT-PCR Reagents (Applied Biosystems, США) на 384-луночных TAC картах (Applied Biosystems, США). Каждый образец был исследован на наличие 34 кишечных патогенов (вирусных, бактериальных, протозойных), включая диареегенную *E. coli* пяти основных патотипов (EAEC, ETEC, EPEC, STEC, EIEC). Данный метод позволял детектировать гены шигатоксина 1 и 2 типов (*stx1* и *sxt2*) и другие факторы патогенности *E. coli* (гены *aaiC*, *aar*, *aatA*, *aag*, характерные для (EAEC); гены *eae*, *bfpA*, характерные для EPEC; гены *LT*, *STh*, *STp* и факторы колонизации CF, в число которых входят поверхностные антигены (CS1–CS6), характерные для ETEC; ген *ipaH*, выявляемый у *Shigella* и EIEC).

Анализ данных выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения QuantStudio 7 Real-Time PCR software v 1.3 (Life Technologies, США) со стандартизованными порогами флуоресценции. Согласно инструкции разработчика, образцы со значением порогового цикла (Ct) менее 35 считались положительными.

Все образцы, где с использованием технологии TAC обнаружены шигатоксины, были исследованы с помощью ПЦР, направленной на амплификацию и секвенирование фрагментов *stx*-гена для установления субтипа шигатоксинов *stx1* и *sxt2* на основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей [3].

Для проведения всех ПЦР использовали ArtStart ДНК-полимеразу с «горячим стартом» отечественного производства с 10X буфером, смесь дНТФ (10 мМ) и раствор хлорида магния (50 мМ) отечественного производства (АртБиоТех, Беларусь).

Полученные фрагменты кДНК вырезали из геля и очищали с использованием набора QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAGEN, Германия). Секвенирование выполняли в обоих направлениях с использованием набора BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Life Technologies, США) на капиллярном секвенаторе 3500 (Life Technologies, США).

Редактирование полученных нуклеотидных последовательностей осуществляли с использованием лицензионного программного обеспечения SeqScape v 3.0 (Applied Biosystems, США). Трансляцию нуклеотидных последовательностей в аминокислотные и последующий филогенетический анализ выполняли с помощью программы MEGA версии 10. Нуклеотидные последовательности, используемые для генетического и биоинформационного анализа в качестве референсных, брали в Международной базе данных NCBI.

Обработку статистических данных проводили с использованием программы Statistica 13.3. Рассчитывали средние величины и стандартное отклонение при нормальном распределении признака, медиану и квартили – при распределении, отличном от нормального. Для сравнения переменных с нормальным распределением использовали параметрические методы статистической обработки данных, при неправильном – непараметрические: двухсторонний вариант точного критерия Фишера, тест Манна – Уитни. Для описания взаимосвязи двух качественных или качественного и количественного признаков использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (*rs*). Сила корреляционной связи оценивалась как слабая при *rs* < 0,25, умеренная – 0,25–0,75, сильная – > 0,75. Различия считали достоверными при *p* < 0,05.

В результате проведенного исследования диареегенные *E. coli* были выявлены у 45 пациентов. У диареегенных *E. coli* были выявлены факторы вирулентности, характерные для STEC, EPEC, EAEC, ETEC в различных сочетаниях, что позволило дифференцировать «классические» патотипы и гибридные, а также

установить тип шигатоксина (таблица 1). Среди наиболее известных диареегенных *E. coli* только EIEC не были обнаружены ни в одном из исследуемых образцов.

Таблица 1 – Результаты типирования диареегенной *E. coli* и определения типа шигатоксина с использованием метода количественной ПЦР на основе технологии TaqMan Array Card

Патотип <i>E. coli</i>	Количество выявленных штаммов, абс.	Из них продуцировали	
		шигатоксин типа 2 (<i>stx2</i>)	шигатоксины типов 1 и 2 (<i>stx1</i> + <i>stx2</i>)
EAEC	2	-	-
EPEC	3	-	-
STEC	11	10	1
EHEC	15	8	7
EHEC/EAEC	7	5	2
STEC/EAEC	3	3	-
EHEC/ETEC	2	1	1
STEC/EAEC/ETEC	1	-	1
EHEC/EAEC/ETEC	1	-	1
Всего:	45	27	13

Среди 45 случаев выявления диареегенной *E. coli*, в 88,9 % (40 / 45) обнаружены гены шигатоксина. Из них в 67,5 % (27 / 40) случаев выявлялся шигатоксин 2 типа и в 32,5 % (13 / 40) – одновременно присутствовали шигатоксины 1 и 2 типов (таблица 1). Только в 11 случаях шигатоксин являлся единственным фактором патогенности, в 29 случаях он выявлялся вместе с другими факторами, характерными для диареегенных *E. coli*: у 15 детей обнаружена энтерогеморрагическая *E. coli* (EHEC), которая продуцирует шигатоксин и интимин, характерный для энтеропатогенной *E. coli*, у 14 детей – гибридные варианты. Доминирующим гибридным вариантом являлся EHEC/EAEC, он выявлен у 7 заболевших, в 3 случаях обнаружена энтероагрегативная шигатоксин-продуцирующая (STEC/EAEC), и еще у 4 заболевших обнаружены гибридные варианты, у которых выявлены гены термолабильного (LT) и/или термостабильного (STp) токсинов, характерные для ETEC (EHEC/ETEC – у 2 пациентов, EHEC/EAEC/ETEC – у 1 пациента и STEC/EAEC/ETEC – у 1 пациента). Эти 3 гибридных варианта обнаружены в 2022–2023 гг.

В 5 случаях идентифицированы другие не шигатоксин-продуцирующие патотипы *E. coli* (в 3 случаях – EAEC, в 2 – EPEC). Поскольку и EPEC, и EAEC обладают генами вирулентности и способны к продукции собственных токсинов, их роль в развитии ГУС исключить нельзя. Следует отметить, что вспышка геморрагического колита и ГУС в 2011 г. в Германии была вызвана штаммом O104:H4, который содержал гены EAEC (*aggR*, *aggA*, *set1*, *pic* и *aap*) и профаг, кодирующий ген *stx2* (STEC/EAEC).

На основании результатов изучения образца стула, направленного на обнаружение шигатоксина, а также других исследований, для 7 из 98 детей, поступивших во 2 ГКБ на лечение с диагнозом ГУС, окончательный диагноз был определен как атипичный ГУС, для 91 – типичный постдиарейный ГУС. Таким образом, на основании обнаружения шигатоксин-продуцирующей *E. coli* в образцах стула этиологический диагноз типичной ГУС удалось подтвердить у 44,0 % (40 / 91) пациентов. Частота обнаружения шигатоксин-положительных проб среди детей в 2021 г. составила 35,8 % (19 / 53), в 2022 г. – 43,8 % (7 / 16), а в 2023 г. выросла до 63,6 % (14 / 22).

Исследование, направленное на субтипирование шигатоксина, показало следующее. Всего на основании результатов исследования с использованием токсин-антитоксинальных систем (далее – ТАС) у 13 пациентов выявлена смесь шигатоксинов 1 и 2 типа, соответственно образцы от них исследованы одновременно в реакциях к *stx1* и к *stx2*. Также выявлено 27 детей с шигатоксином 2 типа, следовательно все они были исследованы в реакции к *stx2*. Синтез целевого фрагмента гена в ПЦР был успешным для образцов, значение Ct при исследовании в ТАС составляло не менее 31. Всего удалось секвенировать фрагмент *stx1* гена для 11 штаммов STEC и *stx2* – для 29 штаммов.

В результате секвенирования участка гена *stx1* были получены нуклеотидные последовательности длиной 998–1002 п. н. Поскольку субтипирование шигатоксина проводится на основании филогенетического анализа аминокислотных последовательностей, в полученных нами нуклеотидных последовательностях выполнили удаление спейсера, участка между регионами, кодирующими субъединицы А и В, и затем провели трансляцию в аминокислотную последовательность длиной 326 а. к. На основании филогенетического анализа установлено, что все штаммы относились к субтипу *stx1a*, наиболее распространенному среди людей. Все они были идентичны референс-штамму M19473_*stx1a*-O157-EDL933.

Секвенирование фрагмента гена *stx2* 29 штаммов *E. coli* позволило получить нуклеотидные последовательности длиной 608–621 п. н. При сравнении их с референсными штаммами было выявлено 5 штаммов, которые содержали 15 вырожденных оснований, что свидетельствует о том, что в исследуемых образцах от пациентов присутствовали гены различных типов токсина. Сравнение с референс-последовательностями всех субтипов показало, что 14 из 15 замен локализовались в позициях, которые позволяют дифференцировать субтипы *stx2a* и *stx2c*. Нуклеотидные последовательности 24 штаммов также были подвергнуты удалению спейсера и трансляции и преобразованы в аминокислотные длиной 200 а. к. Их филогенетический анализ показал, что 23 штамма относились к субтипу *stx2a*, и 1 – к субтипу *stx2c*. Известно, что именно эти 2 субтипа, наряду с *stx2d* ассоциированы с высоким риском ГУС у человека [4].

Нуклеотидные последовательности фрагмента гена *stx1* и *stx2* штамма BLR-19268, относящегося к субтипу *stx1a* + *stx2c*, а также нуклеотидная последовательность фрагмента гена *stx2* штамма BLR-19203, относящегося к субтипу *stx2a*, депонированы в Международную базу данных Национального центра биотехнологической информации США (NCBI) (коды доступа PP908961-PP908963).

Изучение влияния типа шигатоксина на клиническую картину, тяжесть течения и исходы заболевания показало, что пациенты с положительным результатом ПЦР на *stx2* в сравнении с группой на *stx1* + *stx2* младше по возрасту, у них был значимо короче продромальный период ($p = 0,008$) и имелась тенденция, отражающая более тяжелое течение заболевания. Обнаружены корреляционные связи средней силы между детекцией *stx* и прогнозируемой тяжестью отдаленных последствий ГУС ($r_s = 0,29$; $p = 0,008$), длительностью продрома ($r_s = -0,294$; $p = 0,006$), временем от начала диареи до забора фекалий на ПЦР анализ ($r_s = -0,25$; $p < 0,05$) и количеством лейкоцитов при поступлении в диализный центр ($r_s = 0,25$; $p < 0,05$). Полученные нами данные подтвердили, что, несмотря на сходные последовательности *stx1* и *stx2*, они повреждают ткани по-разному и в разной степени, что подтверждается более высокой патогенностью штаммов *E. coli*, образующих только *stx2* [5].

Таким образом, проведенное с использованием молекулярных методов исследование позволило обнаружить диареегенную *E. coli* у 45 из 98 детей с ГУС. Для 91 (92,9 %) ребенка, поступивших на лечение с диагнозом ГУС, окончательный диагноз был определен как типичный постдиарейный ГУС. На основании обнаружения шигатоксин-продуцирующей *E. coli* в образцах стула этиологический диагноз тГУС удалось подтвердить у 44,0 % (40 / 91) пациентов. Частота обнаружения шигатоксин-положительных проб среди детей в 2021 г. составила 35,8 % (19 / 53), в 2022 г. – 43,8 % (7 / 16), а в 2023 г. выросла до 63,6 % (14 / 22). Субтипирование шигатоксинов 1 и 2 типов, выполненное при помощи секвенирования фрагментов *stx1* и *stx2* генов, показало, что шигатоксин 1 типа относился к субтипу *stx1a* (11 штаммов), шигатоксин 2 типа – к субтипам *stx2a* (23) и *stx2c* (1), также выявлялась смесь *stx2a* + *stx2c* [5]. Полученные данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего расширенного молекулярно-генетического анализа выявленных *E. coli* с проведением их серо- и генотипирования.

Литература

1. *E. coli* Outbreak Linked to Organic Walnuts [Electronic resource] / U. S. Centers for Disease Control and Prevention // CDC. – Mode of access: <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks/organic-walnuts-04-24.html>. – Date of access: 28.08.2024.
2. Этиологическая диагностика постдиарейного гемолитико-уремического синдрома у детей с использованием TaqMan Array карт / Г. В. Семейко [и др.] // Педиатрия. Восточная Европа. – 2022. – Т. 10, № 4. – С. 510–519.
3. Identification of the subtypes of Shigatoxin encoding genes (*stx*) of *Escherichia coli* by conventional PCR [Electronic resource] / EU Reference Laboratory for *E. coli* // ISS. – Mode of access: https://www.iss.it/documents/20126/0/EURL-VTEC_Method_06_Rev+2+%281%29.pdf/d2e51896-ed7b-36eb-8caf-26ba6e3d1350?t=1644309383905. – Date of access: 28.08.2024.
4. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations / S. Persson [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, iss. 6. – P. 2020–2024.
5. Hemolytic uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in children: incidence, risk factors, and clinical outcome / E. Ylinen [et al.] // Pediatr. Nephrol. – 2020. – Vol. 35, iss. 9. – P. 1749–1759.

Поступила 02.09.2024

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГИГИЕНЫ, ТОКСИКОЛОГИИ,
ЭПИДЕМИОЛОГИИ, ВИРУСОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ
«РЕСПУБЛИКАНСКИЙ ЦЕНТР ГИГИЕНЫ, ЭПИДЕМИОЛОГИИ
И ОБЩЕСТВЕННОГО ЗДОРОВЬЯ» (НИИ ГТ ЭВМ РЦГЭиОЗ)
ОБЩЕСТВЕННОЕ ОБЪЕДИНЕНИЕ
«НАУЧНОЕ ОБЩЕСТВО ГИГИЕНИСТОВ»

**СБОРНИК МАТЕРИАЛОВ
МЕЖДУНАРОДНОЙ
НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКОЙ КОНФЕРЕНЦИИ
«ЗДОРОВЬЕ И ОКРУЖАЮЩАЯ СРЕДА»**

5–6 декабря 2024 года, г. Минск

Гомель
Редакция газеты «Гомельская праўда»
2024