

А.В.Шашкова, Д.А.Агафонов, А.В.Черкасов, С.П.Заднова, Н.И.Смирнова

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННОГО ТОКСИГЕННОГО ШТАММА *VIBRIO CHOLERAЕ* 301 БИОВАРА ЭЛЬТОР, ИЗОЛИРОВАННОГО В 2011 ГОДУ В РОССИИ

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

Фенотипический и молекулярно-генетический анализ штамма *Vibrio cholerae* 301 O1 серовара Инаба биовара эльтор, выделенного в 2011 г. из морской воды в рекреационной зоне Таганрога, показал, что данный изолят относится к геновариантам возбудителя холеры эльтор. Установлено присутствие в его геноме гибридного профага CTXφ, содержащего ген *ctxB* классического типа и ген *rstR* эльтор типа, а также измененных острова патогенности VPI-1 и острова пандемичности VSP-II. Показано, что исследованный штамм продуцирует значительно больше холерного токсина (0,12 мкг/мл) по сравнению с типичными штаммами этого возбудителя.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* биовара эльтор, геноварианты, профаг CTXφ, VPI-1, VSP-II.

A.V.Shashkova, D.A.Agafonov, A.V.Cherkasov, S.P.Zadnova, N.I.Smirnova

Phenotypic and Molecular-Genetic Analysis of Genetically Modified Toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor Strain 301, Isolated in 2011 in Russia

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov

The phenotypic and molecular-genetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Inaba strain 301, isolated in 2011 from sea water in recreation zone in Taganrog, demonstrated this isolate to be a genetic variant of El Tor cholera causative agent. Its genome was shown to carry a hybrid prophage, containing gene *ctxB* of classical type and gene *rstR* of El Tor type, as well as altered pathogenicity island VPI-1 and pandemicity island VSP-II. This strain produced much more cholera toxin (0,12 mcg/ml) than typical strains of this causative agent.

Key words: *Vibrio cholerae* biovar El Tor, gene-variants, prophage CTXφ, VPI-1, VSP-II.

Возбудителем холеры, особо опасной инфекции, являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы классического и эльтор биовара, а также *V. cholerae* O139 серогруппы. Холерные вибрионы классического биовара вызвали первые шесть пандемий холеры, тогда как возбудителем текущей, 7-й, пандемии, самой длительной из известных (с 1961 г. по настоящее время) является *V. cholerae* биовара эльтор. Холерные вибрионы O139 серогруппы вызывают спорадические случаи заболевания. В результате эволюции возбудителя холеры эльтор почти 20 лет назад возникли генетически измененные штаммы, или геноварианты, несущие в геноме профага CTXφ, кодирующего холерный токсин (ХТ), ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*) [11]. Современный период развития 7-й пандемии холеры характеризуется дальнейшим изменением генома *V. cholerae* биовара эльтор, что выражается в появлении дополнительной мутации в гене *ctxB*, нового аллеля гена *tcpA*, ответственного за биосинтез основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии, необходимых на первом этапе развития инфекционного процесса – колонизации, а также протяженной делеции в острове пандемичности VSP-II [8]. К настоящему времени геноварианты вытеснили типичные штаммы возбудителя холеры эльтор на многих эндемичных территориях Юго-Восточной Азии и Африки.

Что касается России, то установлено, что начиная с 1993 г. все эпидемические вспышки и еди-

ничные случаи холеры были вызваны геновариантами [4]. Поскольку показано, что измененные варианты генетически неоднородны, большой интерес представляют генетические особенности штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, выделенные на территории Российской Федерации в последние годы.

Цель работы состояла в проведении фенотипического анализа и исследовании структуры генома штамма *V. cholerae* 301 серовара Инаба биовара эльтор, выделенного в 2011 г. из морской воды в рекреационной зоне Таганрога.

Материалы и методы

В работе использовали следующие штаммы, выделенные от больных или из внешней среды: 3 типичных штамма *V. cholerae* биовара эльтор (*V. cholerae* M818 (Саратов, 1970), P14376 (Ростов-на-Дону, 1990), M1259 (Ставрополь, 1990)) и два генетически измененных (*V. cholerae* M1269 (Дагестан, 1994), L3226 (Москва, 2010)), а также изучаемый штамм *V. cholerae* 301. Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий. Для культивирования штаммов использовали агар LB (рН 7,2). Определение лизабельности диагностическими фагами (классический и эльтор) проводили согласно инструкции производителя. Определение чувствительности к полимиксину В и способности к продукции ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра определяли

согласно методическим указаниям [2].

Производство ХТ изучали с помощью иммуноферментного анализа GM₁ELISA [15]. Для детекции ХТ штаммы выращивали в условиях, оптимальных для производства данного белка эльтор вибрионами – бульон АК1 (1,5 % Бакто-пептона, 0,4 % дрожжевого экстракта Дифко, 0,5 % NaCl, 0,3 % NaHCO₃), pH 7,6, при температуре 37 °С [9]. Измерение оптической плотности проводили на фотометре «Stat Fax 2100» (США) при длине волны 405 нм. Количество продуцируемого ХТ рассчитывали по калибровочному графику, построенному с использованием очищенного ХТ. Гемолитическую активность исследуемого штамма, способность к продукции растворимой гемоглобулина/протеазы (РГА/П) и фосфолипазы изучали на плотных средах по методикам, описанным ранее [7, 13, 16]. Подвижность определяли на полужидком (0,6 %) LB агаре.

Чувствительность к антибиотикам устанавливали при посеве штамма *V. cholerae* 301 на среды, содержащие соответствующие антибиотики [6]. Результат учитывали после инкубирования посевов в течение суток при температуре 37 °С по наличию/отсутствию роста на пластинках агара.

Для изучения генетической организации штамма использовали блот-гибридизацию по Саузерну, полимеразную цепную реакцию (ПЦР) и секвенирование. Подготовку и обеззараживание образцов для ПЦР и секвенирования 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». Рестриктию и блот-гибридизацию по Саузерну осуществляли по методу, описанному в пособии по молекулярному клонированию [1]. Для фрагментирования хромосом использовали рестриктазу *Pst*I. ПЦР проводили в микропробирках объемом 600 мкл на амплификаторах «БИС» (Россия) и «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Анализируемую ДНК добавляли в количестве 10 мкл в приготовленную реакционную смесь объемом 15 мкл (2,5 мкл стандартного 10x буфера; 2,5 мкл смеси 2 мМ дНТФ («Сибэнзим»); 0,25 мкл 5 ед/мкл Таq-полимеразы («Бионем»); по 0,5 мкл специфических праймеров и 8,75 мкл деионизованной воды).

Секвенирование генов проводили на приборе «SEQ8000» (Beckman Coulter, США). Полученные последовательности изучаемых генов сравнивали с последовательностями, представленными в GenBank для референс-штаммов *V. cholerae* N16961 эльтор биовара и *V. cholerae* O395 классического биовара. Анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0», «Mega4» и «BioEdit 7.1.3».

Результаты и обсуждение

При изучении фенотипических свойств установлено, что штамм *V. cholerae* 301 обладает всеми

признаками, характерными для холерных вибрионов биовара эльтор: лизируется до ДРТ диагностическим фагом эльтор и не чувствителен к классическому фагу, растет на среде с добавлением 50 ед/мл полимиксина В, образует ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра и продуцирует гемолизин при выращивании на плотных питательных средах с добавлением 1 % эритроцитов барана.

На следующем этапе работы был проведен сравнительный анализ продукции основных (холерного токсина) и дополнительных (ферменты патогенности, подвижность) факторов патогенности у изучаемого штамма. Было показано, что в условиях *in vitro* данный штамм синтезирует и секретирует в среду выращивания 0,12 мкг/мл холерного токсина, что значительно превышает данный показатель у взятых для контроля типичных вибрионов биовара эльтор: *V. cholerae* M818 – 0,03 мкг/мл, P14376 – 0,04 мкг/мл, M1259 – 0,02 мкг/мл. Вместе с тем уровень продукции ХТ этим штаммом соответствует таковому, характерному для измененных вариантов – *V. cholerae* M1269 – 0,1 мкг/мл, L3226 – 0,4 мкг/мл. Приведенные результаты полностью согласуются с данными литературы [14] и полученными нами ранее сведениями о повышенной продукции ХТ измененными вариантами, выделенными на территории России [4].

При оценке уровня продукции ферментов патогенности установлено, что штамм 301 обладает слабой фосфолипазной активностью (зона просветления на агаре с яичным желтком – 0,5 мм), а также синтезирует в небольшом количестве секретируемый белок РГАП (средняя зона просветления на агаре с молоком – 1,0 мм). Вместе с тем клетки исследуемого штамма оказались более подвижными по сравнению с ранее изученными типичными и генетически измененными штаммами. Средний радиус распространения клеток в макроколонии на полужидком агаре составил 7,0 мм.

Далее нами была исследована устойчивость штамма *V. cholerae* 301 к антибактериальным препаратам. При этом минимальная ингибирующая доза для хлорамфеникола составила 50 мкг/мл, тетрациклина – 2 мкг/мл, триметаприма – 100 мкг/мл, ампициллина – 10 мкг/мл, спектиномицина – 20 мкг/мл, стрептомицина – 10 мкг/мл. Анализ полученных данных позволил сделать вывод, что штамм устойчив к спектиномицину, стрептомицину и триметаприму, но чувствителен к тетрациклину, хлорамфениколу, канамицину, ампициллину и рифампицину.

Таким образом, изучаемый штамм *V. cholerae* 301 по фенотипическим свойствам, включая биовар-специфические, в целом не отличается от типичных штаммов холерных вибрионов биовара эльтор. В то же время установлено выраженное отличие между ним и типичными штаммами по продукции ХТ – основного фактора патогенности.

Повышенный уровень продукции ХТ штамма 301 может служить указанием на его принадлежность к геновариантам. Однако для решения этого вопроса

необходимо изучение его молекулярно-генетических особенностей. В этой связи далее была исследована структура генома его профага СТХф, содержащего оперон *ctxAB*, кодирующий синтез ХТ. С помощью сконструированной нами ранее диагностической ПЦР тест-системы, дифференцирующей типичные и генетически измененные штаммы [5], было показано, что в геноме штамма 301 присутствует профаг СТХф, содержащий ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (*ctxB1*).

Учитывая, что гены *ctxAB*, кодирующие продукцию ХТ, входят в состав профага СТХф, нами была исследована структура данного мобильного генетического элемента. При ПЦР-тестировании 6 генов коровой части и 3 генов RS2-области установлено, что штамм *V. cholerae* 301 содержит полноценный профаг СТХф. Поскольку в настоящее время измененные варианты холерных вибрионов биовара эльтор могут нести разные аллели гена *ctxB* – *ctxB1* или *ctxB7* [3], нами было проведено секвенирование этого гена у штамма *V. cholerae* 301. В результате показано наличие цитозина в положениях 58, 115 и 206, что подтверждает присутствие в геноме профага СТХф аллеля *ctxB1*, который характерен для классических вибрионов. Поскольку в профаге СТХф измененных вариантов могут содержаться разные аллели гена *rstR*, далее нами было проведено его секвенирование. Оказалось, что в СТХф имеется эльтор аллель гена *rstR*. Это означает, что штамм 301 действительно является геновариантом возбудителя холеры эльтор и содержит в геноме гибридный профаг СТХф (*ctxB1*, *rstR^{Eltor}*).

Учитывая ранее полученные нами данные о вариативности количества гептаповторов TTTTGAT в промоторной области оперона *ctxAB* (от 3 до 5) у измененных вариантов, нами было проведено секвенирование промоторной области штамма *V. cholerae* 301. Установлено, что исследуемый штамм содержит 4 копии гептаповторов, как и большинство типичных и изученных измененных вариантов холерного вибриона биовара эльтор.

На следующем этапе была определена копияность профага СТХф у штамма 301, которую устанавливали с помощью блот-гибридизации по Саузерну с использованием СТ-зонда, созданного на основе амплифицированного фрагмента гена *ctxA* (564 п.н.). Хромосома фрагментировалась с помощью эндонуклеазы рестрикции *PstI*. В результате было показано, что в штамме *V. cholerae* 301 содержится одна копия профага СТХф, расположенная на *PstI*-фрагменте размером около 5,4 п.н.

Для установления локализации профага СТХф было проведено ПЦР-тестирование с праймерами СИП-СИР на участки хромосомы, соседние с *dif*-сайтом на малой хромосоме. Суть данного анализа заключается в следующем: если профаг СТХф находится на малой хромосоме, то сайт рекомбинации занят и образование ампликона размером около 800 п.н. не происходит [10]. При проведении ПЦР нами был

обнаружен указанный ампликон. Это означает отсутствие профага СТХф в *dif*-сайте на малой хромосоме и указывает на его локализацию на большой хромосоме, что характерно для типичных штаммов возбудителя холеры эльтор.

Принимая во внимание тот факт, что геноварианты могут отличаться от типичных штаммов по структуре генома острова патогенности VPI-1 и острова пандемичности VSP-II, мы изучили структуру этих мобильных элементов. В первую очередь была определена нуклеотидная последовательность гена *tcpA*, входящего в состав острова патогенности VPI-1. Было показано, что ген *tcpA* содержит однонуклеотидную замену – в положении 266 аденин был заменен на гуанин (А на G). Эти данные указывают на присутствие в VPI-1 аллеля *tcpA*, который ранее был обнаружен в штамме *V. cholerae* CIRS101, выделенном в 2002 г. в Бангладеш, и обозначен как *tcpET^{CIRS}* [8, 12]. Эти данные соответствуют ранее полученным нами результатам о наличии аллеля *tcpET^{CIRS}* в штаммах геновариантов *V. cholerae*, вызвавших спорадические случаи холеры на территории России в 2004–2010 гг.

При изучении структуры острова пандемичности VSP-II с помощью ПЦР показано наличие протяженной делеции – из 13 исследованных отсутствовали 7 генов (VCO495–VCO512), локализованных в центральной части этого острова. Последующее секвенирование VSP-II данного штамма подтвердило наличие делеции. При этом было показано, что делеция затрагивает часть гена VCO495 и заканчивается в межгенном пространстве между генами VCO512 и VCO513. Кроме того, было обнаружено, что на месте делетированных генов присутствует нуклеотидная последовательность размером около 1,25 т.п.н., соответствующая генам, кодирующим А и В-субъединицы транспозазы *OrfAB*. Стоит отметить, что подобная нуклеотидная последовательность острова пандемичности VSP-II характерна для геновариантов, выделяемых в настоящее время в странах Юго-Восточной Азии и Восточной Африке [8].

Таким образом, фенотипический и молекулярно-генетический анализ штамма *V. cholerae* 301, завезенного на территорию России в 2011 г., показал, что исследованный изолят относится к геновариантам *V. cholerae* биовара эльтор, содержит в геноме гибридный профаг СТХф с геном *ctxB* классического типа и геном *rstR* эльтор типа. Исследуемый штамм, как и другие геноварианты возбудителя холеры эльтор, продуцирует *in vitro* повышенное количество ХТ. Установлено также присутствие в геноме измененного острова патогенности VPI-1, а также измененного острова пандемичности VSP-II. Эти данные свидетельствуют о том, что генетическая организация штамма *V. cholerae* 301 полностью соответствует штаммам, выделяемым в настоящее время в ряде эндемичных по холере стран Юго-Восточной Азии, являющимся высокопатогенными и имеющим высокий эпидемический потенциал.

Работа выполнена по государственному контракту № 53-Д от 04.06.2012 в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности (2009–2013 годы)» и гранту РФФИ 12-04-00285а.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.; 1984. 480 с.
2. Лабораторная диагностика холеры: Методические указания МУК 4.2.2218-07. М.; 2007.
3. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. Мол. генет. микробиол. и вирусол. 2010; 4:11–9.
4. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2011; 3:3–10.
5. 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 эльтор на типичные и измененные. Пробл. особо опасных инф. 2011; 4(110):49–52.
6. Bani S., Mastromarino P.N., Ceccarelli D., Le Van A., Salvia A.M., Ngo Viet Q.T. et al. Molecular characterization of ICEVchVie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 266:42–8.
7. Finkelstein R.A., Atthasampunna P., Chulasamaya M., Charunmethee P. Pathogenesis of Experimental Cholera: Biologic Activities of Purified Procholeragen A. J. Immunol. 1966; 96(3):440–9.
8. Grim C.J., Choi J., Chun J., Jeon Y.S., Taviani E., Hasan N.A. et al. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. OMICS. 2010; 14(1):1–7.
9. Iwanaga M., Yamamoto K., Higa N., Ichinose Y., Nakasone N., Tanabe M. Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. Microbiol. Immunol. 1986; 30(11):1075–83.
10. Maiti D., Das B., Saha A., Nandy R.K., Nair G.B., Bhadra R.K. Genetic organization of pre-CTX and CTX prophages in the genome of an environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strain. Microbiology. 2006; 152(12):3633–41.
11. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New Variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002; 40(9):3296–9.

12. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Nusrin S., Murphy D., Nicol C. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2006; (44):4211–3.
13. Singh D.V., Matte M.H., Matte G.R., Jiang S., Sabeena F., Shukla B.N. et al. Molecular analysis of *Vibrio cholerae* O1, O139, non-O1, and non-O139 strains: clonal relationships between clinical and environmental isolates. Appl. Environ. Microbiol. 2001; 67(2):910–21.
14. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. J. Clin. Microbiol. 2011; 49(11):3739–49.
15. Svennerholm A.M., Strömberg G.J., Holmgren J. Purification of *Vibrio cholerae* soluble hemagglutinin and development of enzyme-linked immunosorbent assays for antigen and antibody quantitations. Infect. Immun. 1983; 41(1):237–43.
16. Tan N.H., Tan C.S. Acidimetric assay for phospholipase A using egg yolk suspension as substrate. Anal. Biochem. 1988; 170(2):282–8.

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

1. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. [Molecular Cloning]. M.; 1984. 480 p.
2. [Laboratory Diagnosis of Cholera: Methodological regulations. MR 4.2.2218-07]. M.; 2007.
3. Sмирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. [Evolution of *Vibrio cholerae* genome during the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2010; 4:11–9.
4. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. [Genetic characterization of *Vibrio cholerae* strains emerging in the Russian Federation during the 7th cholera pandemics]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2011; 3:3–10.
5. Шашкова А.В., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Смирнова Н.И., Кутырев В.В. [Construction of the PCR test-system for the detection of *Vibrio cholerae* O1 toxigenic strain, for identification of their biovar and for differentiation between typical and altered El Tor vibrio strains]. Probl. Osobo Opasn. Infek. 2011; (110):49–52.

Authors:

Шашкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russia. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Об авторах:

Шашкова А.В., Агафонов Д.А., Черкасов А.В., Заднова С.П., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 28.06.12.