

УДК 616.932:579.25

Н.А. ПЛЕХАНОВ*, С.П. ЗАДНОВА, Д.А. АГАФОНОВ, Н.И. СМИРНОВА

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»», Саратов, 410005

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов генетических вариантов *Vibrio cholerae* эльтор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу

Разработан способ выявления токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор и их дифференциации на штаммы с высоким и низким эпидемическим потенциалом. С этой целью определяли структуру острова пандемичности VSP-II методом мультиплексной ПЦР, которую проводили в один прием в двух реакционных смесях. Для токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 биовара эльтор с интактным островом пандемичности VSP-II и низким эпидемическим потенциалом характерно наличие ампликонов генов *rfbO1*, *rstC*, *ctxA*, *ctxB^{Class}*, *vc0502* и *vc0514*; у токсигенных геновариантов *V. cholerae* O1 биовара эльтор, обладающих высоким эпидемическим потенциалом и имеющих VSP-II с протяженной делецией, определяются ампликоны фрагментов генов *rfbO1*, *rstC*, *ctxA*, *ctxB^{Class}* и *vc0514*. Высокая специфичность мультиплексной ПЦР подтверждена при тестировании близкородственных видов вибрионов, а также энтеробактерий. С помощью разработанной мультиплексной ПЦР проведено исследование 52 коллекционных штаммов *V. cholerae* и выявлено 8 токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 биовара эльтор, завезенных в Российскую Федерацию в 2004—2012 г. и обладающих высоким эпидемическим потенциалом. Сконструированная мультиплексная ПЦР может быть использована при проведении эпидемиологических исследований и получении полной характеристики завезенных штаммов *V. cholerae*, а также при паспортизации штаммов холерного вибриона, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Ключевые слова: генетически измененные штаммы, мультиплексная ПЦР, эпидемический потенциал, *Vibrio cholerae*.

Возбудителями холеры — особо опасной инфекционной болезни, характеризующейся диарейным синдромом и выраженной дегидратацией — являются токсигенные штаммы холерных вибрионов *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Так, текущая седьмая пандемия холеры, начавшаяся в 1961 г., была вызвана типичными токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор [1]. Имея на момент возникновения высокий

эпидемический потенциал, вибрионы эльтор вытеснили с эндемичной территории возбудителя предыдущей пандемии — холерных вибрионов классического биовара — и быстро распространились по многим странам Азии, Африки и Латинской Америки. Несмотря на то, что холерные вибрионы классического и эльтор биоваров относятся к одной серогруппе O1, они отличаются как по фенотипическим, так и генетическим свойствам.

Плеханов Никита Александрович, Заднова Светлана Петровна, Агафонов Дмитрий Александрович, Смирнова Нина Ивановна.

Список сокращений: биовар — биовариант; БСА — бычий сывороточный альбумин; п.н. — пара нуклеотидов; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ХТ — холерный токсин; dNTP — дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); VSP (Vibrio Seventh Pandemic Island) — остров пандемичности *Vibrio*.

* Автор для переписки.

Одно из важных генетических отличий касается структуры профага вирулентности СТХφ, включающего гены *ctxAB*, кодирующие биосинтез холерного токсина (ХТ), ответственного за развитие диареи. В геноме профага СТХφ вибрионов эльтор содержатся гены *ctxAB3*, а у классических вибрионов — *ctxAB1* [2]. В результате таких различий холерные вибрионы классического биовара продуцируют ХТ I (классического) типа, а эльтор вибрионы — ХТ II типа.

Продолжающиеся микроэволюционные изменения вибрионов эльтор привели к появлению в 1990-х годах генетически измененных штаммов, или геновариантов, *V. cholerae* биовара эльтор с повышенной вирулентностью [3, 4]. Важной особенностью этих геновариантов является продукция значительного количества холерного токсина классического типа в результате присутствия профага СТХφ с генами *ctxAB1*.

Однако геном геновариантов *V. cholerae* биовара эльтор подвержен дальнейшим изменениям. В настоящее время возникли новые штаммы геновариантов, генетической особенностью которых является наличие обширной делеции (21 ген из 30 имеющихся) в центральной части острова пандемичности VSP-II [5]. В последнее десятилетие именно данные штаммы вызывают заболевание на эндемичной территории, а также явились причиной всех импортированных случаев холеры на территории Российской Федерации в 2004—2012 г. [6, 7]. Глобальное распространение геновариантов, имеющих делецию в VSP-II, и вытеснение ими ранее возникших геновариантов с интактным VSP-II указывают на наличие у новых штаммов геновариантов более высокого эпидемического потенциала по сравнению с ранее возникшими геновариантами. Таким образом, учитывая, что в мире циркулируют штаммы геновариантов с разной структурой генома и разным эпидемическим потенциалом, способные нанести разной степени ущерб здоровью населения и экономике страны, актуальным является разработка мультиплексных ПЦР, позволяющих быстро и одновременно выявлять штаммы различных геновариантов и определять их эпидемический потенциал.

В настоящее время разработано и выпускается значительное количество ПЦР-тест-систем для индикации и идентификации возбудителя холеры, определения серогруппы, биовара, токсигенности (вирулентности) и эпидемической значимости выделяемых штаммов. Созданы также тест-системы, с помощью которых можно проводить детекцию геновариантов *V. cholerae* биовара эльтор [8] и устанавливать их эпидемический потен-

циал [9]. Однако тест-системы, позволяющие одновременно выявлять штаммы различных геновариантов *V. cholerae* биовара эльтор и определять их эпидемический потенциал, отсутствуют.

Целью работы была разработка мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара эльтор и дифференциации их на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II на штаммы с высоким и низким эпидемическим потенциалом.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали 52 клинических штамма *V. cholerae*, выделенных в разные годы на территории Российской Федерации и зарубежных стран и хранящихся в лиофильно высушенном состоянии в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб». Для культивирования бактерий использовали бульон и агар LB (pH 7,2) (Sigma-Aldrich, США).

Для выделения ДНК клетки холерных вибрионов, выращенные на LB-агаре в течение 18 ч, ресуспендировали в 0,85%-ном растворе натрия хлорида до концентрации 10^9 микробных клеток в 1 мл и затем разводили деионизованной водой до концентрации $1 \cdot 10^7$ кл./мл. После этого к суспензии добавляли мертиолят натрия (Promega, США) до конечной концентрации 0,01% и прогревали при 56° в течение 30 мин. Далее 100 мкл образца переносили в микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл, добавляли лизирующий буфер на основе 6 М гуанидинизотиоцианата (Helicon, Россия) в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 15 мин при температуре $(65 \pm 1)^\circ$. После выполнения данного этапа материал считался обеззараженным. Дальнейшее выделение ДНК осуществляли методом нуклеосорбции на силикагеле в присутствии гуанидинизотиоцианата с использованием коммерческого набора «ДНК-СОРБ-В» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Работу проводили в соответствии с инструкцией к набору, начиная с этапа добавления нуклеосорбента. На последнем этапе полученную ДНК суспендировали в ТЕ-буфере (10 мМ трис-HCl (Sigma-Aldrich), 1 мМ ЭДТА (Helicon), pH 8,0) и хранили при 4° .

Аmplификацию ДНК проводили с помощью программируемого термостата «Терцик» («ДНК-технология», Россия); результаты анализировали методом электрофореза в 2%-ном агарозном геле (ООО НТК "Диам", Россия) с добавлением бромистого этидия (Serva, Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы были выбраны ДНК-мишени для определения серогруппы, биовара, выявления токсигенности исследуемого штамма холерного вибриона и идентификации геновариантов *V. cholerae* биовара эльтор. В качестве генетических маркеров для детекции серогруппы O1 были использованы фрагменты генов *rfbE* (*vc0244*) и *rfbG* (*vc0245*), входящие в состав локуса *rfbO*, кодирующего биосинтез O1-антигена [10], для детекции O139 антигена — фрагмент гена *rfbR*, входящий в состав генов, кодирующих антиген O139 [11]. Для определения биовара был выбран ген *rstC* из профага RS1, присутствующий только в штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор и O139-серогруппы [12]. Токсигенность штаммов устанавливали по наличию фрагмента гена *ctxA*, кодирующего токсическую А-субъединицу холерного токсина [13]. Идентификацию геновариантов осуществляли по присутствию аллеля *ctxB1* в токсигенных штаммах *V. cholerae* биовара эльтор [14].

В качестве первой мишени для определения эпидемического потенциала был выбран ген *vc0514*, локализованный в 3'-концевом регионе VSP-II и кодирующий метилакцепторный белок хемотаксиса, наличие которого характерно для всех типов VSP-II. В качестве второй мишени был выбран ген *vc0502*, расположенный в центральной части VSP-II и кодирующий пили IV типа, отсутствующий у штаммов с протяженной делецией данного геномного острова с высоким эпидемическим потенциалом [5]. Выбор указанных генов-мишеней был обусловлен тем, что их использование обеспечивает дифференциацию штаммов с низким и высоким эпидемическим потенциалом на основе различий в структуре разных типов VSP-II. Для штаммов с низким эпидемическим потенциалом, содержащих интактный VSP-II или VSP-II с короткой делецией, характерно наличие двух генов *vc0502* и *vc0514*. У штаммов с высоким эпидемическим потенциалом, имеющих VSP-II с протяженной делецией, тестируется лишь ген *vc0514* [9].

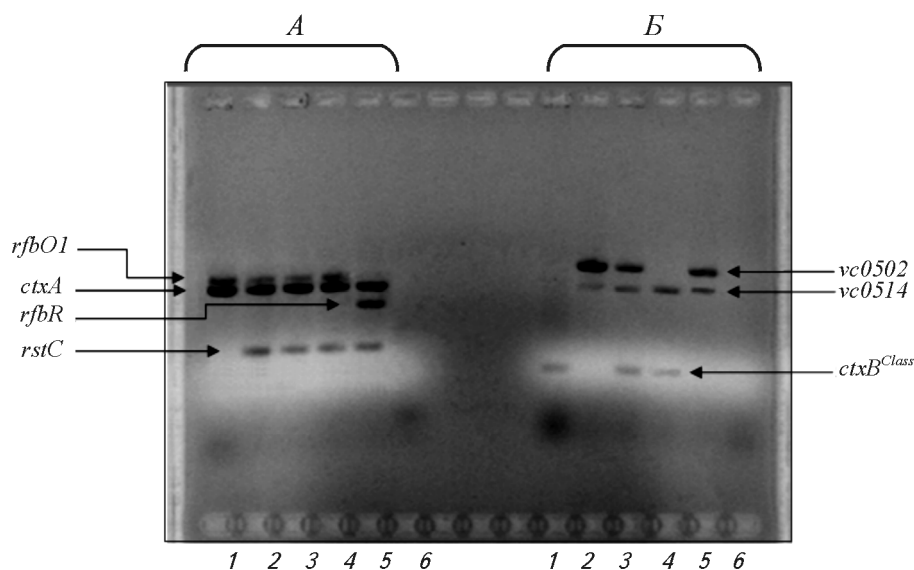
Использована структура праймеров к участкам генов *rfbO1*, *rfbR*, *rstC*, *ctxA*, VSPpilin, VSPchem, аллель-специфических праймеров для гена *ctxB1* (*ctxB^{Class}*) из литературных источников. Праймеры *rfbO1-F—rfbO1-R* образуют ампликон размером 638 п.н. [15]; праймеры *rfbR-F—rfbR-R* способствуют формированию ПЦР-продукта размером 428 п.н. [16]; праймеры *rstC-F—rstC-R* обеспечивают образование фрагмента размером 238 п.н. [12]; праймеры *ctxA-F—ctxA-R* амплифицируют

фрагмент ДНК размером 564 п.н. [13], а праймеры *ctxB^{Class-F—ctxB^{Class-R}}* — фрагмент ДНК размером 189 п.н. [14]. Праймеры VSPpilin-F (5'-CTGTGATTCGGGCTTTATCGG-3') и VSPpilin-R (5'-GCGTAAACTGAGCCAATAAGC-3') для участка гена *vc0502* обеспечивают образование фрагмента размером 761 п.н., праймеры VSPchem-F (5'-CTTGATGGAGCGGAGAAAAC-3') и VSPchem-R (5'-CGATGAATAGCCTGTTGAAC-3') для участка гена *vc0514* способствуют формированию ПЦР-продукта размером 604 п.н. [9].

Далее отдельно для каждой пары праймеров была подобрана минимальная концентрация для образовывания ПЦР-продуктов и экспериментальным путем установлены соотношения концентрации праймеров в реакционной смеси. Для лучшего разделения ампликонов и получения легко интерпретируемых результатов мультиплексная ПЦР была разделена на две реакционные смеси. В первую смесь (№ 1) включены праймеры к генам *rfbO1*, *rfbR*, *rstC* и *ctxA*; во вторую (№ 2) — праймеры к генам *ctxB^{Class}*, *vc0502* и *vc0514* в концентрации 6,9; 3,7; 4,9 пмоль/мкл, соответственно (рисунков). Подбор праймеров проводили таким образом, чтобы минимизировать вероятность их неспецифического отжига. Размер получаемых фрагментов был выбран с целью упрощения процесса визуализации и учета результатов. Из рисунка видно, что эксперимент с двумя реакционными смесями для ПЦР позволяет получать легко интерпретируемые результаты и вести их учет.

На следующем этапе был отработан оптимальный состав первой и второй реакционных смесей, включающих 10-кратный ПЦР-буфер (рН 8,8) с БСА (200 мкг/мл), 2 мМ dNTP, 25 мМ раствор MgCl₂, Taq-полимеразу (5 ед/мкл), деионизованную воду и смесь праймеров соответственно №1 или №2. Объем реакционной смеси составлял 15 мкл в расчете на одну реакцию.

Для выбора оптимальной температуры и длительности отжига праймеров были проведены ряд ПЦР в интервале температур от 55 до 60°. При этом образование четких амплификатов с участием всех использованных праймеров происходило при температуре 58°, которая и была выбрана для дальнейшего проведения исследований. Затем был экспериментально определен режим амплификации (количество циклов и продолжительность стадий) с использованием программируемого амплификатора «Терцик». Амплификацию контрольных образцов проводили одновременно с исследуемыми пробами в том же приборе и при тех же условиях.



Определение фрагментов генов *rfbO1*, *rfbR*, *rstC* и *ctxA* в первой реакционной смеси (А) и *ctxB^{Class}*, *vc0502* и *vc0514* во второй реакционной смеси (Б) у контрольных штаммов *V. cholerae*: дорожка 1 — токсигенный штамм *V. cholerae* 569В О1 серогруппы классического биовара; 2 — М738, типичный токсигенный штамм О1 серогруппы биовара эльтор; 3 — токсигенный геновариант *V. cholerae* М1266 О1 серогруппы биовара эльтор с интактным островом пандемичности VSP-II и низким эпидемическим потенциалом; 4 — токсигенный геновариант *V. cholerae* М1509 О1 серогруппы биовара эльтор с высоким эпидемическим потенциалом, несущим VSP-II с протяженной делецией; 5 — токсигенный штамм *V. cholerae* P16064 О139 серогруппы; дорожка 6 — отрицательный контроль (деионизованная вода)

Аmplified DNA after PCR was detected by horizontal gel-electrophoresis in 2% agarose gel. PCR results were compared with control samples; identification results are given in table 1.

In the next step of the work, the specificity of the constructed PCR, which was checked using strains of close relatives — *Vibrio mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, and also enterobacteria — *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri* (table 2). Results of testing indicated 100% specificity of the developed multiplex PCR.

Further in the study were taken toxigenic strains *V. cholerae* serogroup O1 (classical and eltor biovars) and serogroup O139, the genome structure of which was well studied previously by PCR and sequencing: *V. cholerae* 569В О1 serogroup of classical biovar, typical strain М738 О1 serogroup of eltor biovar, genotype М1266 eltor biovar with intact VSP-II island and low epidemic potential, genotype М1509 eltor biovar containing VSP-II with a long deletion and having a high epidemic potential. These strains in the further

were chosen as positive controls. During their testing with the help of the created PCR it was revealed that strain *V. cholerae* 569В produced amplicons of 638 bp and 564 bp in reaction mixture №1 and 189 bp in reaction mixture №2, which testifies to the presence in its genome of genes *rfbO1*, *ctxA* and *ctxB^{Class}* (see figure, lane 1) and confirms that the studied strain belongs to O1 serogroup of classical biovar (*rfbO1*⁺, *rfbR*⁻, *rstC*⁻, *ctxA*⁺, *ctxB^{Class}*⁺, *vc0502*⁻, *vc0514*⁻). In strain *V. cholerae* М738 were revealed amplicons of 638 bp, 564 bp and 238 bp in reaction mixture №1, and also 761 bp and 604 bp in reaction mixture №2, which testifies to the presence in its genome of genes *rfbO1*, *ctxA*, *rstC*, *vc0502* and *vc0514* (see figure, lane 2) and proves the belonging of this strain to typical toxigenic strains O1 serogroup of eltor biovar (*rfbO1*⁺, *rfbR*⁻, *rstC*⁺, *ctxA*⁺, *ctxB^{Class}*⁻, *vc0502*⁺, *vc0514*⁺). In strain *V. cholerae* М1266 were revealed amplicons of 638 bp, 564 bp and 238 bp in reaction mixture №1, and also 761 bp, 604 bp and 189 bp in reaction mixture №2 (see figure, lane 3). This strain is a toxigenic genotype of eltor biovar with intact VSP-II island and low epidemic potential (*rfbO1*⁺, *rfbR*⁻, *rstC*⁺, *ctxA*⁺, *ctxB^{Class}*⁺, *vc0502*⁺, *vc0514*⁺). The presence of amplicons of 638 bp, 564 bp and 238 bp in reac-

Результаты идентификации и дифференциации исследуемых штаммов

Реакционная смесь № 1				Реакционная смесь № 2			Результаты идентификации и дифференциации
<i>rfbO1</i>	<i>rfbR</i>	<i>rstC</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB^{Class}</i>	<i>vc0502</i>	<i>vc0514</i>	
638 п.н.	428 п.н.	238 п.н.	564 п.н.	189 п.н.	761 п.н.	604 п.н.	
+	-	+	+	+	+	+	Токсигенный геновариант <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор с низким эпидемическим потенциалом
+	-	+	+	+	-	+	Токсигенный геновариант <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор с высоким эпидемическим потенциалом
+	-	+	+	-	+	+	Типичный токсигенный штамм <i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор
+	-	-	+	+	-	-	Токсигенный штамм <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара
-	+	+	+	-	+	+	Токсигенный штамм O139 серогруппы
-	-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	Токсигенный или нетоксигенный штамм <i>V. cholerae</i> серогруппы неO1/неO139

ционной смеси №1, а также 604 п.н. и 189 п.н. в реакционной смеси №2 (см. рисунок дорожка 4) штамм *V. cholerae* M1509 идентифицирован как токсигенный геновариант биовара эльтор, содержащий VSP-II с протяженной делецией и имеющий высокий эпидемический потенциал (*rfbO1*⁺, *rfbR*⁻, *rstC*⁺, *ctxA*⁺, *ctxB^{Class}*⁺, *vc0502*⁻, *vc0514*⁺). По данным ПЦР-тестирования (*rfbO1*⁻, *rfbR*⁺, *rstC*⁺, *ctxA*⁺, *ctxB^{Class}*⁻, *vc0502*⁺, *vc0514*⁺) штамм *V. cholerae* P16064 отнесен к токсигенным изолятам серогруппы O139 (см. рисунок, дорожка 5).

Таким образом, созданная мультиплексная ПЦР является высокоспецифичной и позволяет выявлять штаммы геновариантов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор в чистой культуре в количестве 1·10⁷ кл/мл, устанавливать структуру их острова пандемичности VSP-II и на основе ее анализа определять эпидемический потенциал штаммов геновариантов.

На заключительном этапе с помощью созданной мультиплексной ПЦР было исследовано 52 коллекционных штамма *V. cholerae*. При их анализе было выявлено 34 изолята, относящихся к токсигенным геновариантам *V. cholerae* серогруппы O1 биовара эльтор. На основании изучения структуры острова пандемичности VSP-II данная группа штаммов была разделена на две подгруппы. Первая состояла из 26 штаммов, которые содержали в реакционной смеси №2 два фрагмента размером 761 п.н. и 604 п.н., как у контрольного штамма M1266. Данные штаммы имеют интактный VSP-II и низкий эпидемический потенциал. В то же время, у второй подгруппы, включающей 8 изолятов, амплифицировался только фрагмент размером 604 п.н., как у контрольного *V. cholerae* M1509, содержащего VSP-II с протяженной делецией (см. табл. 2). Эти изоляты, завезенные в Россию в последние годы (2004—2012 г.), являются гено-

Таблица 2

Определение специфичности и эффективности разработанной мультиплексной ПЦР

Штамм	Место и год выделения	Реакционная смесь № 1					Реакционная смесь № 2			Характеристика штамма на основе ПЦР
		<i>rfbO1</i>	<i>rfbR</i>	<i>rstC</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB^{class}</i>	<i>vc0502</i>	<i>vc0514</i>		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<i>V. cholerae</i> M16, M24	Саратов, 1942	+	+	-	+	+	-	-	К	
<i>V. cholerae</i> 569B	Индия, 1950	+	+	-	+	+	-	-	К	
<i>V. cholerae</i> Дакка 35	Пакистан, 1958	+	+	-	+	+	-	-	К	
<i>V. cholerae</i> 49520	Индия, 1962	+	+	-	+	+	-	-	К	
<i>V. cholerae</i> M736, M738	Пермь, 1970	+	-	+	+	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> M893, M867	Астрахань, 1971	+	-	+	+	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> M582	Калмыкия, 1974	+	-	+	+	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> P13762	Узбекистан, 1988	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> 14300	Узбекистан, 1989	+	-	+	-	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> C402	Ставрополь, 1990	+	-	+	+	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> M14380	Ростов-на-Дону, 1990	+	-	+	-	-	+	+	Э	
<i>V. cholerae</i> P15431, P15384, P15678, P15653	Украина, 1991	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1264, M1272, M1298, M1299	Краснодар, 1993	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1271, M1270	Татарстан, 1993	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1275, M1297	Дагестан, 1993	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1268, M1269	Магнитогорск, 1994	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1293, M1295	Дагестан, 1994	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> M1266	Пермь, 1994	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	
<i>V. cholerae</i> P17645	Иркутск, 1997	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП	

Окончание табл. 2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>V. cholerae</i> P17644, P17647	Ачинск, 1997	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП
<i>V. cholerae</i> M1326, M1328	Дагестан, 1998	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП
<i>V. cholerae</i> M1344, M1345, M1349	Казань, 2001	+	-	+	+	+	+	+	ГЭНП
<i>V. cholerae</i> M1429	Башкирия, 2004	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> M1430	Тверь, 2005	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> P18899	Мурманск, 2006	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> J3225, J3226, J4150	Москва, 2010	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> 301	Таганрог, 2011	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> M1509	Москва, 2012	+	-	+	+	+	-	+	ГЭВП
<i>V. cholerae</i> MO28	Индия, 1993	-	+	+	+	-	+	+	O139
<i>V. cholerae</i> 55, 62	Франция, 1994	-	+	+	+	-	+	+	O139
<i>V. cholerae</i> PG29, AS514	Индия, 1997	-	+	+	+	-	+	+	O139
<i>E. coli</i> M17	Саратов, н/и	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>
<i>S. enteritidis</i> BO3	н/и	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>
<i>Sh. flexneri</i> 26 «С»	н/и	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	Институт Пастера, н/и	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>
<i>V. anguillarum</i> ATCC 19264	н/и	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>
<i>V. parahemolyticus</i> 745	Новороссийск, 1976	-	-	-	-	-	-	-	не <i>V. cholerae</i>

Примечания: н/и – нет информации; К – штамм *V. cholerae* классического биовара; Э – типичный штамм *V. cholerae* биовара эльтор; ГЭНП – генотипичный штамм *V. cholerae* биовара эльтор; ГЭВП – генотипичный штамм *V. cholerae* биовара эльтор с высоким эпидемическим потенциалом; O139 – штамм *V. cholerae* серогруппы O139; не *V. cholerae* – штамм не относится к виду *V. cholerae*.

вариантами с высоким эпидемическим потенциалом, которые практически вытеснили геноварианты с низким эпидемическим потенциалом во многих регионах мира.

Сконструированная ПЦР может также использоваться для выявления типичных штаммов вибрионов эльтор, еще встречающихся на территории некоторых эндемичных стран, для выявления штаммов серогруппы O139, циркулирующих в настоящее время только на территории Индии, а также для идентификации токсигенных штаммов классического биовара. Несмотря на то, что классические вибрионы вызывают более тяжелое течение болезни, чем вибрионы эльтор, вспышки, вызванные данными вибрионами, не фиксируются. Высказывается предположение, что классические вибрионы присутствуют во внешней среде в некультивируемом состоянии. Однако в последние годы исследователи стали сообщать об их обнаружении [17, 18]. В связи с этим мы сочли необходимым предусмотреть возможность использования данной ПЦР для выявления штаммов классического биовара. Среди исследованных 5 штаммов относились к токсигенным возбудителям *V. cholerae* O1-серогруппы классического биовара, а 8 штаммов идентифицированы как типичные штаммы *V. cholerae* серогруппы O1 биовара эльтор, при этом 2 изолята не содержали ген *ctxA* и были атоксигенными. Выявлено также 5 токсигенных изолятов O139-серогруппы (см. табл. 2). Сконструированная ПЦР может быть использована и для определения геновариантов *V. cholerae* серогруппы O139, содержащих аллель *ctxB1*, которые в 2002 г. были обнаружены на территории Южной Индии [19]. Данные штаммы до настоящего времени не были завезены на территорию России, но если это произойдет, то с помощью сконструированной нами ПЦР они обязательно будут выявлены.

На созданную мультиплексную ПЦР оформлена заявка на получение патента (№2014138534 от 23.09.2014 г.).

Таким образом, впервые сконструирована мультиплексная ПЦР, позволяющая выявлять токсигенные штаммы геновариантов *V. cholerae* серогруппы O1 биовара эльтор, несущие в геноме ген *ctxB* классического типа, и определять их эпидемический потенциал. Данная мультиплексная ПЦР может быть использована при проведении эпидемиологических расследований и получении полной характеристики завезенных штаммов, а также для паспортизации штаммов холерного вибриона, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Работа выполнена в рамках ФЦП «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009—2014 г.) (государственный контракт №16-Д/3 от 25.06.2014 г.).

Получено 03.02.15

ЛИТЕРАТУРА

1. Kaper, J.B. Cholera / J.B. Kaper, J.G. Morris, M.M. Levine // J. Clin. Microbiol. Rev. — 1995. — V. 8. — N 1. — P. 48—86.
2. Olsvik, O. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains / O. Olsvik, J. Wahlberg, B. Petterson, M. Uhlen, T. Popovic, I.K. Wachsmuth, P.I. Fields // J. Clin. Microbiol. — 1993. — V. 31(1). — P. 22—25.
3. Nair, G.B. New Variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh / G.B. Nair, S.M. Faruque, N.A. Bhuiyan // J. Clin. Microbiol. — 2002. — V. 40 (9). — P. 3296—3299.
4. Смирнова Н.И. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, В.В. Кутырев // Молекуляр. генетика, микробиол. вирусол. — 2010. — №4. — С.11—19.
5. Taviani, E. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic island using comparative analysis / E. Taviani, C.J. Grim, J. Choi, J. Chun, B. Haley, N.A. Hasan, A. Hug, R.R. Colwell // FEMS Microbiol. Lett. — 2010. — V. 308. — P. 130—137.
6. Hasan, N.A. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains / N.A. Hasan, S.Y. Choi, M. Eppinger, P.W. Clark, A. Chen, M. Alam, B.J. Haley, E. Taviani, E. Hine, Q. Su, L.J. Tallon, J.B. Prosper, K. Furth, M.M. Hoq, H. Li, C.M. Fraser-Liggett, A. Cravioto, A. Huq, J. Ravel, T.A. Cebula, R.R. Colwell // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — V. 109(29). — P. 2010—2017.
7. Смирнова Н.И. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период / Н.И. Смирнова, Д.А. Агафонов, Т.А. Кульшань, Я.М. Краснов, В.В. Кутырев // Вестник РАМН. — 2014. — №7—8. — С. 46—53.
8. 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 эльтор на типичные и измененные методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления // Патент РФ № 2458141, С12Q1/68, С12Q1/02, С12N15/11. 2012.
9. Агафонов Д.А. Конструирование ПЦР тест-системы для дифференциации генетически измененных токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом / Д.А. Агафонов, С.П. Заднова, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций. — 2014. — В. 2. — С. 85—88.
10. Yamasaki, S. Distribution of *Vibrio cholerae* O1 antigen biosynthesis genes among O139 and other non-O1 serogroups of

- Vibrio cholerae* / S. Yamasaki, S. Garg, G.B. Nair, Y. Takeda // FEMS Microbiol. Lett. — 1999. — V. 179(1). — P. 115—121.
11. Sozhamannan, S. Cloning and sequencing of the genes downstream of the *wbf* gene cluster of *Vibrio cholerae* serogroup O139 and analysis of the junction genes in other serogroups / S. Sozhamannan, Y.K. Deng, M. Li, A. Sulakvelidze, J.B. Kaper, J.A. Johnson, G.B. Nair, J.G. Morris // J. Infect. Immun. — 1999. — V. 67(10). — P. 5033—5040.
 12. Waldor, M.K. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX ϕ are encoded by region RS2 / M.K. Waldor, E.J. Rubin, G.D. Pearson, H. Kimsey, J.J. Mekalanos // Mol. Microbiol. — 1997. — V. 24 (5). — P. 917—926.
 13. Fields, P.I. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic / P.I. Fields, T. Popovic, K. Wachsmuth, O. Olsvik // J. Clin. Microbiol. — 1992. — V. 30. — P. 2118—2121.
 14. Morita, M. Development and variation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor / M. Morita, M. Ohnishi, E. Arakawa, N.A. Bhuiyan, Nusrin S., Alam M., A.K. Siddique, F. Qadri, H. Izumiya, G.B. Nair, H. Watanabe // Microbiol. Immunol. — 2008. — V. 52 (6). — P. 314—317.
 15. Goel, A.K. Single multiplex polymerase chain reaction for environmental surveillance of toxigenic-pathogenic O1 and non-O1 *Vibrio cholerae* / A.K. Goel, S. Ponmariappan, D.V. Kamboj, L. Singh // Folia Microbiol. — 2007. — V. 52. — P. 81—85.
 16. 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 серогрупп и оценки их вирулентности // Патент РФ № 2404257, C12Q 1/68. 2010.
 17. Bakhshi, B. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran / B. Bakhshi, M. Boustanshenas, A. Mahmoudi-Aznavah // Lett. Appl. Microbiol. — 2014. — V. 58(2). — P. 145—149.
 18. Pun, S.B. The first appearance of classical-like phenotype *Vibrio cholerae* in Nepal // N. Am. J. Med. Sci. — 2014. — V. 6(4). — P. 183—184.
 19. Fazil, M.H. Characterization of *Vibrio cholerae* O139 belonging to multiple ribotypes and isolated from diarrhoeal patients in Kerala, southern India / M.H. Fazil, R. Bhanumathi, H.P. Pandey, D.V. Singh // Infect. Genet. Evol. — 2011. — V. 11(2). — P. 454—459.

N.A. PLEKHANOV*, S.P. ZADNOVA, D.A. AGAFONOV, and N.I. SMIRNOVA

The Russian Research Antiplague Institute *Microbe*, 410005, Saratov Russia

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Development of a Multiplex PCR for Simultaneous Identification of Genetically Altered Toxigenic *Vibrio cholerae* Strains and their Differentiation by Epidemic Potential

A method for detecting toxigenic genetically altered strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup eltor biotype and their differentiation into strains with high and low epidemic potential has been developed. To this purpose, the structure of the *Vibrio* Pandemic Island-II (VSP-II) was determined by multiplex PCR in two reaction mixtures. The toxigenic strains of *V. cholerae* O1 genovariants eltor biotype with intact VSP-II and low epidemic potential are characterized by gene amplicons *rfbO1*, *rstC*, *ctxA*, *ctxB^{Class}*, *vc0502*, and *vc0514*. The toxigenic *V. cholerae* O1 genovariants eltor biotype with high epidemic potential and long deletion in VSP-II have amplified gene fragments *rfbO1*, *rstC*, *ctxA*, *ctxB^{Class}*, and *vc0514*. The high specificity of this method was confirmed by testing of closely related species of *Vibrio* genus and *Enterobacteriaceae*. The developed multiplex PCR was used in the investigation of 52 collectible *V. cholerae* strains, 8 of which were found to be toxigenic genetically altered strains of *V. cholerae* O1 serogroup biotype with high epidemic potential that were imported to the Russian Federation in 2004—2012. The designed multiplex PCR can be used in the epidemiological investigations and complete characterization of *V. cholerae* imported strains and certification of *Vibrio cholerae* strains, which are deposited in the State Collection of Pathogenic Bacteria of the Russian Research Anti-Plague Institute *Microbe*.

Key words: epidemic potential, genetically altered strains, multiplex PCR, *Vibrio cholerae*.

* Author for correspondence.