

УДК: 579.873.1[Vibrio:579.25]:616.932-036.21(571.6)"1961/1990"

VNTR-ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *V.CHOLERAЕ ELTOR*, ИЗОЛИРОВАННЫХ НА ДАЛЬНЕМ ВОСТОКЕ РОССИИ В ПЕРИОД СЕДЬМОЙ ПАНДЕМИИ

Ж.Ю. Хунхеева¹, Л.В. Миронова¹, А.С. Пономарева¹, М.В. Афанасьев¹,
А.В. Алленов², В.П. Борзов², В.Н. Краснощеков², А.Г. Ковальский³,
Т.В. Громова³, С.В. Балахонов¹

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Иркутск

²ФКУЗ Приморская противочумная станция Роспотребнадзора, г. Уссурийск

³ФКУЗ Хабаровская противочумная станция Роспотребнадзора, г. Хабаровск

Представлена характеристика клональной структуры вибрионов эльтор, изолированных в Приморском и Хабаровском краях, а также в Сахалинской области при различных эпидемиологических ситуациях по результатам VNTR-типирования. Для эпидемически опасных штаммов характерна высокая клональность и кластеризация в зависимости от места изоляции, тогда как для нетоксигенных *V.cholerae* из поверхностных водоемов – более высокая гетерогенность популяции. Для данной группы установлена, в большинстве случаев, кластеризация по временному параметру.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, VNTR-типирование, аллельный профиль, вспышка, эпидемиологическое благополучие

VNTR-TYPING OF THE STRAINS *VIBRIO CHOLERAЕ ELTOR* ISOLATED IN THE FAR EAST DURING SEVENTH CHOLERA PANDEMIC

Zh. Yu. Khunkheeva¹, L.V. Mironova, A.S. Ponomareva¹, M.V. Afanas'ev¹, A.S. Allenov²,
V.P. Borzov², V.N. Krasnoshchekov², A.G. Kovalsky³, T.V. Gromova³, S.V. Balakhonov¹

¹Irkutsk Antiplague Research Institute of Rospotrebnadzor, Irkutsk

²Primorsky Antiplague Station of Rospotrebnadzor, Ussuriysk

³Khabarovsk Antiplague Station of Rospotrebnadzor, Khabarovsk

There is *V. cholerae eltor* clonal structure VNTR characteristic reported.

The strains were isolated from Primorsky, Khabarovsk territories and Sakhalin region during different epidemiological situation. The epidemic dangerous strains are characterized with high clonality and clustering that depend on the isolation place. Contrary, nontoxigenic *V.cholerae* strains from surface water have higher population heterogeneity. The clusterisation that depends on the isolation place belongs to the last group in most cases.

Key words: *Vibrio cholerae*, VNTR-typing, allelic profile, outbreak, epidemiological welfare.

В настоящее время генетические методы типирования являются неотъемлемым звеном при проведении микробиологических исследований, реализуемых в рамках эпидемиологического надзора за различными инфекционными болезнями. В субъектах Дальнего Востока за счет интенсификации межгосударственных торгово-экономических связей, роста миграционных потоков, территориальной близости эндемичных и неблагополучных по холере стран, регистрации осложнений эпидемиологического характера [4,5], обнаружения потенциально эпидемически опасных вариантов холерного вибриона [2] особое значение отведено эпидемиологическому надзору за возбудителем холеры [3,4,5] с углубленным изучением его геномной организации. По данным молекулярного типирования возможно не только прослеживание путей распространения инфекции при эпидемических осложнениях, сбор в единую цепь компонентов эпидпроцесса, но и выявление особенностей циркулирующих в объектах окружающей среды в период эпидемиологического благополучия вибрионов эльтор. Мультилокусный метод типирования, основанный на анализе структуры и кратности варьируемых тандемных повторов, на протяжении многих лет успешно применяется как в оперативном эпидемиологическом анализе, так и для ретроспективного исследования популяции возбудителя холеры [6,7,8,9].

Таким образом, цель исследования – изучение клональной структуры изолированных штаммов *V. cholerae eltor* на различных этапах седьмой пандемии холеры методом VNTR-анализа.

Материалы и методы

Для реализации поставленной цели было использовано 137 штаммов *V. cholerae eltor*, изолированных на территориях Приморского и Хабаровского краев, Сахалинской области в период с 1976-2014 гг., в том числе изолированные из клинического материала и объектов окружающей среды при эпидосложнении в 1999 г. в Приморском крае и Сахалинской области (34 изолята). Все штаммы *V. cholerae eltor* получены из Музея живых культур Иркутского научно-исследовательского противочумного института.

Экстракцию тотальной ДНК проводили с использованием коммерческого набора «Рибо-Преп» (ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора, Москва). Матричная ДНК в концентрации 10 нг/мкл использовалась для постановки ПЦР. Реакционная смесь для постановки реакции содержала: 10хПЦР буфер – 2,5 мкл; 25 mM MgCl₂ – 2,5 мкл; смесь 2,5 mM дНТФ – 2,5 мкл; прямой и обратный праймеры, меченные флуоресцентными красителями (FAM, R6G, TAMRA, ROX) – по 5 пкмоль; Taq-полимераза – 0,6 Ед; матричная ДНК исследуемого штамма – 10 нг/мкл (1мкл); бидистиллированная вода – 15 мкл. Амплификацию проводили на термоциклере BioRad по следующей программе: стартовая денатурация 95°C – 2 мин; денатурация 94°C – 35 сек., отжиг праймеров 56-61°C – 25 сек., элонгация 72°C – 35 сек.

Мишенями для ПЦР выбраны локусы вариабельных tandemных повторов VcA, VcB, VcC, VcD, VcG, описанные Водопьяновым А.С. с соавторами [1]. В зарубежных исследованиях эти локусы обозначены как VCA0171, VCA0283, VCA0147, VCA0437 и VCA1650, соответственно[4]. Анализируемые повторы локализованы на обеих хромосомах референсного штамма *V. cholerae eltor* №16961.

Размер полученного в ПЦР фрагмента определялся методом капиллярного электрофореза на ДНК-анализаторе ABI Prism® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония). На основании размера ампликона определялось число tandemных повторов исследуемого штамма по формуле, включающей размер и число повторов контрольного штамма.

Отметим, что использование данного способа расчета числа повторов в локусе на основании данных секвенирования контрольного штамма и прогона его при каждом запуске капиллярного электрофореза с исследуемой группой штаммов дает наиболее достоверные результаты за счет минимизации погрешностей, возникающих при эксплуатации ДНК-анализатора и влияющих на полученный размер ампликона (смена капилляра, использование праймеров с другой флуоресцентной краской и т.д.).

Биоинформационный анализ результатов VNTR-типирования осуществлялся с помощью программного обеспечения BioNumerics v 6.01 («Applied Maths», Бельгия) методом невзвешенной попарной группировки с усреднением (UPGMA).

Результаты и обсуждение

В последнее десятилетие, изучение геномного полиморфизма инфекционных патогенов позволило сделать существенный рывок в изучении вопросов микробиологии, эпидемиологии, экологии различных возбудителей бактериальных инфекций. Эффективность методологии VNTR-типирования возбудителя холеры отмечена широким кругом авторов [6,7,8,9]. Так, данные полученные Ghosh et al. [7] при исследовании штаммов холерного вибриона O1 и O139 серогрупп, выделенных на различных географических территориях Индии, показали эффективность VNTR-типирования как эпидемиологического инструмента для отслеживания популяционных изменений во времени и пространстве, а также для отслеживания распространения новых заносных холерных вибрионов в популяцию.

На протяжении более тридцати лет, в водоемах Дальнего Востока периодически обнаруживаются нетоксигенные вибрионы эльтор. На этом фоне в 1999 г. в гг. Владивосток и Южно-Сахалинск зарегистрирована крупная вспышка холеры, которой предшествовал занос инфекции из Китая [4,5]. В 2013 г. в Хабаровском крае при мониторинге водных объектов на вибриофлору изолированы потенциально-эпидемически опасные варианты вибриона эльтор, несущие в геноме детерминанту токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA*[2]. Получение индивидуального генетического профиля изолируемых штаммов *V. cholerae eltor* и изучение их клональной структуры является одной из задач эпидемиологического надзора за холерой.

При анализе полученных VNTR-профилей исследуемых 137 штаммов *V. cholerae eltor* установлена как внутри-, так и межкластерная дифференциация в зависимости от эпидемической значимости изолятов.

Среди 34 токсигенных штаммов, изолированных из клинического материала и объектов окружающей среды Приморского края и Сахалинской области, установлено 11 VNTR-генотипов, из которых доминирующие – четыре кластерных генотипа. Отметим, что два крупных кластера со сходными генотипами образованы штаммами *V. cholerae eltor*, изолированными в Сахалинской области (первый кластерный генотип с 14 изолятами) и Приморском крае (второй кластер с 8 изолятами), т.е. просле-

живается привязка к территории распространения вспышек и определяется свой доминирующий генотип для каждой территории распространения

В клональном комплексе, образованном нетоксигенными изолятами, отдельной ветвью представлены потенциально-эпидемически опасные варианты *V. cholerae eltor*, изолированные в 2013 г. из р. Черная Хабаровского края. Как уже отмечалось, для данных штаммов характерно наличие локуса VcB с большим числом повторов, в сравнении с токсигенными штаммами (30). Локус VcB ассоциирован с геном токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA*, что и определило исследуемые штаммы в группу потенциально-эпидемически опасных.

Согласно анализу штаммов вибриона эльтор, выделенных на различных этапах текущей пандемии холеры, большое число повторов по локусу VcB (VCA0283) является характерным для изолятов седьмой пандемии [9].

В отличие от потенциально-эпидемически и эпидемически опасных вариантов нетоксигенные вибрионы эльтор характеризуются отсутствием в геноме локуса VcB и высоким генетическим разнообразием. Для них установлено 70 VNTR-генотипов с дифференциацией на 16 кластерных и 54 уникальных. При распределении VNTR-профилей по времени выявлено, что полученные кластеры идентичных генотипов объединили, в основном, штаммы, связанные годом изоляции вне зависимости от водного объекта из проб которых они были изолированы. Возможно, влияние в данный период времени определенных внешних факторов привело к селективному распространению таковых вибрионов эльтор с последующей их бактериологической изоляцией. Так, на протяжении с июля по сентябрь 2007 г. на территории Приморского края из рек Раздольная, Славянка, Репьевка, Комаровка изолировано 25 штаммов *V. cholerae eltor*. Из них шесть из восьми, взятых в исследование, имеют идентичные VNTR-профили.

Одиннадцать штаммов холерного вибриона, выделенных в Хабаровском крае до изоляции *tcpA*⁺-положительных штаммов (1979, 2004, 2006 гг.) характеризуются отсутствием локуса VcB и полиморфизмом генотипов, заключающемся в их уникальности и схожести. Сходный генотип со штаммами с геном *tcpA*⁺ (идентичность по локусам VcC, VcG и отличие на один повтор по локусам VcA, VcD) установлен для изолята, выделенного ранее из р.Черная в 2004 г.

В целом анализ выборки показал, что для изолятов *V. cholerae eltor* периода эпидблагополучия характерен полиморфизм аллелей. По локусу VcA для них установлено наличие 20 аллелей в противоположность единственному варианту по этому локусу у токсигенных вариантов. Консервативность по числу аллелей прослеживается в отношении локусов VcD и VcG (6 и 7 аллелей, соответственно) с часто встречаемым числом повторов для нетоксигенных холерных вибрионов – 3 (по VcD), 2 (по VcG), для токсигенных – 7 (по VcD), 8 (по VcG).

Таким образом, по результатам VNTR-типирования штаммов *V. cholerae eltor*, выделенных в период осложнений и благополучия по холере на территориях Приморского, Хабаровского краев, Сахалинской области установлен значительный полиморфизм структуры tandemных повторов у нетоксигенных изолятов, заключающийся, в большинстве случаев, в уникальности их VNTR-генотипов. Идентичные генотипы выявлены у вибрионов эльтор, изолированных в течение одного эпидемиологического сезона, что, возможно, связано с влиянием в данный период времени определенных внешних факторов, приведших к селективному распространению адапционно устойчивых вибрионов эльтор вне зависимости от водного объекта. Для токсигенных штаммов *V. cholerae eltor* по результатам типирования характерна высокая клональность изолятов и кластеризация их VNTR-генотипов по территориальному признаку.

Литература

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б. и др. Вариабельные tandemные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae* // Биотехнология. – 2001. – № 6. – С. 85-88.
2. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В. и др. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Хабаровского края в 2013 г. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2014. – Вып. 1. – С. 121–125.
3. Марамович А.С., Урбанович Л.Я., Ганин В.С. и др. Холера в Сибири и на Дальнем Востоке на этапах VII пандемии // Бюл. ВСНЦ СО РАМН. – 2004. – №1, Т.2. – С.116–123
4. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Владивостоке // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С.26-31
5. Онищенко Г.Г., Марамович А.С., Голубинский Е.П., Папиренко Е.В. и др. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Южно-Сахалинск // Журн. микробиол. – 2000. – № 5. – С.31–35
6. Danin-Poleg Y., Cohen L.A., Gancz H. et al. *Vibrio cholerae* Strain Typing and Phylogeny Study Based on Simple Sequence Repeats // J. Clin. Microbiol. – 2007. – Vol. 45, No. 3. – P. 736-746

7. Ghosh R., Nair G.B, Tang L. et al. Epidemiological study of *Vibrio cholerae* using variable number of tandem repeats // FEMS Microbiol Lett.–2008.– No. 288.– P. 196–201
8. Kendall E.A., Chowdhury F., Begum Y. et al. Relatedness of *Vibrio cholerae* O1/O139 Isolates from Patients and Their Household Contacts, Determined by Multilocus - Variable Number Tandem Repeat Analysis // Journal of Bacteriology.–2010.–Vol.192, No. 17.– P. 4367–4376
9. Lam C., Octavia S., Reeves P.P., Lan R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae* // BMC Microbiology. – 2012. – Vol.12, No.82.

Сведения об авторах

Хунхеева Жанна Юрьевна – врач-бактериолог лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: khunkheeva2011@yandex.ru).

Миронова Лилия Валерьевна – кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: mironova-lv@yandex.ru).

Пономарева Анна Сергеевна – врач-бактериолог лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора, e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru).