

А.В.Осин, Я.М.Краснов, Н.П.Гусева, Н.И.Смирнова

РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМА MLST-ТИПИРОВАНИЯ ПАНДЕМИЧЕСКИХ И ПРЕДПАНДЕМИЧЕСКИХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* БИОВАРА ЭЛЬТОР

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

Проведено молекулярное типирование пандемических и предпандемических штаммов холерного вибриона методом мультилокусного секвенирования. Применение двух схем MLST, основанных на сиквенсе генов, связанных с вирулентностью, и генов жизнеобеспечения, показало большую эффективность последней в дифференциации штаммов, выделенных до начала и в период 7-й пандемии холеры.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, мультилокусное секвенирование, гены вирулентности, гены жизнеобеспечения.

Холера – тяжелое инфекционное диарейное заболевание, возбудителями которой являются штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Холерные вибрионы O1 серогруппы представлены двумя биоварами – классическим и эльтор. Вибрионы классического биовара являлись возбудителями пятой и шестой пандемий азиатской холеры, последняя из которых закончилась в 1923 г. Штаммы *V. cholerae* биовара эльтор, впервые выделенные на карантинной станции Эль Тор в 1905 г., не вызывали заболевание холерой, а являлись причиной спорадических диарейных расстройств кишечника. Первая крупная вспышка холеры, вызванная эльтор вибрионами, была зарегистрирована в 1937 г. на о. Целебес, однако за пределы острова болезнь распространения не получила. Формирование нового клона возбудителя холеры *V. cholerae eltor* завершилось к 1961 г. за которым последовало начало 7-й пандемии холеры, продолжающейся и по настоящее время.

Способность к пандемическому распространению штаммов *V. cholerae eltor*, выделяемых от больных после 1961 г., связывают с наличием у них в геноме двух кластеров генов VSP-1 и VSP-2, называемых «островами» пандемичности и отсутствующих как у предпандемических штаммов эльтор вибрионов, так и у *V. cholerae* классического биовара [3]. Происхождение современных эльтор вибрионов до сих пор остается неясным так же, как и неясна их филогенетическая связь с предпандемическими изолятами. Проблемы, связанные с процессами образования штаммов с новыми свойствами, стоят в последнее время особенно остро, что вызвано, в первую очередь, выделением изолятов *V. cholerae eltor* с отличной от основного клона возбудителя 7-й пандемии структурой некоторых генов, связанных с вирулентностью, а также появлением вибрионов, сходных по строению генома с предпандемическими штаммами биовара эльтор [2, 5]. В сложившейся ситуации изучение изменений в геноме возбудителя холеры, происходящих в процессе эволюции, с использованием современных технологий, является одним из самых актуальных направлений в исследованиях этого патогена. Одним из основных методов

изучения генома является секвенирование фрагментов генов и анализ полученных данных в специализированных компьютерных программах. Кроме того, совокупное сравнение нуклеотидных последовательностей 6–7 локусов у разных штаммов – мультилокусное секвенирование (MLST), позволяет с высокой точностью и воспроизводимостью определять степень их филогенетического родства. Для целого ряда микроорганизмов существуют разработанные схемы MLST-анализа, результаты которых можно найти в сети Internet и сопоставить их с данными собственных исследований [6]. Однако для *V. cholerae* таких схем пока не создано, что, несомненно, затрудняет проведение научных экспериментов с этим возбудителем.

Цель работы – подбор генов-мишеней для проведения MLST-анализа пандемических и предпандемических штаммов *V. cholerae* биовара эльтор и определения их филогенетического родства.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе использовано 11 штаммов *V. cholerae* биовара эльтор и один штамм классического биовара, которые хранились в Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб» в лиофилизированном состоянии. Все изученные штаммы были выделены от больных, их характеристика представлена в табл. 1. Сведения о содержании в геноме этих изолятов генов вирулентности, пандемичности и персистенции были опубликованы нами ранее [1]. Культивирование штаммов проводили на LB-агаре (pH 7,2) в течение 18 ч при 37 °C.

Полимеразная цепная реакция и ДНК секвенирование. Олигонуклеотидные праймеры на 7 генов, имеющих непосредственное отношение к вирулентности возбудителя холеры (*ctxA*, *tcpA*, *toxR*, *toxT*, *IS1358*, *gmd*, *manB*), были рассчитаны нами в ходе выполнения работы, кроме того использовали праймеры на гены жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*) [4]. Праймеры синтезировали в НПФ «Литех» (Россия) на автоматическом синтезаторе ДНК «АСМ-102U». ПЦР проводили в микро-

Таблица 1

Штаммы *Vibrio cholerae*, использованные в работе

Штамм	Биовар	Год выделения	Место выделения
ATCC14033	Эльтор	1910	Египет
Mak97	Эльтор	1937	Индонезия
Mak676	Эльтор	1937	Индонезия
Celebes 30	Эльтор	1937	Индонезия
Mak757	Эльтор	1937	Индонезия
Dakka33	Классический	1958	Пакистан
T-4	Эльтор	1963	Индия
M818	Эльтор	1970	Россия
2223	Эльтор	1972	Туркмения
M1328	Эльтор	1998	Россия
M1429	Эльтор	2004	Россия
M1430	Эльтор	2005	Россия

пробирках объемом 600 мкл в следующих условиях: предварительная денатурация 94 °C – 2 мин, затем (денатурация при 94 °C – 45 с, отжиг праймеров при 57 °C – 45 с, элонгация 72 °C – 45 с) 35 циклов, заключительный этап (отжиг праймеров при 57 °C – 45 с, элонгация 72 °C – 3 мин) 5 циклов на амплификаторе PTC-0150 MiniCycler (MJ Research, Incorporated, USA). Секвенирование ДНК проводили по методу [9].

Обработка результатов. Выравнивание последовательностей проводили по алгоритму CLUSTALW в программе MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) версия 4.0 [8], кластерный анализ нуклеотидных последовательностей – в программе START (ST analysis and recombination tests). Дендрограмму, показывающую связь между типами последовательностей (ST), строили по методу UPGMA (от англ. unweighted pair-group method for arithmetic averages). Кроме того, в программе START определено соотно-

шение несинонимичных нуклеотидных замен к синонимичным (d_N/d_S) [7].

Результаты и обсуждение

Вариабельность нуклеотидных последовательностей генов связанных с вирулентностью. На первом этапе нашей работы в качестве мишеней для секвенса были выбраны фрагменты 7 локусов, связанных с вирулентностью: *ctxA* – отвечающий за синтез А субъединицы холерного токсина (СТ); *tcpA* – кодирующий продукцию основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии (TCP), главного фактора колонизации холерных вибрионов; *toxR* и *toxT* – двух регуляторных генов, координирующих синтез СТ и TCP, а также трех локусов *manB*, *gmd* и инсерционной последовательности IS1358, входящих в состав кластера генов O1 антигена. В результате анализа полученных данных установлена высокая консервативность нуклеотидной последовательности локусов *ctxA*, IS1358, *manB* и *gmd*, у всех штаммов она представлена одним аллелем (табл. 2).

Другие изучаемые гены были более вариабельны: регуляторный ген *toxT* обладал двумя аллелями, глобальный ген-регулятор *toxR* – тремя, а *tcpA* – пятью. Использование алгоритма UPGMA на основе полученного аллельного профиля позволило выявить шесть филогенетических групп изучаемых штаммов. В первую вошли 7 штаммов эльтор вибрионов, включая предпандемические и пандемические изоляты (рис. 1, А). Проведенный анализ секвенированных нуклеотидных последовательностей фрагментов генов этих штаммов выявил их полную идентичность.

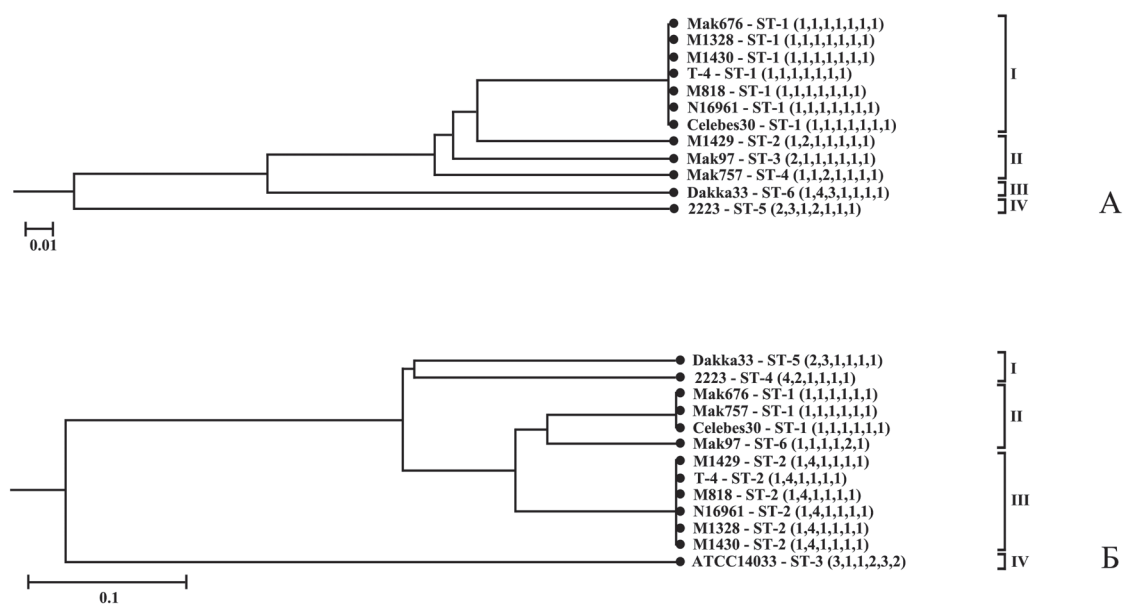
Вторая группа представлена 3 штаммами биовара эльтор, один из которых является пандемическим, а два других – предпандемическими. Эти изоляты отличаются друг от друга не более чем по одному локусу и при проведении кластерного анализа оказались

Таблица 2

Характеристика локусов секвенированных последовательностей

Локус	Размер анализируемого фрагмента, п.н.	Число аллелей	Число полиморфных нуклеотидов	Среднее содержание G+C пар, %	d_N/d_S *
ctxA	699	1	0	40,5	0,0000
tcpA	654	5	210	42,7	0,1172
toxR	799	3	14	45,9	4,0313
toxT	756	2	7	28,3	0,1063
IS1358	1297	1	0	41,9	0,0000
gmd	1072	1	0	39,9	0,0000
manB	1464	1	0	38,5	0,0000
cat	512	4	8	52,8	0,0000
chi	370	4	4	50,7	0,0000
dnaE	551	1	0	49,7	0,0000
gyrB	575	2	15	50,6	0,0000
recA	714	2	23	48,1	0,0000
pgm	732	3	10	49,4	0,0000

* Показатель соотношения не синонимичных и синонимичных нуклеотидных замен в секвенированных последовательностях.



Дендрограммы результатов MLST, построенные по алгоритму UPGMA:

А – схема MLST с использованием набора генов, связанных с вирулентностью (*ctxA*, *tcpA*, *toxR*, *toxT*, *manB*, *gmd*, *IS1358*);Б – схема MLST с использованием набора генов жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*)

близко расположены на филогенетическом дереве, что дает нам основание объединить их в одну группу. Наличие ряда варибельных нуклеотидов в секвенированных последовательностях штаммов, относящихся ко второй группе, в частности в генах *tcpA* и *toxR*, может отражать особенности генетической организации отдельных изолятов, поскольку филогенетическая удаленность их друг от друга крайне незначительна.

Третья группа была представлена лишь одним штаммом – *V. cholerae* 2223 биовара эльтор. Структура гена *tcpA* у этого штамма заметно отличалась от таковой у других изолятов эльтор (145 полиморфных нуклеотидов) и имела значительное сходство с геном *tcpA* классических холерных вибрионов (55 идентичных нуклеотидов).

В четвертую группу входил штамм *V. cholerae* классического биовара. Таким образом, при использовании в качестве мишеней для MLST-типирования генов, связанных с вирулентностью, не удалось выявить различия в происхождении пандемических и предпандемических штаммов холерного вибриона биовара эльтор. Данный алгоритм исследования позволил установить лишь удаленное родство *V. cholerae* классического и эльтор биоваров, а также обнаружить локус *tcpA* у вибрионов эльтор, имеющий аллель, сочетающий в себе особенности нуклеотидной структуры этого гена обоих биоваров.

Секвенирование нуклеотидных последовательностей генов жизнеобеспечения. Для дальнейшей работы было выбрано шесть генов жизнеобеспечения (*housekeeping*), расположенных в эволюционно более древних участках хромосомы и кодирующих соответственно: *cat* – каталазу, *chi* – хитиназу, *dnaE* – ДНК полимеразу, *gyrB* – гиразу, *pgm* – фосфоглюко-

мутазу и *recA* – рекомбиназу А. Сравнение выровненных последовательностей показало отсутствие варибельных нуклеотидов лишь в гене *dnaE*. В то же время локусы *gyrB* и *recA* содержали по два аллеля, *pgm* – три, а *cat* и *chi* – четыре (табл. 2). Наиболее информативным при монолокусном анализе оказалось использование фрагмента гена хитиназы *chi*. Штаммы, выделенные до начала 7-й пандемии, входили по этим данным в одну группу и отличались от пандемических изолятов наличием 4 варибельных нуклеотидов, расположенных в разных участках секвенированной последовательности. Другая группа объединила в себе все пандемические штаммы, за исключением *V. cholerae* 2223, аллель которого обладал высокой степенью сходства с таковым у штамма классического биовара Dakka33 и был отнесен, вместе с последним, в общую группу. По результатам мультилокусного секвенирования с использованием алгоритма UPGMA, следует отметить наиболее выраженную варибельность генов *cat*, *gyrB*, *pgm*, *recA* у авирулентного предпандемического штамма ATCC14033, что указывает на его эволюционную удаленность от всех взятых в исследование изолятов обоих биоваров. *V. cholerae* Dakka33 классического биовара и пандемический штамм 2223 биовара эльтор так же, как и при анализе генов вирулентности, оказались филогенетически близки, что может свидетельствовать о возможности существования промежуточных вариантов между холерными вибрионами обоих биоваров. И, наконец, две большие группы сформировали предпандемические вирулентные изоляты с о. Целебес и пандемические штаммы. Анализ полученных данных показал, что они эволюционно очень близки и имели, вероятно, одного общего предка, однако выявленные различия не позволяют

говорить о клональности их происхождения.

Проведенный статистический анализ с использованием расчета коэффициента соотношения несинонимичных нуклеотидных замен к синонимичным (d_N/d_S) позволил установить, что единственным локусом, вариабельность которого привела к изменению аминокислотного состава кодируемого им белка, является ген *toxR* у штамма Mak757, поскольку его расчетное соотношение d_N/d_S превысило единицу и равнялось четырем. Остальные локусы несмотря на наличие в них вариабельных нуклеотидов, по всей видимости, не оказывали влияния на структуру кодируемых ими белков.

Установлено, что в качестве мишеней для мультилокусного секвенирования с целью изучения эволюционных связей штаммов *V. cholerae* различного происхождения наиболее перспективными являются гены жизнеобеспечения (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*). Проведено типирование пандемических и предпандемических штаммов холерных вибрионов биовара эльтор и определена степень их филогенетического родства. Подтверждена эффективность предлагаемого алгоритма MLST-типирования для выяснения эволюционных связей *V. cholerae* различного происхождения и выявления патогенных клонов с новыми свойствами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Н.И., Неведов К.С., Осин А.В., Ливанова Л.Ф., Краснов Я.М. Изучение распространенности регуляторных генов, контролирующих экспрессию генов вирулентности, среди штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор с разным пандемическим потенциалом. Мол. генет. 2007; 1:15–22.
2. Balakrish Nair, Ashrafus Safa, Bhuiyan N. A., Suraia Nusrin, Denise Murphy, Carolyn Nicol et al. Isolation of *Vibrio cholerae* O1 strains similar to pre-seventh pandemic El Tor strains during an outbreak of gastrointestinal disease in an island resort in Fiji. J. Med. Microbiol. 2006; 55:1559–62.
3. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.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(3):1556–61.
4. Garg P., Aydanian A., Smith D., Morris J.G., Balakrish Nair

G., Stine O.C. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. Emer. Infect. Diseases. 2003; 9(7):810–4.

5. Grim C.J., Hasan N.A., Taviani E., Haley B., Chun J., Brettin T.S. et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIR5101 and comparative genomics with *V. cholerae*. J. Bacteriol. 2010; 192(13):3524–33.

6. MLST-Home: Multi Locus Sequence Typing [Internet]. Available from: <http://www.mlst.net> [cited 17 Jun 2010].

7. Jolley K.A., Feil E.J., Chan M.S., Maiden M.C. Sequence type analysis and recombinational tests (START). Bioinformatics. 2001; 17:1230–1.

8. Kumar S., Tamura K., Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. Briefings in Bioinformatics. 2004; 5:150–63.

9. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977; 74:5463–7.

A.V.Ossin, Ya.M.Krasnov, N.P.Guseva, N.I.Smirnova

Elaboration of the Algorithm of MLST-Typing of Pandemic and Pre-Pandemic *V. cholerae* El Tor strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Molecular typing of pandemic and pre-pandemic cholera vibrio strains was carried out with the help of multi-locus sequence analysis. Application of two MLST schemes based on the sequence of virulence-associated and house-keeping genes demonstrated the last one to be the most effective in differentiation of strains, isolated before and during the seventh cholera pandemic.

Key words: *Vibrio cholerae*, multi-locus sequence typing, virulence genes, housekeeping genes.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Smirnova N.I., Nefedov K.S., Osin A.V., Livanova L.F., Krasnov Ia.M. [A Study of the Prevalence of Regulatory Genes Controlling Virulence Gene Expression among *Vibrio cholerae* Eltor Strains Varying in Their Pandemic Potential]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2007; 1:15–22.

Authors:

Ossin A.V., Krasnov Ya.M., Guseva N.P., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Осин А.В., Краснов Я.М., Гусева Н.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 10.11.10.