

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 579.843.1:579.251.083.1

Пудова Е.А., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Чеканова Т.А., Сажин А.И., Кирдяшкина Н.П., Бекова М.В., Девяткин А.А., Шипулин Г.А.

## РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ В ФОРМАТЕ ДНК-ЧИПА ДЛЯ ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ VIBRIO CHOLERAE

ФБУН "Центральный НИИ эпидемиологии" Роспотребнадзора, 111123, Москва

*Продолжение 7-й пандемии холеры, таксономическое разнообразие вовлеченных в пандемию штаммов Vibrio cholerae, а также постоянная опасность завоза заболевания на территорию Российской Федерации обуславливают необходимость разработки методов генной диагностики холеры, позволяющих за сравнительно короткое время максимально подробно охарактеризовать штаммы, выделяемые от пациентов или из окружающей среды. В статье представлена информация о создании набора реагентов для генотипирования возбудителей холеры с использованием ДНК-чипа. В состав ДНК-чипа были включены олигонуклеотидные зонды, позволяющие дифференцировать штаммы V.cholerae по серогруппам и био-варам, а также определить их патогенность. Один ДНК-чип позволяет генотипировать до 12 образцов одновременно, при этом время анализа без учета стадии выделения ДНК составляет 5 ч. В ходе работы было исследовано 23 штамма холерных и нехолерных вибрионов и показано полное соответствие результатов типирования на ДНК-чипе с ранее известными характеристиками штаммов. Таким образом, есть основания говорить о перспективности дальнейшей работы над набором реагентов и возможности последующего его применения в лабораториях регионального уровня и референсных центрах.*

**Ключевые слова:** холера; генотипирование; ДНК-чип; набор реагентов.

*E.A. Pudova, M.L. Markelov, V.G. Dedkov, T.A. Tchekanova, A.I. Sadjin, N.P. Kirdiyashkina, M.V. Bekova, A.A. Deviyatkin, G.A. Shipulin*

### THE DEVELOPMENT OF REAGENTS SET IN THE FORMAT OF DNA-CHIP FOR GENETIC TYPING OF STRAINS OF VIBRIO CHOLERAE

The central research institute of epidemiology of Rospotrebnadzor, 111123 Moscow, Russia

*The necessity of development of methods of genic diagnostic of cholera is conditioned by continuation of the Seventh pandemic of cholera, taxonomic variability of strains of Vibrio cholerae involved into pandemic and also permanent danger of delivery of disease to the territory of the Russian Federation. The methods of genic diagnostic of cholera make it possible in a comparatively short time to maximally minutely characterize strains isolated from patients or their environment. The article presents information about working out reagents set for genetic typing of agents of cholera using DNA-chip. The makeup of DNA-chip included oligonucleotide probes making possible to differentiate strains of V. cholerae on serogroups and biovars and to determine their pathogenicity. The single DNA-chip makes it possible to genetically type up to 12 samples concurrently. At that, duration of analysis without accounting stage of DNA separation makes up to 5 hours. In the progress of work, 23 cholera and non-cholera strains were analyzed. The full compliance of DNA-chip typing results to previously known characteristics of strains. Hence, there is a reason to consider availability of further development of reagents set and possibility of its further application in laboratories of regional level and reference centers.*

**Key words:** cholera, genetic typing, DNA-chip, reagents set.

**Введение.** Ситуация по заболеваемости холерой в мире на начало 2013 г. остается неблагоприятной. По данным Роспотребнадзора, в 2012 г. в мире зарегистрировано более 190 тыс. случаев заболевания [1]. Сведения о многочисленных крупных вспышках в разных странах мира и формировании новых эндемичных очагов позволяют говорить о продолжении 7-й пандемии холеры [2]. Глобальное распространение получили измененные штаммы *Vibrio cholerae* eltor, несущие в себе фрагменты классического генотипа и характеризующиеся повышенной патогенностью. В России и странах СНГ ситуация по заболеваемости холерой характеризуется как нестабильная. Это связано с постоянно существующей опасностью завоза инфекции из неблагополучных по холере стран, а также с риском распространения возбудителей холеры водным, пищевым и контактно-бытовым путем при снижении уровня санитарно-эпидемиологического благополучия.

В настоящее время в России зарегистрированы наборы реагентов для генетической характеристики штаммов холе-

ры с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей электрофоретической детекцией либо детекцией флюоресцентного сигнала в режиме реального времени. Однако данные методы имеют определенные ограничения. Так, детекция результатов ПЦР с помощью электрофореза характеризуется невысокой чувствительностью. Вместе с тем ПЦР в режиме реального времени при гораздо более высокой чувствительности имеет инструментальные ограничения, не позволяющие анализировать более 6 локусов в ходе одной реакции. На сегодняшний день все большее распространение получают методы генодиагностики с использованием ДНК-чипов. Особенностью этой технологии является возможность проведения одномоментного мультилокусного анализа исследуемых штаммов за сравнительно короткое время при высоких уровнях чувствительности и специфичности. Наравне с ПЦР ДНК-чипы можно применять для идентификации и генетического типирования возбудителей различных инфекций в профильных лабораториях Роспотребнадзора, Россельхознадзора и иного территориального и регионального уровня, а также в мобильных лабораториях специализированных противозидемических бригад [3].

Целью настоящей работы являлась разработка набора реагентов на основе ДНК-чипа, предназначенного для генотипирования холерных вибрионов.

Для корреспонденции:

Пудова Елена Александровна, науч. сотр.  
Адрес: 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а  
E-mail: el\_pudov@mail.ru

## Штаммы, использованные в работе

Штамм	Предоставившее штамм учреждение	Время и место выделения	Источник выделения
<i>V. cholerae</i> eltor U-1336 (Огава)	ГНЦ ПМБ, Оболенск	НИ	НИ
<i>V. cholerae</i> 569В (Инаба)	То же	НИ	НИ
<i>V. cholerae</i> O139, U12	" "	НИ	НИ
<i>V. cholerae</i> 16348	" "	НИ	НИ
<i>V. cholerae</i> O1 33 Дакка	РосНИПЧИ "Микроб", Саратов	1958 г., Пакистан	Больной
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-878	То же	1971 г., Саратов	"
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-818	" "	1970 г., Балаково	"
<i>V. cholerae</i> eltor O1 В-23	" "	1971 г., Волгоград	Проба воды р. Волги
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-1067	" "	1972 г., Волгоград	Больной
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-1289	" "	1994 г., Дагестан	"
<i>V. cholerae</i> eltor O139 МО-45	" "	1993 г., Индия	"
<i>V. cholerae</i> eltor O139 Р-16064	" "	1993 г., Азов	"
<i>V. cholerae</i> eltor O1 КМ-26	" "	1988 г.	Вода открытого водоема
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-1447	" "	2009 г., Элиста	Проба воды Колонского пруда
<i>V. cholerae</i> eltor O1 М-1425	" "	2003 г., Пермь	Проба стоячей воды
<i>V. cholerae</i> eltor O139 М-534	" "	2010 г., Челябинская область	Проба сточных вод, Шелогоно
<i>V. cholerae</i> O32 Р-9741	" "	1972 г., р. Махино	Проба воды
<i>V. alginolyticus</i> 281	" "	1976 г., Новороссийск	Больной
<i>V. damsela</i> ATCC 33539	" "	1997 г., Институт Пастера	НИ
<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809	" "	1997 г., АТСС, США	НИ
<i>V. metschnikovii</i> NCTC 8443	" "	1997 г., Институт Пастера	НИ
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	" "	То же	НИ
<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	" "	1997 г., АТСС, США	НИ

Примечание. Здесь и в табл. 3: НИ – нет информации.

**Материалы и методы.** Материал для исследования был предоставлен Российским научно-исследовательским противочумным институтом "Микроб" (Саратов) и ГНЦ прикладной микробиологии (Оболенск) в виде препаратов очищенной ДНК штаммов *V. cholerae* и других (нехолерных) вибрионов, а также в виде инактивированных культур возбудителей холеры. Список штаммов, использованных в настоящей работе, приведен в табл. 1. Для выделения ДНК из инактивированных культур использовали набор реагентов РибоПРЕП (ЦНИИ эпидемиологии, Россия).

**Дизайн праймеров и зондов.** Для определения патогенности и таксономической принадлежности возбудителей холеры с помощью ДНК-чипа были выбраны следующие локусы генома холерных вибрионов: *ctxA*, *tcpA*, *hlyA*, *whfR*, *wbeT*, *rstR*, *rstC*, *ctxB*. Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов осуществлялся с использованием программного пакета Vector NTI ("Invitrogen Corporation", США) и интернет-инструментов <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> и <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer>. В состав одного из праймеров каждой пары был включен сайт узнавания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7. Праймеры и зонды были синтезированы в ЦНИИ эпидемиологии. Для иммобилизации на слайдах использовали олигонуклеотидные зонды, содержащие аминокислотную группу на 5'-конце. Структура выбранных праймеров и олигонуклеотидных зондов приведена в табл. 2.

**Производство ДНК-чипа.** Для производства ДНК-чипов использовали слайды VALS ("Cel Associates", США), представляющие собой микроскопное стекло размером 25×75×1 мм с альдегидным покрытием. Слайд содержал 12 зон (эреев), в каждой из которых идентичным образом иммобилизованы в виде отдельных пятен (спотов) диаметром около 300 мкм

олигонуклеотидные зонды, комплементарные определенным локусам генома *V. cholerae* (рис. 1). Олигонуклеотидные зонды наносили на поверхность стекла с помощью плоттера S3 ("Sciencion", Германия) для бесконтактного раскапывания нанолитровых количеств растворов. Для того чтобы в область каждого эрея можно было внести отдельный исследуемый образец, на этапе гибридизации использовали 16-луночные трафареты (16-well incubation chamber, "Whatman", Германия), слайды с трафаретами помещали в рамки-держатели (FAST-Frame, "Whatman", Германия).

**Амплификация.** ПЦР-амплификацию проводили в формате "мультипрайм". Праймеры группировали в 2 пробирки по 5 пар в каждой. Таким образом, для каждого образца проводили две ПЦР-реакции. В состав реакционной смеси входили 10 мкл ПЦР-смеси-2blue (ЦНИИЭ, Россия), 2,5 мкл 10x dNTP-mix (ЦНИИЭ, Россия), по 0,08 мкМ прямого и обратного праймеров и 1М бетаин. Объем реакции составлял 25 мкл. Амплификацию выполняли в термоциклере Терцик ("ДНК-Технология", Россия) по следующему протоколу: начальная денатурация при 94°C в течение 2 мин, 35 циклов амплификации (15 с – денатурация при 94°C, 25 с – отжиг праймеров при 60°C, 20 с – элонгация при 72°C), завершающий этап элонгации – 2 мин при 72°C.

**Транскрипция.** Транскрипцию ПЦР-продукта проводили с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7. В состав реакционного буфера входили 40 мМ трис-НСl-буфера (рН 8,0), 6 мМ хлорида магния, 10 мМ хлорида натрия, 10 мМ ДТТ, по 0,25 мМ АТР, СТР и ГТР (ЗАО "Биосан", Россия), 0,2 мМ УТР (ЗАО "Биосан", Россия), 0,05 мМ biotin-УТР ("ДНК-Синтез", Россия), 50 ед. ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага Т7 (ЦНИИЭ, Россия). Для проведения транскрипции в реакцию брали 10 мкл неочищенного ПЦР-

Таблица 2

## Выбранные локусы, праймеры и олигонуклеотидные зонды, использованные в ДНК-чипе для диагностики холеры

Локус	Значимость локуса для генотипирования	Структура праймеров	Структура зонда (ов)
<i>ctxA</i>	Оценка патогенности	Forw: aat tct aat acg act cac tat agg gag at att gct cca gca gca gat ggt t Rev: atc gat gat ctt gga gca ttc cca ca	ctxA: NH2-C12- ttt ttt ttt ctc caa gct cta tgc tcc
<i>tcpA(eltor)</i>	То же	Forw: aat tct aat acg act cac tat agg gag a gct cag cgt gcg att gat tgc cag a Rev: tac cag tga aag gat t(c/t)t ttg cct cat c	tcpA(eltor): NH2-C12- ttt ttt ttt cca agg ctg acc aaa cca t
<i>tcpA(classic)</i>	" "	Forw: atc atc gtt cta ggc att atg ggg Rev: a at tct aat acg act cac tat agg gag ttt tac cta aac taa cca agc ctg aag	tcpA(classic): NH2-C12- ttt ttt ttt agc gtg cga ttg att cgc ag
<i>wbeT</i>	Принадлежность к серогруппе O1	Forw: ata atc gaa act tca ttt aca atg gag ag Rev: aat tct aat acg act cac tat agg gag a cac aga aag ttc caa cgt ttg cac cga	wbeT: NH2-C12- ttt ttt ttt ccc aga gtg cag ttg aac
<i>wbfR</i>	Принадлежность к серогруппе O139	Forw: aat tct aat acg act cac tat agg gag a cct acg ttt ctg gtt tgc aag ctg gct Rev: aac caa agg ctc atc tag atc cca gt	wbfR: NH2-C12- ttt ttt ttt ca tca cca gac aag cat aca
<i>hlyA</i>	Принадлежность к виду <i>V. cholerae</i> Принадлежность к классическому биовару или эльтор	Forw: agt cgt cgg ttc tgt aaa gat gcc Rev: a att cta ata cga ctc act ata ggg aga tgc tat aac tgg ctc caa act gac g	hlyA(classic): NH2-C12- ttt ttt ttt agc cgg ctg atc aac tgc g hlyA(eltor): NH2-C12- ttt ttt ttt gcc ggc att cat ctg aat g
<i>rstR(classic)</i>	Принадлежность к классическому биовару	Forw: att agg gat tta aga gtt gag aga gat c Rev: a att cta ata cga ctc act ata ggg aga tgc act ctt act tct cat cag caa ag	rstR(classic): NH2-C12- ttt ttt ttt tcc gaa tga ttg aat cac ttg
<i>rstR(eltor)</i>	Принадлежность к эльтор-биовару	Forw: tga aga taa aag aaa ggc tag cca acc Rev: a att cta ata cga ctc act ata ggg aga aag cac cat gat tta aga tgc tct tgg	rstR(eltor): NH2-C12- ttt ttt ttt tca att gat gaa cta tgc ggc
<i>rstC</i>	То же	Forw: aca ctt taa tgg atg ttt acg ata gcc Rev: a att cta ata cga ctc act ata ggg aga tta cag tga tgg ctc agt caa tgc	rstC: NH2-C12- ttt ttt ttt ata tct gcg ttc agg cg
<i>ctxB</i>	Принадлежность к классическому биовару или эльтор	Forw: tta cag ttt tac tat ctt cag cat atg Rev: a att cta ata cga ctc act ata ggg aga ata cta att gcg gca atc gca tga g	ctxB-115-C: NH2-C12-tttttttt aca aca cac aaa tac ata cgc ctxB-115-C (inosin): NH2-C12- ttt ttt ttt aca aca cai aaa tac ata cgc ctxB-115-T: NH2-C12- ttt ttt ttt acc aca aca cac aaa tat ata cg ctxB-115-T (inosin): NH2-C12- ttt ttt ttt acc aca aca cai aaa tat ata cg ctxB-203-C: NH2-C12-tttttttt tgg tgc aac ttt tca agt ag ctxB-203-C (inosin): NH2-C12- ttt ttt ttt tgg tgc aac ttt tci agt ag ctxB-203-T: NH2-C12-tttttttt tgg tgc aat ttt tca agt ag ctxB-203-T (inosin): NH2-C12- ttt ttt ttt tgg tgc aat ttt tci agt ag

продукта из каждой амплификационной пробирки. Общий объем реакции составлял 50 мкл. Реакцию проводили в течение 40 мин при 37°C.

**Гибридизация.** В состав реакционной смеси входили 300 мМ хлорида натрия, 30 мМ цитрата натрия (2x SSC, pH 7,0), 10% формамида, 20 мМ ЭДТА, 0,5% SDS и 10 мкл продукта транскрипции. Объем гибридизационной смеси, вносимой в одну ячейку, составлял 80 мкл. Гибридизацию проводили в течение 40 мин при 37°C и 300 об/мин с использованием термостатируемого шейкера («Biosan», Латвия). После трехкратной отмывки раствором, содержащим 0,75 М хлорида

натрия, 75 мМ цитрата натрия (5x SSC-буфер, pH 7,0) и 0,1% твин-20, слайды инкубировали со стрептавидином, меченым флюоресцирующим красителем Cyanine-5 («Имтек», Россия) в течение 30 мин при 37°C и 300 об/мин с использованием термостатируемого шейкера.

**Измерение флюоресцентного сигнала и учет результатов.** Изображения ДНК-чипа получали с помощью флюоресцентного сканера MArS («Ditabis», Германия). Уровни флюоресцентных сигналов от каждого спота оценивали с помощью программы ScanArray Express («Perkin Elmer», США) а также специализированного программного обеспечения для

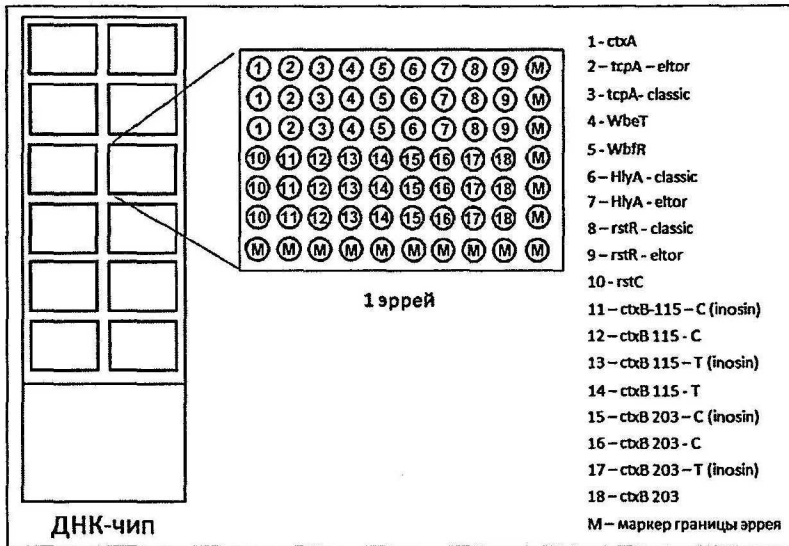


Рис. 1. Схема ДНК-чипа и расположения олигонуклеотидных зондов в эррее. Объяснения см. в тексте.

интерпретации сигналов флюоресценции “SCAN ARRAY PARSER” разработанного в ЦНИИЭ.

**Подтверждение результатов гибридизации.** Специфичность результатов гибридизационного анализа подтверждали посредством электрофоретической детекции продуктов ПЦР в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующего капиллярного секвенирования фрагментов на приборе Genetic Analyzer Abi Prism 3500xl (“Life Technologies”, США).

**Результаты и обсуждение.** В результате настоящей работы был разработан набор реагентов на основе ДНК-чипа, позволяющий определять патогенность и таксономическую принадлежность штаммов *V. cholerae*. Общее время анализа без учета стадии выделения ДНК возбудителя составляло 5 ч, при этом на одном слайде можно одновременно исследовать до 12 образцов (4 лунки трафарета приходятся на область бар-кода).

Для повышения эффективности ДНК-чипа нами была введена стадия транскрипции. Продуктом амплификации при проведении ПЦР является двухцепочечная ДНК, которую перед гибридизацией на ДНК-чипе необходимо денатурировать. Перевод ДНК в одноцепочечную форму традиционно осуществляется путем прогревания или обработки щелочью. По предлагаемой нами методике получение одноцепочечного продукта за счет стадии синтеза РНК с помощью ДНК-зависимой РНК-полимеразы позволяет увеличить эффективность гибридизации на ДНК-чипе и сократить ее длительность.

На рис. 2 отражена схема генотипирования холерных вибрионов на основе выбранных для этого локусов. Подробнее следует остановиться на определении биовара, поскольку остальные ло-

кусы являются традиционными для формата ПЦР и хорошо описаны в литературе [4 5]. Для определения принадлежности к классическому или эльтор-биоварам нами были использованы 4 фрагмента: *hlyA*, *rstR*, *rstC* и *ctxB*.

Фрагмент *hlyA*, дифференцирующий холерные вибрионы от нехолерных, может быть использован также для дифференциации классического биовара от эльтор, поскольку у представителей классического биовара в этом гене имеется делеция размером 11 нуклеотидов [6]. Нами была выбрана 1 пара праймеров на фрагмент гена *hlyA*, содержащий делецию, и 2 зонда на области делеции, соответствующие классическому и эльтор вариантам.

Ген *rstR*, входящий в состав фрагмента RS2, имеет значительные различия в структуре классических и эльтор штаммов и является биоварспецифическим [7]. На локус *rstR* были выбраны 2 пары праймеров: для амплификации классического и эльтор вариантов. У вибрионов эльтор, кроме того, имеется фрагмент *rstC*, отсутствующий у классических штаммов, следовательно, определение наличия этого локуса может послужить дополнительным маркером принадлежности к биовару эльтор.

Отдельное внимание следует уделить генотипированию локуса *ctxB*, входящему в состав профага СТХφ и кодирующему субъединицу В холерного токсина. Ген *ctxB* имеет протяженность 375 пар оснований. На основе ряда однонуклеотидных полиморфизмов выделяют несколько генотипов этого локуса. Среди возбудителей 7-й пандемии холеры выделены атипичные штаммы, несущие в себе ген *rstR* типа эльтор и ген *ctxB* классического типа [8], поэтому одновременный анализ структуры этих фрагментов является крайне актуальным. Классический и эльтор варианты гена *ctxB* (обозначаемые как *ctxB1* и *ctxB3* соответственно) различаются всего двумя нуклеотидами: в положении 115 [С/Т] и в положении 203 [С/Т]. Анализ однонуклеотидных замен с помощью гибридизации на ДНК-чипе представляет определенную сложность, поскольку при наличии всего одного мисс-матча стабильность гетеродуплекса может оставаться достаточно высокой и флюоресцентный сигнал будет получен при любом варианте генотипа. Следовательно, вывод о принадлежности к тому или иному генотипу можно сделать на основании сравнения сигналов флюоресценции с двух зондов,



Рис. 2. Принцип выбора локусов для генотипирования холерных вибрионов.

Таблица 3

Результаты генотипирования 23 штаммов рода *Vibrio* с помощью ДНК-чипа

№	Штамм	Характеристика	Патогенность		Серогруппа	Биовар			ctxB	
			ctxA	tcpA		wbeT/wbfR	rstC	rstR	hlyA	ctxB 115
1	<i>Vibrio cholerae</i> eltor U-1336 (Орава)	ctxA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor	eltor	C	C
2	<i>Vibrio cholerae</i> 569B (Инаба)	ctxA+ wbeN+ hlyA <sup>classic/ne O1</sup> -	+	+	wbeT	-	classic	classic	C	C
3	<i>Vibrio cholerae</i> O139, U12	ctxA+ tcpA+ wbfR+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbfR	+	eltor	eltor	T	T
4	<i>Vibrio cholerae</i> 16348	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> -	+	+	wbeT	-	classic	classic	C	C
5	<i>Vibrio cholerae cholerae</i> O133 Дакка	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> -	+	+	wbeT	-	classic	classic	C	C
6	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-878	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor	eltor	T	T
7	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-818	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor	eltor	T	T
8	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 B-23	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor	eltor	T	T
9	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-1067	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>actor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor	eltor	T	T
10	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-1289	ctxA+ tcpA+ wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbeT	+	eltor + classic	eltor	C	C
11	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O139 MO-45	ctxA+ tcpA+ wbfR+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbfR	+	eltor	eltor	T	T
12	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O139 P-16064	ctxA+ tcpA+ wbfR+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	+	+	wbfR	+	eltor	eltor	T	T
13	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 KM-26	ctxA- tcpA- wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	-	-	wbeT	-	eltor	eltor	-	-
14	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-1447	ctxA- tcpA- wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	-	-	wbeT	-	eltor	eltor	-	-
15	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O1 M-1425	ctxA- tcpA- wbeN+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	-	-	wbeT	-	-	eltor	-	-
16	<i>Vibrio cholerae</i> eltor O139 M-534	ctxA- tcpA- wbfR+ hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	-	-	wbfR	-	-	eltor	-	-
17	<i>Vibrio cholerae</i> O32 P-9741	ctxA- tcpA- wbeN- wbfR- hlyA <sup>eltor/ne O1</sup> +	-	-	-	-	-	eltor	-	-
18	<i>V. alginolyticus</i> 281	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-
19	<i>V. damsela</i> ATCC 33539	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-
20	<i>V. fluvialis</i> ATCC 33809	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-
21	<i>V. metschnikovi</i> NCTC 8443	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-
22	<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-
23	<i>V. vulnificus</i> ATCC 27562	НИ	-	-	-	-	-	-	-	-

соответствующих двум разным вариантам полиморфизма. Для того чтобы получить достоверную разницу между сигналами, нами были протестированы несколько вариантов зондов: зонды, полностью комплементарные исследуемому фрагменту гена *ctxB*; зонды, содержащие мутацию в следующем за полиморфизмом положении; зонды, содержащие мутацию на расстоянии 5–6 нуклеотидов от места полиморфизма; зонды, содержащие инозин на расстоянии 5–6 нуклеотидов от места полиморфизма. Общая длина комплементарной части зондов равнялась 19 основаниям. Эмпирически за достоверную разницу нами было принято превышение сигнала флюоресценции одного зонда из пары над другим в 2 раза и более. Наибольшая информативность была показана для одновременного использования

пар зондов, полностью комплементарных ДНК холерного вибриона, и пар зондов, содержащих инозин.

В ходе работы нами было протестировано 23 образца ДНК холерных и нехолерных вибрионов. Результаты представлены в табл. 3.

По результатам генотипирования холерных штаммов с помощью ДНК-чипа к виду *V. cholerae* по наличию гена *hlyA* были отнесены 17 штаммов (№ 1–17). К эпидемиологически значимым по наличию локусов *tcpA* и *ctxA* были отнесены 12 образцов (№ 1–12). К группе O1 по наличию фрагмента *wbeT* были отнесены 12 штаммов (№ 1, 2, 4–10, 13–15), к группе O139 по наличию фрагмента *wbfR* – 4 штамма (№ 3, 11, 12, 16). К классическому биовару по наличию классического варианта локуса *rstR* и классического варианта *ctxB* были от-

несены 3 штамма (№ 2, 4, 5). К биовару эльтор по наличию фрагмента *rstR* типа эльтор следует отнести 11 штаммов (№ 1, 3, 5–13). При этом штамм № 1 (*V. cholerae* *eltor* U-1336 (предоставлен ГНЦ ПМБ, Оболенск) содержит фрагмент *rstR* типа эльтор и классический вариант локуса *ctxB*, на основании чего он отнесен к измененным штаммам эльтор. Штамм № 10 (*V. cholerae* *eltor* O1 M-1289) (предоставлен РосНИИПЧИ “Микроб”, Саратов) содержит одновременно и классический, и эльтор варианты фрагмента *rstR*, а также классический вариант *ctxB*, что соответствует характеристикам гибридных штаммов холеры [9].

Анализ однонуклеотидных замен в локусе *ctxB* с помощью ДНК-чипа в некоторых случаях остается трудно решаемой задачей. С целью увеличения разности уровней флюоресценции помимо введения в состав зондов инозина целесообразно также уменьшить длину самих зондов. Однако существуют штаммы возбудителей холеры, которые несут в себе одновременно как классический, так и эльтор варианты гена *ctxB* [9], и в этом случае генотипирование полиморфизмов в локусе *ctxB* с помощью ДНК-чипа может оказаться затруднительным или невозможным.

В дальнейшем предполагается оптимизировать зонды для определения полиморфизмов локуса *ctxB*, а также включить в состав ДНК-чипа зонды для определения антибиотикорезистентности холерных штаммов.

**Заключение.** В большинстве случаев результаты генотипирования возбудителей холеры, полученные с помощью тестового варианта ДНК-чипа, совпадали с характеристиками исследуемых холерных штаммов. В дальнейшем предстоит определить чувствительность ДНК-чипа, а также включить в его состав локусы для определения антибиотикорезистентности возбудителей. Наши результаты дают основание предполагать, что разрабатываемый ДНК-чип может впоследствии найти применение в референсных центрах и лабораториях регионального уровня для генодиагностики холерных штаммов, полученных из внешней среды или от пациентов.

Работа проводилась в 2012–2013 гг. в рамках Федерально-целевой программы “Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)”.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Об эпидемиологической ситуации по холере в мире и прогнозе на 2013 год. М.: Роспотребнадзор. Available at: [http://67.rosotrebнадзор.ru/c/journal/view\\_article\\_content?groupId=10156&articleId=152112&version=1.0](http://67.rosotrebнадзор.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=152112&version=1.0)
- Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Арешина О.А., Назаретян А.А., Кругликов В.Д. и др. Характеристика эпидемиологической обстановки по холере в мире. Проблемы особо опасных инфекций. 2013; 1: 11–7.
- Куличенко А.Н., Кутырев В.В., Таран А.В. Проблемные вопросы развития молекулярной диагностики особо опасных инфекций. В кн.: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием “Молекулярная диагностика – 2010”. М.; 2010; ч. 1: 397–400.
- Huang J., Zhu Yu., Wen H., Zhang J., Huang Sh., Niu J. et al. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxicogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (22): 6981–85.
- Faruque Shah M., Nair Balakrish G., eds. *Vibrio cholerae: genomics and molecular biology*. Poole: Horizon Scientific Press; 2008: 101–23.
- Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., ред. *Лабораторная диагностика особо опасных инфекций. Практическое руководство*. М.: Медицина; 2009.
- Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. Проблемы особо опасных инфекций. 2008; вып. 97: 5–11.
- Safa A., Nair Bakarish G., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Cell.* 2009; 18 (1): 46–54.
- Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2010; 4: 11–9.

#### REFERENCES

- About the epidemiology of cholera in the world and predictions for 2013. Available at: [http://67.rosotrebнадзор.ru/c/journal/view\\_article\\_content?groupId=10156&articleId=152112&version=1.0](http://67.rosotrebнадзор.ru/c/journal/view_article_content?groupId=10156&articleId=152112&version=1.0) (in Russian)
- Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Arëshina O.A., Nazaretyan A.A., Kruglikov V.D. et al. Characteristics of the epidemiologic situation for cholera in the world. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2013; 1: 11–7. (in Russian)
- Kulichenko A.N., Kutyrev V.V., Taran A.V. Development problems of molecular diagnostics of extremely dangerous infections. In: Proc. 7-th All-Russian conference «Molecular Diagnostics – 2010». Moscow; 2010; part 1: 397–400. (In Russian)
- Huang J., Zhu Yu., Wen H., Zhang J., Huang Sh., Niu J. et al. Quadruplex real-time PCR assay for detection and identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains and determination of their toxicogenic potential. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75 (22): 6981–85.
- Faruque Shah M., Balakrish Nair G., eds. *Vibrio cholerae: genomics and molecular biology*. Poole: Horizon Scientific Press; 2008: 101–23.
- Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., eds. *Laboratory diagnosis of especially dangerous infections. Practical guide*. Moscow: Medizina; 2009. (In Russian)
- Smimova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovskiy Yu.V., Kutyrev V.V. The evolution of the genome of *Vibrio cholerae*: the way of formation of atypical strains. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2008; 97: 5–11. (In Russian)
- Safa A., Bakarish Nair G., Kong R. Y. C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Cell.* 2009; 18 (1): 46–54.
- Smimova N.I., Goryaev A.A., Kutyrev V.V. The evolution of the genome of *Vibrio cholerae* in the modern period. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2010; 4: 11–9. (In Russian)

Поступила 10.10.13