



ივანე ჯავახიშვილის სახელობის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი

**საქართველოში გავრცელებული ტოქსიგენური Escherichia coli-ის O104
შტამების დახასიათება პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზის
მეთოდით**

გვანცა ბრაჭველი

ზუსტ და საბუნებისმეტყველო მეცნიერებათა ფაკულტეტი, საბაკალავრო პროგრამა:
ბიოლოგია

ნაშრომი შესრულებულია ბიოლოგიის ბაკალავრის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

ხელმძღვანელები: **თეა თევდორაძე** (ზმდ,
დკსჯეც, ლუგარის ლაბორტორია)

ნუნუ მიცკევიჩი (ზმდ,
თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტი)

რიჩარდ ლუგარის სახელობის საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის კვლევითი ცენტრი

თბილისი

2017

სარჩევი

ანოტაცია.....	4
Annotation.....	5
თავი I	6
შესავალი	6
1.1 თემის აქტუალობა.....	6
1.2 კვლევის მიზანი	7
თავი II.....	8
ლიტერატურული მიმოხილვა.....	8
2.1 მიკროორგანიზმის ზოგადი დახასიათება.....	8
2.2 მიკროორგანიზმის ანტიგენური სტრუქტურა და კლასიფიკაცია.....	8
2.3 შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი E.coli.....	10
2.4 შიგა ტოქსინი	12
2.5 STEC O104:H4.....	13
2.6 ინფექციის წყარო და გადაცემის გზა.....	14
თავი III.....	16
კვლევის მასალა და მეთოდები.....	16
3.1 კვლევის მასალა	16
3.2 კვლევის მეთოდი.....	16
3.2.1. გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში	16
3.2.2. პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის შედარება სტანდარტულ გელ-ელექტროფორეზთან	18
3.3 პროცესის მსვლელობა	19
3.3.1 პლაგების დამზადება.....	19

3.3.2 პლაგების ლიზისი, რეცხვა და დაჭრა.....	20
3.3.3 რესტრიქცია	21
3.3.4 ელექტროფორეზი.....	24
3.3.5. შედეგების ვიზუალიზაცია	26
3.3.6. შედეგების პროგრამული ანალიზი	26
თავი IV.....	27
შედეგები	27
4.1. XbaI რესტრიქციის შედეგები	27
4.2. AvrII რესტრიქციის შედეგები.....	29
თავი V	31
დასკვნა	31
მადლობა	32
გამოყენებული ლიტერატურა	33

ანოტაცია

შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი *E.coli*-ის (STEC) დეტექცია და შესწავლა უმნიშვნელოვანეს წინაპირობას წარმოადგენს მისგან გამოწვეული დაავადებების დროული დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის პროცესისთვის. ამის თქმის საფუძველს ქმნის ის, რომ იგი წარმოადგენს გასტეროენტერიტული დაავადებების ძირითად გამომწვევეს, მთავარ გართულებად კი შეგვიძლია მივიჩნიოთ ჰემოლიზურ-ურემიული სინდრომი (HUS). ამასთან, *E.coli* გამოირჩევა საოცარად დიდი შიდასახეობრივი მრავალფეროვნებით და, განსაკუთრებით კი, ისეთი პათოგენური შტამების არსებობით, როგორებიცაა: O26, O45, O103, O111, O145, O157, O104 და სხვა.

რ. ლუგარის საზოგადოებრივი ჯანდაცვის ცენტრის ლაბორატორიაში შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი *E.coli*-ის (STEC) სრული შესწავლა მიმდინარეობს ლაბორატორიული კვლევის ალგორითმის მიხედვით. კვლევის ერთ-ერთ მნიშვნელოვან ეტაპს წარმოადგენს შტამების მოლეკულური ტიპირება, რომელიც ხორციელდება გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით პულსირებად ველში (PFGE).

ჩატარებული კვლევის ფარგლებში შევისწავლეთ STEC O104 -ის ხუთი შტამი, რომლებიც საქართველოში გამოიყო სხვადასხვა გართულებით მიმდინარე დიარეის მქონე პაციენტებისგან. გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით პულსირებად ველში (PFGE) შესაძლებელი გახდა მათი მოლეკულური ტიპირება გენეტიკური მრავალფეროვნების გამოვლენის მიზნით. შტამები შედარდა როგორც ერთმანეთთან, ისე 2009 წლის ეპიდემიოლოგიური აფეთქების დროს გამოყოფილ ორ ისტორიულ შტამთან (2009EL-2050, 2009EL-2071). კვლევის შედეგად გამოიყო ოთხი PFGE პროფილი, რაც საქართველოში მოცირკულირე შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი STEC O104 ის გენეტიკურ მრავალფეროვნებაზე მიუთითებს.

Characterization of toxigenic *E.coli* O104 strains from Georgia by Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)

Gvantsa Brachveli

Annotation

Detection and molecular characterization of shiga toxin producing *E.coli* (STEC) has a high importance for timely diagnosis and treatment of the disease, as *E.coli* is the main cause of gastrointestinal disease in humans. The most problematic complication is Hemolytic Uremic Syndrome (HUS). On the other hand, *E.coli* is recognized to contain highly virulent strains for human, like O26, O45, O103, O111, O145, O145, O157, O104 and etc.

The Algorithm for laboratory diagnosis of Shiga toxin producing *E.coli* (STEC) is introduced in Richard G. Lugar Center for Public Health Research. There is developed Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) for genetic comparison and molecular typing of Shiga toxin producing *E.coli*.

The object of our research was five STEC O104 strains. According to our previous experiments, genomes of samples were compared to each other. In the same way, we compared these samples to the 2 historical reference genomes of O104 *E.coli*, isolated from epidemiological outbreak in 2009 (2009EL-2050, 2009EL-2071).

The analysis of obtained data reveals four PFGE profiles out of the five samples. By these results we can see the high diversity of shiga toxin *E.coli*, spread in Georgia.

თავი I

შესავალი

1.1 თემის აქტუალობა

წყლისა და საკვების ბაქტერიული დაბინძურება მსოფლიო ჯანდაცვის ორგანიზაციების ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ და მუდმივ კვლევის საგანს წარმოადგენს, ვინაიდან მათთან დაკავშირებული დაავადებები საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის საკმაოდ დიდი პრობლემაა. განსაკუთრებით ეს ითქმის ინფექციურ დიარეებზე. WHO-ს (ჯანდაცვის მსოფლიო ორგანიზაცია) მონაცემებით 21-ე საუკუნის პირველ ათწელში მხოლოდ მწვავე დიარეით ყოველწლიურად 2 მილიარდი შემთხვევა ფიქსირდება, მათგან კი 1.5 მილიონი ლეტალურად სრულდება. [31]

ზემოაღნიშნული შემთხვევების ძირითად გამომწვევს წარმოადგენს *E.coli*. ნორმალურ შემთხვევაში, *E.coli* არის თბილსისხლიანი ორგანიზმების ნაწლავური ფლორის შემადგენელი ნაწილი და სრულიად უსაფრთხოა მასპინძლისთვის, თუმცა არსებობს მისი ისეთი შტამები, რომლებიც საკმაოდ მძაფრი და რთულად მიმდინარე პროცესებით ხასითდებიან. ასეთი სეროტიპებიდან ჰემორაგიული დიარეის გამომწვევ მთავარ აგენტად აშშ-ში გვევლინება *E.coli*-ის O157:H7 შტამი. რაც შეეხება ევროპის ქვეყნებს, აღნიშნული შტამი აქ ნაკლები სიხშირით ვრცელდება და ძირითად გამომწვევებს წარმოადგენენ: O26, O45, O103, O111, O145 და O157 შტამები („დიდი ექვსეულის“ შტამები). ხოლო, ძირითადი გართულებები, როგორც წესი, უკავშირდება ჰემოლიზურ-ურემიულ (HUS) სინდრომის გამოწვევას. [18, 8]

რაც შეეხება საქართველოს, საქართველოს დაავადებათა კონტროლისა და საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის ეროვნული ცენტრის (NCDC) მონაცემების მიხედვით, საქართველოში ინფექციური დიარეის მაჩვენებელი საკმაოდ მაღალია (100000 მოსახლეზე 170-226). 2009 წელს აღინიშნა ჰემორაგიული კოლიტებისა და HUS-ის გართულებულ შემთხვევათა განსაკუთრებული ზრდა, რომელსაც ეპიდემიოლოგიური აფეთქების სახე ჰქონდა. დაფიქსირდა 7 ლეტალური შემთხვევა. ამ ეპიდემიოლოგიური აფეთქების ორ შემთხვევაში

გამოიყო *E.coli* O104:H4 შტამი - 2009EL-2050, 2009EL-2071 (დადასტურებულია ატლანტის რეფერალური ლაბორატორიის მიერ). [12]

საინტერესოა 2011 წლის მოვლენები. ივნის-აგვისტოს პერიოდში გერმანიაში წარმოიშვა მსგავსი O104:H4 შტამის მიერ გამოწვეული ეპიდემიოლოგიური აფეთქება. WHO-ს მონაცემებით, დაფიქსირდა ჰემორაგიული კოლიტის 4000-მდე შემთხვევა, მათ შორის 50-მდე დასრულდა ლეტალურად. პარალელურად, 2011 წელს, საქართველოში STEC ინფექციაზე საექვო 157 გამოკვლეული პაციენტიდან 76 დადებითი აღმოჩნდა STEC-ის ტოქსიგენობის სხვადასხვა მარკერზე.

ზემო-აღნიშნულ მიზეზთა გამო, როგორც ვხედავთ, პრობლემატიკა საკმაოდ აქტუალურია. შესაბამისად, *E.coli*-ის დროული დეტექცია და მოლეკულური ტიპირება უმნიშვნელოვანეს როლს ასრულებს არა მხოლოდ კონკრეტულ შემთხვევებში (მწვავე დიარეით მიმდინარე დაავადებების დიგნოსტიკა-მკურნალობა), არამედ მნიშვნელოვანია ეპიდემიოლოგიური აფეთქებების კონტროლისა და პრევენციის პროცესში.

1.2 კვლევის მიზანი

კვლევის მიზანს წარმოადგენდა 2012-2015 წლებში საქართველოში გამოყოფილი შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი O104:H4 *E.coli*-ის 5 შტამის მოლეკულური ტიპირება გელ-ელექტროფორეზის მეთოდით პულსირებად ველში (PFGE).

ასევე, ამ შტამების შედარება როგორც ერთმანეთთან, ისე - 2009 წლის აფეთქებიდან გამოყოფილ ისტორიულ შტამებთან (2009EL-2050, 2009EL-2071), გენეტიკური მრავალფეროვნების გამოვლენის მიზნით.

კვლევის ერთ-ერთ მიზანს წარმოადგენდა შტამების დახასიათება განსხვავებული რესტრიქციული აქტივობის რესტრიქტაზებით: პირველადი რესტრიქტაზა - XbaI და მეორადი რესტრიქტაზა - AvrII.

თავი II

ლიტერატურული მიმოხილვა

2.1 მიკროორგანიზმის ზოგადი დახასიათება

Escherichia coli არის მიკროორგანიზმი, რომელიც პირველად ავსტრიელმა ექიმმა, თეოდორ ეშერიხმა გამოყო 1885 წელს ადამიანის ფეკალიიდან. წარმოადგენს გრამ-უარყოფით, ფაკულტატურ ანაერობულ ბაქტერიას. ზომით - 1-3 მკმ სიგრძის, 0.4-0.8 მკმ სიგანის, ფორმით - ჩხირისებური ბაქტერიაა. აღსანიშნავია, რომ არ ახასიათებს სპორების წარმოქმნა. საერთაშორისო სტანდარტებში გამოიყენება, როგორც წყლის ფეკალური დაბინძურების ხარისხის მაჩვენებელი. [1]

ბინადრობს ადამიანის ორგანიზმში და წარმოადგენს ნორმალური მიკროფლორის ერთ-ერთ კომპონენტს. ჩვეულებრივ პირობებში, ის უსაფრთხო ორგანიზმია, იგი არა თუ დაავადებას იწვევს, არამედ დადებით როლს ასრულებს არაერთ მნიშვნელოვან პროცესში. მიუხედავად იმისა, რომ მისი რაოდენობა არ აღემატება ნაწლავური მიკროფლორის 0.1%-ს, მათ ეკისრებათ ისეთი ფუნქციები, როგორებიცაა: ქოლესტერინის, ბილირუბინის, ქოლინის, ნაღვლისა და ცხიმოვანი მჟავების ცვლაში მონაწილეობა, B და K ჯგუფის ვიტამინების სინთეზი, გავლენას ახდენს რკინისა და კალციუმის შეწოვაზე. ასევე საინტერესოა, რომ იგი შთანთქამს ნაწლავებში არსებულ ჟანგბადს, რომელიც უარყოფითად მოქმედებს ბიფიდო და ლაქტობაქტერიებზე. ყოველივე აქედან გამომდინარე, მისი არსებობა ნორმალურ მიკროფლორაში აუცილებელია.

2.2 მიკროორგანიზმის ანტიგენური სტრუქტურა და კლასიფიკაცია

თავის მხრივ, *E.coli* მიეკუთვნება ენტერობაქტერიების (Enterobacteriaceae) ოჯახს. თუმცა, თვითონ წარმოადგენს საკმაოდ მრავალფეროვნებით გამოირჩევა და მოითხოვს კლასიფიკაციას.

E.coli-ის პათოტიპების კლასიფიკაცია (ევოლუციური ტაქსონომიისგან დამოუკიდებლად) შესაძლებელია უჯრედულ კედელზე არსებული ანტიგენური სტრუქტურების მეშვეობით, ვინაიდან სწორედ ისინი განსაზღვრავენ მიკროორგანიზმის სეროტიპს. ძირითადი როლი ენიჭებათ O(უჯრედული) და H (ფლაგელარული) ანტიგენებს.

ნაწლავის ჩხირი შეიცავს სამი ტიპის ანტიგენს: O - სომატური, K - კაპსულარული, H - შოლტის.

- O - სომატური ანტიგენი თერმოსტაბილურია და მოთავსებულია უჯრედის კედელზე. თავის მხრივ წარმოადგენს ლიპო-პოლისაქარიდო-პროტეინულ სტრუქტურას და ამ კომპლექსში თითოეულ ნაწილს თავისი ფუნქცია აქვს. ლიპიდი განსაზღვრავს ტოქსიკურობას, ანუ ენდოტოქსინია. პოლისაქარიდი - სეროლოგიურ სპეციფიკურობას, სწორედ მას ენიჭება განსაკუთრებული როლი კლასიფიკაციის დროს. პროტეინი წარმოადგენს ანტიგენური თვისებების მატარებელ ნაწილს.
- K - კაპსულარული ანტიგენი წარმოადგენს გლიკოპროტეინს. მისი იმუნოგენობა დამოკიდებულია ქიმიურ ბუნებაზე.
- H - შოლტის ანტიგენი თერმოსტაბილური შოლტის ცილაა. მახასიათებელ თვისებას წარმოადგენს მრავალფეროვნება - გამოირჩევა რამდენიმე ათეული სეროლოგიური ნაირსახეობით. [20, 13]

აღნიშნული ანტიგენები მნიშვნელოვანია ანტიგენური აღნაგობის ფორმულის ჩასაწერად. *E.coli* -ის მიკროორგანიზმის ანტიგენურ აღნაგობას გამოსახავენ ფორმულით, რომელშიც ყოველი ანტიგენის ასოთი აღნიშვნის შემდგომ მოდის არაბული ციფრი, ეს უკანასკნელი მიუთითებს ანტიგენის რიგით ნომერს სადიაგნოსტიკო ანტიგენურ სქემაზე.

თანამედროვე კლასიფიკაციით, *E.coli* წარმოდგენილია 7 ძირითადი პათოტიპი, რომლებიც მოცემულია ცხრილში N1.

1. შიგა ტოქსინ მატოციტოგენური <i>E.coli</i> (STEC) ანუ ენტეროჰემორაგიული <i>E.coli</i> (EHEC)
2. ენტეროტოქსიგენური <i>E.coli</i> (ETEC)
3. ენტეროპათოგენური <i>E.coli</i> (EPEC)
4. ენტეროინვაზიური <i>E.coli</i> (EIEC)
5. ენტეროაგრეგაციული <i>E.coli</i> (EAEC)
6. დიფუზურ-ადჰერენტული <i>E.coli</i> (DAEC)
7. ადჰერენტულ-ინვაზიური <i>E.coli</i> (AIEC)

ცხრ. N1 *E.coli*-ის 7 ძირითადი პათოტიპი

აღნიშნული პათოტიპები მნიშვნელოვანია, ვინაიდან იწვევენ ადამიანისთვის დამახასიათებელ არაერთ ინფექციურ დაავადებას. აქ უნდა გამოიყოს ისეთი მძიმე დაავადებები, როგორებიცაა: საშარდე სისტემის ინფექცია (UTI), ნეონატალური მენინგიტი და, განსაკუთრებით, ინტესტინური დაავადებები - გასტეროენტერიტები.

მეორე მხრივ, აღნიშნული პათოტიპები სხვადასხვა ტიპისა და სხვადასხვა ხარისხის რეზისტენტულობას სხვადასხვა ანტიბიოტიკების მიმართ. სწორედ აღნიშნული ფაქტორები - სეროტიპების სიმრავლე, გამოწვეული კლინიკური ნიშნების სხვადასხვაობა და ანტიბიოტიკებისადმი მაღალრეზისტენტულობა მეტად აქტუალურს ხდის *E.coli*-ის მრავალპროფილურ შესწავლას.

2.3 შიგა ტოქსინის მატოციტოგენური *E.coli*

შიგა ტოქსინის მატოციტოგენური *E.coli* (STEC) ერთ-ერთი ყველაზე ფართოდ გავრცელებული და ცნობილი წარმომადგენელია ენტეროპათოგენებისა. იმის მიხედვით, თუ რა სირთულითა და დოზით იწვევენ ისინი ინფექციებს, გამოყოფენ STEC-ის 5 ძირითად სეროტიპს და მათ აღნიშნავენ ლათინური ასოებით: A, B, C, D, E. თითოეული ჯგუფი აერთიანებს არაერთ შტამს. აღსანიშნავია ისიც, რომ A სეროტიპი წარმოადგენს დაავადების ყველაზე ხშირ გამომწვევს და მისთვის ყველაზე რთული პათოგენეზი არის

დამახასიათებელი, ხოლო სიმწვავის ხარისხი მომდევნო სეროტიპებში თანდათან კლებულობს.

შტამების განაწილება სეროტიპებში, მათ მიერ გამოწვეული დაავადების სიხშირე და სიმწვავე, ასევე აფეთქებებში ჩართულობა მოცემულია ცხრილში N.2

¹ სერო-პათოტიპი	სეროტიპი	დაავადების გამოწვევის სიხშირე	აფეთქებებში ჩართულობა	HUS ² და HC ² გამომწვევი
A	O157:H7 ,O157:NM	მაღალი	დამახასიათებელი	+
B	O26:H11, O103:H2, O121:H19	ზომიერი	არადამახასიათებელი	+
C	O104:H21, O113:H21,O91:H21, O113:H21 და ა.შ	დაბალი	იშვიათი	+
D	O103:H25, O117:H7და ა.შ	დაბალი	იშვიათი	-
E	O6:H34, O8:H19, O39:H49 და ა.შ	არ იწვევენ	დაავადებას	-

ცხრ. N2. შიგა-ტოქსინის მაპროდუცირებელი *E.coli*-ის სეროტიპების განაწილება, დაავადების გამოწვევის სიხშირის, აფეთქებებში ჩართულობისა და პათოგენუზის მიხედვით.

მიკროორგანიზმების დიფერენცირებისა და ვირულენტური ბუნების დახასიათებისათვის სეროტიპის განსაზღვრა მნიშვნელოვან საფუძველს წარმოადგენს. ამერიკის შეერთებული შტატების მონაცემებზე დაყრდნობით, O157:H7 ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული შტამია STEC ინფექციებისა და აფეთქებების გამოწვევის მიხედვით. პირველად იგი აღმოაჩინეს 1982 წელს ჰემორაგიული კოლიტის ინფექციის აფეთქებისას აშშ-ში. ამის შემდგომ კვლავ დაფიქსირდა სპორადიული შემთხვევები და ინფექციის აფეთქებები მთელს მსოფლიოში, მათგან ერთ-ერთი ყველაზე მასშტაბური აფეთქება - იაპონიაში, რომლის შედეგად ინფიცირდა 9000 ბავშვი.

როგორც უკვე ავლნიშნეთ, O157:H7 ერთ-ერთი ყველაზე გავრცელებული შტამია ადამიანებში და ამასთან ერთად ცხოველებშიც. შესაბამისად, STEC სეროტიპები ძირითადად დაყოფილია ორ მთავარ კატეგორიად: O157 და non-O157 შტამები. [29]

2.4 შიგა ტოქსინი

ენტერო ჰემორაგიული *E.coli*-ის პრაქტიკულად ყველა იზოლატი შეიცავს ვირულენტურ პლაზმიდას - pO157. პლაზმიდის ზომა დაახლოებით 97 KB-ია და ის უზრუნველყოფს რამდენიმე ტიპის ვირულენტური ფაქტორის სინთეზს. ამ ფაქტორთაგან ერთ-ერთი ყველაზე მნიშვნელოვანია ბაქტერიოფაგით კოდირებული შიგა-ტოქსინი, იგივე ვეროციტოტოქსინი. [4]

შიგა - ტოქსინი მაპროდუცირებელი *E.coli*-ის (STEC) ვირულენტობის გენები მობილიზებულია მიკროორგანიზმის პლაზმიდასა და ქრომოსომულ დნმ-ში. ვირულენტობის ძირითად ფაქტორებს წარმოადგენენ შიგა ტოქსინის (*Stx1*, *Stx2*) მაპროდუცირებელი გენები (თუმცა, რა საკვირველია, ვირულენტობის განსაზღვრაში სხვა ფაქტორებიც მონაწილეობენ, მაგალითად: ინთიმინი (*eae*) და ენტეროჰემოლიზინი (*Ehly*)).

შიგა ტოქსინები - ადამიანიდან იზოლირებულ STEC-ს აქვს შესაძლებლობა ბაქტერიოფაგით კოდირებული *Stx1* ან *Stx2* შიგა ტოქსინების პროდუცირებისა. შიგა ტოქსინი წარმოადგენს რთული სტრუქტურის მქონე ჰექსამერს, რომელიც შეიცავს ორი ტიპის სუბერთეულებს: A და B სუბერთეულებს. A სუბერთეული B სუბერთეულების პენტამერს უკავშირდება არაკოვალენტურად და წარმოიმნება A1B5 სტრუქტურა. A სუბერთეულს გააჩნია N-გლიკოზიდაზურ აქტივობა და ავლენს ცილის მაინჰიბირებელ უნარს მასპინძელ უჯრედში. რაც შეეხება B სუბერთეულს, მისი ფუნქცია ტოქსინის სამიზნე უჯრედთან დაკავშირებაა, კერძოდ Gb3 (გლობოტრიასილცერამიდი) *Stx*-ის უჯრედულ გლიკოლიპიდურ რეცეპტორს წარმოადგენს და სწორედ ამით აიხსნება თირკმლის უპირატესი დაზიანება HUS-ის დროს. [4, 10, 28]

აღსანიშნავია, რომ *Stx1* და *Stx2* მოლეკულებში A სუბერთეულის ამინომჟავური შემადგენლობა 55%-ით ემთხვევა ერთმანეთს.

E.coli -ის *Stx1* ფაქტიურად იდენტურია შიგელას (*Shigella dysenteriae*) მიერ წარმოებული ტოქსინისა, განსხვავება ერთ ამინომჟავურ თანმიმდევრობაშია, ამასთან *Stx1*-ის 60% იდენტურია *Stx2* -ისა. ჰემორაგიული კოლიტისა ან HUS-ის მქონე პაციენტებიდან მიღებული, *E.coli* O157:H7-ის კლინიკური იზოლატები აპროდუცირებდნენ უფრო ხშირად

Stx2. ამასთან, *in vitro* კვლევებით აღმოჩნდა რომ ადამიანის ინტენტიციუმის ენდოთელური და თირკმლის გლომერულური ენდოთელური უჯრედები არიან 1000-ჯერ უფრო მგრძობიარენი *Stx2*-ის ციტოტოქსიური ეფექტების მიმართ, ვიდრე *Stx1*-ის შემთხვევაში.

2.5 STEC O104:H4

2011 წელს გამოქვეყნებული კვლევის მიხედვით, ყოველ წლიურად ა.შ.შ-ში დაავადების დაახლოებით 93,094 შემთხვევა გამოწვეული იყო შინაურ ცხოველებთან კონტაქტით. ყოველწლიურად საკვებისმიერი დაავადებების შემთხვევები კი მოიცავს 2,138 ჰოსპიტალიზაციას და 20 ფატალურ შემთხვევას. [11]

ამავე წელს, ევროპა მოიცვა *E.coli* O104:H4 შტამის აფეთქებამ. შემთხვევები გამოირჩეოდნენ განსაკუთრებულად მაღალი ვირულენტობითა და რეზისტენტულობით. ჯამში გამოვლინდა 3842 შემთხვევა გასტეროენტერიტებისა, მათგან 782 მიმდინარეობდა ჰემოლიზურ-ურემიული სინდრომით და ლეტალურად დასრულდა 46. [10]

საინტერესოა ისიც, რომ ამ აფეთქების მიზეზი - *E.coli* O104:H4 შტამი მიეკუთვნება ენტეროჰემორაგიულ *E.coli* (EHEC) ჯგუფს. თუმცა, ამ კონკრეტულ შემთხვევებში, შტამები გაცილებით უფრო ახლოს იდგნენ ენტეროაგრეგატული *E.coli* (EAEC) შტამებთან. გამოვლინდა ორივე ჯგუფისთვის დამახასიათებელი გენეტიკური მახასიათებლები - ვირულენტური ფაქტორები.

ძირითად განსხვავებას წარმოადგენდა ის, რომ ამ შტამებში წარმოდგენილი იყო შიგა ტოქსინი, რომელიც ენტეროჰემორაგიული ჯგუფის მთავარი მახასიათებელია და სწორედ ამის მიხედვით მოხდა კლასიფიკაცია, შტამი კი მიაკუთვნეს ენტეროჰემორაგიულ ჯგუფს.

გენომური მახასიათებლების კომბინაციის მიხედვით, შეიძლება ითქვას, რომ აღნიშნული შტამი სრულიად ახალი პათოტიპია. იგი წარმოადგენს კლონს, რომელსაც აქვს ორივე პათოტიპისთვის (EHEC, EAEC) დამახასიათებელი ვირულენტურობის პოტენციალი. გარდა ამისა, დადგინდა, რომ მისი განსაკუთრებულად მაღალი რეზისტენტულობა დამოკიდებულია β-ლაქტამაზას არსებობაზე.

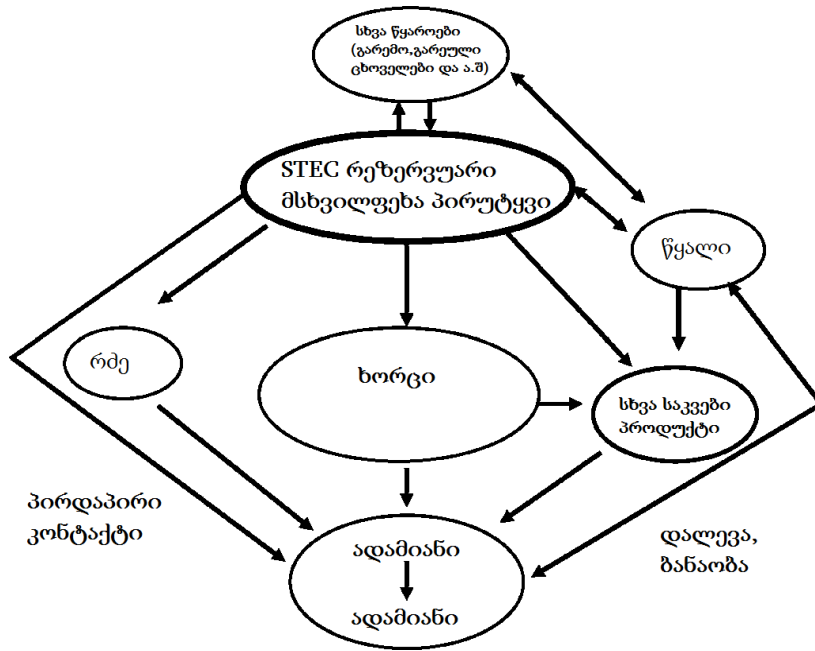
EHEC დამახასიათებელი ვირულენტობის ფაქტორები	EAEC დამახასიათებელი ვირულენტობის ფაქტორები
<ol style="list-style-type: none"> 1. შიგა ტოქსინ 2 Stx2 2. ადჰეზინი iha 3. ფიმბრიების ცილა IpfO26 4. ფიმბრიების ცილა IpfO113 	<ol style="list-style-type: none"> 1. აგლუტინაციის ცილა aggA 2. ტრანსკრიფციის ფაქტორი aggR 3. ჰისტონ მეთილ-ტრანსფერაზა Set1 4. ტრანსკრიფციის პრეინიციატორული კომპლექსი Pic 5. აკუმულციურ-ასოციაციური ცილა aap

ცხრ. N3. EHEC და EAEC ვირულენტური ფაქტორების გადანაწილება *E.coli* O104:H4 შტამზე

2.6 ინფექციის წყარო და გადაცემის გზა

STEC ინფექციებისათვის ძირითადად დამახასიათებელია გადაცემის ფეკალურ-ორალური მექანიზმი. შესაბამისად, ინფექციის განვითარება იწყება მაშინ, როცა მიკრობი ადამიანის ორგანიზმში მოხვდება პირის ღრუს გავლით. ხშირად ეს ხდება დაბინძურებული რძის (არაპასტერიზებული), ხილის, ბოსტნეულის და სხვა პროდუქტის, ან დაბინძურებული სასმელი წყლის მიღებით. აგრეთვე დაავადებულ ცხოველთან კონტაქტის შედეგად.

იშვიათ შემთხვევებში, მაგრამ ასევე ცნობილია ადამიანიდან ადამიანზე გადაცემის შემთხვევებიც (სურ. N.1).



სურ. N1. ინფექციის გადაცემის გზა

თავი III

კვლევის მასალა და მეთოდები

3.1 კვლევის მასალა

ჩატარებული კვლევის ფარგლებში შევისწავლეთ STEC O104 -ის ხუთი შტამი, რომლებიც საქართველოში გამოიყო სხვადასხვა გართულებით მიმდინარე დიარეის მქონე პაციენტებისგან. ერთი მათგანი წარმოადგენს 2012 წლის შემთხვევას, ხოლო 4 – 2015 წელს იყო გამოყოფილი. აღსანიშნავია, რომ სამი მათგანი მიმდინარეობდა ჰემორაგიულ-ურემიული სინდრომის (HUS) თანაობით.

გარდა ამისა, კვლევაში გამოყენებულ იქნა 2 ისტორიული შტამი 2009 წლის ეპიდ-აფეთქებიდან. აღნიშნული შტამები სრულყოფილად არის შესწავლილი ატლანტას რეფერალური ლაბორატორიის მიერ (CDC). გაშიფრულია მათი გენომები და გამოიყენება რეფერალურ შტამებად.

გარდა ამისა, სტანდარტულ შტამებს აღნიშნულ კვლევაში წარმოადგენდა Salmonella branderup ნიმუშები, როგორც მითითებულია PulseNet-ის კლასიკურ პროტოკოლში.

3.2 კვლევის მეთოდი

3.2.1. გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში

გელ-ელექტროფორეზი აგაროზას გელზე საკმაოდ გავრცელებული მეთოდია დნმ მოლეკულის სეპარაციისთვის მოლეკულურ ბიოლოგიაში. ამ პროცესში დნმ-ის დაყოფა და გადანაწილება ხდება ფრაგმენტების ზომის მიხედვით. სწორედ ამიტომ, მეთოდს ფართო გამოყენება აქვს ბაქტერიული ტიპირების დროს.

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში (PFGE) წარმოადგენს ბაქტერიული შტამების მოლეკულური დიფერენცირებისა და ტიპირების „ოქროს სტანდარტს“ და ერთ-ერთ ყველაზე გავრცელებულ მეთოდია პათოგენური ორგანიზმების ეპიდემიოლოგიური კვლევებისთვის. იგი ხასიათდება მაღალი გარჩევადობის უნარით და გამოიყენება მრავალი პათოგენის გენოტიპირებისთვის.

მეთოდი დაფუძნებულია კულტურიდან ნატიური გენომური დნმ-ის დაუზიანებელი სახით ექსტრაქციაზე და შემდეგ მისი რესტრიქციული ენდონუკლეაზით დამუშავებაზე, რის შედეგადაც მიიღება მაღალმოლეკულური მასის მქონე დნმ-ის ფრაგმენტები. მიღებული ფრაგმენტების დაცილება ხდება პულსირებად ველში გელ-ელექტროფორეზის საშუალებით. ამ მეთოდით შესაძლებელია ანალიზი ჩატარდეს 20 კილობაზიდან (Kb) რამდენიმე მეგაბაზამდე (Mb) ზომის ფრაგმენტებს.

მიღებული პროფილი ყველა შტამისთვის ინდივიდუალურია და მისი დნმ-ის ანაბეჭდს წარმოადგენს, რადგან ერთი კლონიდან წარმოქმნილ შტამებს ერთნაირი რესტრიქციული საიტები გააჩნიათ და შესაბამისად მათი ანაბეჭდიც იდენტურია.

მეთოდის სტანდარტული პროტოკოლი შედგენილია დაავადებათა კონტროლის ცენტრის (CDC) მეშვეობით (ატლანტა, აშშ). დღესდღეისობით ფართოდ გამოიყენება ინტერნაციონალურ სივრცეში, მეთვალყურეობის სხვადასხვა ქსელების მიერ და არაერთხელ არის დამტკიცებული მეთოდის ეფექტურობა და სიზუსტე.[27]

გელ-ელექტროფორეზი წარმოადგენს კომპლექსურ პროცესს და პროცესთა ერთობლიობა ჯამში მიმდინარეობს 3 დღის განმავლობაში. მათი თანმიმდევრობას მოცემულია ცხრილში N4.

პირველი დღე	მეორე დღე	მესამე დღე
1. პლაგების დამზადება	1. პლაგების დაჭრა	1. გელის შეღებვა
2. ლიზისი	2. რესტრიქცია	2. ვიზუალიზაცია
3. რეცხვა	3. გელ-ელექტროფორეზი	

ცხრ. N4. PFGE პროცესების თანმიმდევრობა

3.2.2. პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის შედარება სტანდარტულ გელ-ელექტროფორეზთან

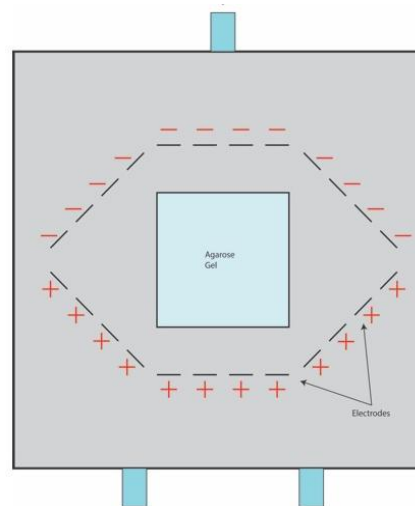
მიუხედავად იმისა, რომ გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში წარმოადგენს გელ-ელექტროფორეზის ერთ-ერთ სახეს, არსებობს ძირეული განსხვავებები, რომელთა გამოც, ამ პროცესის მიმდინარეობა და შედეგი დიდად განსხვავდება კლასიკური მეთოდისგან.

პირველ რიგში, უნდა აღინიშნოს თითოეულ მათგანში მონაწილე დნმ-ფრაგმენტების ზომები. თუ კლასიკურ მეთოდში ფრაგმენტის მაქსიმალური ზომა 15 Kb-ია, პულსირებად ველში მათი ზომები 1000-ჯერ უფრო დიდი შეიძლება იყოს და აღწევდეს 10-15 Mb-ს. ამრიგად, პულსირებადი ველის გელ-ელექტროფორეზში მონაწილეობს ბაქტერიების პრაქტიკულად მთლიანი გენომი, როცა კლასიკურ შემთხვევაში საქმე ცალკეულ ამპლიკონთან გვაქვს.

გამომდინარე ფრაგმენტების ამდენად დიდი ზომისა, გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში მოითხოვს განსხვავებულ აპარატურას. განსხვავება მდგომარეობს იმაში, რომ მასში დამონტაჟებულია არა ერთი, არამედ ელექტროდების 3 წყვილი, შესაბამისად, ელექტრულ დენს შესაძლებელია ჰქონდეს 3 მიმართულება.

გარდა ამისა, ელექტროდები განლაგებულნი არიან არა მართობულად, არამედ წარმოქმნიან წესიერი ექვსკუთხედის ფორმას და ელექტროდებს შორის იქმნება 120°. პულსირებაც სწორედ აქედან გამომდინარეობს, მუხტის გადანაცვლებას ერთი ელექტროდიდან მეორეზე აქვს პულსირების სახე და მისი ხანგრძლივობა პროცესის მიმდინარეობასთან ერთად იზრდება.

პულსირება და მუხტის გადანაწილება სხვადასხვა მხარეს განლაგებულ ელექტროდებზე აადვილებს დიდი ზომის დნმ-ფრაგმენტის მოძრაობას. დნმ-ფრაგმენტი იძენს სპეციფიკურ, გლობულარულ ფორმას, ხოლო მუხტის სამი მხრიდან მოქმედება უზრუნველყოფს მის ზიგზაგისებურ მოძრაობას.



სურ. N2. პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის აპარატის მექანიზმი

ზემოთ აღწერილიდან გამომდინარე, ელექტროფორეზი მოითხოვს გაცილებით დიდ დროს. განსხვავებით სტანდარტული შემთხვევისგან (1-1.5 საათი), გელ-ელექტროფორეზს პულსირებად ველში სჭირდება 18-დან 20 საათამდე, რაც დამოკიდებულია ნიმუშთა რაოდენობასა და გელის ზომაზე.

3.3 პროცესის მსვლელობა

3.3.1 პლაგების დამზადება

მეთოდის საწყის ეტაპს წარმოადგენს ბაქტერიული კულტურის დამზადება. ამ შემთხვევაში - *E.coli* O104:H4 შტამის კულტურა, რომელიც ითესება სოიოს საკვებ არეზე. კულტურა უნდა იყოს ახალგაზრდა, არ უნდა მოხდეს მისი გადაზრდა. ამიტომ, კულტურის ზრდის პერიოდი განისაზღვრება 14-18 საათით.

შემდგომ ეტაპზე საჭიროა ბაქტერიული სუსპენზიის დამზადება. კულტურის განზავება ხდება უჯრედული სუსპენზიის ბუფერით (CLB - 100 mM Tris:100 mM EDTA, pH 8.0). აუცილებელია, რომ ყველა ნიმუშის კონცენტრაცია იყოს თანაბარი, რის გამოც ვამოწმებთ სუსპენზიების ოპტიკურ სიმკვრივეს სპექტროფოტომეტრის ან სხვა ოპტიკური ხელსაწყოთა მეშვეობით (სპექტროფოტომეტრის შემთხვევაში ოპტიკური სიმკვრივე უნდა მერყეობდეს 0.9-1.1-ის ფარგლებში).

პროცესის პარალელურად მზადდება 1% აგაროზას გელი. პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზისთვის ყოველთვის გამოიყენება განსხვავებული აგაროზა - SeaKem Gold აგაროზა, ვინაიდან ამ ტიპის აგაროზას უფრო მეტი სიმტკიცე და სიძლიერე ახასიათებს. აღნიშნული პულსირებადი ელექტროფორეზისთვის მეტად მნიშვნელოვანია, რათა დნმ-ფრაგმენტები არ დაზიანდეს. გელი მზადდება TE ბუფერის (10 mM Tris:1 mM EDTA, pH 8.0) მეშვეობით.

საბოლოოდ, მზადდება პლაგები. პლაგი წარმოადგენს აგაროზას გელში ჩაყალიბებულ ბაქტერიების ცოცხალ კულტურას. პლაგების დასამზადებლად ადუღებამდე მიყვანილი, თხევადი აგაროზას გელი კარგად უნდა შეერიოს ბაქტერიულ სუსპენზიას და დაემატოს პროტეინაზა K.

პლაგების კონცენტრაცია ისაზღვრება შემდეგნაირად:

1. 400 μ l ბაქტერიული სუსპენზია
2. 20 μ l პროტეინაზა K
3. 400 μ l აგაროზას გელი

გაციებამდე ნარევი უნდა ჩამოიხხას სპეციალურ ყალიბებში (Plug molds) და დაყოვნდეს გაციებამდე. პლაგები წარმოადგენს მთელი შემდგომში პროცესის სამუშაო მასალას.

3.3.2 პლაგების ლიზისი, რეცხვა და დაჭრა

პლაგების ჩაყალიბებისა და გაციების შემდეგ იწება შემდგომი პროცედურა - ლიზისი.

როგორც ვიცით, პლაგებში მოთავსებულია ცოცხალი ბაქტერიული კულტურა. იმისათვის, რომ მოხდეს ცოცხალი უჯრედებისგან დნმ-ის გამოყოფა, საჭიროა უჯრედების დესტრუქცია. სწორედ აღნიშნულს გულისხმობს ლიზისის პროცესი: უჯრედული კედლისა და სხვა უჯრედული სტრუქტურების რღვევა, რათა მოხდეს ბაქტერიული ქრომოსომის ექსტრაქცია.

ლიზისი მიმდინარეობს შემდეგი შედგენილობის არეში:

1. 5 ml უჯრედული ლიზისის ბუფერი (CLB 50 mM Tris:50 mM EDTA, pH 8.0 + 1% Sarcosyl)
2. 25 μ l პროტეინაზა K

ლიზისის სარეაქციო არის დამზადებისა და სინჯარებში ჩამოსხმის შემდეგ პლაგები გადაგვაქვს აღნიშნულ არეში.

ლიზისი მიმდინარეობს სინჯარების ინკუბირებით 54-55°C ტემპერატურაზე, 2-2.5 საათის განმავლობაში. სწორედ ამ დროს ხდება ბაქტერიების უჯრედების დესტრუქცია (უჯრედის კედლისა და ცილების დაშლა) და დნმ-ის გამოთავისუფლება.

იმისათვის, რომ მოხდეს დნმ-ის გასუფთავება და გათავისუფლება უჯრედის ლიზირებული პროდუქტებისგან, საჭიროა რეცხვა. რეცხვის პირველ ეტაპს წარმოადგენს ულტრა-სუფთა წყლით რეცხვა ორჯერ, მეორე ეტაპს კი 4-ჯერ რეცხვა TE ბუფერის მეშვეობით.

რეცხვა მიმდინარეობს 15-20 წუთიანი ინტერვალებით და გულისხმობს ყოველი წინა სითხის ჩანაცვლებას მომდევნო, სუფთა წყლით/ზუფერით. ინტერვალის განმავლობაში საჭიროა ინკუბაცია 54-55°C ტემპერატურაზე.

საბოლოოდ, აგაროზას ბლოკებში - პლაგებში, რჩება გასუფთავებული, დაუზიანებელი დნმ.

ლიზისისა და რეცხვის შემდეგ, იწყება მზადება რესტრიქციისთვის. დნმ-ის რესტრიქციისათვის აგაროზის პლაგიდან ჩამოიჭრება ვიწრო ზოლი (~2მმ). დანარჩენი ნაწილის შენახვა შესაძლებელია TE ბუფერში +4°C ტემპერატურაზე. შენახვის პერიოდი განსაზღვრული არ არის და პლაგში დნმ-ის დაუზიანებლად ნარჩუნდება წლობის განმავლობაში, მათი გამოყენება ათწლეულის შემდეგაც კი არის შესაძლებელი. [30]

3.3.3 რესტრიქცია

დნმ-ის რესტრიქცია წარმოადგენს პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის უმნიშვნელოვანეს და კრიტიკულ ეტაპს. რესტრიქცია, თავის მხრივ, გულისხმობს დნმ-ის ფრაგმენტის დაჭრას სპეციფიკურ უბნებში ფერმენტების, ენდონუკლეაზების ერთ-ერთი ჯგუფის - ენდონუკლეაზების მეშვეობით.

რესტრიქტაზა - ენდონუკლეაზების ჯგუფი, რომელიც განეკუთვნება ჰიდროლაზების კლასს და აკატალიზირებს ნუკლეინის მჟავების ჰიდროლიზის რეაქციას.

როგორც უკვე ითქვა, რესტრიქტაზები დნმ-ს ჭრიან სპეციფიკურად შეცნობად უბნებში და ამ უბნებს რესტრიქციის საიტები ეწოდებათ. როგორც წესი, ეს უბნები პალინდრომული აგებულებისაა. სხვადასხვა რესტრიქტაზასთვის აღნიშნული უბნები განსხვავებულია, ანუ სხვადასხვა რესტრიქტაზები შეიცნობენ და ჭრიან განსხვავებულ ნუკლეოტიდურ თანმიმდევრობებს.

ეგზონუკლეაზებისგან განსხვავებით, რესტრიქტაზები ნუკლეინის მჟავებს ხლეჩენ არა მოლეკულის ბოლოდან, არამედ შუაში. ამასთანავე თითოეული რესტრიქტაზა ცნობს დნმ-ის გარკვეულ უბანს, რომლის სიგრძე ნუკლეოტიდების ოთხ წყვილზე მეტია, და ხლეჩს ნუკლეოტიდურ ჯაჭვს ამოცნობის უბნის შიგნით ან მის გარედან. საინტერესოა ისიც, რომ ჭრა ხდება არა ცალკეულ ჯაჭვში, არამედ ორჯგონიანი დნმ-ის მოლეკულის ორივე ჯაჭვში.

ბაქტერიული გენომის დაცვა საკუთარი უჯრედში არსებული რესტრიქტაზისგან ხორციელდება დნმ-ში არსებული ადენინისა და ციტოზინის ნუკლეოტიდური ნაშთების მეთილირების მეშვეობით.

დღესდღეისობით აღმოჩენილი და კარგად შესწავლილია 3000-მდე რესტრიქციული ფერმენტი. კომერციულად ხელმისაწვდომია 600 მათგანი და დიდი გამოყენება აქვთ მოლეკულური ბიოლოგიის არაერთ მეთოდიკაში, მათ შორის პულსირებადი გელ-ელექტროფორეზის პროცესში.

გელ-ელექტროფორეზი პულსირებად ველში ტარდება სხვადასხვა ტიპის პათოგენზე. სწორედ ამაზე არის დამოკიდებული, თუ რომელი რესტრიქტაზა გამოიყენება პროცესში.

პროტოკოლის მიხედვით, თითოეული ბაქტერიისთვის შერჩეულია 3 რესტრიქტაზა: პირველადი, მეორადი და მესამეული რესტრიქტაზები. მათი შერჩევა ხდება მიღებული შედეგების ინფორმატიულობისა და სიზუსტის მიხედვით.

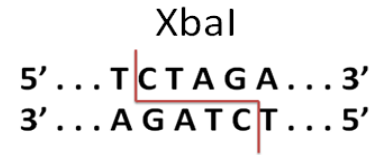
მაგალითისთვის, თუ რომელი პათოგენისთვის რომელი ფერმენტი შეირჩევა, მოცემულია ცხრილში 5.

Organism	Primary Enzyme	Secondary Enzyme	Tertiary Enzyme
<i>E. coli</i> O157	XbaI (50U/sample)	BlnI/AvrII (30U/sample)	SpeI (30U/sample)
<i>E. coli</i> non-O157	XbaI (50U/sample)	BlnI/AvrII (30U/sample)	SpeI (30U/sample)
<i>Salmonella</i>	XbaI (50U/sample)	BlnI/AvrII (30U/sample)	SpeI (30U/sample)
<i>S. sonnei</i>	XbaI (50U/sample)	BlnI/AvrII (30U/sample)	SpeI (30U/sample)
<i>S. flexneri</i>	NotI (50U/sample)	XbaI (50U/sample)	SpeI (30U/sample)

ცხრ. N5 პირველადი, მეორადი და მესამეული რესტრიქტაზები სხვადასხვა მიკროორგანიზმებისთვის

ჩვენ მიერ კვლევის პროცესში გამოყენებულია პირველად და მეორეული რესტრიქტაზები: XbaI და AvrII. გამომდინარე იქიდან, რომ თითოეული მათგანისთვის დამახასიათებელია სხვადასხვა რესტრიქციულ საიტზე მოქმედება, მიღებული შედეგი, ერთი და იმავე ნიმუშებისთვის, განსხვავებული უნდა ყოფილიყო.

XbaI რესტრიქტაზა წარმოადგენს უკიდურესაც მაღალი სპეციფიკურობისა და სიზუსტის ფერმენტს, სწორედ ამიტომ იგი გამოიყენება, როგორც პირველად რესტრიქტაზა, არაერთი ბაქტერიისთვის. კომერციული გამოყენებისთვის, მას იღებენ ბაქტერიიდან *Xanthomonas badrii*. მისთვის დამახასიათებელი რესტრიქციული საიტი მოცემულია სურათზე N3.



სურ. N3 XbaI
რესტრიქციის საიტი

AvrII რესტრიქტაზა წარმოადგენს ასევე მაღალი სიზუსტის ფერმენტს. იგი, უმეტესად, გამოიყენება, როგორც მეორეული ფერმენტი. ამის მიზეზს წარმოადგენს ის, რომ მას გააჩნია შედარებით ნაკლები რესტრიქციული საიტი, ვიდრე XbaI-ს და, შესაბამისად, ხასიათდება შედარებით ნაკლები ინფორმატიულობით. მისთვის დამახასიათებელი რესტრიქციული საიტი მოცემულია სურათზე N4.



სურ. N 4 AvrII
რესტრიქციის საიტი

რესტრიქტაზები აქტიურობისთვის მოითხოვენ შესაბამის პირობებს, აქედან გამომდინარე, უშუალოდ რესტრიქციის პროცესი მოითხოვს ერთგვარ შემამზადებელ ეტაპს, რაც გულისხმობს პლაგების გაჟღენთვას ბუფერით.

შესამზადებელი ეტაპის სარეაქციო არეს აქვს შემდეგი სახე:

1. ულტრასუფთა წყალი - 180 µl
2. რესტრიქციის ბუფერი - 20 µl

დნმ-პლაგები თავსდება აღნიშნულ არეში და ინკუბირდება 15 წუთის განმავლობაში, 37°C ტემპერატურაზე.

ამის შემდეგ უშუალოდ იწყება რესტრიქციის ეტაპი. სარეაქციო არეს აქვს შემდეგი სახე:

1. ულტრასუფთა წყალი - 173 µl
2. რესტრიქციის ბუფერი - 20 µl
3. რესტრიქტაზა (XbaI/AvrII) – 5 µl
4. BSA – 2 µl

რესტრიქციაში მონაწილე კომპონენტები მოითხოვენ ტემპერატურულ სტაბილურობას, რის გამოც სარეაქციო არის დამზადება მიმდინარეობს ყინულზე (ან სხვა მსგავს პირობებში).

რესტრიქცია მიმდინარეობს 2-3 საათის განმავლობაში 37°C ტემპერატურაზე. [30]

3.3.4 ელექტროფორეზი

რესტრიქციის დასრულებამდე ნახევარი საათით ადრე ვიწყებთ გელ-ელექტროფორეზის პროცესისთვის მზადებას. თავდაპირველად საჭიროა დავამზადოთ გელი.

გელის დასამზადებლად კვლავ გამოიყენება SeaKem Gold ტიპის აგაროზა. აგაროზა ზავდება 0.5%-იან ტრის-ბორატ-EDTA (TBE) ბუფერის მეშვეობით.

გელი უნდა მოიხარშოს ნელა, ადუღებამდე და გამოყენებამდე შეინახოს 54-55°C ტემპერატურაზე.

რესტრიქციის დასრულების შემდეგ რეაქცია უნდა შევაჩეროთ პლაგების გადატანითა და ინკუბაციით TBE ბუფერით (200 μ l - თითო რეაქციისთვის). ინკუბაცია გრძელდება 10 წუთის განმავლობაში, ოთახის ტემპერატურაზე.

მომდევნო ნაბიჯს წარმოადგენს გელის ყალიბის აწყობა და ჰორიზონტალურ მდგომარეობაში მოყვანა. რესტრიქციის შეჩერების შემდეგ პლაგები, სწორი თანმიმდევრობით, გადმოგვაქვს „სავარცხელზე“ და ვაცდით გაშრობას.

გაშრობის შემდეგ გამზადებულ აგაროზას გელს ვასხამთ ყალიბში და ვიცდით მის გამყარებამდე.

ელექტროფორეზის პროცესი მიმდინარეობს პულსირებად ველში. არსებობს ძირეული განსხვავებები კლასიკური ელექტროფორეზის აპარატსა და პულსირებადი ელექტროფორეზის აპარატს შორის. აღნიშნული აპარატი წარმოადგენს წესიერი ექვსკუთხედი ფორმით განლაგებული ელექტროდების კომპლექსს, წარმოდგენილია 3 წყვილი ელექტროდებისა და მათ შორის წარმოიქმნება 120°.

ელექტროდებს შორის ხდება ელექტრული დენის გადანაცვლება. გამომდინარე იქიდან, რომ სხვადასხვა ბაქტერიებს განსხვავებული გენეტიკური შემცველობა აქვთ და რესტრიქციის

შედეგად მიღებული ფრაგმენტები მოითხოვენ განსხვავებულ პირობებს მოძრაობისა და სეპარაციისთვის.

პულსირება ელექტროდებს შორის და მუხტის გადანაწილება სხვადასხვა მხარეს განლაგებულ ელექტროდებზე აადვილებს დიდი ზომის დნმ-ფრაგმენტის მოძრაობას. დნმ-ფრაგმენტი იძენს სპეციფიკურ, გლობულარულ ფორმას, ხოლო მუხტის სამი მხრიდან მოქმედება უზრუნველყოფს მის ზიგზაგისებურ მოძრაობას.

ზემოთ აღწერილიდან გამომდინარე, ელექტროფორეზი მოითხოვს გაცილებით დიდ დროს. განსხვავებით სტანდარტული შემთხვევისგან (1-1.5 საათი), გელ-ელექტროფორეზს პულსირებად ველში სჭირდება 18-დან 20 საათამდე, რაც დამოკიდებულია ნიმუშთა რაოდენობასა და გელის ზომაზე.

ჩვენ შემთხვევაში, ელექტროფორეზი მიმდინარეობს აპარატში: CHEF-DR II, BioRad. აპარატი შედგება 3 ძირითადი ოპერაციული კომპონენტისგან:

- საკონტროლო მოდული - მისი მეშვეობით ხდება პარამეტრების შერჩევა და მოდელირება.
- სატუმბი მოდული - უზრუნველყოფს ბუფერის მუდმივ მოძრაობას სისტემაში.
- გასაგრილებელი სისტემა - ქულერი, უზრუნველყოფს მოძრავი ბუფერის ტემპერატურის მუდმივ შენარჩუნებას.

სამივე მათგანი, თავის მხრივ, დაკავშირებულია უშუალოდ ელექტროდებთან სისტემასთან, რომელშიც თავსდება გელი და მიმდინარეობს ფორეზი.

აღსანიშნავია, რომ ფორეზის დაწყებამდე, სასურველია, მოხდეს სისტემის ჩართვა, მასში ელექტროფორეზის ბუფერის (0.5-ჯერადი TBE ბუფერი) მოთავსებითა და ტუმბოს ჩართვით. შემდგომ ირთვება გამაგრილებელი სისტემა და როცა ტემპერატურა დავა საჭირო ნიშნულზე, აპარატი მზად არის რეაქციის დასაწყებად.

ჩვენი კვლევის პროცესში გამოყენებულ იქნა PulseNet-ის პროტოკოლი. შეირჩა პარამეტრები *E.coli* non-O157 შტამებისთვის ელექტროფორეზისთვის, როგორც XbaI-თი რესტრიქციის, ისე AvrII-ით რესტრიქციის შემდეგ. შესაბამისად, პროგრამას ჰქონდა შემდეგი სახე:

- საწყისი დრო - 6.76s
- საბოლოო დრო - 35.38s
- დაწყების კოეფიციენტი - 1.0
- ვოლტაჟი - 200V
- რეაქციის პერიოდი - 19 საათი.
- ტემპერატურა - 14°C

პროგრამის დაყენების შემდეგ აპარატში თავსდება გამყარებული გელი და იწყება რეაქცია.

3.3.5. შედეგების ვიზუალიზაცია

ელექტროფორეზის დასრულების შემდეგ საჭიროა მიღებული შედეგების ვიზუალიზაცია.

თავდაპირველად, გელი იღებება ეთიდიუმ ბრომიდის ხსნარით (100 მგ/ლ), ნახევარი საათის განმავლობაში, სანჯღრეველას მსუბუქი მოძრაობის პირობებში. ეთიდიუმ ბრომიდი წარმოადგენს საღებავ ნივთიერებას, რომელსაც გააჩნია უნარი, დაუკავშირდეს დნმ-ის ორმაგ სტრუქტურებს.

შემდგომ, საჭიროა ეთიდიუმ ბრომიდის გამორეცხვა, რათა შენარჩუნდეს მხოლოდ სპეციფიკური კავშირები დნმ-თან, რაც ხორციელდება დისტილირებული წყლით 4-5-ჯერადი რეცხვის მეშვეობით. რეცხვებს შორის ინტერვალს წარმოადგენს 20-30 წუთი და მიმდინარეობს კვლავ ნჯღრევის პირობებში.

ამის შემდეგ PFGE პროფილის ვიზუალიზაცია ხდება ტრანსილუმინატორის ულტრაიისფერი გამოსხივების დროს სპეციალური კამერის მეშვეობით. [30]

3.3.6. შედეგების პროგრამული ანალიზი

შედეგების მიღების შემდეგ, საჭიროა მათი პროგრამული ანალიზი, რისთვისაც საჭიროა სპეციალური პროგრამული უზრუნველყოფა. ჩვენი კვლევისთვის გამოყენებულია სპეციალური პროგრამა BioNumerics. [30]

თავი IV

შედეგები

როგორც ვიცით, ნიმუშები რესტრიქირდა როგორც პირველადი - XbaI, ისე მეორადი - AvrII რესტრიქტაზების მეშვეობით. თითოეულ შემთხვევაში გამოვლინდა PFGE პროფილების მრავალფეროვნება.

აღსანიშნავია, რომ გამოყენებულ რესტრიქტაზებს (XbaI, AvrII) გააჩნიათ განსხვავებული რესტრიქციული საიტები, რის გამოც მივიღეთ სხვაობა ამ ორი რეაქციის შედეგებს შორის.

4.1. XbaI რესტრიქციის შედეგები

XbaI რესტრიქციის შემდეგ გამოჩვენდა შემდეგი სურათი:



სურ.N 5 XbaI რესტრიქციის შედეგი

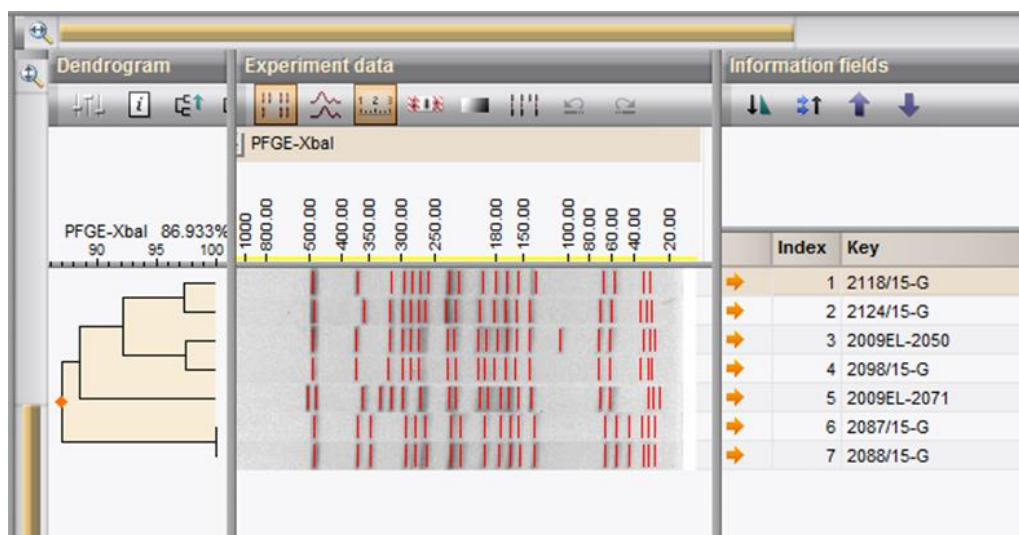
ნიმუშები განლაგებულია შემდეგი თანმიმდევრობით:

I, V, X პოზიციაზე განლაგებულია სტანდარტები (STD). სტანდარტებად გამოყენებულია Salmonella branderup-ის შტამები.

II, III, V, VI პოზიციებზე საკვლევი 5 ნიმუშიდან განლაგებულია ოთხი (2087, 2088, 2118, 2124). ოთხივე მათგანი იზოლირებულია 2015 წელს. VII პოზიციაზე კი მოთავსებულია 2012 წელს იზოლირებული მეხუთე ნიმუში (2098).

VIII და IX პოზიციებზე განლაგებულია 2009 წლის ისტორიული რეფერენს-შტამები.

აღნიშნული სურათი დამუშავდა ბიონფორმატიკულად, BioNumerics პროგრამის მეშვეობით. პროგრამაში დაზუსტდა სხვაობები შტამებს შორის, ასევე აიგო დენდოგრამა და მოხდა ნიმუშების დაჯგუფება მათი PFGE პროფილის მსგავსების მიხედვით.



სურ. N6 XbaI შედეგის პროგრამულად დამუშავებული სურათი და დენდოგრამა

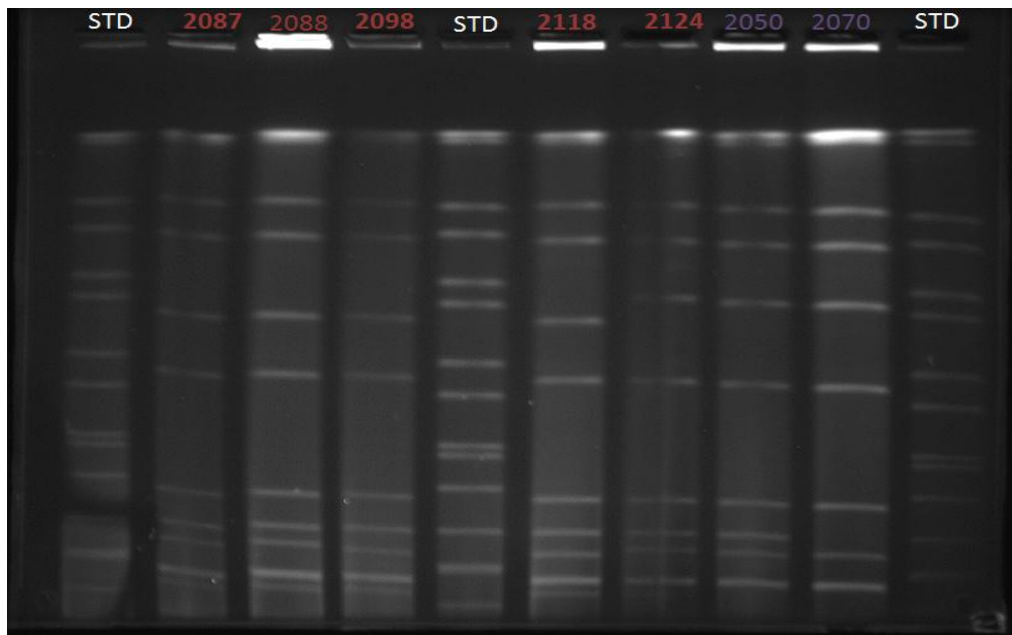
შედეგების მიხედვით შეიძლება გამოიყოს რამოდენიმე ძირითადი დასკვნა:

- საკვლევი 5 შტამიდან მხოლოდ ორმა (2015 წლის იზოლატები –2087/15-G, 2088/15-G) გამოავლინა იდენტური PFGE პროფილი.
- 2009 წლის აფეთქების ერთ-ერთი შტამი (2009EL-2071) სრულიად განსხვავებული აღმოჩნდა ყველა დანარჩენისაგან.

- 2009 წლის რეფერლურ შტამთან (2009EL-2050) გენეტიკურად ყველაზე ახლოს აღმოჩნდა 2012 წლის იზოლატი (2098/15).
- 2015 წლის დანარჩენმა ორმა შტამმა (2118/15-G, 2124/2015-G) მეტი გენეტიკური სიახლოვე გამოავლინეს ერთმანეთის მიართ, თუმცა არ აღმოჩნდნენ იდენტურები.
- ამრიგად, შესწავლილი 5 შტამიდან გამოიყო 4 ჯგუფი (PFGE პროფილი).

4.2 AvrII რესტრიქციის შედეგები

AvrII რესტრიქციის შემდეგ გამოძლავნდა შემდეგი სურათი:



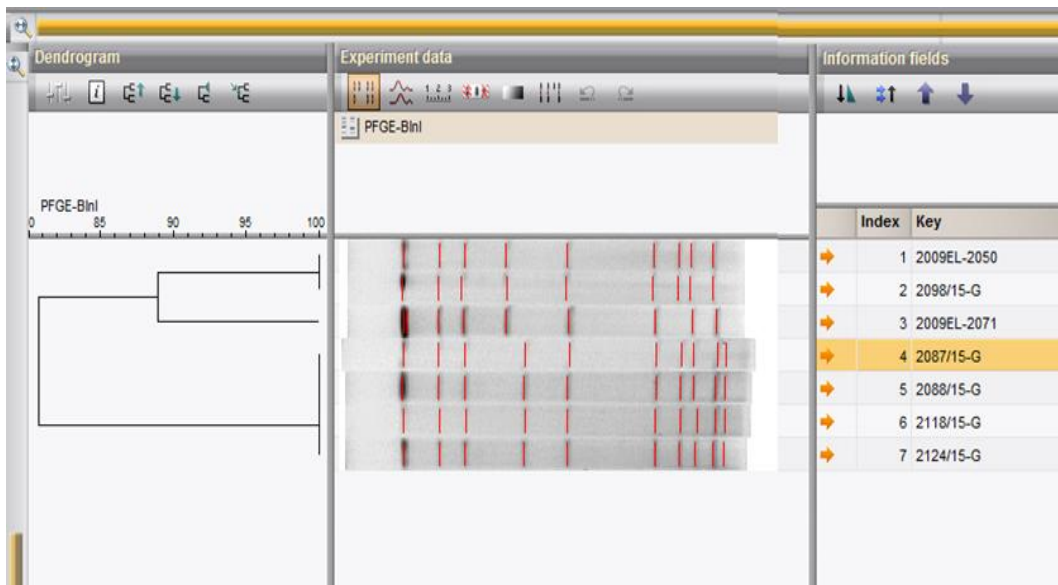
სურ. N7 AvrII რესტრიქციის შედეგი

I, V, X პოზიციაზე განლაგებულია სტანდარტები (STD). სტანდარტებად გამოყენებულია *Salmonella branderup*-ის შტამები.

II, III, V, VI პოზიციებზე საკვლევი 5 ნიმუშიდან განლაგებულია ოთხი (2087, 2088, 2118, 2124). ოთხივე მათგანი იზოლირებულია 2015 წელს. VII პოზიციაზე კი მოთავსებულია 2012 წელს იზოლირებული მეხუთე ნიმუში (2098).

VIII და IX პოზიციებზე განლაგებულია 2009 წლის ისტორიული რეფერენს-შტამები.

აღნიშნული სურათი დამუშავდა ბიოინფორმატიკულად, BioNumerics პროგრამის მეშვეობით. პროგრამაში დაზუსტდა სხვაობები შტამებს შორის, ასევე აიგო დენდოგრამა და მოხდა ნიმუშების დაჯგუფება, მათი PFGE პროფილის მსგავსების მიხედვით.



სურ. N8 AvrII შედეგის პროგრამულად დამუშავებული სურათი და დენდოგრამა

შედეგების მიხედვით შეიძლება გამოიყოს რამენიმე ძირითადი დასკვნა:

- საკვლევი 5 შტამიდან ოთხმა (2015 წლის იზოლატები –2087/15-G, 2088/15-G, 2118/15-G, 2124/2015-G) გამოავლინა იდენტური PFGE პროფილი.
- 2009 წლის აფეთქების ერთ-ერთი შტამი (2009EL-2071) სრულიად განსხვავებული აღმოჩნდა ყველა დანარჩენისაგან.
- 2009 წლის რეფერალურ შტამთან (2009EL-2050) გენეტიკურად ყველაზე ახლოს აღმოჩნდა 2012 წლის იზოლატი (2098/15).
- ამრიგად, შესწავლილი 5 შტამიდან გამოიყო 2 ჯგუფი (PFGE პროფილი).

თავი V

დასკვნა

კვლევაში გამოყენებული *E.coli* O104:H4 საკვლევი 5 შტამიდან გამოიყო 4 PFGE პროფილი. დადასტურდა საქართველოში გავრცელებული შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი O104:H4 *E.coli*-ის მრავალფეროვნება, რაც მნიშვნელოვან ეპიდემიოლოგიურ მაჩვენებელს წარმოადგენს.

E.coli O104:H4 შტამების პირველადი რესტრიქტაზით (XbaI) დამუშავების შედეგად გამოვლინდა PFGE პროფილების უფრო დიდი მრავალფეროვნება (4 PFGE პროფილი), ვიდრე მეორადი რესტრიქტაზით დამუშავების შემთხვევაში (2 PFGE პროფილი).

გამომდინარე აქედან, საქართველოში გავრცელებული შიგა ტოქსინის მაპროდუცირებელი *E.coli* O104:H4 შტამების დამუშავება რეკომენდირებული იქნება XbaI რესტრიქტაზას მეშვეობით, მის მიერ გამოვლენილი მაღალსპეციფიკურობისა და მაღალმგრძობელობის გამო.

მადლობა

კვლევა განხორციელდა ლუგარის სახ. საზოგადოებრივი ჯანმრთელობის კვლევით ცენტრში. გაწეული დახმარებისთვის დიდ მადლობას ვუხდით მას.

ასევე მადლობა ივანე ჯავახიშვილის თბილისის სახელმწიფო უნივერსიტეტის იმუნოლოგიისა და მიკრობიოლოგიის კათედრას.

გამოყენებული ლიტერატურა

1. სამედიცინო მიკრობიოლოგია - გიორგი გოგიჩაძე, გამომცემლობა „მერიდიანი“ 2004, 194-196
2. **A Case of Hemolytic Uremic Syndrome Caused by Escherichia coli O104:H4** – Woo Kyun Bae, Youn Kyoung Lee, Min Seok Cho, Seong Kwon Ma, Soo Wan Kim, Nam Ho Kim, Ki Chul Choi (Yonsei Med J. 2006 Jun 30, 47(3) 437-439)
3. **A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E.coli** - McDaniel, T. K., and J. B. Kaper. 1997, Mol Microbiol 23:399-407.
4. **Associations between virulence factors of Shiga toxin-producing Escherichia coli and disease in humans.** – Boerlin P, McEwen SA, Boerlin-Perzold F, Wilson JB, Johnson RP, Gyles CL (J Clin Microbiol, 1999 Mar; 37(3):497-503)
5. **Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement in Escherichia coli O157:H7 and other Shiga toxin-producing E.coli strains.** Kaper J. B., Elliott S. J., Sperandio V., Perna N. T., Mayhew G. F., Blattner F. R. (1998) (ASM Press, Washington, D.C.) pp 163–182.
6. **Characteristics of the Shiga-toxin-producing enteroaggregative Escherichia coli O104:H4 German outbreak strain and of STEC strains isolated in Spain.** – Mora A, Herrera A, Lopez C, Dahbi G, Mamani R, Pita JM, Alonso MP, Liovo J, Berardez MI, Blanco JE, Blanco M, Blanco J (Int Microbiol, 2011, 14(3):121-141)
7. **Comparative genomics and transcriptomics of Escherichia coli isolates carrying virulence factors of both enteropathogenic and enterotoxigenic E.coli** – Hazen TH, Michalski J, Luo Q, Shetty AC, Daugherty SC, Flechenstein JM Sasko DA (Scientific Reports, 2017, 7, 3513)
8. **Escherichia coli harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms** Friedrich AW, et al. 2002.. J. Infect. Dis.185:74–84.
9. **Escherichia coli in the Environment: Implications for Water Quality and Human Health** - Satoshi Ishii; Michael J. Sadowsky (Microbes and Wnvironments, 2008, No. 2, p101-108)
10. **Escherichia coli O104:H4 Pathogenesis: an Enteroaggregative E.coli / Shoga toxin-producing E.coli Explosive Cocktail of High Virulence** – Fernando Navarro-Garcia, Vanessa Sperandio, Carolyn J Hovde (American Society for Microbiology, 2014, vol. 2, No 6)
11. **Foodborne illness acquired in the United States –major pathogens**, Scallan, E, *et al.*, EMERGING INFECTIOUS DISEASES, Vol. 17, No. 1, (Jan. 2011), available at:
12. **Genomic Comparison of Escherichia coli O104:H4 Isolates from 2009 and 2011 Reveals Plasmid, and Prophage Heterogeneity, Including Shiga Toxin Encoding Phage stx2.** –

- Sanaa A. Ahmed, Joy Awosika, Carson Baldwin, Kimberly A. Bishop-Lilly, Biswajit Biswas, .. PloS One, 2012, 7(11) e48228
13. **Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced verotoxin *in vitro*.** Lingwood CA, Law H, Richardson S, Petric M, Brunton JL, De Grandis S, Karmali M 1987 *J Biol Chem* 262:8834–8839
 14. **Human influence and biotic homogenization drive the distribution of *Escherichia colivirulence genes in natural habitats*** – Adriana Cabal, Joaquin Vicente, Julio Alvarez, Jose Angel Barasona, Mariana Boadella, Lucas Dominguez, Chrisin Gortazar, Microbiologyopen, 2017, 6(3): e00445
 15. **Infection by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview.** Karmali MA. 2004. Mol. Biotechnol. 26:117–122.
 16. **Intermediate Follow-up of Pediatric Patients With Hemolytic Uremic Syndrome During the 2011 Outbreak Caused by *E.coli* O104:H4.** – Loos S, Aulbert W, Hoppe B, Ahlenstiel-Grunow T, Kranz B, Wahl C, Clin Infect Dis, 2017, 15:64(12): 1637-1643
 - Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity** – Matthew A, Croxen Finlay, B. Brett Finlay, Nature Reviews Microbiology, 2010, 8, 26-38
 17. **Non-O157 Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* Infections in Europe** – Caprioli A, Tozzi AE, Rizzoni G, Karch H (Emerg Infect Dis, 1997 oct-dec; 3(4):578-9)
 18. **Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States, 1983-2002.** Brooks JT, et al. 2005. J. Infect. Dis. 192:1422–1429.
 19. **Prevalence of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* stains isolated form raw beef in southern Italy** – Nobili G, Franconieri I, La Bella G, Basanisi MG, La Salandra G. J Food Microbiol, 2017, 28; 257:201-2015
 20. **Roles of globotriosyl-and galabiosylceramide in verotoxin binding and high affinity interferon receptor.** Cohen A, Hannigan GE, Williams BR, Lingwood CA 1987, *J Biol Chem* 262:17088–17091
 21. **Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Montana: bacterial genotypes and clinical profiles.** Jelacic JK, et al. 2003 J. Infect. Dis. 188:719 –729.
 22. **Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.** CDC. Sarah Lathorp, Karen Edge, Joseph Baretta. New Mexico, USA, 2004-2007. Center For Disease Control and Prevention.
 23. **Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome.** Tarr P.I., Gordon C.A., Chandlre W.L Lancet 2008, 365:1087-1110.
 24. **STEC-EPEC oligonucleotide microarray: a new tool for typing genetic variants of the LEE pathogenicity island of human and animal Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and enteropathogenic *E.coli* (EPEC) strains.** Garrido, P., et. al. 2006. Clin Chem 52:192-201.
 25. **Strong Association Between Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157 and Virulence Genes *stx 2* and *eae* as Possible Explanation for Predominance of Serogroup O157 in**

- Patients with Haemolytic Uraemic Syndrome.** Werber, D., et. al. 2003 *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 22:726-730
26. **The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli*** Elliott S., Wainwright L. A., McDaniel T., MacNamara B., Donnenberg M., Kaper J. B. (1998) E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1–4.
27. **The Use of Pulsed Field Gel Electrophoresis in *Listeria monocytogenes* Sub-Typing Harmonization at the European Union Level** – Benjamin Felix, Trinh Tam Dao, Bertrand Lombard, Adrian Assere Anne Brisabois, Sophie Roussel
28. **Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O157, associated with human infections in the United Kingdom** Thomas A, Chart H, Cheasty T, Smith HR, Frost JA, Rowe B 1993 1989–1991. *Epidemiol Infect* 110:591–600
29. **Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*,** - *Journal of Applied Microbiology* 2000 730-731
30. <https://www.cdc.gov/pulsenet/index.html> - CDC, PulseNet official Webpage.
31. <http://www.who.int/topics/statistics/en/> - WHO official Webpage.