

Е.Н.Стрельникова-Ааб, Л.Ф.Ливанова, А.А.Горяев, Н.Б.Челдышова, Н.И.Смирнова

АВИРУЛЕНТНЫЕ ШТАММЫ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 – ПРОДУЦЕНТЫ ПРОТЕКТИВНОГО O1-АНТИГЕНА: ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

После пребывания 15 вирулентных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор сероваров Инаба и Огава в водной среде было обнаружено 6 штаммов, спонтанно утративших коровую область профага СТХф, включая структурные гены (*ctxAB*) холерного токсина. Установлено, что полученные *ctxA*⁻ мутанты не продуцировали холерный токсин и не вызывали специфической холерогенной реакции у зараженных внутрикишечно кроликов-сосунков, что указывает на их принадлежность к III группе патогенности. При изучении популяционного состава двух отобранных нетоксигенных штаммов М569А и 5/65А выявлены клоны, имеющие высокий уровень продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава. Полученные авирулентные штаммы предназначены для использования их в качестве продуцентов указанных протективных антигенов как при изготовлении химической холерной вакцины, так и при конструировании диагностических иммуноферментных тест-систем.

Ключевые слова: холерный вибрион, авирулентные штаммы, протективные антигены, химическая вакцина.

Распространение холеры во многих странах Азии, Африки, Южной Америки и огромная по масштабам миграция населения определяют реальную возможность ее завоза на территорию Российской Федерации [4]. Сложившаяся эпидемиологическая ситуация указывает на необходимость создания современных и надежных средств профилактики холеры. Одно из ведущих направлений специфической иммунопрофилактики холеры связано с созданием безопасных неживых вакцин. В настоящее время в Российской Федерации разработана и внедрена в производство лицензированная бивалентная химическая таблетированная холерная вакцина, содержащая основные протективные антигены *Vibrio cholerae* O1 классического биовара, вызвавшего шесть предыдущих пандемий азиатской холеры: холерный анатоксин, отвечающий за формирование антитоксического иммунитета, а также O1 антиген сероваров Инаба и Огава, определяющий образование антибактериального иммунитета при холере [1]. Данная вакцина безопасна, но из-за отсутствия биовароспецифических антигенов возбудителя текущей 7-й пандемии холеры (*V. cholerae* O1 биовара эльтор) не может обеспечить высокий уровень защиты от холеры эльтор. Более того, для производства указанной химической вакцины используют высоковирулентные штаммы, применение которых требует больших материальных затрат для обеспечения биологической безопасности. В этой связи одним из важных направлений исследований, связанных с разработкой и усовершенствованием современных химических вакцин против холеры, является конструирование авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор – продуцентов протективных антигенов.

Цель настоящего исследования состояла в получении авирулентных штаммов *V. cholerae* O1 биовара эльтор и оценки их способности к продукции O1 антигена сероваров Инаба или Огава, обеспечивающих формирование антибактериального иммунитета.

Материалы и методы

В работе использовали 15 природных штаммов *V. cholerae* серогруппы O1, типичных по культуральным, морфологическим, биохимическим и серологическим свойствам (табл. 1). Штаммы хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Бактериальные культуры выращивали при 37 °С с использованием жидкой и агаризованной сред LB (Luria-Bertani), а также жидкой среды АК1 (1,5 % бактопептона; 0,4 % дрожжевого экстракта Дифко; 0,5 % NaCl; 0,3 % NaHCO₃) [11].

Для изучения антигенных свойств применяли реакцию агглютинации с холерными O1, Инаба, Огава, RO антисыворотками. Развернутая реакция агглю-

Таблица 1

Использованные в работе природные токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор

Штамм	Место выделения	Год выделения	Источник выделения	Серовар
M569	Мордовия	1974	Больной	Инаба
M886	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M890	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M1055	Астрахань	1970	Больной	Инаба
M1061	Астрахань	1970	Носитель	Инаба
M642	Астрахань	1975	Носитель	Инаба
M899	Астрахань	1970	Больной	Инаба
5/65	Иран	1965	Больной	Огава
M1062	Астрахань	1970	Носитель	Огава
28Афг	Афганистан	1965	Больной	Огава
M1244	Туркменистан	1986	Вн. среда	Огава
M1216	Туркменистан	1986	Вн. среда	Огава
M1259	Перм. обл.	1990	Больной	Огава
P17644	Ачинск	1997	Больной	Огава
P17645	Иркутск	1997	Больной	Огава

тинации в пробирках ставилась по общепринятому методу [3].

Продукцию холерного токсина определяли с помощью иммуноферментного метода GM₁ ELISA [13]. Для определения продукции холерного токсина (ХТ) клетки холерного вибриона выращивали в АК1 бульоне при 37 °С в течение 4 ч без аэрации и последующие 16 ч в условиях интенсивной аэрации [11]. При ИФА (GM₁ ELISA) в качестве положительного контроля и для определения чувствительности метода использовали очищенный препарат ХТ, полученный из эталонного высокотоксигенного штамма *V. cholerae* 569В классического биовара.

Вирулентность изучаемых штаммов определяли путем внутрикишечного заражения крольчат-сосунков по методу N.F.Dutta и M.F.Habibu [9]. Наблюдение за животными вели в течение 48 ч. Всех павших или усыпленных хлороформом крольчат вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса.

Для тестирования различных генов использовали полимеразную цепную реакцию (ПЦР) со специфическими олигонуклеотидными праймерами, приведенными в работах А.В.Осина и соавт. и Н.И.Смирновой и соавт. [5, 6]. Продукты ПЦР фракционировали в 2 % агарозном геле (BioRad) и регистрировали в ультрафиолетовом свете.

Результаты и обсуждение

Согласно современным представлениям ключевым фактором вирулентности *V. cholerae* является холерный экзотоксин – термолабильный белок с молекулярной массой 84 кДа, вызывающий развитие тяжелой диареи – основного клинического симптома при холере [12]. Установлено, что биосинтез ХТ кодируют структурные гены *ctxA* и *ctxB*, входящие в состав профага СТХф. Типичный профаг СТХф размером 6,9 т.п.н. имеет две области – коровую и RS2. Коровая область профага, помимо генов *ctxAB*, содержит гены *zot*, *ace*, *orfU* и *cep*, продукты которых участвуют в морфогенезе и секреции фага. Кроме того, белки Zot и Ace одновременно являются дополнительными токсинами, вызывающими или способствующими развитию диареи. RS2-последовательность содержит гены *rstA*, *rstB*, контролирующие соответственно репликацию фага СТХф и интеграцию его в хромосому, а также ген *rstR*, кодирующий репрессор, запрещающий транскрипцию гена *rstA* [10]. Штаммы, содержащие профаг СТХф с генами *ctxAB*, относят к вирулентным. Однако геном профага СТХф является нестабильным, что выражается в появлении штаммов, утративших либо весь геном СТХф, либо отдельные гены его коровой области [7]. Показано, что возникновение нетоксигенных клонов из вирулентных штаммов *V. cholerae* могло быть обусловлено действием неблагоприятных факторов внешней среды во время пребывания возбудителя холеры в водной среде [2]. Эти сведения послужи-

ли основанием для проведения экспериментов по моделированию процесса пребывания холерных вибрионов в водной среде с целью получения из вирулентных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор нетоксигенных клонов, которые могли быть в дальнейшем использованы в качестве продуцентов О1 антигена сероваров Инаба или Огава.

На первом этапе работы 15 природных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор сероваров Инаба и Огава были проверены на наличие в их хромосомах генов, входящих в состав профага СТХф. С помощью ПЦР с использованием специфических пар праймеров установлено, что в геноме выбранных штаммов присутствовали 9 генов профага СТХф (*ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*, *orfU*, *cep*, *rstA*, *rstB*, *rstR*). Исключение составлял лишь штамм 5/65, который отличался измененной структурой профага – в его составе отсутствовали три гена коровой области – *ace*, *zot*, *orfU*, при наличии генов *ctxA*, *ctxB*, *cep*. Присутствие оперона *ctxAB* свидетельствует о токсигенности изучаемых штаммов и, следовательно, о принадлежности их ко II группе патогенности [3]. Для получения атоксигенных вариантов необходимо было удалить из их генома профаг СТХф или его коровую область, содержащую гены холерного токсина. Для решения этой задачи бактериальные суспензии вирулентных штаммов *V. cholerae* вносили в стерильную речную воду до конечной концентрации 10⁷ кл./мл, поскольку ранее было показано, что голодание клеток по основным источникам питания может индуцировать реорганизацию генома профага возбудителя холеры [2]. При ПЦР-тестировании гена *ctxA* у 5400 изолированных колоний, получаемых через каждые 4 сут после высева речной воды на агар, обнаружили, что в популяции 6 штаммов (M569, M886, M890, M1055, M1061, 5/65) после пребывания в воде в течение 4–75 сут появились клоны *ctxA*[–], утратившие способность к продукции ХТ. Частота образования таких клонов составила 4–25 % от общего числа проверенных изолированных колоний. ПЦР-анализ *ctxA*[–] клонов показал отсутствие в их геноме не только гена *ctxA*, но и других генов, входящих в состав коровой области (*ctxB*, *ace*, *zot*) генома профага СТХф. Далее был проведен сравнительный анализ продукции холерного токсина исходными штаммами и клонами *ctxA*[–] *ctxB*[–] с использованием высокочувствительного иммуноферментного метода GM₁ ELISA. Установлено, что клоны, утратившие структурные гены *ctxAB*, действительно не продуцировали ХТ, тогда как у исходных штаммов был зарегистрирован биосинтез этого белка. Исключение составлял лишь исходный штамм 5/65, который при наличии оперона *ctxAB*, не продуцировал ХТ. Причины отсутствия экспрессии генов ХТ у данного *ctxA*⁺ штамма пока не известны и требуют дальнейшего изучения.

Утрата штаммами генов коровой области профага СТХф привела к изменению их вирулентности, которая была определена путем внутрикишечного заражения кроликов-сосунков клетками исходных

Таблица 2

Серологические и вирулентные свойства исходных штаммов *Vibrio cholerae* O1 и их нетоксигенных вариантов

Штамм	Серологические свойства*				Вирулентные свойства**				
					Количество животных				
	O1	Инаба	Огава	RO	зараженных	павших	с холерогенным эффектом	с энтеропатогенным эффектом	без изменений
M569 исх	(3200)	(800)	0	0	3	0	3	0	0
M569 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(800)	0	0	5	0	0	0	5
M886 исх	(3200)	(400)	0	0	3	3	3	0	0
M886 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
M890 исх	(3200)	(400)	0	0	3	3	3	0	0
M890 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
M1055 исх	(3200)	(400)	0	0	4	3	4	0	0
M1055 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	1	2
M1061 исх	(3200)	(400)	0	0	2	2	2	0	0
M1061 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	(400)	0	0	3	0	0	0	3
5/65 исх	(3200)	0	(800)	0	5	0	0	0	5
5/65 <i>ctxA</i> ⁻	(3200)	0	(800)	0	5	0	0	0	5

*Цифры в скобках означают величины, обратные титрам.

**Характеристика экспериментальной холерной инфекции у кроликов-сосунков, зараженных исходными штаммами *V. cholerae* и их нетоксигенными вариантами.

штаммов и их нетоксигенных вариантов. Полученные результаты представлены в табл. 2. У всех кроликов, инфицированных клетками исходных *ctxA*⁺ штаммов, продуцирующих ХТ, наблюдалась выраженная холерогенная реакция – растяжение толстого и тонкого кишечника прозрачной бесцветной жидкостью, что указывало на вирулентность данных штаммов. У животных, инфицированных клонами *ctxA*⁻ *ctxB*⁻, никаких видимых изменений в кишечнике не выявлено.

На основе анализа всех представленных выше результатов полученные нетоксигенные клоны были отнесены к авирулентным штаммам, входящим в III группу патогенности.

На следующем этапе работы у авирулентных вариантов определяли уровень биосинтеза O1 антигена серовара Инаба и O1 антигена серовара Огава, которые относятся к ключевым протективным антигенам, обеспечивающим формирование антибактериального иммунитета при холере. Продукцию указанных антигенов оценивали с помощью развернутой реакции агглютинации в пробирках с холерными O1, Инаба, Огава, RO антисыворотками, результаты которой представлены в табл. 2. Установлено, что утрата мутантами генов коровой области профага CTXφ (*ctxA*, *ctxB*, *ace*, *zot*) не сопровождалась изменением продукции O1 антигена. Все полученные авирулентные штаммы *V. cholerae* O1 агглютиниро-

вались O1-антисывороткой в разведении 1:3200, не отличаясь по данному свойству от исходных. Также не наблюдалось различий между исходными штамми и их нетоксигенными производными относительно продукции серовароспецифических антигенов.

Для последующей работы было отобрано два следующих *ctxA*⁻ *ctxB*⁻ штамма *V. cholerae* O1, относящихся к разным сероварам: M569 Инаба и 5/65 Огава, получившие обозначения соответственно M569-A и 5/65-A. У этих штаммов было определено наличие в их хромосоме других генов, связанных с вирулентностью. В результате установлено, что отобранные штаммы, в отличие от исходных, не имели ни одного гена коровой области профага CTXφ. В то же время в их хромосоме присутствовали все тестируемые гены двух островов патогенности VPI-1 и VPI-2 (табл. 3).

Учитывая существующую фенотипическую гетерогенность бактериальной популяции, обусловленную различной экспрессией генов, был изучен популяционный состав отобранных штаммов M569-A и 5/65-A для выявления клонов с повышенной продукцией O1 антигена сероваров Инаба либо Огава. С этой целью после посева штаммов на плотной среде оценивали уровень биосинтеза указанных антигенов у полученных изолированных колоний с помощью развернутой реакции агглюти-

Таблица 3

Присутствие генов профага CTXφ и островов патогенности VPI-1 и VPI-2 в хромосоме исходных штаммов и их нетоксигенных вариантов, определенных с помощью ПЦР

Штамм	CTXφ						VPI-1		VPI-2		
	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>ace</i>	<i>zot</i>	<i>orfU</i>	<i>cep</i>	<i>tcpA</i>	<i>mop</i>	<i>hsl1760</i>	<i>nanH</i>	<i>rep1803</i>
M569 исх	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M569-A (M569 <i>ctxA</i> ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
5/65 исх	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
5/65-A (5/65 <i>ctxA</i> ⁻)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+

нации в пробирках. В случае штамма М569-А Инаба среди 20 изученных колоний обнаружили 2 клона, клетки которых агглютинировались антисывороткой Инаба в разведении 1:3200, тогда как до проведенной работы клетки штамма М569 *ctxA*⁻ (или М569-А) агглютинировались этой антисывороткой в разведении 1:800 (табл. 2). Что касается штамма 5/65-А Огава, то из 35 проверенных колоний 3 имели повышенный уровень продукции О1 антигена серовара Огава, поскольку титр агглютинации их сывороткой Огава повысился в 2 раза, составляя 1:1600 (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенных исследований получены авирулентные штаммы *V. cholerae* О1 биовара эльтор сероваров Инаба и Огава, отвечающие требованиям, предъявляемым к холерным вибрионам III группы патогенности. Высокий уровень продукции ими протективных антигенов О1 серовара Инаба и О1 серовара Огава указывают на возможность их использования в качестве продуцентов этих антигенов при изготовлении химической холерной вакцины, а также при создании иммуноферментных диагностических тест-систем.

Работа поддержана грантом РФФИ № 09-04-00217а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Джапаридзе М.Н., Наумов А.В., Никитина Г.В., Мелещенко М.В., Доброва Г.В., Заворотных В.И. и др. Оральная химическая вакцина из гипертонических штаммов КМ-76 Инаба и КМ-68 Огава возбудителя холеры. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 1991; 4:31–3.
2. Кульшань Т.А., Топорков А.В., Смирнова Н.И. Генетические изменения вирулентных штаммов холерных вибрионов биовара эльтор при их обитании в водной среде. Пробл. особо опасных инф. 2006; 91:41–4.
3. Лабораторная диагностика холеры. Методические указания 4.2.2218-07. 4.2. Методы контроля. Биологические и микробиологические факторы: изд. офиц. [утвержден Г.Г.Онищенко 31 марта 2007 г]. М: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. 87 с.
4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М. и др. Холера в начале XXI века, прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
5. Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. Генетика. 2005; 41(1):1–10.
6. Смирнова Н.И., Кириллина О.А., Челдышова Н.Б., Кутырев В.В. Изучение распространенности основных генов вирулентности среди различных штаммов *Vibrio cholerae* El-Tor для определения их эпидемической значимости. Мол. генет., ми-

кробиол. и вирусол. 2001; 3:23–8.

7. Смирнова Н.И., Осин А.В., Нефедов К.С., Кульшань Т.А., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф. и др. Вариативность генома профага CTXφ и ее роль в изменении вирулентных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6:41–4.

8. Boyd E.F., Heilpern J., Waldor M.K. Molecular analyses of a putative CTXφ precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTXφs by toxigenic *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 2000; 182(19):5530–38.

9. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. Brit. J. Pharmacol. 1955; 256(23):12252–56.

10. Faruque S.M., Asadulghani, Kamruzzaman M., Nandi R.K., Ghosh A.N., Nair G.B. et al. RS1 Element of *Vibrio cholerae* can propagate horizontally as a filamentous phage exploiting the morphogenesis genes of CTXφ. Infect. Immun. 2002; 70(1):163–70.

11. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N. et al. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30:1075–83.

12. Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8 (1):48–86.

13. Svennerholm A.M., Holmgren J. Identification of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin by means of a ganglioside immunosorbent assay (GM₁-ELISA) procedure. Curr. Microbiol. 1978; 1:19–23.

E.N.Strelnikova-Aab, L.F.Livanova, A.A.Goryaev, N.B.Cheldyshova,
N.I.Smirnova

***Vibrio cholerae* O1 Avirulent Strains – Producers of Protective O1 Antigen: Obtaining and Peculiarities**

Russian Anti-Plague Research Institute “Microbe”, Saratov

Among 15 *Vibrio cholerae* El Tor O1 virulent strains of Inaba and Ogawa serovars grown in sterile river water, 6 strains were found to lose spontaneously the core region of CTXφ prophage including structural genes (*ctxAB*) of cholera toxin. It was determined that the obtained *ctxA*⁻ mutants did not produce cholera toxin and did not cause specific cholera reaction in the intra-intestinally inoculated suckling rabbits suggesting that they belonged to the III⁴ pathogenicity group. Analysis of the population structure of two selected non-toxigenic strains M569A and 5/65A revealed clones with high level of O1 antigen of Inaba and Ogawa serovars production. The obtained avirulent strains can be used as producers of above-noted protective antigens both in production of chemical cholera vaccine and in constructing of diagnostic immunoenzyme test-systems.

Key words: cholera vibrio, avirulent strains, protective antigen, chemical vaccine.

Об авторах:

Стрельникова-Ааб Е.Н., Ливанова Л.Ф., Горяев А.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Authors:

Strelnikova-Aab E.N., Livanova L.F., Goryaev A.A., Cheldyshova N.B., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 410005, Saratov, Universitetskaya St., 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 31.03.10.