

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

УДК 616.932:616-07

В.Н. Савельев<sup>1</sup>, А.Н. Куличенко<sup>1</sup>, И.В. Савельева<sup>1</sup>, Д.А. Ковалев<sup>1</sup>, Т.В. Таран<sup>1</sup>, Е.И. Подопригра<sup>1</sup>,  
В.В. Сосунов<sup>2</sup>, Т.В. Радаева<sup>2</sup>**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ ХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**<sup>1</sup>ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь, Российская Федерация;  
<sup>2</sup>ООО «ДНК-СИНТЕЗ», Москва, Российская Федерация

**Цель** работы – анализ и оценка результатов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» для идентификации *Vibrio cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты в мультиплексном формате с гибридационно-флуоресцентным методом учета результатов в режиме реального времени. **Материалы и методы.** Для достижения указанной цели в работе представлен набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL», а также способ осуществления идентификации *V. cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты. Изучены специфичность, специфическая активность и чувствительность разработанной тест-системы на 35 штаммах *V. cholerae* O1, 6 штаммах *V. cholerae* non O1, 5 гетерологичных штаммах (*Shigella zonnei* – 2 штамма, по одному штамму *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*). **Результаты и обсуждение.** Набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» выявляет в геноме токсигенных *V. cholerae* O1 фрагменты ДНК генов *ctxB<sup>Cl</sup>*, *ctxB<sup>El</sup>*, *rtxC* (обладает специфической активностью, аналитическая чувствительность 1·10<sup>3</sup> ГЭ/мл) и не обнаруживает данные гены у нетоксигенных *V. cholerae* O1 и non O1, а также у гетерологичных штаммов микроорганизмов (показана специфичность 100 %). На ПЦР-тест-систему «Гены *V. cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» получен патент РФ № 2732448, опубл. 24.08.2020, бюл. № 24. ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» может быть использована для повышения эффективности системы эпидемиологического надзора за холерой и проведения обоснованного объема противоэпидемических мероприятий в случае ее завоза на территорию Российской Федерации.

**Ключевые слова:** типичные токсигенные и генетически измененные варианты холерного вибриона биовара Эль Тор, ПЦР-тест-система для идентификации возбудителя холеры.

Корреспондирующий автор: Савельев Вилорий Николаевич, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Для цитирования: Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригра Е.И., Сосунов В.В., Радаева Т.В. Тест-система для идентификации типичных и генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор методом ПЦР в режиме реального времени. Проблемы особо опасных инфекций. 2021; 4:120–127. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

Поступила 08.04.2021. Отправлена на доработку 29.04.2021. Принята к публ. 19.05.2021.

V.N. Savel'ev<sup>1</sup>, A.N. Kulichenko<sup>1</sup>, I.V. Savel'eva<sup>1</sup>, D.A. Kovalev<sup>1</sup>, T.V. Taran<sup>1</sup>, E.I. Podoprigora<sup>1</sup>,  
V.V. Sosunov<sup>2</sup>, T.V. Radaeva<sup>2</sup>**Test-System for Identification of Typical and Genetically Altered Variants of Cholera Vibrios, Biovar El Tor, Using Real-Time PCR**<sup>1</sup>Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol, Russian Federation;<sup>2</sup>"DNK-SINTEZ" LLC, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work was to analyze and assess the results of using PCR test-system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes” for identification of *Vibrio cholerae* O1 with differentiation between typical toxigenic and genetically modified variants in a multiplex format with a real-time hybridization-fluorescent recording of results. **Materials and methods.** To achieve this goal, a set of reagents for the PCR test-system “*V. cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC* FL genes”, as well as a method for identifying *V. cholerae* O1 with differentiation between typical toxigenic and genetically altered variants were utilized. The specificity, specific activity and sensitivity of the developed test-system by the example of 35 *V. cholerae* O1 strains, 6 *V. cholerae* non-O1 strains, 5 heterologous strains (*Shigella zonnei* – 2 strains, one *Salmonella typhimurium* strain, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*) were investigated. **Results and discussion.** The panel of reagents for the PCR test system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes” detects DNA fragments of the *ctxB<sup>Cl</sup>*, *ctxB<sup>El</sup>*, *rtxC* genes in the genome of toxigenic *V. cholerae* O1 (has specific activity, analytical sensitivity 1·10<sup>3</sup> GE/ml) and does not detect these genes in non-toxicogenic *V. cholerae* O1 and non-O1, as well as in heterologous strains of microorganisms (100 % specificity). RF Patent No. 2732448 was granted for the PCR test-system “*V. cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes”. It can be used to increase the efficiency of the epidemiological surveillance system and to carry out a justified scope of anti-epidemic measures in the event of cholera importation into the territory of the Russian Federation.

**Key words:** typical toxigenic and genetically modified variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, PCR test-system for identification of the causative agent of cholera.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

**Corresponding author:** Vilory N. Savel'ev, e-mail: stavnipchi@mail.ru.

Citation: Savel'ev V.N., Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprigora E.I., Sosunov V.V., Radaeva T.V. Test-System for Identification of Typical and Genetically Altered Variants of Cholera Vibrios, Biovar El Tor, Using Real-Time PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 4:120–127. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-120-127

Received 08.04.2021. Revised 29.04.2021. Accepted 19.05.2021.

Savel'ev V.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Kulichenko A.N., ORCID: <https://orcid.org/0000-000-9362-39>

Savel'eva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

Kovalev D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Taran T.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8070-0706>

Podoprigora E.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4549-9701>

Типичные токсигенные холерные вибрионы биовара Эль Тор (*Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor, Hly<sub>–</sub>, *ctxA*+) за счет присутствия в геноме дополнительных блоков генов, обеспечивающих высокий уровень адаптации к меняющимся условиям окружающей среды (островов патогенности (VPI-I, II) и пандемичности (VSP-I, II)) [1–3], явились этиологическим фактором холеры в Азии (1961–1969 гг.), Азии, Африке, Европе, США, Океании (1970–1980 гг.), Азии, Африке, Европе, США, Океании, Австралии (1981–1990 гг.) [4–11].

В начале 90-х гг. прошлого столетия появились штаммы холерного вибриона O1 серологической группы с фено- и генотипическими признаками классического и Эль Тор биоваров, получивших название «генетически измененные» (геноварианты) или «гибридные» варианты холерных вибрионов биовара Эль Тор [12, 13], и они являются доминантными этиологическими агентами современного этапа развития седьмой пандемии холеры Эль Тор, начавшейся в 1990-е гг., а в первые два десятилетия XXI в. получили глобальное распространение.

Эволюционные преобразования типичного токсигенного биовара Эль Тор в гибридный вариант сопровождались изменениями структуры генов коровой области профагов *CTX<sub>φ</sub>* и *RS1<sub>φ</sub>*. В результате горизонтального переноса генов образовались генотипы с различными комбинациями генов патогенности типичного Эль Тор и классического биовара. При этом геномы названных вариантов биовара Эль Тор обязательно содержат ген *ctxB<sup>Cl</sup>*, кодирующий биосинтез энтеротоксина классического типа (СТ1) [14]. Вместе с тем эволюционные преобразования в гибридный вариант не затронули гены «домашнего хозяйства», в частности ген *rtxC*, специфичный для типичного токсигенного биовара Эль Тор. При этом в реакции полимеразной цепной реакции типичные токсигенные штаммы биовара Эль Тор образуют ампликоны к генам *ctxB<sup>El</sup>* и *rtxC*, а генетически измененные варианты биовара Эль Тор образуют ампликоны к генам *ctxB<sup>Cl</sup>* и *rtxC*.

Учитывая генетические особенности гибридных вариантов Эль Тор, специалисты РосНИПЧИ «Микроб» разработали «Набор реагентов для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 классического и Эль Тор биоваров и дифференциации Эль Тор вибрионов на типичные и измененные методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с электрофорезным учетом результатов (Ген *Vibrio cholerae* вариант *ctxB*-РЭФ)» [15, 16].

**Цель** работы – анализ и оценка результатов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант

*ctxB-rtxC*, FL» для идентификации *V. cholerae* O1 с дифференциацией на типичные токсигенные и генетически измененные варианты в мультиплексном формате с гибридационно-флуоресцентным методом учета результатов в режиме реального времени.

## Материалы и методы

В работе использовали набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL», предназначенный для идентификации *V. cholerae* O1 с определением биовара и дифференциацией вибрионов биовара Эль Тор на типичные штаммы и генетически измененные (гибридные) варианты методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов, состоящий из следующих ингредиентов (табл. 1).

Для изучения специфичности, специфической активности и чувствительности разработанной тест-системы использованы гомологичные штаммы: штаммы *V. cholerae* O1 стандартного образца ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» СО 002-9388-2010 «Набор штаммов для контроля качества МИБП для диагностики холеры» – 35 штаммов, *V. cholerae* non O1 – 6 штаммов, гетерологичные штаммы – 5 штаммов (*Shigella zonnei* (2 штамма), *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*, *Escherichia coli*).

Штаммы указанных микроорганизмов получены из коллекции патогенных микроорганизмов Ставропольского противочумного института, где холерные вибрионы хранились в 0,4 % агаре Хоттингера при температуре 20–25 °С, а шигеллы, сальмонеллы и кишечные палочки – в 0,4 % агаре Хоттингера при 4–6 °С.

Подготовку проб проводили 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 осуществляли с использованием комплекта реагентов для экстракции ДНК «АмплиПрайм ДНК-сорб-АМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия).

Алельспецифические праймеры для амплификации смеси генов F+R *ctxB* (*ctxB<sup>Cl</sup>*+*ctxB<sup>El</sup>*) и *rtxC* методом полимеразной цепной реакции в мультиплексном формате с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов на амплификаторе Rotor Gene Q5 синтезировали в ООО «ДНК-Синтез». Полимеразную цепную реакцию двух реакционных смесей различ-

Таблица 1 / Table 1

Состав набора реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC, FL*»  
Composition of the set of reagents for the PCR test system “*Vibrio cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC, FL*”

Компонент Component	Описание Description	Объем, мкл Volume, µl	Кол-во (пробирка) Qty (test tube)
ПЦР-смесь 1: (F+R) праймеры <i>ctxB<sup>Cl</sup></i> (10 мкМ) GREEN <i>ctxB<sup>El</sup></i> (10 мкМ) YELLOW PCR mixture 1: (F+R) <i>ctxB<sup>Cl</sup></i> primers (10 µM) GREEN <i>ctxB<sup>El</sup></i> (10 µM) YELLOW	Лиофильно высушенный порошок, при растворении – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к генам <i>B1</i> и <i>B3</i> Freeze-dried powder, when dissolved – a clear colorless liquid containing primers for <i>B1</i> and <i>B3</i> genes	130	1
Зонд G-FAM (10 мкМ) GREEN G-FAM probe (10 µM) GREEN	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>B1</i> на канале Green Freeze-dried powder. Identifies <i>B1</i> gene on the Green channel	55	1
Зонд – A-VIC (10 мкМ) YELLOW Probe – A-VIC (10 µM) YELLOW	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>B3</i> на канале Yellow Freeze-dried powder. Identifies the <i>B3</i> gene on the Yellow channel	55	1
ПЦР-смесь 2: (F+R) праймеры <i>rtxC</i> (10 мкМ) ORANGE PCR-mixture 2: (F+R) <i>rtxC</i> primers (10µM) ORANGE	Лиофильно высушенный порошок, при растворении – прозрачная бесцветная жидкость, содержащая праймеры к гену <i>rtxC</i> Freeze-dried powder, when dissolved – a clear colorless liquid containing primers to the <i>rtxC</i> gene	130	1
Зонд для выявления гена <i>rtxC</i> на канале ORANGE Probe for detecting <i>rtxC</i> gene on the ORANGE channel	Лиофильно высушенный порошок. Выявляет ген <i>rtxC</i> на канале ORANGE Freeze-dried powder. Identifies the <i>rtxC</i> gene on the ORANGE channel	55	1
Смесь дНТП 10x (5 мМ) dNTP Mixture 10x (5 mM)	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	55	1
10x буфер для TaqPol+MgCl <sub>2</sub> 10x Buffer for TaqPol+MgCl <sub>2</sub>	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	130	1
Taq-полимераза (5 ед/мкл) Taq polymerase (5 units/µl)	Прозрачная бесцветная жидкость Transparent colorless liquid	30	1
К – (H <sub>2</sub> O или РНК-элюент) K – (H <sub>2</sub> O or RNA eluent)	Вода очищенная – прозрачная бесцветная жидкость Purified water – transparent colorless liquid	1200	1
ПКО+Class (ДНК, 569B) PCS+Class (DNA, 569B)	Прозрачная бесцветная жидкость – водный раствор ДНК <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара Transparent colorless liquid – aqueous solution of <i>V. cholerae</i> O1 DNA of classic biovar	55	1
ПКО+El Tor (ДНК, 484Ст) PCS+El Tor (DNA, 484St)	Прозрачная бесцветная жидкость – водный раствор ДНК <i>V. cholerae</i> O1 биовара Эль Тор Transparent colorless liquid – aqueous solution of <i>V. cholerae</i> O1 biovar El Tor	55	1

Примечание: набор реагентов «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC, FL*» рассчитан на 50 определений с учетом положительных и отрицательных контролей. ПКО – положительный контрольный образец.

Note: the set of reagents “*Vibrio cholerae* O1 variant *ctxB-rtxC FL* genes” is designed for 50 runs, taking into account positive and negative controls. PCS – positive control sample.

ного состава с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени проводили в объеме 25 мкл (табл. 2).

Режим амплификации: 1 цикл 95 °С – 3 мин; 40 циклов 95 °С – 20 с; 57 °С – 30 с; 72 °С – 20 с. Накопление продукта амплификации только с зондом, специфичного к гену *ctxB<sup>Cl</sup>* (G-FAM) в канале Green, свидетельствует о наличии в пробе *ctxB<sup>Cl</sup>* (B1). Накопление продукта амплификации только с зондом, специфичного к гену *ctxB<sup>El</sup>* (A-VIC) в канале HEX/VIC (Yellow), – о наличии в пробе гена *ctxB<sup>El</sup>* (B3).

Накопление продукта амплификации с двумя зондами одновременно (в двух каналах) свидетельствует о наличии в пробе ДНК двух генов одновременно. Накопление продукта амплификации только с зондом ROX, специфичного к гену *rtxC* в канале Orange, свидетельствует о наличии в пробе ДНК гена *rtxC*.

#### Анализ и интерпретация результатов:

а) анализ результатов амплификации ДНК исследуемых штаммов микроорганизмов с ПЦР-смесью № 1: анализируют кривые накопления флуоресцентного сигнала по двум каналам:

Таблица 2 / Table 2

Состав реакционных смесей  
The composition of the reaction mixtures

Смесь № 1 Mix No. 1	Смесь № 2 Mix No. 2
10x буфер для TaqPol, 2,5 мкл 10x TaqPol buffer, 2.5 µl	10x буфер для TaqPol, 2,5 мкл 10x TaqPol buffer, 2.5 µl
MgCl <sub>2</sub> (50 мкМ), 2,0 мкл MgCl <sub>2</sub> (50 µM), 2.0 µl	MgCl <sub>2</sub> (50 мкМ), 2,0 мкл MgCl <sub>2</sub> (50 µM), 2.0 µl
(F+R <i>ctxB</i> ) праймеры (10 мкМ), 2,5 мкл (F+R <i>ctxB</i> ) primers (10 µM), 2.5 µl	(F+R <i>rtxC</i> ) праймеры (10 мкМ), 2,5 мкл (F+R <i>rtxC</i> ) primers (10 µM), 2.5 µl
Зонд G-FAM (10 мкМ), Green, 1 мкл G-FAM probe (10 µM), Green, 1 µl	Зонд на <i>rtxC</i> (10 мкМ), Orange, 1 мкл Probe for <i>rtxC</i> (10 µM), Orange, 1 µl
Зонд A-VIC (10 мкМ), Yellow, 1 мкл Probe A-VIC (10 µM), Yellow, 1 µl	
Смесь dNTPs (5 мкМ), 4 мкл dNTPs mixture (5 µM), 4 µl	Смесь dNTPs (5 мкМ), 4 мкл DNTPs mixture (5 µM), 4 µl
TaqPol (5 ед/мкл), 1 мкл TaqPol (5 U/µl), 1 µl	TaqPol (5 ед/мкл), 1 мкл TaqPol (5 U/µl), 1 µl
Вода до 25 мкл Water up to 25 µl	Вода до 25 мкл Water up to 25 µl
Контроли: Controls:	Контроли: Controls:
К – (H <sub>2</sub> O) – отрицательный, 2,0 мкл К – (H <sub>2</sub> O) – negative control, 2.0 µl	К – (H <sub>2</sub> O) – отрицательный, 2,0 мкл К – (H <sub>2</sub> O) – negative control, 2.0 µl
ПКО+Эль Тор: ДНК <i>V. cholerae</i> El Tor PCS +El Tor: DNA <i>V. cholerae</i> El Tor	ПКО+Эль Тор: ДНК <i>V. cholerae</i> El Tor РКО+El Tor: DNA <i>V. cholerae</i> El Tor
484Ст (10 нг/мкл), 2 мкл 484St (10 ng/µl), 2 µl	484Ст (10 нг/мкл), 2 мкл 484St (10 ng/µl), 2 µl
ПКО+Classical: ДНК <i>V. cholerae</i> Classical PCS +Classical: DNA <i>V. cholerae</i> Classical	ПКО+Classical: ДНК <i>V. cholerae</i> Classical РКО+Classical: DNA <i>V. cholerae</i> Classical
569В (10 нг/мкл), 2 мкл 569B (10 ng/µl), 2 µl	569В (10 нг/мкл), 2 мкл 569B (10 ng/µl), 2 µl
ДНК (10 нг/мкл) изучаемая, 2 мкл DNA (10 ng/µl) studied, 2 µl	ДНК (10 нг/мкл) изучаемая, 2 мкл DNA (10 ng/µl) studied, 2 µl

- по каналу для флуорофора G-FAM регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *ctxB<sup>Cl</sup>* (*B1*) на канале Green;

- по каналу для флуорофора A-VIC регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *ctxB<sup>El</sup>* (*B3*) на канале Yellow;

б) анализ результатов амплификации ДНК исследуемых штаммов микроорганизмов с ПЦР-смесью № 2: по каналу для флуорофора ROX регистрируется сигнал, свидетельствующий о накоплении продукта амплификации фрагмента ДНК гена *rtxC* на канале Orange.

Уровень пороговой линии (порог) на всех каналах учета – 0,05. Величина порогового цикла для положительных проб составила: Ct не ≥25. Корректировка уклона выявленных кривых обязательна, процент устранения выбросов – 15–20 %. Амплификацию осуществляли на приборе RotorGeneQ 5plex (QiaGen, ФРГ).

## Результаты и обсуждение

Результаты ПЦР-анализа ДНК штаммов *V. cholerae* при использовании тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» представлены в табл. 3 и на рисунке.

Примеры результатов ПЦР-анализа ДНК генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 представлены на рисунке.

Таким образом, набор реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL» выявляет в геноме токсигенных *V. cholerae* O1 фрагменты ДНК генов *ctxB<sup>Cl</sup>*, *ctxB<sup>El</sup>*, *rtxC* (обладает специфической активностью) и не обнаруживает данные гены у нетоксигенных *V. cholerae* O1 и non O1, а также у гетерологичных штаммов микроорганизмов: *S. zonnei* 20, 76; *S. typhimurium* 160; *S. enteritidis* 165; *E. coli* 406-1 (обладает специфичностью).

Образцы набора реагентов ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» для идентификации штаммов *V. cholerae* O1 с определе-

Таблица 3 / Table 3

Протокол учета результатов ПЦР-анализа ДНК штаммов *V. cholerae* O1, non O1/139 и гетерологичных при использовании тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* вариант *ctxB-rtxC*, FL»

Protocol for recording the results of PCR assay of *V. cholerae* O1, non O1/139 and heterologous strain DNA, using the test system “*Vibrio cholerae* variant *ctxB-rtxC* FL genes”

ДНК штаммов <i>V. cholerae</i> O1 DNA of <i>V. cholerae</i> O1 strains	ПЦР-смеси праймеров № 1, 2 <i>V. cholerae</i> O1 PCR primer mixtures No. 1, 2 <i>V. cholerae</i> O1			Результат / Result (Биовар / Biovar)
	Каналы учета выявляемых генов в режиме реального времени Channels for registering the detected genes in real-time mode			
	Green: (B1)	Yellow: (B3)	Orange: <i>rtxC</i>	
К – (H <sub>2</sub> O) / К – (H <sub>2</sub> O)	–	–	–	–
ПКО+Class / PCS + Class	+	–	–	БК / BC
ПКО+El Tor / PCS + El Tor	–	+	+	БЭТ / BET
ДНК Эль Тор / DNA El Tor	+	–	+	ГИЭ / GME
<b>Дагестан, 1993 г. / Dagestan, 1993</b>				
1. <i>V. cholerae</i> O1, 64	+	–	+	ГИЭ / GME
2. <i>V. cholerae</i> O1, 169	+	–	+	ГИЭ / GME
3. <i>V. cholerae</i> O1, 1045	+	–	+	ГИЭ / GME
4. <i>V. cholerae</i> O1, 1308	+	–	+	ГИЭ / GME
5. <i>V. cholerae</i> O1, 1726	+	–	+	ГИЭ / GME
<b>Дагестан, 1994 г. / Dagestan, 1994</b>				
6. <i>V. cholerae</i> O1, 489	+	–	+	ГИЭ / GME
7. <i>V. cholerae</i> O1, 549	+	–	+	ГИЭ / GME
8. <i>V. cholerae</i> O1, 1095	+	–	+	ГИЭ / GME
9. <i>V. cholerae</i> O1, 1105	+	–	+	ГИЭ / GME
10. <i>V. cholerae</i> O1, 1120	+	–	+	ГИЭ / GME
11. <i>V. cholerae</i> , 1641	+	–	+	ГИЭ / GME
<b>Дагестан, 1998 г. / Dagestan, 1998</b>				
12. <i>V. cholerae</i> O1, 6К	+	–	+	ГИЭ / GME
13. <i>V. cholerae</i> O1, 8К	+	–	+	ГИЭ / GME
14. <i>V. cholerae</i> O1, 13К	+	–	+	ГИЭ / GME
15. <i>V. cholerae</i> 1720к	+	–	+	ГИЭ / GME
16. <i>V. cholerae</i> 1, 17280	+	–	+	ГИЭ / GME
17. <i>V. cholerae</i> O1, 17390	+	–	+	ГИЭ / GME
<b>Украина, Мариуполь (1994, 1995, 1998 гг.) / Ukraine, Mariupol (1994, 1995, 1998)</b>				
18. <i>V. cholerae</i> O1, 12К	+	–	+	ГИЭ / GME
19. <i>V. cholerae</i> O1, 31К	+	–	+	ГИЭ / GME
20. <i>V. cholerae</i> O1, 39К	+	–	+	ГИЭ / GME
21. <i>V. cholerae</i> O1, 43К	+	–	+	ГИЭ / GME
22. <i>V. cholerae</i> O1, 56К	+	–	+	ГИЭ / GME
23. <i>V. cholerae</i> O1, 80К	+	–	+	ГИЭ / GME
<b>Азербайджан, 1985 г.; Ставрополь, 1990 г. / Azerbaijan, 1985; Stavropol, 1990</b>				
24. <i>V. cholerae</i> O1, 350Аз	–	+	+	БЭТ / BET
25. <i>V. cholerae</i> O1, 351Аз	–	+	+	БЭТ / BET
26. <i>V. cholerae</i> O1, 363Аз	–	+	+	БЭТ / BET
27. <i>V. cholerae</i> O1, 431Ст	–	+	+	БЭТ / BET
28. <i>V. cholerae</i> O1, 454Ст	–	+	+	БЭТ / BET
29. <i>V. cholerae</i> O1, 477Ст	–	+	+	БЭТ / BET
<b>Сочи, 2015 г. / Sochi, 2015 (sampling with traps)</b>				
30. <i>V. cholerae</i> O1, 3 л	–	–	+	–
31. <i>V. cholerae</i> O1, 5 л	–	–	+	–
32. <i>V. cholerae</i> O1, 7 л	–	–	+	–
33. <i>V. cholerae</i> O1, 548 л	–	–	+	–
34. <i>V. cholerae</i> O1, 647 л	–	+	+	БЭТ / BET
35. <i>V. cholerae</i> O1, 1013 л	–	–	+	–
<b>Азербайджан, <i>V. cholerae</i> не O1 / Azerbaijan, <i>V. cholerae</i> non-O1</b>				
36. <i>V. cholerae</i> не O1, 1775Аз	–	–	–	–
37. <i>V. cholerae</i> не O1, 2286Аз	–	–	–	–
38. <i>V. cholerae</i> не O1, 2603Аз	–	–	–	–
39. <i>V. cholerae</i> не O1, 5278Аз	–	–	–	–
40. <i>V. cholerae</i> не O1, 7007Аз	–	–	–	–
41. <i>V. cholerae</i> не O1, 161–168, коллекция Саказаки	–	–	–	–
<b>Гетерологичные штаммы / Heterologous strains</b>				
42. <i>S. zonnei</i> , 20	–	–	–	–
43. <i>S. zonnei</i> , 76	–	–	–	–
44. <i>S. enteritidis</i> , 160	–	–	–	–
45. <i>E. coli</i> , 406-1	–	–	–	–
46. <i>S. typhimurium</i> , 165	–	–	–	–

Примечание: БК – биовар классический; БЭТ – биовар Эль Тор типичный; ГИЭ – генетически измененный биовар Эль Тор.

Note: BC – classic biovar; BET – biovar El Tor typical; GME – genetically modified El Tor.



Типичные кривые амплификации при анализе ДНК штаммов *V. cholerae* O1, выделенных в Республике Дагестан в 1993, 1994, 1998 гг. Канал Green (A); канал Yellow (B); канал Orange (C)

Typical amplification curves in the analysis of DNA of *V. cholerae* O1 strains isolated in the Republic of Dagestan in 1993, 1994, 1998. Green channel (A); Yellow channel (B); Orange channel (C)

нием биовара и дифференциацией биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные (гибридные) варианты методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов (серии 1–18 и 2–18) соответствуют требованиям ТУ 21.10.60-52-018977080–2019.

ПЦР-тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» позволяет выявлять генетически измененные штаммы холерных вибрионов биовара Эль Тор и соответствует результатам, полученным с помощью ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rstR-rstC*, РЭФ» (опытный

образец, Ставропольский противочумный институт) и ПЦР-тест-системы «Ген *V. cholerae* вариант *ctxB*-РЭФ», предназначенной для идентификации токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, определения биовара выделенного штамма, дифференциации Эль Тор вибрионов на типичные штаммы и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов (производство РосНИПЧИ «Микроб»).

Основное преимущество разработанной ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» при сравнении с указанными выше

заключается в том, что идентификация штаммов *V. cholerae* O1 с определением биовара и дифференциацией биовара Эль Тор на типичные токсигенные и генетически измененные (гибридные) варианты осуществляется методом мультилокусной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Воспроизводимость результатов, получаемых с помощью данной ПЦР-тест-системы, составляет 100 %. Чувствительность тест-системы составила  $10^3$  ГЭ/мл.

Представленная ПЦР тест-система «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» может быть использована для повышения эффективности системы эпидемиологического надзора за холерой и принятия обоснованного решения по объему противоэпидемических мероприятий в случае ее завоза на территорию Российской Федерации.

На ПЦР-тест-систему «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB-rtxC*, FL» получен патент РФ на изобретение № 2732448 (опубл. 24.08.2020, бюл. № 24) [17].

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### Список литературы

- De Haan L., Hirst T.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 2004; 21(2):77–92. DOI: 10.1080/09687680410001663267.
- Dziejman M.E., Balon D., Boyd C.M., Fraser J.F., Heidelberg J.J., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and handemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(3):1556–61. DOI: 0.1073/pnas.042667999.
- Pradhan S., Baidya A.K., Ghosh A., Paul K., Chowdhury R. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype. *J. Bacteriol.* 2010; 192(4):955–63. DOI: 10.1128/JB.01180-09.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.П., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, изолированных на территории России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011; 3:11–7.
- Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 15(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
- Nguyen B.M., Lee J.H., Cuong N.T., Choi S.Y., Hien N.T., Anh D.D., Lee H.R., Ansaruzzaman M., Endtz H.P., Chun J., Lopez A.L., Czerkinsky C., Clemens J.D., Kim D.W. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1568–71. DOI: 10.1128/JCM.02040-08.
- Raychoudhuri A., Patra T., Ghosh K., Ramamurthy T., Nandy R.K., Takeda Y., Balakrish-Nair G., Mukhopadhyay A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):131–2. DOI: 10.3201/eid1501.080543.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor end classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.
- Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
- Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Huq A., Nizam A., Longini I.M. Jr., Qadri F., Faruque S.M., Colwell R.R.,

Ahmed S., Iqbal A., Bhuiyan N.A., Sack R.B. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(3):347–52. DOI: 10.1017/S0950268809990550.

12. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., Siddique A.K., Qadri F., Izumiya H., Nair G.B., Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(6):314–7. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00041.x.

13. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., 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(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.

14. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Ковалев Д.А., Жиров А.М., Савельев В.Н. Эволюция генома холерного вибриона биовара Эль Тор и разработка ПЦР-тест-системы для идентификации штаммов возбудителя холеры. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы Проблемной комиссии. Ростов н/Д; 2017. Вып. 30. С. 172–7.

15. 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. Бюл. № 22.

16. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Конструирование ПЦР-тест-системы для идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их биовара и дифференциации штаммов Эль Тор вибрионов на типичные и измененные. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2011; 4(110):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.

17. Савельев В.Н., Савельева И.В., Сосунов В.В., Ковалев Д.А., Подопригора Е.И., Васильева О.В., Гусева Л.В. Способ идентификации штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их токсигенности и биовара с дифференциацией биовара Эль Тор на типичные и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления с учетом результатов в режиме «реального времени». Патент РФ № 2732448, опубл. 16.09.2020. Бюл. № 26.

#### References

- De Haan L., Hirst T.R. Cholera toxin: a paradigm for multi-functional engagement of cellular mechanisms. *Mol. Membr. Biol.* 2004; 21(2):77–92. DOI: 10.1080/09687680410001663267.
- Dziejman M.E., Balon D., Boyd C.M., Fraser J.F., Heidelberg J.J., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and handemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99(3):1556–61. DOI: 0.1073/pnas.042667999.
- Pradhan S., Baidya A.K., Ghosh A., Paul K., Chowdhury R. The El Tor biotype of *Vibrio cholerae* exhibits *Vibrio cholerae* a growth advantage in the stationary phase in mixt cultures with the classical biotype. *J. Bacteriol.* 2010; 192(4):955–63. DOI: 10.1128/JB.01180-09.
- Smirnova N.I., Zаднова S.P., Shashkova A.P., Kutyrev V.V. [Genome variability of altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated on the territory of Russia in the modern period]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2011; 3:11–7.
- Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 15(6):987–8. DOI: 10.3201/eid1406.080129.
- Nguyen B.M., Lee J.H., Cuong N.T., Choi S.Y., Hien N.T., Anh D.D., Lee H.R., Ansaruzzaman M., Endtz H.P., Chun J., Lopez A.L., Czerkinsky C., Clemens J.D., Kim D.W. Cholera outbreaks caused by an altered *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strain producing classical toxin B in Vietnam in 2007 to 2008. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47(5):1568–71. DOI: 10.1128/JCM.02040-08.
- Raychoudhuri A., Patra T., Ghosh K., Ramamurthy T., Nandy R.K., Takeda Y., Balakrish-Nair G., Mukhopadhyay A.K. Classical *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2009; 15(1):131–2. DOI: 10.3201/eid1501.080543.
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: 10.1016/j.tim.2009.10.003.
- Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T., Hamabata T., Barman S., Koley H., Mukhopadhyay A.K., Ramamurthy T., Chatterjee S., Asakura M., Yamasaki S., Nair G.B., Takeda Y. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor end classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.
- Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
- Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Huq A., Nizam A., Longini I.M. Jr., Qadri F., Faruque S.M., Colwell R.R.,

10. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S., Bruce D.C., Detter J.C., Han C.S., Chertkov O., Challacombe J., Huq A., Nair G.B., Colwell R.R. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J. Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–33. DOI: 10.1128/JB.00040-10.
11. Siddique A.K., Nair G.B., Alam M., Sack D.A., Huq A., Nizam A., Longini I.M. Jr., Qadri F., Faruque S.M., Colwell R.R., Ahmed S., Iqbal A., Bhuiyan N.A., Sack R.B. El Tor cholera with severe disease: a new threat to Asia and beyond. *Epidemiol. Infect.* 2010; 138(3):347–52. DOI: 10.1017/S0950268809990550.
12. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., Siddique A.K., Qadri F., Izumiya H., Nair G.B., Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(6):314–7. DOI: 10.1111/j.1348-0421.2008.00041.x.
13. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., 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(11):4211–3. DOI: 10.1128/JCM.01304-06.
14. Savel'eva I.V., Kulichenko A.N., Kovalev D.A., Zhirov A.M., Savel'ev V.N. [Evolution of the genome of *Vibrio cholerae* biovar El Tor and the development of a PCR test-system for the identification of cholera pathogen strains]. In: [Cholera and Vibrios Pathogenic for Humans: Proceedings of the Problem Commission]. Rostov-on-Don; 2017. Vol. 30. P. 172–7.
15. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Shubina A.V., Zadnova S.P., Kuttyrev V.V. Method for identification of toxigenic *V. cholerae* O1 strains, determination of their biovar and differentiation of El Tor biovar strains into typical and modified by multiplex polymerase chain reaction and a test system for its implementation. RF patent No. 2458141, publ. 10.08.2012. Bul. No. 22.
16. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I., Kuttyrev V.V. Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strains, for indication of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor-vibrio strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2011; (4(110)):49–52. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-4(110)-49-52.
17. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Sosunov V.V., Kovalev D.A., Podoprigora E.I., Vasil'eva O.V., Guseva L.V. Method for identification of *Vibrio cholerae* O1 strains, determination of their toxigenicity and biovar with differentiation of El Tor biovar into typical and genetically modified variants by multiplex polymerase chain reaction, and a test system for its implementation with registration of results in real-time mode. RF patent No. 2732448, publ. 16.09.2020. Bul. No. 26.

**Authors:**

Savel'ev V.N., Kulichenko A.N., Savel'eva I.V., Kovalev D.A., Taran T.V., Podoprigora E.I. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russian Federation. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Sosunov V.V., Radaeva T.V. “DNK-SINTEZ” LLC. 9, Lokomotivny Avenue, Moscow, 127238, Russian Federation. E-mail: info@oligos.ru.

**Об авторах:**

Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригора Е.И. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: stavnipchi@mail.ru.

Сосунов В.В., Радаева Т.В. ООО «ДНК-СИНТЕЗ». Российская Федерация, 127238, Москва, Локомотивный пр., 9. E-mail: info@oligos.ru.