



Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 331–336
Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology, 2022, vol. 22, iss. 3, pp. 331–336
<https://ichbe.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-331-336>

Научная статья
УДК 616.932:615.371



Оценка экспрессии гена *ctxA* штамма *Vibrio cholerae* 569В при производстве холерной вакцины

С. А. Воробьева , А. В. Гаева, О. С. Дуракова, А. А. Крицкий, О. В. Громова, О. А. Волох

ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Россия, 410005, г. Саратов, ул. Университетская, д. 46

Воробьева Светлана Александровна, младший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3624-0850>

Гаева Анна Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7395-9023>

Дуракова Оксана Сергеевна, научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-8823-3524>

Крицкий Андрей Александрович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией патогенных вибрионов, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

Громова Ольга Викторовна, кандидат медицинских наук, доцент, старший научный сотрудник лаборатории холерных вакцин, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>

Волох Оксана Александровна, кандидат биологических наук, заведующая отделом профилактических препаратов, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>

Аннотация. Культивирование производственных штаммов *Vibrio cholerae* является одним из важнейших этапов при производстве холерной бивалентной химической вакцины. При производстве иммунобиологических препаратов необходимо использование штаммов-продуцентов со стабильными свойствами, сохраняющимися в ряде генераций. Целью настоящего исследования являлась оценка экспрессии гена *ctxA* с помощью молекулярно-генетических методов штамма-продуцента *V. cholerae* 569В. Методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов было установлено присутствие в хромосоме данного штамма гена *ctxA*. Методом ПЦР с обратной транскрипцией с учетом результатов в режиме реального времени и цифровой капельной ПЦР регистрировали экспрессию данного гена во всех почасовых пробах культуральной жидкости. Иммунохимическими методами подтверждалось наличие холерного токсина в пробах, с максимальной отметкой на девятом часу, что соответствовало максимальным показателям «концентрации микробных клеток». Таким образом, молекулярно-генетическими методами показана стабильность производственного штамма *V. cholerae* 569В в пробах 4 независимых выращивания.

Ключевые слова: холерная вакцина, *Vibrio cholerae*, цифровая капельная полимеразная цепная реакция, *ctxA*

Для цитирования: Воробьева С. А., Гаева А. В., Дуракова О. С., Крицкий А. А., Громова О. В., Волох О. А. Оценка экспрессии гена *ctxA* штамма *Vibrio cholerae* 569В при производстве холерной вакцины // Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия: Химия. Биология. Экология. 2022. Т. 22, вып. 3. С. 331–336. <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-331-336>

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Evaluation of *ctxA* gene expression of *Vibrio cholerae* strain 569В in the production of cholera vaccine

S. A. Vorobeveva , A. V. Gaeva, O. S. Durakova, A. A. Kritsky, O. V. Gromova, O. A. Volokh

Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, 46 Universitetskaya St., Saratov 410005, Russia

Svetlana A. Vorobeveva, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-3624-0850>

Anna V. Gaeva, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7395-9023>.

Oksana S. Durakova, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-8823-3524>

Andrey A. Kritsky, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

Olga V. Gromova, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0172-2964>.

Oksana A. Volokh, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-3044-971X>



Abstract. Cultivation of production strains of *Vibrio cholerae* is one of the most important stages in the production of cholera bivalent chemical vaccines. In the production of immunobiological preparations, it is necessary to use producer strains with stable properties that persist in a number of generations. The aim of this study was to evaluate the expression of the *ctxA* gene using molecular genetic methods of the *V. cholerae* 569B producing strain. By PCR with electrophoretic accounting of the results, the presence of this strain of the *ctxA* gene in the chromosome was established. The expression of this gene in all hourly samples of culture fluid was recorded by the method of PCR with reverse transcription, taking into account the results in real time and digital drip PCR. Immunochemical methods confirmed the presence of cholera toxin in the samples, with a maximum mark at the ninth hour, which corresponded to the maximum indicators of the "concentration of microbial cells". Thus, molecular genetic methods have shown the stability of the production strain *V. cholerae* 569B in samples of 4 independent cultivations.

Keywords: cholera vaccine, *Vibrio cholerae*, digital drip polymerase chain reaction, *ctxA*

For citation: Vorobeva S. A., Gaeva A. V., Durakova O. S., Kritsky A. A., Gromova O. V., Volokh O. A. Evaluation of *ctxA* gene expression of *Vibrio cholerae* strain 569B in the production of cholera vaccine. *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology*, 2022, vol. 22, iss. 3, pp. 331–336 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1816-9775-2022-22-3-331-336>

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

Введение

На сегодняшний день холера является актуальной инфекцией. Наличие действующих социальных и природных рисков, чрезвычайных ситуаций различного происхождения способствует активизации и продолжительности эпидемий с межконтинентальными, меж- и внутригосударственными заносами холеры в регионы, свободные от инфекции, в том числе в Россию [1, 2]. В качестве профилактических мер возникновения эпидемий рекомендуется использование холерных вакцин [3].

В России вакцинация против холеры включена в Национальный календарь профилактических прививок по эпидемическим показаниям [4].

В нашей стране зарегистрирована и выпускается «Вакцина холерная бивалентная химическая, таблетки, покрытые кишечнорастворимой оболочкой» производства ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Согласно Правилам надлежащей производственной практики (GMP) [5, 6] на всех этапах изготовления вакцины проводится постоянный контроль производственного процесса и качества продукции в соответствии с нормативной документацией.

Токсигенный производственный штамм *V. cholerae* 569В классического биовара серовара Инаба является продуцентом холерного токсина (ХТ), из которого в процессе формоловой детоксикации получают холероген-анатоксин (ХА) – один из компонентов холерной химической вакцины. Согласно нормативной документации, на этапе культивирования проводят контроль активности ХТ биологическими и иммунохимическими методами. Штамм-продуцент проходит проверку на токсигенность, которую проводят методом ПЦР с электрофоретическим учетом результатов.

Современные молекулярно-генетические методы используются для диагностики инфекционных агентов, в том числе холерного вибриона. Сотрудниками РосНИПЧИ «Микроб» разработаны экспериментальные тест-системы для идентификации штаммов *V. cholerae* [7–9]. Следует отметить работы зарубежных авторов, указывающих на применение молекулярно-генетических методов для выявления штаммов холерного вибриона [10, 11]. Применение данных методов для оценки экспрессии генов, ответственных за синтез основных иммуногенов холерного вибриона, на этапах культивирования производственных штаммов-продуцентов ранее не рассматривалось.

Целью настоящей работы являлась оценка экспрессии гена *ctxA* штамма-продуцента *Vibrio cholerae* 569В с помощью молекулярно-генетических методов.

Материалы и методы

Для исследования были отобраны образцы бульонной культуры штамма *V. cholerae* 569В на этапах подготовки посевного материала и почасовые пробы при культивировании в биореакторе.

Определение концентрации микробных клеток осуществляли по отраслевому стандартному образцу (ОСО) мутности бактериальных взвесей.

Для выделения и очистки РНК использовали набор «Total RNA Isolation System» («Promega»). Синтез кДНК на матрице РНК методом обратной транскрипции (ОТ) выполняли с использованием набора «Реверта». В реакцию ОТ брали 950 нг РНК (в соответствии с инструкцией), на основе которой получали кДНК.

Анализ штамма-продуцента на присутствие в хромосоме гена *ctxA* проводили с использованием тест-системы для выявления



ДНК *V. cholerae* (*ctxA*+) методом полимеразной цепной реакции (ГенХол) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»). Продукты ПЦР-амплификации анализировали методом электрофореза в 1–2% агарозном геле с добавлением 0,5 мкг/мл этидия бромид. Для регистрации результатов ПЦР использовали «GelDoc 2000» («BioRad», США).

Для проведения оценки экспрессии гена *ctxA* использовали ПЦР с обратной транскрипцией с учетом результатов в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) и цифровую капельную ПЦР (цкПЦР).

ОТ-ПЦР проводили с использованием прибора Rotor-Gene Q («Qiagen») по следующей программе: шаг 1: 95°C – 5 мин (1 цикл); шаг 2: 95°C – 15 с, 60°C – 60 с (35 циклов), с детекцией флуоресцентного сигнала на канале Green во время стадии отжига/элонгации. Для амплификации были использованы специфические праймеры на гены *ctxA* (*ctxA*-F, *ctxA*-R) и *recA* (*recA*-F, *recA*-R), и зонд с детекцией по каналу FAM, рассчитанные Крицким А. А. с соавт. [12] Окончательную оценку уровня экспрессии генов осуществляли методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, который учитывает уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства» *recA*, считающийся постоянным. Обработку результатов осуществляли с использованием программного обеспечения к прибору Rotor-Gene Q.

цкПЦР осуществляли с помощью системы для проведения монокапельной цифровой ПЦР QX100 («Bio-Rad») по следующей программе: шаг 1: 95°C – 5 мин (1 цикл); шаг 2: 95°C – 15 с, 56°C – 60 с (35 циклов), с детекцией флуоресцентного сигнала на канале Green во время стадии отжига/элонгации. Для амплификации использовали вышеуказанные праймеры.

Для проведения абсолютного количественного анализа ДНК-мишени вычисляли соотношение ПЦР-положительных и ПЦР-отрицательных капель в одном микролитре образца с помощью программного обеспечения QuantaSoft.

ХТ в отобранных образцах детектировали иммунохимическими методами (РПИГ, дот-иммуноанализ с золотыми наночастицами).

Результаты и их обсуждение

Нами был проведен анализ токсигенных свойств производственного штамма *V. cholerae* 569В на присутствие в хромосоме гена *ctxA* с помощью тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* (*ctxA*+) (ГенХол) (ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб») методом полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов. Во всех исследованных образцах выявлено наличие гена *ctxA*, размером 564 п.н. (рис. 1).

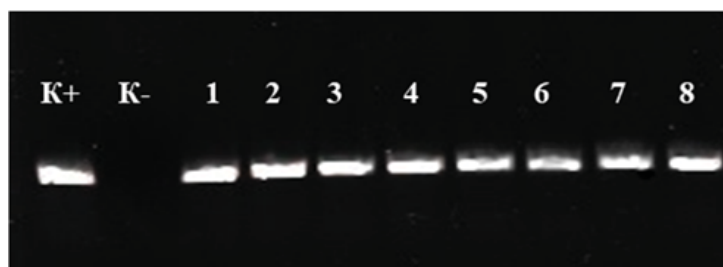


Рис. 1. Выявление гена *ctxA* в хромосоме штамма *V. cholerae* 569В с использованием тест-системы ГенХол методом полимеразной цепной реакции: 1–3 – ДНК, выделенная из проб *V. cholerae* 569В с 1-й по 3-ю генерацию; 5–8 – ДНК, выделенная из проб *V. cholerae* 569В с 5-го по 9-й час культивирования

Fig. 1. Identification of the *ctxA* gene in the chromosome of *V. cholerae* strain 569В using the GenHol test system by polymerase chain reaction: 1–3– DNA isolated from *V. cholerae* 569В samples in the 1st to 3rd generation; 5–8 – DNA isolated from *V. cholerae* 569В samples in the 5th to 9th hour of cultivation

Следующим этапом работы стала оценка экспрессии гена *ctxA* методами ОТ-ПЦР и цкПЦР.

Полученные данные показали, что в пробах, отобранных на 5-м и 8-м часу культивирования штамма *V. cholerae* 569В происходило увеличение экспрессии гена *ctxA*. С 6-го по 7-й и на 9-й час нами отмечалось незначительное снижение экс-

прессии (рис. 2). Результаты по показателю «концентрация микробных клеток» свидетельствовали об увеличении прироста биомассы на 6–7-м часу выращивания, с максимумом на 9-м (рис. 3). Наличие ХТ в пробах подтверждалось иммунохимическими методами с 3-го часа при нарастании к 6-му и с максимальным значением к 9-му часу.

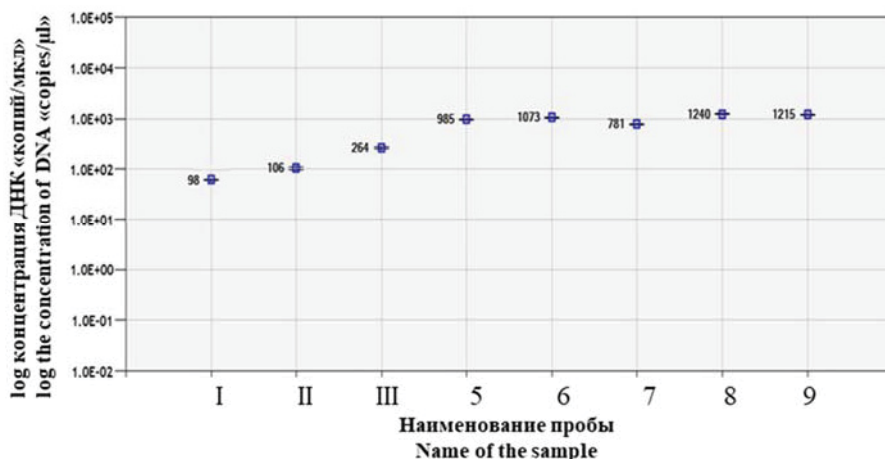


Рис. 2. Результаты, полученные методом цкПЦР. Концентрации целевых молекул ДНК в единицах «копий/мкл». I, II, III – пробы отобранные с 1-й по 3-ю генерации при подготовке посевного материала; 5–9 – часовые пробы, отобранные при культивировании в биореакторе *V. cholerae* 569B

Fig. 2. Results obtained by PCR. Concentrations of target DNA molecules in units of “copies/μl”. I, II, III – samples taken from generation 1 to generation 3 during seed preparation; 5–9 – hour samples taken during cultivation in *V. cholerae* 569B bioreactor

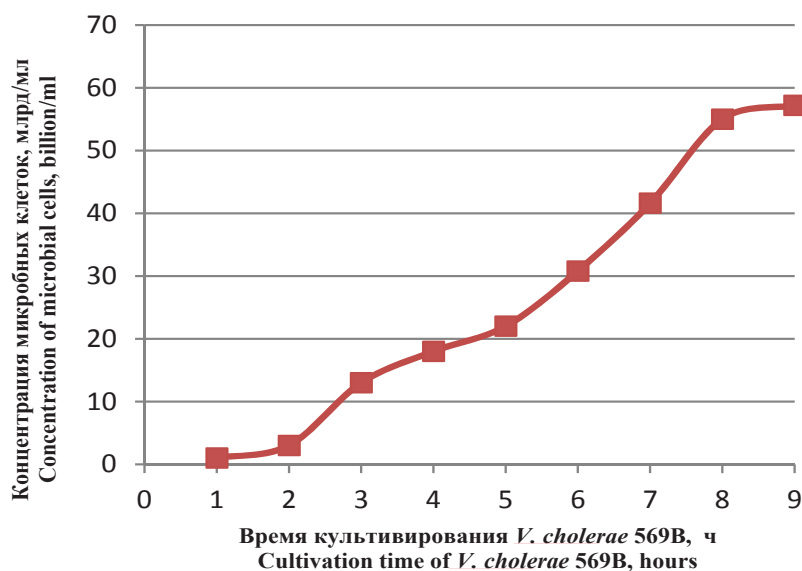


Рис. 3. Накопления биомассы штамма-продуцента *V. cholerae* 569B при культивировании в биореакторе

Fig. 3. Accumulation of biomass of the *V. cholerae* 569B producer strain during cultivation in a bioreactor

Таким образом, с помощью современных молекулярно-генетических методов нами установлено опережение на один-два часа экспрессии гена *ctxA* относительно прироста биомассы и выхода ХТ в культуральную жидкость. Следует отметить, что метод цкПЦР имеет ряд преимуществ: возможность оценки уровня экспрессии гена без использования гена-стандарта; мгновенный подсчет образовавшихся капель на 1 мкл образца; высокая точность анализа, опирающаяся на положительные и отрицательные результаты

в каждой капле, низкая чувствительность к присутствию ингибиторов. Применение праймеров и зонда, являющихся компонентами, рассчитанными для ОТ-ПЦР, делает цкПЦР более доступной для использования.

Заключение

Исследования экспрессии гена *ctxA* и других маркерных для холерного вибриона генов с помощью молекулярно-генетических методов дают возможность использовать полученные



результаты для оптимизации условий культивирования, что позволит увеличить выход основных иммуногенов.

Применение ОТ-ПЦР и цкПЦР является перспективным для оценки экспрессии гена *ctxB* и *rfb* (*wbe*), которые могут применяться в качестве дополнительных маркеров при оценке стабильности штаммов-продуцентов.

Список литературы

1. Москвитина Э. А., Янович Е. Г., Куриленко М. Л., Кругликов В. Д., Титова С. В., Левченко Д. А., Водопьянов А. С., Лопатин А. А., Иванова С. М., Мишанькин Б. М., Кривенко А. С., Анисимова Г. Б., Носков А. К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 год // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 2. С. 38–47. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-38-47>.
2. Носков А. К., Кругликов В. Д., Москвитина Э. А., Монахова Е. В., Левченко Д. А., Янович Е. Г., Водопьянов А. С., Писанов Р. В., Непомнящая Н. Б., Ежова М. И., Подойницына О. А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 год // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 43–51. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-43-51>
3. WHO. Weekly Epidemiological Record. 2018. Vol. 93, № 38. P. 489–500.
4. Приказ Минздрава России от 16.12.2021 г. № 1122н «Об утверждении национального календаря профилактических прививок, календаря профилактических прививок по эпидемическим показаниям и порядка проведения профилактических прививок». URL: <https://docs.cntd.ru/document/727605537> (дата обращения: 25.02.2022).
5. Правила организации производства и контроля качества лекарственных средств, утв. приказом Министерства промышленности и торговли РФ от 14 июня 2013 г. № 916 (ред. от 18.12.2015). URL: <https://docs.cntd.ru/document/499029882> (дата обращения: 25.02.2022).
6. Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 77 «Об утверждении Правил надлежащей производственной практики Евразийского экономического союза». URL: <https://docs.cntd.ru/document/456026099> (дата обращения: 25.02.2022).
7. Заднова С. П. Комплексная гено- и иммунодиагностическая тест-система для идентификации холерных вибрионов O1 и O139 серогрупп и оценки их вирулентности. Пат. РФ № 2404257, опубл. 20.11.2010. Бюл. № 32.
8. Абдраштова А. С., Яцьшина С. Б., Осина Н. А., Астахова Т. С., Портенко С. А., Саяпина Л. В.,

Шипулин Г. А., Щербакова С. А. Разработка мультилокусных амплификационных тест-систем для выявления ускоренной идентификации эпидемиологически значимых штаммов холерных вибрионов // Биозащита и биобезопасность. 2014. Т. 6, № 2. С. 34–41.

9. Плеханов Н. А., Заднова С. П., Агафонов Д. А., Смирнова Н. И. Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов генетических вариантов *Vibrio cholerae* Эльтор и их дифференциации по эпидемиологическому потенциалу // Биотехнология. 2015. Т. 31, № 2. С. 82–90.
10. Jin D., Luo Y., Zheng M., Li H., Zhang J., Stampfl M., Xu X., Ding G., Zhang Y., Tang Y. W. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring // Journal of Clinical Microbiology. 2013. Vol. 51, № 12. P. 3968–3974.
11. Nasreen T., Hussain A. S., Islam M. T., Orata F. D., Kirchnerberger P. C., Alam M., Yanow S. K., Yann F. Simultaneous quantification of *Vibrio metoecus* and *Vibrio cholerae* with its O1 serogroup and toxigenic subpopulations in environmental reservoirs // Pathogens. 2020. Vol. 9, № 12. P. 1053.
12. Крицкий А. А., Челдышова Н. Б., Тучков И. В., Смирнова Н. И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени // Проблемы особо опасных инфекций. 2017. Т. 3. С. 53–57.

References

1. Moskvitina E. A., Yanovich E. G., Kurilenko M. L., Kruglikov V. D., Titova S. V., Levchenko D. A., Vodop'yanov A. S., Lopatin A. A., Ivanova S. M., Mishan'kin B. M., Krivenko A. S., Anisimova G. B., Noskov A. K. Cholera: Monitoring of Epidemiological Situation around the World and in Russia (2010–2019). Forecast for 2020. *Problemy osobo opasnykh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections], 2020, no. 2, pp. 38–47 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-2-38-47>
2. Noskov A. K., Kruglikov V. D., Moskvitina E. A., Monakhova E. V., Levchenko D. A., Yanovich E. G., Vodop'yanov A. S., Pisanov R. V., Nepomnyashchaya N. B., Ezhova M. I., Podoinitsyna O. A. Characteristics of the Epidemiological Situation on Cholera in the World and in the Russian Federation in 2020 and Forecast for 2021. *Problemy osobo opasnykh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections], 2021, no. 1, pp. 43–51 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-43-51>
3. WHO. Weekly Epidemiological Record, 2018, vol. 93, no. 38, pp. 489–500.
4. Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 1122n dated 12/16/2021 “On the approval of the national calendar of preventive vaccinations, the calendar of preventive vaccinations for epidemic indi-



- cations and the procedure for preventive vaccinations”. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/727605537> (accessed 25 February 2022).
5. Rules for the organization of production and quality control of Medicines approved by Order of the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation № 916 dated June 14, 2013 (as amended on December 18, 2015). Available at: <https://docs.cntd.ru/document/499029882> (accessed 25 February 2022).
 6. Decision of the Council of the Eurasian Economic Commission № 77 dated November 3, 2016 “On Approval of the Rules of Good Manufacturing Practice of the Eurasian Economic Union”. Available at: <https://docs.cntd.ru/document/456026099> (accessed 25 February 2022).
 7. Zadnova S. P. Complex geno- and immunodiagnostic test system for identification of cholera vibriosis O1 and O139 of the gray groups and assessment of their virulence. Pat. of the Russian Federation № 2404257, publ. 20 November 2010, Bull. No. 32 (in Russian).
 8. Abdrashitova A. S., Yatsyshina S. B., Osina N. A., Astakhova T. S., Portenko S. A., Sayapina L. V., Shipulin G. A., Shcherbakova S. A. Development of multilocus amplification test systems for identification of accelerated identification of epidemiologically significant strains of cholera vibriosis. *Biosecurity and Biosafety*, 2014, vol. 6, no. 2, pp. 34–41 (in Russian).
 9. Plekhanov N. A., Zadnova S. P., Agafonov D. A., Smirnova N. I. Development of a multiplex PCR for simultaneous identification of genetically altered toxigenic *Vibrio cholerae* strains and their epidemic potential classification. *Biotechnology in Russia*, 2015, vol. 31, no. 2, pp. 82–90 (in Russian).
 10. Jin D., Luo Y., Zheng M., Li H., Zhang J., Stampfl M., Xu X., Ding G., Zhang Y., Tang Y. W. Quantitative detection of *Vibrio cholerae* toxin by real-time and dynamic cytotoxicity monitoring. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013, vol. 51, no. 12, pp. 3968–3974.
 11. Nasreen T., Hussain A. S., Islam M. T., Orata F. D., Kirchnerberger P. C., Alam M., Yanow S. K., Yann F. Simultaneous quantification of *Vibrio metoecus* and *Vibrio cholerae* with its O1 serogroup and toxigenic subpopulations in environmental reservoirs. *Pathogens*, 2020, vol. 9, no. 12, pp. 1053.
 12. Kritsky A. A., Cheldyshova N. B., Tuchkov I. V., Smirnova N. I. Development of the algorithm for identification of the level of *Vibrio cholerae* *ctxA* and *toxR* gene expression using RT-PCR with real-time hybridization-fluorescent registration of results. *Problemy osobo opasnykh infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections], 2017, vol. 3, pp. 53–57 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2017-3-53-57>

Поступила в редакцию 25.05.2022; одобрена после рецензирования 02.06.2022; принята к публикации 03.06.2022
The article was submitted 25.05.2022; approved after reviewing 02.06.2022; accepted for publication 03.06.2022