

**Я.А.Кибирев, И.В.Дармов, М.А.Логина, И.В.Маракулин, Д.А.Чухланцев, Т.И.Дормидонтова,  
С.Л.Кузнецов, А.В.Кузнецовский**

## **РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *V. CHOLERAЕ* С ПОМОЩЬЮ VNTR-АНАЛИЗА**

*ФГУ «48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны  
Российской Федерации», Киров*

Для типирования штаммов *V. cholerae*, депонированных в музее микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», применен метод мультилокусного VNTR-анализа. Выбраны наиболее информативные локусы и фланкирующие их праймеры, составлены VNTR-профили и проведен анализ аллельного разнообразия исследованных штаммов, выпущены лабораторные серии тест-системы. Разработанная тест-система может быть использована для мониторинга эпидобстановки, при проведении эпидемиологических исследований, а также для паспортизации коллекционных штаммов.

*Ключевые слова:* *V. cholerae*, VNTR-анализ, тест-система

**Ya.A.Kibirev, I.V.Darmov, M.A.Loginova, I.V.Marakulin, D.A.Chukhlantsev, T.I.Dormidontova, S.L.Kuznetsov,  
A.V.Kuznetsovskii**

### **Development of VNTR-Based Test System for *V. cholerae* Typing**

*Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute*

Analysis of VNTRs was used for typing of *V. cholerae* strains deposited in microbial culture collection of 48 Central Research Institute. The most informative loci and flanking primers were chosen, VNTR profiles were compiled, and allele variability analysis of the strains was carried out. Laboratory series of test system were manufactured. The developed test system can be used for epidemiological monitoring and investigations, as well as for passportization of collection strains.

*Key words:* *V. cholerae*, VNTR, test system.

Холера была и остается до настоящего времени одной из самых опасных и распространенных инфекций бактериальной природы, унесшей многие миллионы человеческих жизней практически во всех странах мира.

В период с 1817 по 1926 год отмечено шесть крупных пандемий классической (азиатской) холеры, вызванных *Vibrio cholerae cholerae*. После почти 35-летнего отсутствия эпидемического распространения холеры в 1961 г. вспыхнула и продолжается до настоящего времени седьмая пандемия, обусловленная новой разновидностью возбудителя *V. cholerae eltor* [1, 4].

Для Российской Федерации и стран СНГ проблема борьбы с холерой в настоящее время является крайне актуальной: практически ежегодно регистрируются спорадические случаи заболевания и крупные вспышки, преимущественно связанные с заносом (завозом) инфекции, отмечено возможное укоренение холеры в южных регионах страны, появление стертых форм заболевания, а также регулярное выделение холерных вибрионов из объектов внешней среды [2].

Целью настоящей работы являлась разработка тест-системы для VNTR-типирования штаммов *V. cholerae*.

### **Материалы и методы**

Исследовали 45 штаммов *V. cholerae*, выделенных в различные годы и депонированных в музее микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России», из них 24 штамма вибрионов серогруппы O1, 13 – серогруппы O139 и 18 – серогруппы не-O1.

Для VNTR-типирования штаммов *V. cholerae*, основываясь на представленных в международной базе данных последовательностях вариабельных локусов [3], были выбраны олигонуклеотидные праймеры, фланкирующие 10 VNTR-локусов, краткие характеристики которых представлены в табл. 1.

С целью оценки пригодности выбранных локусов для типирования штаммов *V. cholerae* в предварительных исследованиях был проведен VNTR-анализ 45 штаммов *V. cholerae* из коллекции микробных культур ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России».

Для VNTR-анализа использовали хромосомную ДНК штаммов *V. cholerae*, выделенную по методу Мармур из агаровых культур, выращенных при температуре (36±1) °C в течение (16±2) ч. Для оценки стабильности выбранных VNTR-локусов в геноме холерного вибриона проводили сравнительный анализ VNTR-профилей исходных культур исследуемых штаммов *V. cholerae* и культур, полученных после

Таблица 1

VNTR-локусы и последовательности фланкирующих праймеров, использованные в исследовании

Локус	Тандемный повтор	Последовательности праймеров
Vc1	aacaga	5' cca aac cac tgc aac gga ta 3' 5' teg gtc ggt ttc tct tgt tc 3'
Vc2	accaga	5' gaa tca aag act tta gag gat tt 3' 5' tga gtt tct ttg gag gta gc 3'
Vc3	tgctgt	5' ctt gct cct gag ctg tat tt 3' 5' cac aat tta gac gtg gtc aa 3'
Vc4	gacccta	5' aac tgc tga ata agc caa gt 3' 5' tga gaa cgt aga tcc cag aa 3'
Vc5	gataatcca	5' gtt ttc ggc gtg gct gga ta 3' 5' tgc ctg tac gcc ttt cct gt 3'
Vc6	ccataaaaccttag	5' cgc ttg aag cgc tgc ttg ac 3' 5' ctt arc gat cgt tta gcg gca ta 3'
Vc7	gctcatggttaactt	5' aac gct tca caa aac gac tgc 3' 5' cgc cac acc atg agt gaa ga 3'
Vc8	aagtaagaggggataaa	5' ctg aaa ggc aag act cat aaa cg 3' 5' ccc agt tta gcg aac cag ac 3'
Vc9	tcaatccattaccgcataaacgc	5' tgc aat ctg tta ogc aca ctc 3' 5' gct caa gta gcg ggt tat cg 3'
Vc10	taaatacctgacaaaagagtcaaa	5' ata tct tgc gtg gga tct ta 3' 5' acc gca tat ctt cct tta ga 3'

десяти пересевов в жидкой питательной среде.

При постановке ПЦР готовили реакционную смесь, содержащую 0,25 мМ каждого из дезоксинуклеозидтрифосфатов, 0,5 ед. фермента Таq-полимеразы, буферный раствор для ПЦР, производства ЦНИИ Эпидемиологии, 7,5 мМ хлористого магния, 10 пкМ каждого праймера, 10 нг хромосомной ДНК одного из исследуемых штаммов. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл. Олигонуклеотидные праймеры были синтезированы специалистами ФГУ «48 ЦНИИ Минобороны России» фосфоамидитным методом на синтезаторе АСМ-102У («Биосетт», Новосибирск).

Режим термоциклирования реакционной смеси состоял из первичной денатурации (94 °C, 5 мин), 5 циклов, включающих денатурацию (94 °C, 20 с), отжиг (57 °C, 10 с) и элонгацию (72 °C, 5 с), и 35 циклов, включающих денатурацию (94 °C, 5 с), отжиг (57 °C, 5 с) и элонгацию (72 °C, 5 с). Для локусов Vch2 и Vch3 задаваемая температура отжига составляла 53 °C.

Разделение продуктов ПЦР (10 мкл амплификационной смеси) проводили в 8 % неденатурирующем ПААГ. В качестве маркеров молекулярных масс ДНК использовали полученные в ходе отработки методики VNTR-анализа штаммов *V. cholerae* аллельные «лестницы», представляющие собой смесь аллелей каждого анализируемого локуса.

Определение аллотипа исследуемых штаммов проводили путем сравнения молекулярной массы амплифицированных в ПЦР VNTR-локусов с молекулярной массой фрагментов аллельной «лестницы» при электрофоретическом разделении в ПААГ.

## Результаты и обсуждение

### Анализ VNTR-профилей исследованных штаммов

Таблица 2

Варибельность VNTR-локусов у изученных штаммов *V. cholerae*

Локус	Количество аллельных вариантов	Индекс разнообразия Нея
Vc1	9	0,8056
Vc2	16	0,8484
Vc3	16	0,9092
Vc4	9	0,7810
Vc5	9	0,8307
Vc6	4	0,6006
Vc7	3	0,2808
Vc8	1	-
Vc9	2	0,3432
Vc10	1	-

Примечание. Индекс разнообразия Нея определяется по формуле:  $DI=1-\sum p^2$ , где DI – индекс разнообразия Нея; p – частота встречаемости аллеля (отношение числа аллелей данного типа к общему числу аллелей).

*V. cholerae* показал, что все выбранные VNTR-локусы, амплифицированные в ПЦР с выбранными праймерами (за исключением локусов Vc8 и Vc10), обладают достаточным полиморфизмом (табл. 2). Наибольшее число аллельных вариантов – по 16, было выявлено при амплификации последовательностей локусов Vc2 и Vc3. При амплификации последовательностей локусов Vc1, Vc4 и Vc5 было выявлено по 9 аллельных вариантов. Более консервативными оказались локусы Vc6, Vc7 и Vc9, при амплификации последовательностей которых было выявлено 4, 3 и 2 аллельных варианта соответственно. Однако только для локусов Vc7 и Vc9 индекс разнообразия Нея составил менее 0,5. Локусы Vc8 и Vc10, имеющие по 1 аллельному варианту, были исключены из дальнейших исследований.

Для оценки стабильности выбранных VNTR-локусов исследуемых штаммов их культуры десятикратно пересевали в жидкой питательной среде во флаконах. После каждого пересева культуры инкубировали при температуре (36±1) °C в течение (16±2) ч. Выделенные после десятого пересева культуры использовали для VNTR-анализа. Полученные результаты показали полную идентичность VNTR-профилей всех исходных культур и культур, подвергнутых многократным пересевам. Это позволяет утверждать, что выбранные VNTR-локусы стабильно наследуются холерным вибрионом, а полученные VNTR-профили являются уникальными для каждого из исследованных штаммов.

Полученные данные позволили обосновать компонентный состав и разработать тест-систему для типирования штаммов *V. cholerae* методом VNTR-анализа (табл. 3).

Использование данной тест-системы позволит создать базу данных, содержащую сведения о VNTR-профилях штаммов *V. cholerae*, депонированных в коллекциях микробных культур. Включение сведений о VNTR-профилях в паспорта музейных культур

Таблица 3

**Компонентный состав тест-системы  
для штаммовой дифференциации возбудителя холеры  
с помощью мультилокусного VNTR-анализа**

Наименование компонента	Объем компонента, см <sup>3</sup>	Количество микропробирок, шт.
Растворы праймеров для амплификации каждого локуса	0,06	8
Контрольный препарат ДНК	0,1	1
Маркеры молекулярной массы по каждому локусу	0,1	8
10×буферный раствор	0,6	1
Раствор дезоксирибонуклеозид-трифосфатов	0,6	1
Раствор Taq-полимеразы	0,12	1
Минеральное масло	2,0	4
Бидистиллированная вода	2,0	1

*V. cholerae* будет являться важной идентификационной характеристикой депонированных штаммов. Разработанная тест-система также может использоваться при проведении мониторинга эпидобстановки в регионах, эндемичных по холере, и при эпидемиологических расследованиях вспышек этой инфекции.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Покровский В.И., Онищенко Г.Г., редакторы. Актуальные проблемы холеры. М.: ГОУ ВУНМЦ МЗ РФ; 2000. 384 с.
2. Покровский В.И., редактор. Холера в СССР в период VII пандемии. М.: Медицина; 2000. 472 с.
3. GPMS. Genomes, Polymorphism and Minisatellites with a focus on Molecular Epidemiology using Tandem Repeats [Internet]. Available from: <http://minisatellites.u-psud.fr>.
4. Kaper, J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8:48–86.

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

1. Pokrovskii V.I., Onishchenko G.G., editors. [Actual Issues of Cholera]. M.:Minzdrav RF; 2000. 384 p.
2. Pokrovskii V.I., editor. [Cholera in the USSR During VII Pandemic]. M.: Meditsina; 2000. 472 p.
3. The Microorganisms Tandem Repeats Database. Available from: [http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/base\\_ms/bact.php](http://minisatellites.u-psud.fr/ASPSamp/base_ms/bact.php).

**Authors:**

Kibirev Ya.A., Darmov I.V., Loginova M.A., Marakulin I.V., Chukhlantsev D.A., Dormidontova T.I., Kuznetsov S.L., Kuznetsovskii A.V. Russian Federation Ministry of Defense 48 Central Research Institute. Kirov.

**Об авторах:**

Киби́рев Я.А., Дармов И.В., Логинова М.А., Маракулин И.В., Чухланцев Д.А., Дормидонтова Т.И., Кузнецов С.Л., Кузнецовский А.В. 48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации. Киров.

Поступила 11.10.10.