

Э.Г. Гольдапель, Л.В. Миронова, М.В. Афанасьев, С.В. Балахонов

**АЛЛЕЛЬНЫЙ ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНОВ «ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА»
НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ
СИБИРИ И ДАЛЬНЕГО ВОСТОКА****ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока»
Роспотребнадзора, г. Иркутск**

Проведен анализ структуры комплекса генов «домашнего хозяйства» нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae*. Исследовано 20 изолятов, которые дифференцировались на девять сиквенс-типов, пять из которых – уникальных. Установлена кластеризация по принадлежности к серогруппе: в одну группу вошли все штаммы R0 варианта холерного вибриона и один O139 серогруппы, в другую – все штаммы O1 серогруппы. В ряде случаев установлена связь сиквенс-типа с местом и временем выделения штаммов, однако объединение штаммов в наиболее распространенный сиквенс-тип, не зависело от пространственно-временных характеристик.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, аллельный полиморфизм, мультилокусное сиквенс-типирование

**ALLELIC POLYMORPHISM OF ATOXIGENIC *VIBRIO CHOLERAЕ* STRAINS
OF HOUSEKEEPING GENES ISOLATED IN SIBERIA AND FAR EAST****E.G. Goldapel, L.V. Mironova, M.V. Afanas'ev, S.V. Balakhonov****Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor, Irkutsk**

There were atoxigenic *Vibrio cholerae* strains housekeeping genes analyzed. There were studied 20 isolates, in which nine sequence types have determined and five of which have described as unique. There were clusters formed as belonging to serogroup: first cluster includes R0-variant strains and one O139 serogroup strain of *V. cholerae*, second – all O1 serogroup *V. cholerae* strains. There are sequence types associated with place and time isolation strains in some cases, although differentiation of the strains, which are formed the dominant sequence type strains group have no spatial and temporal characteristics associated.

Key words: *Vibrio cholerae*, allelic polymorphism, multi locus sequence typing

ВВЕДЕНИЕ

Холера – особо опасное инфекционное заболевание, склонное к пандемическому распространению [4]. По данным ВОЗ ежегодно холерой заболевают от трех до пяти миллионов человек, с более чем 2 % (до 120 тыс.) летальных исходов [11]. За всю историю человечества известно о семи пандемиях, инфекционным агентом которых являлся холерный вибрион. Первые шесть пандемий, как принято считать, были обусловлены классическим биоваром *V. cholerae*, а последняя – биоваром эльтор холерного вибриона [2, 5]. Нехарактерная продолжительность во времени седьмой пандемии относительно предшествующих, географическая распространенность, способность возбудителя персистировать в определенных экологических нишах и существование его авирулентных вариантов определяет необходимость углубленного исследования особенностей *Vibrio cholerae*.

Эпидемиологические наблюдения за холерой, с точки зрения молекулярной эпидемиологии, были ограничены до начала 70-х годов в связи с отсутствием информативных методов типирования. Однако, последние десятилетия, характеризующиеся развитием ДНК-технологий, включающих методы типирования при помощи секвенирования, открыли новые возможности в изучении микроорганизмов [1, 3, 9, 12]. Один из таких методов – мультилокусное сиквенс-типирование

(MLST), впервые разработанный и описанный в 1998 г. M.C. J. Maiden et al. для исследования *Neisseria meningitidis* [7]. Данный метод, заключающийся в анализе нуклеотидных последовательностей нескольких «housekeeping» генов, ставший «преемником» мультилокусного энзим-электрофореза, был обозначен в работе M.V. Larsen как «золотой стандарт» в типировании многих видов микроорганизмов [6]. На этапах становления применения MLST в изучении *V. cholerae* использовались различные схемы, в том числе вариант, включающий определение структуры четырех генов «домашнего хозяйства» (*mdh*, *hlyA*, *recA*, *dnaE*) [3]. В настоящее время представлены более развернутые схемы MLST, но стандартной по-прежнему не существует [8, 10].

Цель работы: анализ структуры комплекса генов «домашнего хозяйства» нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, изолированных на территории Сибири и Дальнего Востока.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе исследовано 20 нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке в период эпидемиологического благополучия в разные годы седьмой пандемии, как из объектов окружающей среды – 19, так и из клинического материала – 1. Исследованные штаммы типичны по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам, 15 из них характеризуются принадлежностью к *V. cholerae*

О1 серогруппе, 1 – к *V. cholerae* O139 серогруппе и 4 штамма – к *V. cholerae* RO варианту.

ДНК выделяли раствором додецилсульфата натрия с дальнейшей депротеинизацией смесью хлороформ – изоамиловый спирт и осаждением этиловым спиртом. Концентрация ДНК определялась на спектрофотометре NanoVue Plus (GE Health Care, США).

Для мультилокусного секвенирования использована схема Garg P. с соавт., включающая определение нуклеотидной последовательности генов «домашнего хозяйства»: *dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *gyrB*, *cat*, *chi*, *gmd*, *rstA* [8].

Для амплификации указанных генов использовались две программы: 1 – для генов *dnaE*, *lap*, *pgm*, *cat*, *rstA*; 2 – для генов *recA*, *chi*, *gmd*, *gyr*.

Программа 1:

Стартовая денатурация 95 °С – 5 мин

Денатурация 94 °С – 30 с

Отжиг праймеров 60 °С – 30 с 25 циклов

Элонгация 72 °С – 30 с

Заключительная элонгация 72 °С – 5 мин.

Программа 2: отличалась от первой температурой отжига праймеров, которая составила 58 °С.

Ампликоны перед сиквенсной реакцией обрабатывались щелочной фосфатазой (1 Ед) и экзонуклеазой I (10 Ед) «Fermentas» (Литва).

Секвенирование анализируемых генов осуществлялось с использованием набора ABI Prism BigDye v.1.1 Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit («Applied Biosystems», США) на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США).

Полученные нуклеотидные последовательности анализировались в программе VectorNTI v. 10.0 (Invitrogen Corp., USA). Для статистического анализа фрагментов генов применялась программа DNasequencePolymorphism v. 5.10.01 (Universitat de Barcelona, Spain) и Bionumerix 6.0 (Applied Maths, Бельгия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При проведении кластерного анализа по структуре гена *dnaE* выявлено пять аллелей. Уникальным генотипом обладают штаммы *V. cholerae* И-1353 (выделен в Приморском крае в 2000 году) и *V. cholerae* RO 4-06 (изолирован в Иркутской области в 2006 г.). Количество полиморфных сайтов в структуре анализируемого участка – 19 с 20 мутациями. Анализ мутаций показал, что 18 относится к синонимичным, 2 – к несинонимичным. Индекс полиморфизма составил 0,58.

По структуре гена *lap* исследуемые штаммы распределились на восемь генотипов. У одного штамма (*V. cholerae* 4-06) отсутствовал ген, у трех – уникальные аллели (*V. cholerae* И-1353, *V. cholerae* И-16, *V. cholerae* И-1421). Обособленным генотипом характеризовались изоляты из Приморского края, образовавшие два генотипа, к одному относятся выделенные в 2000 г., а к другому – в 2006 г. Количество полиморфных сайтов совпадает с количеством замен и составляет 18 (17 синонимичных и 1 несинонимичная). Индекс полиморфизма составил 0,81.

При кластерном анализе данных секвенирования гена *gyrB* выявлено семь генотипов, пять из которых уникальны (штаммы *V. cholerae* И-1353, *V. cholerae*

И-16, *V. cholerae* И-1421, *V. cholerae* 4-06, *V. cholerae* 99-06-В). Количество синонимичных замен 24, в 23 полиморфных сайтах. Индекс полиморфизма – 0,58.

По структуре гена *chi* выявлено шесть генотипов, в числе которых четыре уникальных – штаммы *V. cholerae* И-1353, *V. cholerae* И-16, *V. cholerae* И-1421, *V. cholerae* 4-06. Количество полиморфных сайтов 38 с 39 мутациями, из которых 33 синонимичные и 6 несинонимичные. Индекс полиморфизма 0,51.

Единственным наиболее консервативным в ряду исследуемых генов оказался ген *gmd*. В один генотип вошли 14 штаммов, принадлежащие к О1 серогруппе, штамм *V. cholerae* И-1421 отличается лишь одним нуклеотидом от указанных выше. У штаммов RO отсутствовал данный ген. Уникальный генотип выявлен у *V. cholerae* О139 серогруппы И-16, который характеризуется наличием 135 полиморфных сайтов. Полиморфизм данного гена подтвердился при сопоставлении нуклеотидных последовательностей в международной базе данных Genbank. Сходство составило 100 % и 99 % с депонированными фрагментами штаммов, той же серогруппы, под регистрационными номерами AS238 и SG20 соответственно. Индекс полиморфизма – 0,24.

Особое внимание стоит уделить аллельной вариабельности генов *pgm*, *recA*, *cat*, *lap* поскольку для них характерен наибольший индекс полиморфизма в данной выборке 0,84; 0,7; 0,7; 0,81 соответственно. Сопоставление результатов кластерного анализа по структуре генов *recA* и *cat* показало идентичность распределения штаммов по генотипам для того и другого локуса. По указанным генам штаммы дифференцируются на восемь генотипов, с одним доминирующим, включающим 11 изолятов.

Ген *rstA*, входящий в состав мобильных генетических элементов, ассоциированных с патогенностью холерного вибриона (профаги CTX и RS1), по результатам ПЦР отсутствует в геноме всех исследованных штаммов, что стало основанием для исключения его из схемы типирования.

Анализ комплекса семи «housekeeping» генов показал, что исследуемые штаммы дифференцируются на девять сиквенс-типов. При этом прослеживаются те же закономерности кластеризации штаммов, что и по отдельным локусам. Так, уникальным сиквенс-типом обладают пять штаммов *V. cholerae* (4-06, И-16, И-1353, И-1421, 99-06-В). Кроме того, отдельные сиквенс-типы образуют два штамма, выделенные из поверхностных водоемов Приморского края в 2000 г. (*V. cholerae* И-1354, *V. cholerae* И-1357), два штамма из того же региона 2006 г. (150-06-В, 151-06-В) и два изолята, выделенные в г. Иркутске в 2010 г. (*V. cholerae* И-1447, *V. cholerae* И-1452). Индекс Хантера-Гастона в целом по выборке составил 0,79 (рис. 1).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате мультилокусного сиквенс-типирования нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, изолированных из поверхностных водоемов на фоне эпидемиологического благополучия в разные периоды седьмой пандемии установлен полиморфизм структуры их «housekeeping» генов (табл. 1).

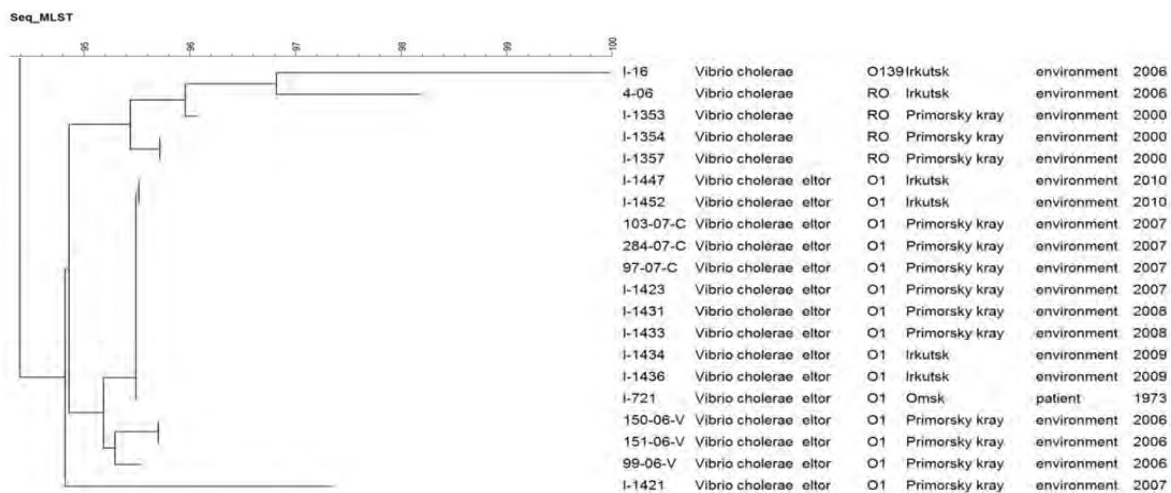


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по алгоритму neighbor joining, на основании анализа нуклеотидных последовательностей комплекса генов «домашнего хозяйства» 20 штаммов *V. cholerae*.

Таблица 1

Анализируемые фрагменты генов

Ген	Кодируемый продукт	Размер секвенированного фрагмента, п.о.	Количество генотипов
<i>dnaE</i>	DNA polymerase III alpha subunit	406	5
<i>lap</i>	leucyl aminopeptidase	390	6
<i>recA</i>	recombinase A	579	8
<i>pgm</i>	phosphoglucomutase	554	9
<i>gyrB</i>	DNA gyrase subunit B	495	6
<i>cat</i>	catalase	490	8
<i>chi</i>	chitinase	284	6
<i>gmd</i>	GDP-mannose 4,6-dehydratase	416	3

При этом кластеризация прослеживается по принадлежности штаммов к серогруппе. В один кластер вошли все штаммы *V. cholerae* RO варианта и один O139 серогруппы, в другой – все штаммы O1 серогруппы. В ряде случаев установлена связь сиквенс-типа штамма с местом и временем его выделения, вместе с тем, объединение штаммов, в наиболее распространенный сиквенс-тип не зависело от пространственно-временных характеристик. Следует выделить четыре локуса (*pgm*, *recA*, *cat*, *lap*), по которым распределение генотипов штаммов отличалось от данных комплексного анализа, лишь на 1–2 аллельных профиля, а в случае гена *pgm* – совпадало с сиквенс-типами, определенными по совокупности генов. Поскольку единая схема MLST для *V. cholerae* до настоящего времени не определена, в перспективе возможно применение сокращенного варианта, используемой в данной работе схемы, включающую изучение структуры генов: *dnaE*, *lap*, *recA*, *pgm*, *gyrB*, *cat*, *chi*, *gmd*, *rstA*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Achtman M. et al. Multilocus sequence typing as a replacement for serotyping in *Salmonella enterica* // PLoS Pathog. – 2012. – Vol. 8. – N 6. – e1002776. doi: 10.1371/journal.ppat.1002776
2. Bogard R.W., Davies B.W., Mekalanos J.J. MetR-regulated *Vibrio cholerae* metabolism is required for virulence // MBio. – 2012. – Vol. 3, N 5. – e00236-12. doi: 10.1128/mBio.00236-12
3. Boonsilp S. et al. A single multilocus sequence typing (MLST) scheme for seven pathogenic *Leptospira* species // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2013. – Vol. 7, N 1. – e1954. doi: 10.1371/journal.pntd.0001954
4. Byun R. et al. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes // Infect. Immun. – 1999. – Vol. 67, N 3. – P. 1116-1124.
5. Faruque S.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 1998. – Vol. 62, N 4. – P. 1301-1314.
6. Larsen M.V. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria // J. Clin. Microbiol. – 2012. – Vol. 50, N 4. – P. 1355-1361. doi: 10.1128/JCM.06094-11
7. Maiden M.C. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within

populations of pathogenic microorganisms // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1998. – Vol. 95, N 6. – P. 3140–3145.

8. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush / Garg P. [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2003. – Vol. 9, N 7. – P. 810–814.

9. Moschioni M. et al. Sequence analysis of 96 genomic regions identifies distinct evolutionary lineages within CC156, the largest *Streptococcus pneumoniae* clonal complex in the MLST database // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 4. – e61003. doi: 10.1371/journal.pone.0061003.

10. Octavia S. [et al.] Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing // PLoS One. – 2013. – Vol. 8, N 6. – e65342. doi: 10.1371/journal.pone.0065342

11. World Health Organization. Cholera. 2012. Fact sheet N 107 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs107/en/index.html>.

12. Yeo M. et al. Multilocus sequence typing (MLST) for lineage assignment and high resolution diversity studies in *Trypanosoma cruzi* // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2011. – Vol. 5, N 6. – e1049. doi: 10.1371/journal.pntd.0001049

Сведения об авторах

Гольдапель Эдуард Геннадьевич – младший научный сотрудник лаборатории холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; e-mail: tapuz82@mail.ru)

Миронова Лилия Валерьевна – кандидат медицинских наук, исполняющая обязанности заведующей лабораторией холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; e-mail: mironova-lv@yandex.ru)

Афанасьев Максим Владимирович – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела эпидемиологии ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; e-mail: afanasev-max@mail.ru)

Балахонов Сергей Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, директор ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Роспотребнадзора (664047, г. Иркутск, ул. Трилиссера, 78; тел. (3952) 220-135).

Information about the authors

Goldapel Eduard Gennadievich – junior scientific officer of the laboratory of cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Irkutsk, Trilissera str., 78, 664047; e-mail: tapuz82@mail.ru)

Mironova Liliya Valerievna – candidate of medical sciences, acting head of the laboratory of cholera of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Irkutsk, Trilissera str., 78, 664047; e-mail: mironova-lv@yandex.ru)

Afanasyev Maksim Vladimirovich – candidate of medical sciences, chief scientific officer of the department of epidemiology of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Irkutsk, Trilissera str., 78, 664047; e-mail: afanasev-max@mail.ru)

Balakhonov Sergey Vladimirovich – doctor of medical sciences, MD, professor, director of Irkutsk Antiplague Research Institute of Siberia and Far East of Rospotrebnadzor (Irkutsk, Trilissera str., 78, 664047; tel. (3952) 220-135).