

Д.А.Агафонов, С.П.Заднова, Ю.В.Лозовский, Н.И.Смирнова

**КОНСТРУИРОВАНИЕ ПЦР-ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ
ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*
БИОВАРА ЭЛЬ ТОР С РАЗНЫМ ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ**

*ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,
Российская Федерация*

Разработана мультилокусная ПЦР-тест-система, позволяющая дифференцировать токсигенные генетически измененные штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор на штаммы с высоким и низким эпидемическим потенциалом на основе определения структуры одного из генетических маркеров возбудителя 7-й пандемии холеры – острова пандемичности VSP-II. В рамках данной работы были подобраны три гена-мишени, расположенные в центральной и краевой областях этого мобильного генетического элемента. Разработанная ПЦР-тест-система позволяет выявлять штаммы, содержащие интактный VSP-II, VSP-II с короткой делецией, а также VSP-II с протяженной делецией. Штаммы с интактным VSP-II или имеющие короткую делецию в острове пандемичности относятся к вариантам с низким эпидемическим потенциалом, в то время как штаммы, содержащие VSP-II с протяженной делецией относятся к вариантам с высоким эпидемическим потенциалом. Экспериментально доказана специфичность и эффективность тест-системы при анализе 28 токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор и 6 штаммов близкородственных видов и энтеробактерий. Полученные результаты совпадают с данными монолокусного ПЦР анализа и в ряде случаев подтверждены секвенированием.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, мультилокусная ПЦР-тест-система, дифференциация, эпидемический потенциал, остров пандемичности.

D.A.Agafonov, S.P.Zadnova, Yu.V.Lofovsky, N.I.Smirnova

**Construction of PCR Test-System for Differentiation between Genetically Altered Toxigenic
Vibrio cholerae Strains, Biovar El Tor, with Varied Epidemic Potential**

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Designed is a multi-locus PCR test-system that allows for differentiation between genetically altered *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor, with high and low epidemic potential respectively, based on identification of genetic marker structure in the agent of the seventh cholera pandemic – pandemicity island VSP-II. In the course of investigations selected have been three target genes allocated in the central region and terminal end of the mobile genetic element. This test-system offers the possibility to identify the strains containing intact VSP-II, the ones containing VSP-II with a short-length deletion, and the strains with VSP-II with extended deletion. The first two are classified as the variants with low epidemic potential, while the last ones – as the variants with high epidemic potential. Specificity and efficacy of the test-system is shown by the experiments with 28 toxigenic genetically altered *V. cholerae* strains, biovar El Tor, and 6 strains of closely related species and enterobacteria. The results obtained coincide with the data on mono-locus PCR assay and in a number of instances are verified by sequencing.

Key words: *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor, multi-locus PCR test-system, differentiation, epidemic potential, pandemicity island.

Возбудителем текущей, 7-й, пандемии холеры, начавшейся в 1961 г. и продолжающейся до сих пор, является *V. cholerae* биовара Эль Тор, геном которого в процессе эволюции претерпел значительные изменения. Современный период пандемии (с 1991 г. по настоящее время) характеризуется глобальным распространением в мире высокопатогенных генетически измененных штаммов (геновариантов) *V. cholerae* биовара Эль Тор [6]. Установлено, что более высокая вирулентность геновариантов по сравнению с типичными штаммами связана в основном с иной структурой оперона *stxAB*, кодирующего холерный токсин (ХТ) – ключевой фактор вирулентности возбудителя холеры [5]. Геноварианты, вытеснившие типичные штаммы во многих эндемичных по холере регионах,

различаются между собой эпидемическим потенциалом, т.е. способностью к эпидемическому распространению. Изменение эпидемического потенциала геновариантов обусловлено изменчивостью их генетических свойств, связанных как с вирулентностью, так и с адаптацией возбудителя к меняющимся условиям окружающей среды.

К настоящему времени известно, что важную роль в широком распространении возбудителя холеры Эль Тор играют два острова пандемичности – VSP-I (от англ. *Vibrio seventh pandemic island*) и VSP-II [7]. Остров пандемичности VSP-I состоит из 11 генов и является одним из наиболее стабильных генетических маркеров штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. В то же время остров пандемичности VSP-II, со-

держаний 30 открытых рамок считывания (*vc0489–vc0517*), продукты которых, видимо, определяют высокий уровень устойчивости возбудителя холеры к стрессовым воздействиям, является переменным. К настоящему времени, помимо интактного VSP-II, известно о пяти его вариантах, обнаруженных в штаммах, изолированных в разных странах и отличающихся от интактного VSP-II наличием делеций разной протяженности [8]. Анализ распространенности штаммов с разными вариантами VSP-II показал, что среди эпидемических штаммов, изолированных в последнее десятилетие, доминируют изоляты, содержащие в VSP-II протяженную делецию, захватывающую сегмент ДНК, включающий 21 ген из 30 известных. Глобальное распространение штаммов с такой структурой VSP-II означает наличие у них высокого эпидемического потенциала. Вытеснение этими штаммами ранее возникших геновариантов с интактным VSP-II или геновариантов, имеющих в VSP-II короткие делеции, захватывающие лишь 2–4 гена, указывает на снижение эпидемического потенциала последних. В связи с тем, что в эндемичных очагах холеры циркулируют штаммы с разным эпидемическим потенциалом, способные нанести в разной степени ущерб здоровью населения и экономике страны, актуальным является дифференциация штаммов с высоким и низким эпидемическим потенциалом.

Разработанные к настоящему времени ПЦР-тест-системы позволяют быстро и эффективно определять биовар, серогруппу, токсигенность возбудителя холеры, способны выявлять токсигенные генетически измененные штаммы возбудителя текущей пандемии холеры [1, 2, 3]. Эти изобретения не способны дифференцировать токсигенные геноварианты с разным эпидемическим потенциалом, что является необходимым для совершенствования методов молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителя холеры.

Таким образом, в данной области существует очевидная потребность в разработке информативного и быстрого способа, а также тест-системы для дифференциации токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор по их эпидемическому потенциалу.

Материалы и методы

В работе использовали 28 генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, содержащих в геноме профаг CTX с геном *ctxV* классического типа, которые были изолированы в России с 1993 по 2011 год, 3 вида энтеробактерий и 3 штамма бактерий близкородственных видов рода *Vibrio*. Для культивирования применяли бульон и агар LB (рН 7,6).

Подготовку проб осуществляли согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Выделение

ДНК проводили методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинизотиоцианата.

Амплификацию ДНК проводили с использованием программируемого термостата «Терцик» (ДНК-технология, Россия).

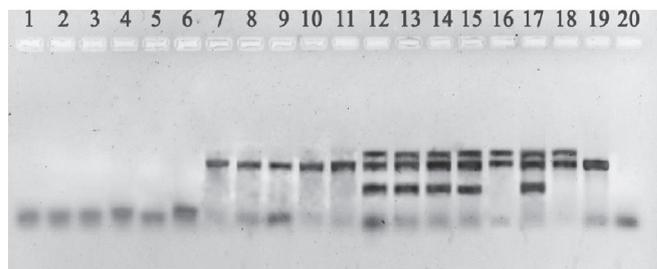
Анализ и оценку результатов осуществляли путем сравнения полученных ПЦР-ампликонов с аналогичными фрагментами типичных штаммов *V. cholerae*.

Результаты и обсуждение

Выбор ДНК-мишеней осуществляли на основе анализа нуклеотидных последовательностей острова пандемичности VSP-II у токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных в современный период 7-й пандемии и содержащих разные типы этого геномного острова. В качестве первой мишени был выбран ген *vc0514*, кодирующий метил-акцепторный белок хемотаксиса, наличие которого характерно для всех типов VSP-II. В качестве второй мишени был выбран ген *vc0502*, кодирующий пили IV типа, присутствующий в геноме штаммов с интактным островом пандемичности и штаммов, несущих короткую делецию VSP-II. В качестве третьей мишени был выбран ген *vc0497*, кодирующий регулятор транскрипции и присутствующий только в геноме штаммов с интактным VSP-II. Праймеры сконструированы авторами с помощью программы Oligo 6.0.

В ходе работы экспериментально установлен оптимальный состав реакционной смеси для проведения мультиплексной цепной реакции, подобрано необходимое и достаточное соотношение компонентов реакционной смеси и определен режим постановки ПЦР.

Специфичность разработанной тест-системы была подтверждена на основе использования штаммов энтеробактерий – *E. coli*, *S. enteritidis*, *Sh. flexneri*, а также близкородственных видов – *V. mimicus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*. Был получен отрицательный результат при проведении ПЦР-тестирования указанных штаммов (рисунок, дорожки 1–6).



Электрофореграмма штаммов с разным эпидемическим потенциалом, полученная с использованием разработанной мультиплексной ПЦР тест-системы:

1 – *E. coli* M17; 2 – *S. enteritidis* BO3; 3 – *Sh. flexneri* 26 «C»; 4 – *V. mimicus* ATCC 33653; 5 – *V. parahaemolyticus* 745; 6 – *V. albensis* 37263; 7 – *V. cholerae* M1430; 8 – *V. cholerae* P18899; 9 – *V. cholerae* Л-3225; 10 – *V. cholerae* Л-4150; 11 – *V. cholerae* 301; 12 – *V. cholerae* M1326; 13 – *V. cholerae* M1293; 14 – *V. cholerae* M1266; 15 – *V. cholerae* M1275; 16 – *V. cholerae* P17647; 17 – ПК-M818 (*V. cholerae* M818); 18 – ПК-P17644 (*V. cholerae* P17644); 19 – ПК-Л3226 (*V. cholerae* Л-3226); 20 – ОКВ, К-

Специфичность и эффективность сконструированной мультилокусной ПЦР-тест-системы

Штамм	Год выделения	Место выделения	Тестируемые гены			Тип VSP-II	Эпидемический потенциал
			<i>vco497</i>	<i>vco502</i>	<i>vco514</i>		
<i>E. coli</i> M17	Неизвестен	Неизвестно	-	-	-	О	н/о
<i>S. enteritidis</i> BO3	Неизвестен	Неизвестно	-	-	-	О	н/о
<i>Sh. flexneri</i> 26 «С»	Неизвестен	Неизвестно	-	-	-	О	н/о
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	Неизвестен	Институт Пастера	-	-	-	О	н/о
<i>V. parahaemolyticus</i> 745	Неизвестен	Новороссийск	-	-	-	О	н/о
<i>V. albensis</i> 37263	Неизвестен	Ставрополь	-	-	-	О	н/о
<i>V. cholerae</i> M1275	1993	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1297	1993	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1278	1993	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1279	1993	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1264	1993	Краснодар	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1272	1993	Сочи	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1299	1993	Сочи	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1271	1993	Респ. Татарстан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1270	1993	Респ. Татарстан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1298	1993	Сочи	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1266	1994	Пермь	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1295	1994	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1287	1994	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1288	1994	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1286	1994	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1293	1994	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1269	1994	Магнитогорск	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> P17647	1997	Ачинск	-	+	+	КД	Н
<i>V. cholerae</i> M1326	1998	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1328	1998	Респ. Дагестан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1345	2001	Респ. Татарстан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1349	2001	Респ. Татарстан	+	+	+	П	Н
<i>V. cholerae</i> M1429	2004	Респ. Башкирия	-	-	+	ПД	В
<i>V. cholerae</i> M1430	2005	Тверь	-	-	+	ПД	В
<i>V. cholerae</i> P18899	2006	Мурманск	-	-	+	ПД	В
<i>V. cholerae</i> Л-3225	2010	Москва	-	-	+	ПД	В
<i>V. cholerae</i> Л-4150	2010	Москва	-	-	+	ПД	В
<i>V. cholerae</i> 301	2011	Таганрог	-	-	+	ПД	В
ПК-M818 (<i>V. cholerae</i> M818)	1970	Саратов	+	+	+	П	Н
ПК-P17644 (<i>V. cholerae</i> P17644)	1997	Ачинск	-	+	+	КД	Н
ПК-Л3226 (<i>V. cholerae</i> Л-3226)	2010	Москва	-	-	+	ПД	В

Примечания: «-» – отсутствие гена; «+» – наличие гена; О – отсутствует VSP-II; П – прототипный VSP-II; КД – VSP-II с короткой делецией; ПД – VSP-II с протяженной делецией; Н – низкий эпидемический потенциал (неспособность штаммов с указанным генетическим маркером к эпидемическому распространению в современный период); В – высокий эпидемический потенциал (способность штаммов с указанным генетическим маркером к эпидемическому распространению в современный период); н/о – не определяется.

Эффективность сконструированной тест-системы подтверждена исследованием 28 генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. Данные по ПЦР-тестированию представлены в таблице и на рисунке. При оценке структуры их острова пандемичности с помощью разработанной тест-системы было установлено, что у 21 штамма определяется образование трех фрагментов размером 761, 604 и 320 п.н., как и у штамма M818, взятого в качестве контрольного; у 1 штамма, выделенного в Ачинске в 1997 г., двух фрагментов размером 761 и 604 п.н., как у контрольного штамма P17644. Из этого следует, что данная группа штаммов, изолиро-

ванных в 1993–2001 гг., относится к геновариантам возбудителя холеры с низким эпидемическим потенциалом. Вторая группа состоит из 6 штаммов, VSP-II которых имеет протяженную делецию, поскольку для них характерно образование в ПЦР только одного фрагмента размером 604 п.н., соответствующего гену *vco514*, общему для всех вариантов. Эти штаммы, изолированные в последние годы (2004–2012 гг.), являются геновариантами с высоким эпидемическим потенциалом, о чем свидетельствует их глобальное распространение и вытеснение в эндемичных очагах холеры геновариантов с низким эпидемическим потенциалом. Полученные нами данные методом мульт-

тилокусной ПЦР впоследствии были подтверждены методом секвенирования [4].

Таким образом, разработанная мультилокусная ПЦР-тест-система для дифференциации геновариантов возбудителя холеры Эль-Тор с высоким и низким эпидемическим потенциалом специфична и эффективна. Показанная возможность быстрого обнаружения недавно сформированных вариантов *V. cholerae* с высоким эпидемическим потенциалом, глобальное распространение которых во многих странах мира стало реальным фактом, позволяет рекомендовать эту ПЦР-тест-систему для использования в качестве дополнительного метода при проведении эпидемиологических расследований.

Подана заявка № 214100736 от 09.01.2014 г. о выдаче патента на изобретение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Заднова С.П., Ливанова Л.Ф., Крепостнова И.М., Захарова Т.Л., Осин А.В., Смирнова Н.И. Комплексная гено- и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогруппы и оценки их вирулентности. Патент РФ 2404257, опубл. 20.11.2010 г. Бюл. 32.
2. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Челдышова Н.Б., Кутырев В.В. Дифференциация штаммов *Vibrio cholerae* eltor по их эпидемической значимости с помощью новых диагностических холерных бактериофагов Эль Тор ctx⁻ и ctx⁺ и полимеразной цепной реакции. *Журн. эпидемиол., микробиол. и иммунобиол.* 2001; 6:11–6.
3. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Шубина А.В., Заднова С.П., Кутырев В.В. Способ идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов биовара Эль Тор на типичные и измененные методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления. Патент РФ 2458141, опубл. 10.08.2012 г. Бюл. 22.
4. Черкасов А.В., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Смирнова Н.И. Вариабельность структуры острова пандемичности VSP-II штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории России. *Инфекция и иммунитет.* 2013; 3(2):185.
5. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser S.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: Genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:1556–61.
6. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3.
7. O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., Boyd F. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26,9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43,4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology.* 2004; 150:4053–63.
8. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308:130–7.

References

1. Zadnova S.P., Livanova L.F., Krepostnova I.M., Zakharova T.L., Osin A.V., Smirnova N.I. [Complex gene- and immune-diagnostic test-system for identification of cholera vibrios belonging to O1 and O139 serogroup; and assessment of their virulence]. RF Patent 2404257.
2. Smirnova N.I., Kirillina O.A., Cheldyshova N.B., Kutyrev V.V. [Differentiation of *Vibrio cholerae* eltor according to their epidemic significance using novel diagnostic cholera bacteriophages El Tor – ctx⁻ and ctx⁺ and polymerase chain reaction]. *Zh. Epidemiol. Mikrobiol. Immunobiol.* 2001; 6:11–6.
3. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Shubina A.V., Zadnova S.P., Kutyrev V.V. [Method of detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains, identification of their biovar affinity, and differentiation of the strains belonging to biovar El Tor onto typical and genetically altered ones using multiplex polymerase chain reaction and a test-system necessary to perform the assay]. RF Patent 2458141.
4. Cherkasov A.V., Krasnov Ya.M., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Smirnova N.I. [Variability of structure of VSP-II pandemicity island in *Vibrio cholerae* strains isolated in the territory of Russia]. *Infektsiya i Immunitet.* 2013; 3(2):185.
5. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser S.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: Genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99:1556–61.
6. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad Q.S., Faruque S.M., Faruque A.S., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3.
7. O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., Boyd F. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26,9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43,4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology.* 2004; 150:4053–63.
8. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308:130–7.

Authors:

Agafonov D.A., Zadnova S.P., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru

Об авторах:

Агафонов Д.А., Заднова С.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru

Поступила 28.03.14.