

УДК 616.932:579.25

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ *Vibrio cholerae* Эль Тор С ПОВЫШЕННЫМ ПАТОГЕННЫМ И ЭПИДЕМИЧЕСКИМ ПОТЕНЦИАЛОМ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

© 2025 г. Д. А. Рыбальченко¹, Н. А. Плеханов¹, Е. Ю. Щелканова¹, Н. И. Смирнова¹, *

¹Российский научно-исследовательский противочумный институт
“Микроб” Роспотребнадзора, Саратов, 410005 Россия

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 22.11.2024 г.

После доработки 15.01.2025 г.

Принята к публикации 20.01.2025 г.

Разработан способ идентификации современных генетических вариантов *Vibrio cholerae* Эль Тор с повышенным патогенным и эпидемическим потенциалом, предусматривающий проведение одностадийной мультиплексной ПЦР в двух реакционных смесях. Состав смесей включал наборы праймеров к фрагментам ключевых генов вирулентности: *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101} – в первой и к фрагментам дополнительного гена вирулентности *rtxA4* совместно с генами *vc0502* и *vc0514* из острова пандемичности VSP-II во второй. Принадлежность исследуемого штамма *V. cholerae* Эль Тор к современному варианту возбудителя устанавливали по наличию ампликонов с мишенями *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4* и *vc0514*. Специфичность и эффективность способа подтверждена при анализе 22 штаммов, относящихся к различным видам рода *Vibrio*, разным серогруппам *V. cholerae* и энтеробактериям, а также 45 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных в различные временные периоды в России и сопредельных странах. Предложенный способ может быть использован при проведении эпидемиологических расследований и получении полной генетической характеристики завезенных штаммов для повышения эффективности геномного эпидемиологического надзора за холерой.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, гены патогенности, эпидемический потенциал, генетические маркеры, мультиплексная ПЦР

DOI: 10.56304/S0234275825010107

Эпидемии и вспышки холеры, особо опасной инфекции с диарейным синдромом, продолжают ежегодно регистрировать во многих эндемичных странах Юго-Восточной Азии, Африки и Центральной Америки, что создает реальные риски ее завоза на территорию Российской Федерации.

Возбудителями семи известных пандемий холеры, охвативших многие страны мира, были штаммы *Vibrio cholerae* серогруппы O1 двух разных биоваров: классического и Эль Тор, – различающихся по биохимическим и генетическим свойствам [1]. Текущая, седьмая, пандемия холеры, начавшаяся в 1961 году и продолжающаяся до сих пор, была вызвана токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 Эль Тор, которые, в отличие от холерных вибрионов классического биовара, обусловивших первые шесть пандемий (1817–1926 гг.), были менее вирулентными, но имели более высокий уровень выживаемости в окружающей среде [1]. Последующее глобальное распространение холеры Эль Тор из первичного очага (Бенгальский залив) в другие страны мира происходило тремя отдельными волнами и сопровождалось значительными генетическими изменениями возбудителя [2]. Если первая волна (1961–1990 гг.) была вызвана вибрионами Эль Тор с типичными свойствами, то возбу-

Список сокращений: СТ (cholera toxin) – холерный токсин; СТХФ – профаг, несущий гены СТ; *ctxA* – ген, кодирующий А-субъединицу СТ; *ctxB1*, *ctxB3*, *ctxB7* – аллели гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу СТ; MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin) – многофункциональный цитотоксин; TCP (toxin coregulated pilus) – токсин-корегулируемые пили; *tcpA*^{CIRS101} – аллель гена *tcpA*, кодирующего основной белок TCP; *rtxA4* – аллель гена *rtxA*, кодирующего многофункциональный цитотоксин MARTX; *vc0502* – ген острова пандемичности VSP-II, кодирующий пили IV типа; *vc0514* – ген острова пандемичности VSP-II, кодирующий метилакцепторный белок хемотаксиса; VPI-1 (*Vibrio pathogenicity island*) – остров патогенности, несущий гены *tcpA*; VSP-II (*Vibrio seventh pandemic island*) – остров пандемичности; *vc0502* – ген острова пандемичности VSP-II, кодирующий пили IV типа.

дителем второй и третьей волн стали различные геноварианты с измененной структурой генов вирулентности [2, 3]. Основное отличие типичных штаммов от геновариантов – разные аллели гена *ctxB* из оперона *ctxAB*, входящего в состав профага СТХφ и кодирующего соответственно А- и В-субъединицы холерного токсина (cholera toxin, СТ) – ключевого фактора патогенности возбудителя. Типичные штаммы имели аллель *ctxB3*, геноварианты – аллели *ctxB1* или *ctxB7*.

Генетическим маркером первых геновариантов, возникших в период второй волны пандемии (1991–2000 гг.) и обозначенных как атипичные штаммы, стал ген *ctxB1*. Появление в их геноме гена *ctxB1* стало результатом его горизонтального переноса от классических холерных вибрионов в типичные Эль Тор [4]. Различия между аллелями *ctxB3* и *ctxB1* типичных и атипичных штаммов вибрионов Эль Тор заключались в том, что в позициях 115 и 203 у типичных изолятов в гене *ctxB3* присутствовал тимин (Т), а у атипичных в аллеле *ctxB1* – цитозин (С). Как следствие, атипичные штаммы стали более вирулентными по сравнению с типичными за счет повышения продукции СТ [4, 5].

Тем не менее, генетические свойства возбудителя холеры продолжали меняться и в период третьей волны (с 2001 года по настоящее время) сформировались новые варианты с иным генотипом. Основные геномные особенности новых вариантов – присутствие ранее неизвестных мутаций в генах патогенности и острова пандемичности [6, 7]. Одним из ключевых изменений стало появление в их геноме нового аллеля гена *ctxB* – *ctxB7*, несущего точечную мутацию в гене *ctxB1* – С58А, которая привела к повышению продукции СТ в 4–5 раз у новых вариантов по сравнению с атипичными штаммами, несущими аллель *ctxB1* [8]. Другая не менее важная мутация затронула ген *tcpA*, входящий в состав острова патогенности VPI-1 (*Vibrio pathogenicity island*) и кодирующий основной белок токсинорегулируемых пилей (ТСП) – ключевого фактора колонизации возбудителем тонкого кишечника. В результате замены А266G появился новый аллель гена *tcpA*, названный *tcpA^{CIRS101}* [9], что привело к повышению колонизирующей способности вибрионов [10]. Более того, новые варианты отличались от атипичных штаммов мутантным геном *rtxA*, кодирующим многофункциональный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocesing repeats-in-toxin). В их геноме присутствовал аллель *rtxA4*, в нуклеотидной последовательности которого гуанин был заменен на аденин в позиции 13602 (G13602A), что привело к образованию стоп-кодона и утрате продукции этого токсина [11].

Кроме того, новые варианты несли измененный остров пандемичности VSP-II (*Vibrio seventh pandemic island*), связанный со способностью возбудителя к эпидемическому распространению. Их

VSP-II имел протяженную делецию, захватывающую участок ДНК, включающий 21 ген из 30 известных (*vc0489–vc0517*), и был обозначен как VSP-IIΔ(*vc0495–0512*) [12].

Помимо изменений в генах патогенности и эпидемичности возникли две точечные мутации в генах *gyrA* и *parC*, кодирующих топоизомеразу II (ДНК-гиразу) и топоизомеразу IV, а также в регуляторном гене *carR*, что привело к формированию у патогена резистентности к налидиксовой кислоте [13] и утрате устойчивости к полимиксину В – фенотипическому маркеру вибрионов Эль Тор [14].

Следствием мутаций в указанных генах стало значительное повышение патогенного и эпидемического потенциала новых вариантов, что обусловило рост числа тяжелых клинических форм холеры и их глобальное распространение в эндемичных по холере странах Азии и Африки за счет вытеснения ими ранее возникших атипичных штаммов [10], а также занос на неэндемичные территории, включая Россию [15, 16]. Тем не менее, несмотря на доминирование новых вариантов, в настоящее время в эндемичных очагах штаммы возбудителя холеры представлены разнообразной группой, состоящей как из ранее возникших атипичных штаммов, так и из изолятов с новыми мутациями в эпидемически значимых генах [17, 18]. Реальный риск заноса в Россию холерных вибрионов с разным генотипом, способных нанести различный ущерб здоровью населения, указывает на необходимость разработки быстрого и эффективного способа идентификации новых вариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор для получения достоверной информации о генетических свойствах выявляемых штаммов с целью прогнозирования эпидемиологической ситуации по холере в России.

Разработанные ранее способы позволяли идентифицировать впервые возникшие атипичные штаммы с аллелем *ctxB1* [19, 20] и дифференцировать их по эпидемическому потенциалу [21, 22], однако эти приемы не могли обеспечить идентификацию новых вариантов с повышенным патогенным и эпидемическим потенциалом. Вместе с тем разработка нового способа на основе мультиплексной ПЦР, позволяющего быстро и достоверно проводить идентификацию новых вариантов возбудителя, необходима для повышения эффективности геномного эпидемиологического надзора за холерой.

Цель работы – разработка способа идентификации новых генетических вариантов *V. cholerae* O1 Эль Тор с набором мутаций в генах патогенности и пандемичности методом мультиплексной ПЦР.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Штаммы и среды культивирования

В работе использовали 45 штаммов *V. cholerae* серогруппы O1 биовара Эль Тор, 22 штамма *V. cholerae* других серогрупп (O139, O20, O4, O41, O42) и близкородственных видов (*V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*), а также штаммы энтеробактерий *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* и *Shigella flexneri*. Все штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт “Микроб”, где они хранились в лиофильно высушенном состоянии. Питательной средой для культивирования бактерий служила жидкая и агаризованная среда Лурия Бертани (LB), содержащая дрожжевой экстракт (5 г), триптон (10 г), NaCl (10 г), pH 7.2 (Sigma-Aldrich, США).

Выделение ДНК

Для выделения ДНК клетки после 18 ч инкубации в жидкой среде LB ресуспендировали в 0.85%-ном растворе NaCl до концентрации 10^9 микробных клеток/мл, затем разводили деионизированной водой до концентрации 10^7 клеток/мл. К суспензии добавляли мертиолят натрия (Promega, США) до конечной концентрации 0.01% и прогревали при 56°C 30 мин. В микроцентрифужные пробирки переносили 100 мкл образца, добавляли лизирующий буфер на основе 6 М гуанидинизотиоционата (“Helicon”, Россия) в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 15 мин при 65°C. После выполнения этого этапа материал считается обеззараженным.

ДНК выделяли с использованием коммерческого набора ДНК-СОРБ-В (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Полученную ДНК суспендировали в ТЕ-буфере: 10 mM трис-HCl (Sigma-Aldrich, США), 1 mM ЭДТА (“Helicon”), pH 8.0 – и хранили при 4°C.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили с использованием Tag ДНК-полимеразы (“Синтол”, Россия) в программируемом термостате Терцик (“ДНК-технология”, Россия). Результаты анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле (“Диам”, Россия) с добавлением бромистого этидия (Serva, Германия).

Секвенирование нуклеотидных последовательностей

Секвенирование полных геномов бактериальных штаммов проводили на приборе Ion PGM (Thermo Fisher Scientific, США) с использованием стандартных протоколов подготовки проб и

программного обеспечения. Первичную обработку данных выполняли с помощью пакета программ Ion Torrent Suite Software версии 5.10.1. (Thermo Fisher Scientific). Сборку полногеномных последовательностей *de novo* проводили при помощи программы Newbler GS Assembler версии 2.6. (454 Life Sciences, США). Средняя глубина прочтений секвенированных штаммов составила 50.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Задача первого этапа работы состояла в выборе в геноме штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор ДНК-мишеней, определяющих принадлежность исследуемого изолята к новым токсигенным генетическим вариантам, подборе оптимального сочетания олигонуклеотидных праймеров и параметров ПЦР для эффективной идентификации этих штаммов.

Поиск ДНК-мишеней в геноме штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор

Поиск ДНК-мишеней проводили путем сравнения секвенированных полных геномов типичных и ранее возникших атипичных штаммов с геномом известных новых геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. В результате в качестве генетических маркеров новых вариантов возбудителя с высоким патогенным и пандемическим потенциалом было выбрано 6 генов. Для выявления измененных генов патогенности были использованы новые аллели ключевых (*ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}*) и дополнительных (*rtxA4*) генов вирулентности, входящих в состав профага СТХφ, острова патогенности VPI-1 и коровой области хромосомы соответственно. С целью выяснения изменений в острове пандемичности VSP-II, определяющем эпидемический потенциал возбудителя, были взяты два гена: *vc0502* и *vc0514*, – использование которых обеспечивает дифференциацию штаммов с интактным VSP-II (*vc0489–vc0517*) и делегированным VSP-IIΔ(*vc0495–0512*), характерным для новых геновариантов. Выбранный в качестве мишени ген *vc0514*, локализованный в 3'-концевом регионе VSP-II, присутствует у всех типов этого острова пандемичности, тогда как второй ген-мишень *vc0502*, расположенный в его центральной части, отсутствует у штаммов, имеющих протяженную делецию в VSP-II. Кроме того, для подтверждения токсигенности изучаемых штаммов был использован ген *ctxA*, кодирующий токсическую А-субъединицу СТ. Основанием для выбора указанного набора генов в качестве ДНК-мишеней для идентификации токсигенных новых вариантов возбудителя стало установленное ранее присутствие в геноме только этих штаммов аллелей генов патогенности *ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}* и *rtxA4*, отсутствие гена *vc0502* из острова пандемичности VSP-II, а также наличие в их хромосоме гена *ctxA* [15].

Таблица 1. Праймеры, использованные для конструирования мультиплексной ПЦР
Table 1. Primers used for construction of multiplex PCR

Мишень	Праймер			
	название	последовательность, 5' → 3'	размер, п.н.	источник
<i>ctxA</i> (А-субъединица СТ)	ctxA-F	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	564	[23]
	ctxA-R	CGATGATCTTGGAGCATCCCCAC		
<i>ctxB7</i> (В-субъединица СТ)	ctxB7-F3	GTTTTACTATCTTCAGCATATGCGA	300	[24]
	ctxB7-R	ATCGCATGAGGCGTTTTATT		Эта работа
<i>tcpA^{CIRS101}</i> (основная субъединица ТСП)	<i>tcpA^{CIRS101}</i> -F2	CCAGCTACCGCAAACGCAGG	167	[25]
	<i>tcpA^{CIRS101}</i> -Rev	CCGACTGTAATTGCGAATGC		
<i>rtxA4</i> (MARTX-токсин)	rtxA4-F	TACTTTAATGGTAACCGCGCT	187	[26]
	rtxA4-R2	TGTGAACCACGTCTGCT		
<i>vc0502</i> (пили IV типа)	vc0502-F	CTGTGATTCGGGCTTTATCGG	761	[21]
	vc0502-R	CTTGATGGAGCGGAGAAAAC		
<i>vc0514</i> (метилакцепторный белок хемотаксиса)	vc0514-F	CTTGATGGAGCGGAGAAAAC	604	
	vc0514-R	CGATGAATAGCCTGTTGAAC		

Выбор генспецифичных праймеров для амплификации ДНК

Для детекции этих генов были использованы известные олигонуклеотидные праймеры, описанные в литературных источниках и рассчитанные нами. Последовательности праймеров ctxA-F – ctxA-R, *tcpA^{CIRS101}*-F2 – *tcpA^{CIRS101}*-Rev, rtxA4-F – rtxA4-R2, vc0502-F – vc0502-R, vc0514-F – vc0514-R, ctxB7-F3 взяты из литературных источников [21, 23–26]. Их выбор был обусловлен высокой специфичностью, доказанной на большой выборке штаммов. Праймер ctxB7-R рассчитан нами с помощью программного обеспечения Primer Quest Tool (Integrated DNA Technologies, США) с целью оптимизации размера ампликона для лучшего разделения продуктов амплификации в геле (табл. 1). Для каждой пары праймеров была подобрана минимальная концентрация, при которой образовывались ПЦР-продукты. Далее экспериментально определяли оптимальное соотношение концентраций праймеров для каждой реакционной смеси. Указанные праймеры обеспечивали амплификацию фрагментов, размеры которых приведены в табл. 1. Подобное сочетание праймеров, взятых из литературных источников и рассчитанных нами, было использовано впервые.

Подбор оптимального сочетания праймеров и параметров мультиплексной ПЦР

Мультиплексную ПЦР проводили в один этап, но в двух реакционных смесях. Первая смесь содер-

жала специально подобранное сочетание праймеров к генам *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}*, вторая – к *rtxA4*, *vc0502*, *vc0514*. Далее экспериментально были подобраны оптимальные концентрации праймеров и соотношения других компонентов для каждой из двух реакционных смесей. Первая реакционная смесь объемом 25 мкл, выявляющая токсигенные штаммы с измененными ключевыми генами патогенности, содержала следующие ингредиенты: 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера (pH 8.8), 1 мкл смеси dNTPs (2 мМ), 0.5 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0.25 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 9.25 мкл деионизованной воды, 1.74 пмоль праймеров ctxA-F и ctxA-R, 10.2 пмоль ctxB7-F3, 19.5 пмоль ctxB7-R, 7.8 пмоль *tcpA^{CIRS101}*-F2, 10.4 пмоль *tcpA^{CIRS101}*-Rev, 10 мкл исследуемой пробы (рекомендуемая концентрация 1–10 нг/мкл). Вторая реакционная смесь объемом 25 мкл, идентифицирующая штаммы с измененными генами, определяющими эпидемический потенциал, и мутантным дополнительным геном патогенности, включала: 2.5 мкл 10× ПЦР-буфера (pH 8.8), 5 мкл смеси dNTPs (2 мМ), 4 мкл MgCl₂ (25 мМ), 0.5 мкл Taq-полимеразы (5 ед/мкл), 4 мкл деионизованной воды, 61.3 пмоль праймеров rtxA4-F, 30 пмоль rtxA4-R2, 1.78 пмоль vc0502-F, 1.56 пмоль vc0502-R, 7.9 пмоль vc0514-F, 7.6 пмоль vc0514-R, 10 мкл исследуемой пробы (табл. 2). В анализ брали 4 токсигенных штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с известным генотипом, относящихся к разным группам генетически измененных штаммов. Это два но-

Таблица 2. Состав реакционных смесей для мультиплексной ПЦР
Table 2. Composition of reaction mixtures for multiplex PCR

Компоненты реакционной смеси	Реакционная смесь № 1	Реакционная смесь № 2
10× ПЦР-буфер (pH 8.8)	2.5 мкл	2.5 мкл
Смесь dNTPs (2 мМ)	1.0 мкл	5.0 мкл
MgCl ₂ (25 мМ)	0.5 мкл	4.0 мкл
Тақ-полимераза (5 ед/мкл)	0.25 мкл	0.5 мкл
Деионизированная вода	9.25 мкл	4.0 мкл
Праймер <i>ctxA</i> -F	1.74 пмоль	—
Праймер <i>ctxA</i> -R	1.74 пмоль	—
Праймер <i>ctxB7</i> -F3	10.2 пмоль	—
Праймер <i>ctxB7</i> -R	19.5 пмоль	—
Праймер <i>tcpA</i> ^{CIRS101} -F2	7.8 пмоль	—
Праймер <i>tcpA</i> ^{CIRS101} -Rev	10.4 пмоль	—
Праймер <i>rtxA4</i> -F	—	61.3 пмоль
Праймер <i>rtxA4</i> -R2	—	30.0 пмоль
Праймер <i>vc0502</i> -F	—	1.78 пмоль
Праймер <i>vc0502</i> -R	—	1.56 пмоль
Праймер <i>vc0514</i> -F	—	7.9 пмоль
Праймер <i>vc0514</i> -R	—	7.6 пмоль

вых генетических варианта: L3226 (*ctxA*⁺*ctxB7*⁺*tcpA*^{CIRS101+}*rtxA4*⁺*vc0502*⁻*vc0514*⁺) и 3265/80 (*ctxA*⁺*ctxB7*⁺*tcpA*^{CIRS101+}*rtxA4*⁺*vc0502*⁻*vc0514*⁺), — изолированных соответственно в 2010 году и 2014 году, а также два других ранее возникших варианта с иным генотипом, обозначенных как атипичные штаммы: M1293 (*ctxA*⁺*ctxB1*⁺*tcpA*^{Eltor+}*rtxA4*⁻*vc0502*⁺*vc0514*⁺) и M1429 (*ctxA*⁺*ctxB1*⁺*tcpA*^{CIRS101+}*rtxA4*⁺*vc0502*⁻*vc0514*⁺), — выделенных соответственно в 1994 году и 2004 году. Токсигенный штамм новых геновариантов L3226, содержащий в геноме весь исследуемый набор измененных генов патогенности и генов, определяющих эпидемический потенциал (*ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4*, *vc0514* при отсутствии *vc0502*), и токсигенный атипичный штамм M1293, не имеющий генетических маркеров новых геновариантов, использовали в качестве положительных контролей. Отрицательным контролем служила деионизированная вода.

Аmplification ДНК контрольных и исследуемых штаммов проводили по следующей программе: предварительная денатурация при 96°С в течение 2 мин; 5 циклов, включающих 10 с при 96°С, 10 с при 58°С, 30 с при 72°С; 5 циклов, включающих 10 с при 96°С, 10 с при 56°С, 30 с при 72°С; 25 циклов, включающих 10 с при 96°С, 10 с при 54°С и 30 с при 72°С; заключительная элонгация при 72°С в течение 2 мин. Постепенное понижение температуры отжига праймеров на начальных этапах детекции выполняли с целью повышения специ-

фичности реакции. Продукты амплификации детектировали электрофорезом в 2%-ном агарозном геле.

Анализ амплифицированных фрагментов ДНК исследуемых генов в штаммах *V. cholerae*

Результаты ПЦР оценивали путем сравнения полученных ампликонов с контрольными образцами. Результаты идентификации приведены в табл. 3 и на рис. 1.

При тестировании исследуемых штаммов с использованием разработанной мультиплексной ПЦР выявлено, что контрольный штамм нового варианта L3226 образовывал ампликоны размером 564, 300 и 167 п.н. в реакционной смеси № 1 и 604 и 187 п.н. в смеси № 2 (рис. 1, дорожки 1, б). Из этого следует, что в геном этого штамма входят гены *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4*, *vc0514*, что подтверждает его принадлежность к новым вариантам с генотипом *ctxA*⁺*ctxB7*⁺*tcpA*^{CIRS101+}*rtxA4*⁺*vc0502*⁻*vc0514*⁺. В то же время для контрольного штамма M1293 (*ctxA*⁺*ctxB1*⁺*tcpA*^{Eltor+}*rtxA4*⁻*vc0502*⁺*vc0514*⁺) в реакционной смеси № 1 обнаружен лишь ампликон размером 564 п.н. (рис. 1, дорожка 2), а в смеси № 2 — ампликоны размером 761 и 604 п.н. (рис. 1, дорожка 7), что свидетельствует о наличии гена *ctxA* и отсутствии *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4* и делетированного VSP-ИД (*vc0495*–*0512*), характерных для новых вариантов. На основании этих результатов можно говорить о принадлежности M1293 либо к

Таблица 3. Идентификация штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор методом мультиплексной ПЦР
Table 3. Identification of *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains by multiplex PCR

Размер ампликона, п.н.						Результат идентификации
реакционная смесь № 1			реакционная смесь № 2			
<i>ctxA</i>	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS101}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>vc0502</i>	<i>vc0514</i>	
564	300	167	187	761	604	
+	+	+	+	–	+	Токсигенный новый геновариант (ПК1) ^a
+	–	–	–	+	+	Токсигенный типичный/атипичный штамм (ПК2) ^b
+	+	+	+	–	+	Токсигенный новый геновариант
–	–	+	+	–	+	Токсигенный типичный/атипичный штамм

Примечание: ^a Положительный контроль-1 (штамм L3226); ^b положительный контроль-2 (штамм M1293).
 Note: ^a Positive control 1 (strain L3226); ^b positive control 2 (strain M1293).

токсигенным типичным штаммам с геном *ctxA* и интактным VSP-II, либо к атипичным с мутациями, отличными от таковых в новых геновариантах (табл. 3). При анализе штамма 3265/80 установлено образование ампликонов с праймерами к фрагментам генов *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}* в реакционной смеси № 1 и к фрагментам генов *rtxA4* и *vc0514* в смеси № 2 (рис. 1, дорожки 4 и 9). Полное совпадение полученных ампликонов с таковыми для контрольного штамма L3226 позволило идентифицировать 3265/80 как новый геновариант с генами *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}*, *rtxA4*, *vc0514* (при отсутствии *vc0502*) с делетированным VSP-IIΔ(*vc0495–0512*). В

то же время у еще одного исследуемого штамма – M1429 – детектировали два ампликона размером 564 и 167 п.н. с праймерами к фрагментам генов *ctxA* и *tcpA^{CIRS101}* в реакционной смеси № 1 и два ампликона размером 514 и 187 п.н. с праймерами к фрагментам генов *rtxA4* и *vc0514* в смеси № 2 (рис. 1, дорожки 3 и 8). Отсутствие ампликона к гену *ctxB7*, несмотря на их образование с праймерами к фрагментам других генов-мишеней (*ctxA*, *tcpA^{CIRS101}*, *rtxA4* и *vc0514*), свидетельствует о принадлежности M1429 к типичным или атипичным штаммам *V. cholerae*.

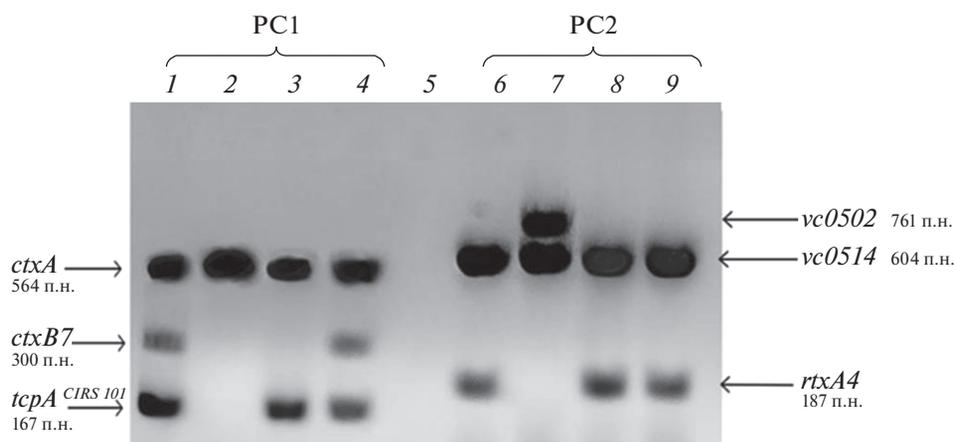


Рис. 1. Электрофореграмма ампликонов исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, полученных с помощью мультиплексной ПЦР. Продукты мультиплексной ПЦР-амплификации в реакционной смеси № 1 (PC1; дорожки 1–4) и в реакционной смеси № 2 (PC2; 6–9). *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор: штамм L3226 – дорожки 1 (PC1) и 6 (PC2) – токсигенный новый генетический вариант; M1293 – 2 (PC1) и 7 (PC2) – токсигенный типичный/атипичный штамм; *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор M1429 – 3 (PC1) и 8 (PC2), – токсигенный типичный/атипичный штамм; *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор 3265/80 – 4 (PC1) и 9 (PC2) – токсигенный новый генетический вариант. Дорожка 5 – отрицательный контроль (деионизированная вода).

Fig. 1 Electropherogram of amplicons of the studied strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor, obtained using multiplex PCR. Multiplex PCR amplification of mixture #1 (RM1; lanes 1–4) and mixture #2 (RM2; 6–9). *V. cholerae* O1 biovar El Tor: strain L3226 – lanes 1 (RM1) and 6 (RM2) – toxigenic new genetic variant; M1293 – 2 (PC1) and 7 (RM2) – toxigenic typical/atypical strain; M1429 – 3 (RM1) and 8 (RM2), – toxigenic typical/atypical strain; 3265/80 – 4 (RM1) and 9 (RM2) – toxigenic new genetic variant. Lane 5, negative control (deionized water).

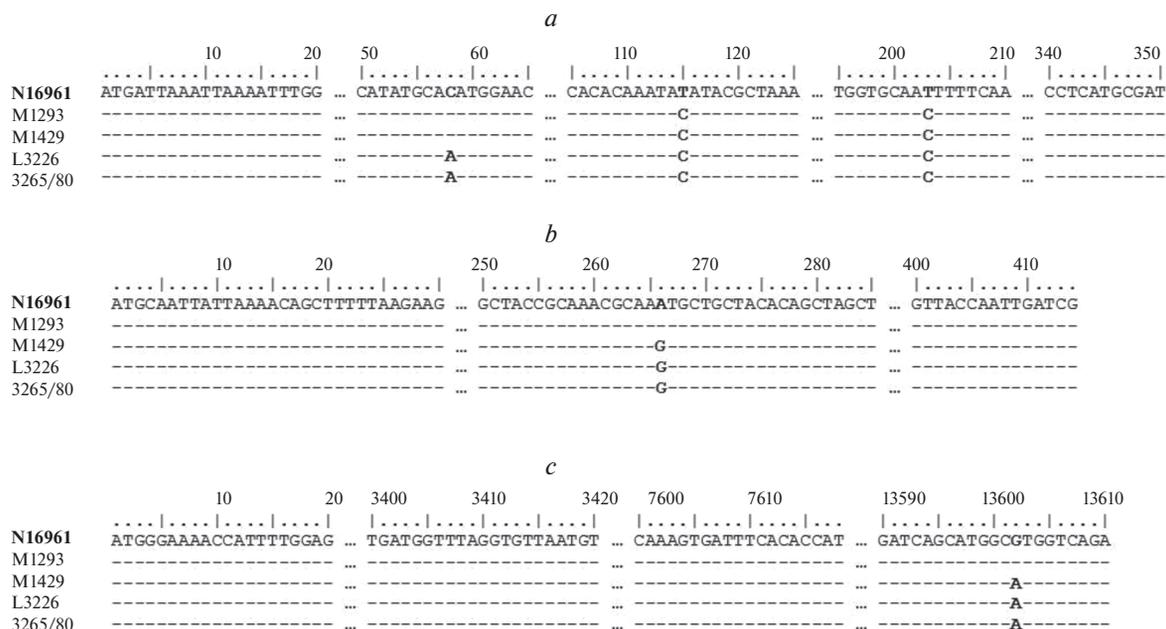


Рис. 2. Фрагменты нуклеотидной последовательности генов *ctxB* (a), *tcpA* (b), *rtxA* (c) токсигенных атипичных штаммов (M1293, 1429) и новых вариантов (L3226, 3265/80) *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Fig. 2 Fragments of the nucleotide sequence of *ctxB* (a), *tcpA* (b), *rtxA* (c) genes of toxigenic atypical (M1293, 1429) and new variants (L3226, 3265/80) of *V. cholerae* O1 biovar El Tor.

Для подтверждения результатов идентификации новых вариантов *V. cholerae* методом ПЦР был проведен анализ нуклеотидной последовательности секвенированных генов *ctxB*, *tcpA* и *rtxA*, кодирующих ключевые и дополнительные факторы патогенности, в геномах контрольных (L3226 и M1293) и исследуемых (3265/80 и M1429) штаммов. Результаты секвенирования полностью совпали с данными ПЦР-анализа (рис. 2).

Так, у исследуемого штамма 3265/80, отнесенного по данным ПЦР к новым вариантам, в нуклеотидной последовательности гена *ctxB* действительно имелись три точечные мутации (однонуклеотидные замены в позициях 58, 115 и 203), характерные для аллеля *ctxB7*, являющегося генетической меткой именно этих вариантов (рис. 2).

Таким образом, разработанный способ идентификации новых генетических вариантов *V. cholerae* Эль Тор предусматривал выделение хромосомной ДНК исследуемого штамма, проведение одностадийной мультиплексной ПЦР в двух реакционных смесях: № 1 содержала специально подобранное сочетание праймеров к генам *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, а № 2 — к генам *rtxA4*, *vc0502*, *vc0514*, — с последовательным понижением температуры отжига праймеров с 58 до 54°C в интервале 2°C каждые 5 циклов амплификации (при общем числе циклов 35) и последующим анализом полученных амплифицированных участков ДНК электрофорезом в агарозном геле.

Оценка специфичности и эффективности разработанного способа

Специфичность разработанной ПЦР оценивали с использованием 12 штаммов близкородственных видов рода *Vibrio*: *V. mimicus*, *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus*, — а также энтеробактерий: *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella flexneri*. Кроме того, проанализировали ДНК 10 штаммов *V. cholerae* O139 и не-O1/не-O139 серогрупп и получили отрицательные результаты. На основании этого было сделано заключение о 100%-ной специфичности разработанной мультиплексной ПЦР.

Для оценки эффективности разработанного способа идентификации новых вариантов возбудителя холеры с помощью мультиплексной ПЦР было исследовано 45 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в разных регионах России и в сопредельных странах от больных и из внешней среды в период 1970–2023 гг. Структура генома этих штаммов была изучена нами ранее методами монолокусной ПЦР и секвенирования. В результате установлено, что исследованные штаммы образовали две группы. В первую входило 24 типичных или атипичных штаммов, выделенных во время эпидемических вспышек холеры в Российской Федерации в 1970–2010 гг. Вторая группа была представлена 21 штаммом новых вариантов, изолированных в России и сопредельных странах в 2010, 2011, 2014 и 2023 гг. (табл. 4).

Таблица 4. Оценка эффективности разработанного протокола мультиплексной ПЦР для идентификации новых геновариантов *V. cholerae* Эль Тор
Table 4. Evaluation of the efficiency of the developed multiplex PCR protocol for the identification of new *V. cholerae* El Tor genovariants

Период выделения: штаммы	Гены						Характеристика штамма
	<i>ctxA</i>	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS101}	<i>rtxA4</i>	<i>vc0502</i>	<i>vc0514</i>	
1970–2001 гг.: M818, M888, M893, M1062, M1067, M1085, M1030, M1011, M1020, P8194, M671, M642, C402, M1275, M1270, M1293, P17644, M1327, M1344	+	–	–	–	+	+	Токсигенный типичный/атипичный
2001–2010 гг.: M1429, M1430, P18899	+	–	+	+	–	+	
89	+	–	+	–	+	+	
2010–2023 гг.: L4150, L3226, 76, 153, 39, 186, 182, 27, 96, 36, 68, 156, 121, 550, 15, 96, M1509, 3265/80, M3210, M3213, M3208	+	+	+	+	–	+	Токсигенный новый генетический вариант
P19613(81)	+	–	+	+	–	+	Токсигенный типичный/атипичный штамм

Эти результаты полностью совпадали с данными монолокусной ПЦР и сиквенса геномов этих штаммов, из чего можно сделать вывод о высокой эффективности разработанного способа идентификации новых геновариантов *V. cholerae* Эль Тор. На это изобретение в 2024 году был получен патент [27].

Таким образом, в результате проведенных экспериментов впервые разработан способ идентификации новых генетических вариантов *V. cholerae* Эль Тор с набором мутаций в генах вирулентности и острова пандемичности VSP-II, имеющих высокий патогенный и эпидемический потенциал. Использование разработанного протокола мультиплексной ПЦР позволяет с высокой специфичностью эффективно идентифицировать токсигенные штаммы новых геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор в чистой культуре по последовательности фрагментов 6 генов патогенности и эпидемичности. Это означает, что разработанный способ может быть использован при проведении геномного эпидемиологического мониторинга за возбудителем холеры для выявления его новых вариантов, завезенных на территорию Российской Федерации, а также при паспортизации штаммов *Vibrio cholerae*, хранящихся в Государственных коллекциях патогенных бактерий.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории геномного и протеомного анализа отдела микробиологии Я.М. Краснову и А.В. Федорову за ока-

занную помощь в проведении работы по секвенированию.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaper J., Morris J.Jr., Levine M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, 8(1), 48–86.
<https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
2. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N., Connor T.R., Lee H.J., Kariuki S., Croucher N.J., Choi Y.S., Harris R.S., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood L.N.J., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature*, 2011, 477, 462–465.
<https://doi.org/10.1038/nature10392>
3. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.*, 2010, 18, 46–54.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
4. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.-M., Safa A., Bhuiyan N.A., Ahmad S.Q., Faruque S.M., Faruque A.S.G., Takeda Y., Sack D.A. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(11), 4211–4213.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01304-06>
5. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Шелканова Е.Ю., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. Геноварианты возбудителя холеры Эль Тор: получение, молекулярно-генетический и протеомный анализ. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2014, 1, 21–31.

6. Chaguza C., Chibwe I., Chaima D., Musicha P., Ndeketa L., Kasambara W., Mhango C., Mseka U.L., Bitilinyu-Bangoh J., Mvula B., Kipandula W., Bonongwe P., Munthali R.J., Ngwira S., Mwendera C.A., Kalizang'oma A., Jambo K.C., Kambalame D., Kamng'ona A.W., Steele A.D., Chauma-Mwale A., Hungerford D., Kagoli M., Nyaga M.M., Dube Q., French N., Msefula C.L., Cunniffe N.A., Jere K.C. Genomic insights into the 2022–2023 *Vibrio cholerae* outbreak in Malawi. *Nat. Commun.*, 2024, 15(1), 6291. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-50484-w>
7. Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect. Genet. Evol.*, 2021, 89, e:104726. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104726>
8. Naha A., Mandal R.S., Samanta P., Saha R.N., Shaw S., Ghosh A., Chatterjee N.S., Dutta P., Okamoto K., Dutta S., Mukhopadhyay A.K. Deciphering the possible role of *ctxB7* allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 2020, 14(4), e0008128. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008128>
9. Kerketta A.S., Kar S.K., Khuntia H.K. Detection of Haitian *ctxB7* & *tcpA* alleles in *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Puri, Odisha, India. *Indian J. Med. Res.*, 2019, 49(4), 558–560. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_1130_17
10. Ghosh P., Sinha R., Samanta P., Saha D.R., Koley H., Dutta S., Okamoto K., Ghosh A., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 strains manifest higher virulence in animal models. *Front. Microbiol.*, 2019, 5(10), 111. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00111>
11. Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA*-null mutation in recent altered El Tor isolates. *Mbio*, 2013, 4(2), e00624. <https://doi.org/10.1128/mBio.00624-12>
12. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic island using comparative analysis. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2010, 308(2), 130–137. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x>
13. Kim H.B., Wang M., Ahmed S., Park C.H., LaRocque C.R., Faruque A.S., Salam M.A., Khan W.A., Qadri F., Calderwood S.B., Jacoby G.A., Hooper D.C. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2010, 54, 799–803. <https://doi.org/10.1128/AAC.01045-09>
14. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., Shaw S., Ghosh P., Dutta S., Ghosh A., Imamura D., Morita M., Ohnishi M., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.*, 2020, 88(5), e00080-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
15. Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Плеханов Н.А., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Кутырев В.В. Новые генетические варианты возбудителя холеры и их распространение в эндемичных странах и России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2023, 41(1), 10–17. <https://doi.org/10.17116/molgen20234101110>
16. Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Молекулярно-генетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O1 Эль-Тор, выявленных на территории России в 2023 г. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2024, 42(1), 34–42. <https://doi.org/10.17116/molgen20244201134>
17. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgina N.O., Basov E.A., Khunkheeva Yu.Z., Balakhonov S.V. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.*, 2018, 60, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.023>
18. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций*, 2020, 3, 17–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26>
19. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Шубина А.В., Заднова С.П., Кутырев В.В. Способ идентификации токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, определение их биовара и дифференциация штаммов эльтор на типичные и измененные методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления. *Патент RU2458141C1*, бюлл. № 22, опублик. 10.08.2012. <https://patents.google.com/patent/RU2556127C2/ru>
20. Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В., Ковалев Д.А., Таран Т.В., Подопригора Е.И., Сосунов В.В., Радаева Т.В. Тест-система для идентификации типичных и генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор методом ПЦР в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2021, 4, 120–127. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-4-120-127>
21. Агафонов Д.А., Заднова С.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Конструирование ПЦР тест-системы для дифференциации генетически измененных токсигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с разным эпидемическим потенциалом. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2014, 2, 85–88. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2014-2-85-88>
22. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И. Способ одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. *Патент RU2560280C2*, бюлл. № 23, опублик. 20.08.2015. <https://patents.google.com/patent/RU2556127C2/ru>
23. Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J. Clin. Microbiol.*, 1992, 30(8), 2118–2121. <https://doi.org/10.1128/jcm.30.8.2118-2121.1992>
24. Naha A., Pazhani G.P., Ganguly M., Ghosh S., Ramamurthy T., Nandy R.K., Nair G.B., Takeda Y., Mukhopadhyay A.K. Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant *ctxB* in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated

- ed from Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, 50(5), 1733–1736.
<https://doi.org/10.1128/JCM.00387-12>
25. Ghosh P., Naha A., Basak S., Ghosh S., Ramamurthy T., Koley H., Nandy R.K., Shinoda S., Watanabe H., Mukhopadhyay A.K. Haitian variant *tcpA* in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in Kolkata, India. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, 52(3), 1020–1021.
<https://doi.org/10.1128/JCM.03042-13.27>
26. Ghosh P., Naha A., Pazhani G.P., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Genetic traits of *Vibrio cholerae* O1 Haitian isolates that are absent in contemporary strains from Kolkata, India. *PloS One*, 2014, 9(11), e112973.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112973>
27. Плеханов Н.А., Рыбальченко Д.А., Шелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Способ идентификации токсигенных генетических вариантов возбудителя холеры Эль Тор с набором мутаций в генах вирулентности и генах острова пандемичности VSP-II методом мультиплексной полимеразной цепной реакции. Патент RU2815711C2, бюлл. № 8, опубл. 20.03.2024.
<https://patents.google.com/patent/RU2815711C2/ru>

Identification of Genetic Variants of *Vibrio cholerae* El Tor with Increased Pathogenic and Epidemic Potential Using Multiplex PCR

D. A. Rybalchenko^a, N. A. Plekhanov^a, E. Yu. Shchelkanova^a, and N. I. Smirnova^{a, #}

^aFederal State Scientific Institution “Research Russian Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor, Saratov, 410005 Russia

[#]e-mail: rusrapi@microbe.ru

Abstract—A method for identification of modern genetic variants of *Vibrio cholerae* El Tor with increased pathogenic and epidemic potential has been developed. The method was based on single-stage multiplex PCR in two reaction mixtures. The composition of the mixtures included sets of primers to fragments of key virulence genes, *ctxA*, *ctxB7* and *tcpA*^{CIRS101}, in the first mixture and to fragments of the additional virulence gene *rtxA4* together with the genes *vc0502* and *vc0514* from the pandemic island VSP-II in the second one. Belonging of the tested *V. cholerae* El Tor strain to the modern variant of the pathogen was established by the presence of amplicons with *ctxA*, *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101}, *rtxA4* and *vc0514* targets. The specificity and efficiency of the method were confirmed by the analyzing 22 strains belonging to various species of the genus *Vibrio*, different serogroups of *V. cholerae* and Enterobacteriaceae, as well as 45 toxigenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor, isolated in different time periods in Russia and neighboring countries. The proposed method can be used in epidemiological investigations and obtaining a complete genetic characterization of imported strains to improve the efficiency of genomic epidemiological surveillance of cholera.

Keywords: *Vibrio cholerae*, genovariants, pathogenicity genes, epidemic potential, genetic markers, identification, multiplex PCR