

Н.И. Смирнова, Д.А. Агафонов, Т.А. Кульшань, Я.М. Краснов, В.В. Кутырев

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Микроэволюция возбудителя холеры в современный период

Цель исследования: провести сравнительный молекулярно-генетический анализ высокопатогенных атипичных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, выделенных на территории Российской Федерации, для выявления микроэволюционных изменений возбудителя холеры в современный период. **Материалы и методы:** исследовали 38 клинических штаммов методами полимеразной цепной реакции, секвенирования и MLVA-анализа. Выбранные штаммы были выделены в разные временные периоды эпидемических осложнений по холере и различались между собой уровнем вирулентности. **Результаты:** показано, что в ходе непродолжительной микроэволюции возникли новые варианты, структура и функция генома которых отличается от всех известных ранее штаммов. Изменения генома были обусловлены точковыми мутациями в генах *ctxB* и *tcpA*, связанных с вирулентностью и входящих в состав профага CTXφ и острова патогенности VPI-1, соответственно, а также протяженной делецией острова пандемичности VSP-II. Представлена динамика изменений структуры и функции генома современных штаммов. **Выводы:** установленные геномные изменения у новых вариантов возбудителя, возникшие в процессе микроэволюции, указывают на возможность усиления их вирулентности и повышение эпидемического потенциала.

Ключевые слова: возбудитель холеры, атипичные штаммы, геном, микроэволюция.
(Вестник РАМН. 2014; 7–8: 46–53)

46

Введение

Механизм эволюции возбудителей опасных инфекций остается одной из важных проблем медицинской микробиологии, решение которой позволит понять причины изменчивости их патогенных свойств. В связи с чрезвычайно высокой пластичностью генома, одним из уникальных модельных объектов изучения его микроэволюционных преобразований является *Vibrio cholerae* — возбудитель холеры, особо опасной инфекционной болезни бактериальной природы. Известно о семи пандемиях холеры, унесших миллионы человеческих жизней. Все пандемии были вызваны *V. cholerae* O1-серогруппы, но разных биоваров — классического или Эль-Тор [1]. Среди них особый интерес представляют штаммы *V. cholerae* биовара Эль-Тор, вытеснившие более 90 лет назад холерные вибрионы классического биовара в эндемичных по холере регионах и вызвавшие текущую, седьмую, пандемию холеры, которая продолжается более 50 лет (с 1961 г. по настоящее время). При этом около

30 лет эпидемические осложнения по холере в мире были вызваны типичными пандемическими штаммами этого биовара. К настоящему времени эпидемическая ситуация по холере резко обострилась в связи с появлением и широким распространением в последние два десятилетия новых атипичных или генетически измененных штаммов с усиленной вирулентностью и высоким эпидемическим потенциалом, которые постепенно вытеснили типичные изоляты во многих регионах мира. Так, в настоящее время эпидемии холеры на Гаити, а также во многих странах Азии и Африки обусловлены именно такими измененными штаммами [2–4].

Одно из основных отличий типичных штаммов от измененных состоит в более высоком уровне вирулентности последних, что выражается в тяжелых клинических формах болезни, нередко с летальным исходом. Выявленные различия в вирулентности между типичными и измененными штаммами прежде всего связаны с разным уровнем продукции ими холерного токсина (ХТ) — ключевого фактора вирулентности, вызывающе-

N.I. Smirnova, D.A. Agafonov, T.A. Kul'shan', Ya.M. Krasnov, V.V. Kut'yrev

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russian Federation

Microevolution of Cholera Agent in the Modern Period

Aim: To carry out comparative molecular genetic analysis of highly pathogenic atypical *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor, isolated in the territory of RF, in order to determine micro-evolutionary alterations of cholera agent in the modern period. **Materials and methods:** 38 clinical strains have been examined by means of polymerase chain reaction, sequencing and MLVA-analysis. The selected strains were isolated at different periods of time during cholera epidemic complications and differed between each other in virulence. **Results:** It is demonstrated that new variants have emerged in the course of short-term microevolution. Their genome structure and function differ from those of all previously known strains. The genome alterations have been caused by point mutations in *ctxB* and *tcpA* genes associated with virulence and located in CTXφ prophage and pathogenicity island VPI-1 respectively, as well as by the extended deletion in pandemicity island VSP-II. Presented is the dynamics of genome structure and function alterations in modern strains. **Conclusion:** The discovered genomic alterations in the new variants of the agent evolved in the process of microevolution are indicative of their epidemic potential enhancement and probability of virulence potentiation.

Key words: cholera agent, atypical strains, genome, microevolution.

(Vestnik Rossiiskoi Akademii Meditsinskikh Nauk — Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2014; 7–8: 46–53)

го развитие острой профузной диареи и состоящего из одной субъединицы А и пяти субъединиц В [5]. Повышение в 2–10 раз продукции ХТ у измененных штаммов, по сравнению с типичными, обусловлено особенностями структуры и функции их профага СТХф, несущего гены *ctxAB*, кодирующие ХТ. У типичных штаммов в нуклеотидной последовательности гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу ХТ, в позициях 115 и 203 присутствует тимин (Т), тогда как у атипичных — цитозин (С), что характерно для *V. cholerae* классического биовара — возбудителя предыдущих пандемий азиатской холеры [6]. Вследствие этого аллель указанного гена у типичных штаммов был обозначен как *ctxBEltor*, у измененных — как *ctxBClass*. Разная нуклеотидная последовательность генов *ctxB1* и *ctxB3* определяла неодинаковую аминокислотную последовательность В-субъединицы. Вследствие этого различают ХТ 1-го и 2-го типа, характерные для измененных и типичных штаммов, соответственно [6, 7]. Принято считать, что высоковирулентные атипичные штаммы возникли в результате горизонтального переноса генов от *V. cholerae* классического биовара в клетки типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор. Впервые такие штаммы были выделены от больных в Бангладеш в 1991–1994 гг. во время эпидемии холеры [1, 4]. К настоящему времени для генетически измененных штаммов возбудителя характерно глобальное распространение в мире.

Вместе с тем геном атипичных штаммов оказался весьма нестабильным. В результате в последнее десятилетие возникли высоковирулентные штаммы с новым набором мутаций в мобильных генетических элементах, связанных с патогенностью (профаг СТХф, остров патогенности VPI-1) или адаптации к стрессовым воздействиям окружающей среды (остров пандемичности VSP-II) [6, 8]. Появление у атипичных штаммов новых мутаций различного типа отразилось на их эпидемическом потенциале. На снижение эпидемического потенциала у ранее возникших (1991–2000 гг.) измененных штаммов, несущих прототипный VSP-II, указывает тот факт, что такие штаммы все реже становятся причиной эпидемий и вспышек холеры. В то же время у недавно (2002–2012 гг.) сформированных клонов, у которых делегирован большой участок ДНК острова пандемичности VSP-II, эпидемический потенциал оказался высоким, поскольку во многих регионах именно такие штаммы стали доминировать в бактериальных популяциях, становясь причиной многочисленных эпидемических осложнений по холере [8, 9].

Таким образом, высокая пластичность генома атипичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор, несущих фрагмент ДНК возбудителя холеры другого биовара, определяет их большое разнообразие. При этом геномные перестройки могут быть важнейшим фактором модуляции патогенных свойств возбудителя. Генетическое разнообразие характерно и для атипичных штаммов, занесенных на территорию Российской Федерации (РФ) из эндемичных по холере регионов и вызвавших либо локальные вспышки, либо спорадические случаи холеры. Между тем динамика изменения молекулярно-генетических свойств у атипичных штаммов, занесенных на территорию РФ, почти не изучена. Однако такие сведения могут дать ценную информацию о направлении микроэволюции, происходящей в природных популяциях возбудителя в эндемичных по холере регионах.

Цель исследования: провести сравнительный молекулярно-генетический анализ высокопатогенных атипичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор, выделенных

на территории Российской Федерации, для определения микроэволюционных изменений возбудителя холеры в современный период.

Материалы и методы

Материал для исследования

В работе использовали 38 клинических штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор, выделенных в разные периоды (1970–2012 гг.) седьмой пандемии холеры в различных регионах РФ. Из них 8 относились к типичным изолятам возбудителя и 30 — к атипичным. Все штаммы были получены из государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Для культивирования бактерий использовали бульон и агар Luria-Bertani (LB).

Методы исследования

Структуру острова пандемичности VSP-II определяли методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием 12 пар специфических праймеров, описанных ранее [10]. Фотодокументирование результатов проводили в системе для гель-документации VersaDoc фирмы Bio-Rad (США) с использованием программы Quantity One v 4.6.9 (Bio-Rad, США).

Аmplификацию структурных генов *ctxB*, *tcpA* и его промоторной области *PtcpA* в ПЦР для последующего определения их нуклеотидных последовательностей выполняли с использованием следующих пар праймеров:

ctxB — 5'-ATGATTAATTAATTTGG-3',
5'-TTAATTTGCCATACTAATTG-3';
tcpA-fl — 5'-CTTTGTGTGGTTAAATGTGCG-3',
5'-AATAATCCGACACCTTGTGG-3';
PtcpA — 5'-TTTCTCGCCTTCCCTTACA-3',
5'-CATACCCTCTTGACCGGTTT-3'.

Секвенирование ДНК проводили на генетическом анализаторе модели ABI 3500xl (Applied Biosystems, США) по методу, описанному F. Sanger и соавт. [11]. Нуклеотидные последовательности изучаемых генов сравнивали с соответствующими последовательностями референс-штаммов *V. cholerae* N16961 биовара Эль-Тор и *V. cholerae* O395 классического биовара, взятыми из GenBank, используя программу MEGA4.

Для проведения MLVA-типирования в качестве переменных участков генома применяли 5 известных переменных локусов (VC0147, VC0436-7, VC01650, VCA0171, VCA0283), локализованных на хромосомах 1 и 2 [12]. С помощью специфических праймеров в ПЦР получали по 5 ампликонов для каждого из 37 штаммов, которые затем были секвенированы на генетическом анализаторе модели ABI 3500xl (США). Первичный анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программы Data Collection v. 1.0 (США) и Sequencing Analysis Software v. 5.4 (США). Для дальнейшего анализа применяли программное обеспечение BioEdit 7.1.3 (США), Mega 5 (США) и BioNumerics 7.1 (Бельгия).

Результаты

Геном возбудителя холеры Эль-Тор представлен двумя хромосомами — большой (1) и малой (2), в состав которых входят различные мобильные элементы (профаги, острова патогенности или пандемичности, интегрон и т.д.), несущие гены патогенности, антибиотикорезистентности и адаптации к стрессовым воздействиям окружающей среды [13, 14]. Появление в начале 90-х гг. прошлого столетия в эндемичных по холере регионах

высокопатогенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор с атипичной структурой профага СТХф, кодирующего ХТ, явилось основанием для поиска таких изолятов среди штаммов, занесенных в РФ в этот же период. Генетической меткой атипичных штаммов было присутствие в составе генома профага СТХф аллеля *ctxB1*, характерного для холерных классических вибрионов. В связи с этим ранее у всех исследуемых штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор, независимо от места и времени их выделения, нами был определен аллельный вариант гена *ctxB* методом МАМА-ПЦР (Mismatch Amplification Mutation Assay PCR) [15]. Обнаружено, что начиная с 1993 г. все локальные вспышки (Дагестан, 1993, 1994, 1998; Казань, 2001) либо спорадические случаи холеры (Белорецк, 2004; Тверь, 2005; Мурманск, 2006; Москва, 2010) были вызваны атипичными штаммами, несущими аллель *ctxB1* [10]. Однако этот метод, основанный на выявлении замены лишь одного нуклеотида в *ctxB* (С/Т в положении 203), не мог предоставить полную информацию о других изменениях в нуклеотидной последовательности данного гена. Напротив, секвенирование этого гена показало, что у 27 атипичных штаммов из 30 изученных в *ctxB* содержится 2 нуклеотидные замены С на Т в позициях 115 и 203, приводящие к смене триплетов ТАТ и АТТ на САТ и АСТ и кодируемых аминокислот тирозин и изолейцин, соответственно, на гистидин и треонин в 39-м и 68-м положении полипептидной цепи белкаCtxB. Это означает, что в геноме профага СТХф 90% исследуемых штаммов действительно присутствовал аллель *ctxB1*. Вместе с тем в трех штаммах (L3225, L4150, L3226) был идентифицирован новый аллельный вариант *ctxB7*, отличающийся от аллеля *ctxB1* наличием одной дополнительной мутации: цитозин (С) был заменен на аденин (А) в позиции 58. Смена триплета САТ на ААТ обусловила замену кодируемой аминокислоты гистидина на аспарагин в белковой В-субъединице ХТ (табл. 1). Присутствие дополнительной мутации в гене *ctxB7* указывает на генетическое сходство этих изолятов с высокопатогенными вариантами возбудителя холеры, обнаруженными в Индии и на Гаити [6]. Изменение гена *ctxB* вполне могло повысить вирулентность штаммов, поскольку В-субъединица ХТ вовлечена во взаимодействие с ганглиозидом GM₁, находящимся на поверхности кишечного эпителия. Однако это предположение нуждается в дальнейших исследованиях.

Обнаружение различий в структурной организации гена *ctxB* у недавно возникших измененных штаммов дало основание говорить о том, что включение чужеродного участка ДНК в геном профага СТХф типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор могло привести к нестабильности и других хромосомных регионов, связанных с вирулентностью. Второй ключевой фактор патогенности возбудителя холеры — токсин-корегулируемые пили, определяющие способность патогена колонизировать тонкий кишечник хозяина. Мы определили у всех изученных штаммов нуклеотидную последовательность гена *tcpA*, кодирующего белок TcpA (основной белок этих пилей), и входящего в состав острова патогенности VPI-1 [13]. Оказалось, что у штаммов, изолированных в начальный период их формирования (1993–1994 гг.), структура гена *tcpA* была идентична таковой типичных штаммов. Вместе с тем у 13 штаммов, выделенных в более поздний период (1997–2012 гг.), было найдено 3 аллельных варианта гена *tcpA*. Первый аллель, *tcpA1* (5 штаммов), несет 2 мутации в промоторной области гена — замену единичного нуклеотида С на Т на 128 пн выше стартовой точки начала транскрипции, а также вставку единичного нуклеотида А на 180 пн от стартового кодона АТГ.

Второй аллель, *tcpA2* (7 штаммов), содержит 3 мутации: 2 описанные выше, а также нуклеотидную замену А на G в позиции 266 в кодирующей области гена, которая привела к изменению аминокислотной последовательности белка TcpA — в позиции 89 аспарагин заменен на серин. Третий аллельный вариант, *tcpA3* (1 штамм), имеет лишь 2 однонуклеотидные замены: А на G в кодирующей области и С на Т в промоторной области гена. Функциональная значимость этих мутаций пока не определена. Можно лишь предполагать, что за счет изменения структуры белка TcpA такие штаммы более эффективно колонизируют тонкий кишечник человека, тем самым способствуя развитию более тяжелых клинических проявлений болезни.

Другим, не менее важным, был вопрос о вариабельности генома одного из двух островов пандемичности, а именно VSP-II. Этот мобильный элемент, приобретенный холерными вибрионами Эль-Тор через горизонтальный перенос от неизвестных доноров, определяет, более высокий уровень их адаптации к действию различных стрессовых факторов по сравнению с классическими холерными вибрионами, лишенными указанного участка ДНК [13]. Вместе с тем прототипный VSP-II, содержащий 30 генов (vc0498–vc0517), кодирующих различные белки (транспозазы, белки репарации и хемотаксиса, эндонуклеазы и т.д.), оказался нестабильным. За счет делеции ряда его генов появились различные варианты VSP-II, обнаруженные в основном в геноме измененных штаммов, изолированных во время эпидемических вспышек холеры в различных эндемичных по холере регионах [8]. Среди делетированных вариантов следует особенно отметить VSP-II, имеющий протяженную делецию его центральной части, поскольку такой остров был обнаружен в геноме атипичных штаммов с высоким эпидемическим потенциалом [8, 9].

Для поиска штаммов с измененным VSP-II среди изучаемых изолятов мы применили метод ПЦР с использованием 12 пар специфических праймеров, позволяющий определить присутствие 12 генов (vc0490–vc0493, vc0495–vc0498, vc0502, vc0510, vc0512, vc0513), локализованных в краевых и центральных регионах этого острова (см. табл. 1). Оказалось, что VSP-II с протяженной делецией, затрагивающей 7 генов из 12 тестируемых, имелся в геноме только тех штаммов, которые были выделены в последнее десятилетие (2004–2012 гг.). Почти все атипичные штаммы, сформированные ранее (1993–2001 гг.), содержали прототипный VSP-II. При этом следует отметить, что в тот же период (1997 г.) было обнаружено 3 штамма (P17644, P17645 и P17647), у которых потерянный участок в VSP-II затрагивал лишь 4 гена: vc0495–vc0498. Вариант VSP-II с протяженной делецией был обозначен как VSP-IIΔvc0495–vc0512, с короткой — как VSP-IIΔvc0495–vc0498. Дальнейшая оценка протяженности делеции в VSP-II методом секвенирования показала, что у штаммов с VSP-IIΔvc0495–vc0512 отсутствовала центральная область этого мобильного элемента размером 13 105 пн, включающая 21 ген.

Выявление различий в структуре и функции генома атипичных штаммов, изолированных в разные временные периоды, ставит вопрос о возможности их дифференциации методом MLVA, имеющим высокую разрешающую способность [12]. Взятые 5 вариабельных локусов, указанных в табл. 2 [16], имеют разный уровень полиморфизма. Для локусов VC0147, VC436-7, VC01650, находящихся на хромосоме 1, характерно наличие 3–5 аллелей, тогда как 2 других локуса (VCA0171 и VCA0288) из хромосомы 2 были представлены 14–15 аллелями (см. табл. 1). По-

Таблица 1. Молекулярно-генетические свойства клинических штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных в разные временные периоды на территории Российской Федерации

Штамм	Место и год выделения	Аллель гена <i>ctxB</i> из СТХф	Мутации в гене <i>tcpA</i> ^{Eltor} из VPI-1			VSP-II	Аллельные профили VC0147, VC0436-7, VC1650, VCA0171, VCA0283
			Замена ^а A/G	Вставка ^б А	Замена ^а C/T		
<i>Типичные штаммы</i>							
M818	Саратов, 1970	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,18,25
M887	Астрахань, 1970	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,18,25
M888	Астрахань, 1970	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,18,24
M1011	Уфа, 1972 (Башкирия)	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,18,24
M582	Элиста, 1974 (Калмыкия)	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,19,25
M568	Саранск, 1974 (Мордовия)	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,19,23
M569	Саранск, 1974 (Мордовия)	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,19,23
M589	Пермь, 1974	<i>ctxB3</i>	-	-	-	VSP-II	8,6,7,19,23
<i>Атипичные штаммы</i>							
M1297	Махачкала, 1993 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,14,20
M1275	Махачкала, 1993 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,14,20
M1264	Краснодар, 1993	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,20
M1299	Краснодар, 1993	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,24
M1298	Краснодар, 1993	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,22
M1272	Краснодар, 1993	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,21
M1266	Пермь, 1993	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,20
M1271	Казань, 1993 (Татарстан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,21
M1270	Казань, 1993 (Татарстан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,11,21
M1293	с. Сулина, 1994 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,15,20
M1294	с.Айди-Кутан 1994, (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,15,20
M1269	Магнитогорск, 1994	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,15,20
M1268	Магнитогорск, 1994	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	8,7,8,15,20
P17647	Ачинск, 1997	<i>ctxB1</i>	-	+	+	VSP-II Δvc0495-0498	9,8,6,13,24
P17644	Ачинск, 1997	<i>ctxB1</i>	-	+	+	VSP-II Δvc0495-0498	9,8,6,13,24
P17645	Иркутск, 1997	<i>ctxB1</i>	-	+	+	VSP-II Δvc0495-0498	н.о.
M1326	с. Рубас, 1998 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	9,7,8,15,22
M1327	с. Хорези, 1998 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	н.о.	н.о.	н.о.	VSP-II	9,7,8,15,22
M1328	с. Хорези, 1998 (Дагестан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	9,7,8,15,22
M1344	Казань, 2001 (Татарстан)	<i>ctxB1</i>	-	+	+	VSP-II	11,7,6,9,13
M1345	Казань, 2001 (Татарстан)	<i>ctxB1</i>	-	+	+	VSP-II	11,7,6,6,13
M1349	Казань, 2001 (Татарстан)	<i>ctxB1</i>	-	-	-	VSP-II	11,7,6,6,13
M1429	Уфа, 2004 (Башкирия)	<i>ctxB1</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,20,17
M1430	Тверь, 2005	<i>ctxB1</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,20,18
P18899	Мурманск, 2006	<i>ctxB1</i>	+	-	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,10,19
Л-3225	Москва, 2010	<i>ctxB7</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,14,19
Л-3226	Москва, 2010	<i>ctxB7</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,15,19
Л-4150	Москва, 2010	<i>ctxB7</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,13,20
301	Таганрог, 2011	<i>ctxB1</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	8,3,6,19,18
1	2	3	4	5	6	7	8
M1509	Москва, 2012	<i>ctxB1</i>	+	+	+	VSP-II Δvc0495-0512	9,3,6,14,22

Примечание. а — замена аденина на гуанин в позиции 266 в кодирующей области гена *tcpA*; б, в — мутации в промоторной области гена *tcpA*; VSP-II — интактный остров пандемичности; VSP-II Δvc0495-0498 — короткая делеция из 4 генов; VSP-II Δvc0495-0512 — протяженная делеция из 21 гена; н.о. — не определяли; «-» или «+» — отсутствие или наличие мутации, соответственно.

Таблица 2. VNTR-локусы и последовательности праймеров, использованные в исследовании

Локус	Нуклеотидная последовательность повтора	Праймеры (5' – 3')
VC0147 (хромосома 1)	AACAGA	CCAAACCACTGCAACGATA GCTGCTCGACCTGAGAGAGA
VC0436-7 (хромосома 1)	GACCCTA	CGTGGTACTAAGTTCCACGC CGTTTPTACCACGCTCCGCTTC
VC1650 (хромосома 1)	GATAATCCA	CTACCAAGCGGCGGTTAAGCTG TGGGCAACCTGCTGGTAGC
VCA0171 (хромосома 2)	TGCTGT	GCATCATCCACAGCGTTTGG GCTGAAGCCTTTTCGCGATCC
VCA0283 (хромосома 2)	ACCAGA	CTTCATCGGCAAACAAGACA TTGCGACAATTCTCTTTGA

Примечание. VNTR-локусы и последовательности праймеров взяты из работы S.Y. Choi и соавт. [16].

строение филогенетического дерева методом «maximum parsimony tree» на основе MLVA по 5 указанным локусам и его анализ показали, что 30 атипичных штаммов образуют 4 кластера (II, III, IV и V). В отдельный кластер (I) вошли типичные пандемические штаммы *V. cholerae* биовара Эль-Тор, взятые для сравнения. При этом штаммы из

каждого кластера имели гомологичный или идентичный аллельный профиль (см. табл. 1; рис. 1). Особенно важен тот факт, что каждый кластер был образован штаммами с определенным генотипом. Так, кластер II состоял из 16 измененных штаммов, изолированных в начальный период их образования (1993–1994 гг.) и отличающихся

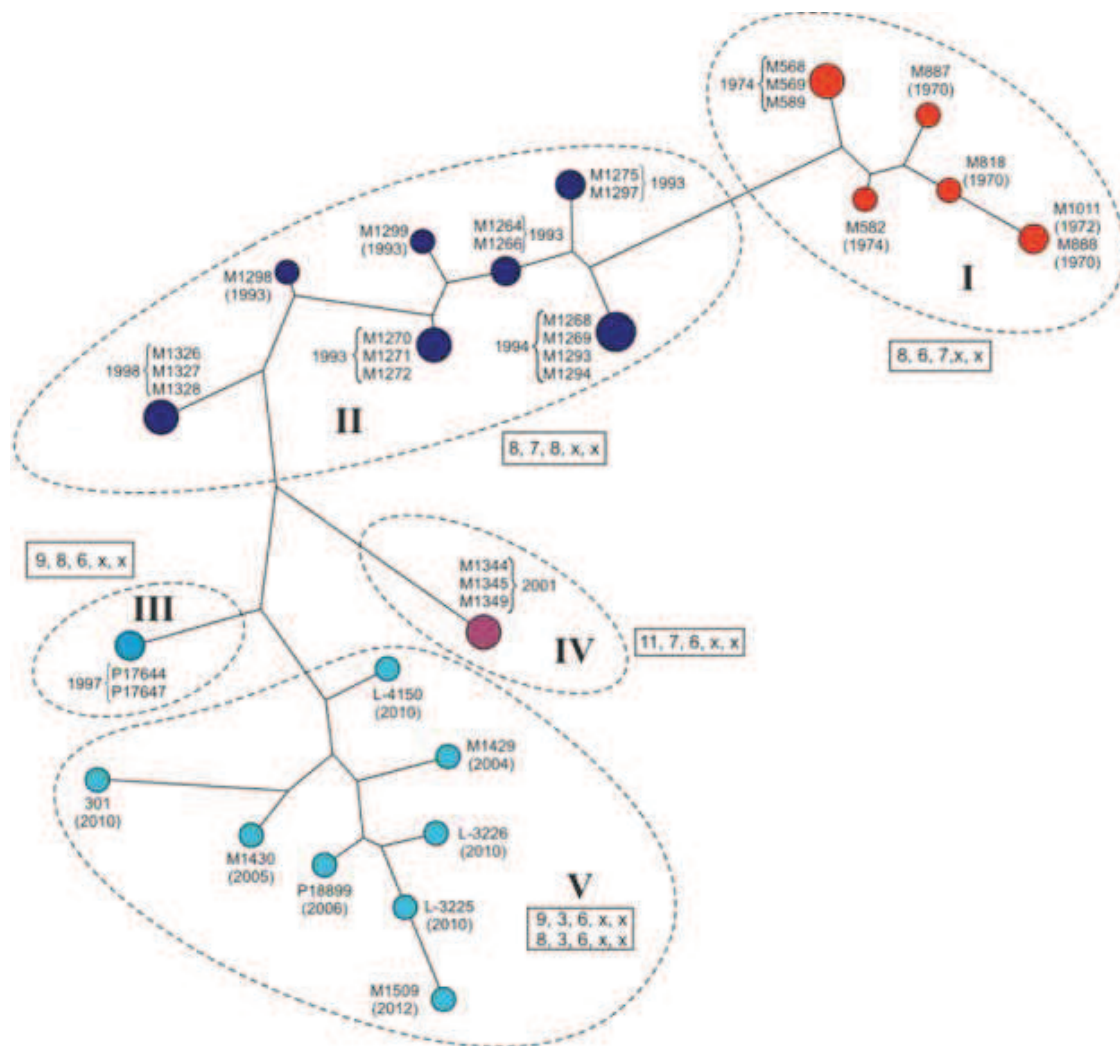


Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное методом «maximum parsimony tree» (Bionumerics, v.7.1) на основе MLVA по 5 хромосомным VNTR-локусам 37 типичных и атипичных пандемических штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор.

Примечание. Овалами выделены кластеры штаммов, в которые входят типичные (I) и атипичные штаммы (II, III, IV, V), выделенные в разные временные периоды и различающиеся между собой по структуре генома. В кружках указаны изученные штаммы. В прямоугольниках приведены аллельные профили 3 наиболее стабильных локусов, расположенных на хромосоме I.

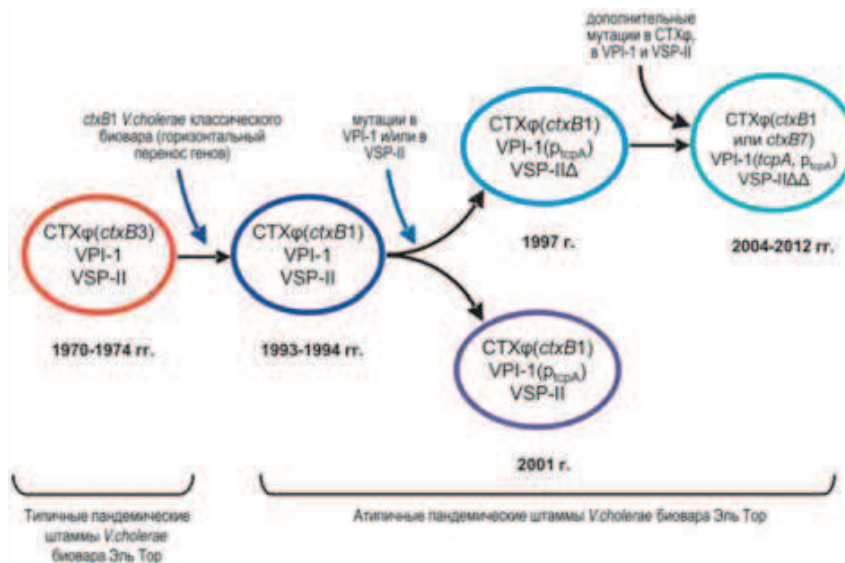


Рис. 2. Динамика изменения молекулярно-генетических свойств пандемических атипичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории Российской Федерации в разные временные периоды текущей пандемии холеры.

Примечание. *PtcpA* — мутации в промоторной области гена *tcpA*, входящего в состав острова патогенности VPI-I; *tcpA* и *PtcpA* — мутации в кодирующей и промоторной области гена *tcpA*; VSP-II Δvc0495-0498 и VSP-II Δvc0495-0512 — остров пандемичности VSP-II с короткой и протяженной делецией, соответственно.

от типичных изолятов присутствием в геноме профага CTXφ гена *ctxB1* (см. табл. 1, рис. 1). В два других, малых, кластера (III и IV) вошли атипичные штаммы, изолированные несколько позже (1997 и 2001 гг., соответственно), в геноме которых были обнаружены мутации, локализованные в участках ДНК, связанных с вирулентностью и эпидемическим потенциалом. И, наконец, кластер V был образован штаммами, занесенными на территорию РФ в течение последнего десятилетия (2004–2012 гг.). Эти атипичные штаммы отличались от предыдущих более значимыми мутациями (появлением дополнительной мутации в кодирующей области гена *tcpA* и утрата около 70% генов VSP-II), затрагивающими, видимо, вирулентные и адаптивные свойства патогена (см. табл. 1, рис. 1). Представленные результаты говорят о том, что MLVA-типирование позволило выявить основные генетические группы атипичных штаммов, выделенные в различные временные периоды и отличающиеся друг от друга по структуре ключевых генов вирулентности и пандемичности.

Приведенные выше сведения свидетельствуют о том, что процесс изменения генома пандемических штаммов *V. cholerae* биовара Эль-Тор в процессе микроэволюции происходил на протяжении относительно короткого периода времени и был многоступенчатым. Динамика изменения свойств возбудителя холеры Эль-Тор представлена на рис. 2. Первый этап — приобретение типичными штаммами, вызвавшими текущую пандемию холеры, нового генетического материала через горизонтальный перенос генов — гена *ctxB1*, локализованного в геноме профага CTXφ. Все последующие этапы были связаны с изменением генома уже возникших высокопатогенных атипичных штаммов. Сначала появились точковые мутации в регуляторной области гена *tcpA* из VPI-1. При этом в ряде случаев возникновение мутаций сопровождалось утратой небольшого участка ДНК, включающего 4 гена в острове пандемичности VSP-II. Следующий этап — изменение у этих вариантов кодирующей области гена *tcpA* и потеря большого сегмента генетического материала,

в состав которого входит 21 ген VSP-II. Такие геномные изменения обусловили, по-видимому, функциональные изменения. В результате последовательное накопление мутаций различного типа в геноме атипичных штаммов, возникших в более поздний период, привело к получению ими новых селективных преимуществ. Об этом свидетельствует тот факт, что во многих эндемичных по холере регионах атипичные штаммы, несущие лишь измененный профаг CTXφ с геном *ctxB1*, впоследствии были вытеснены новыми высокопатогенными изолятами, геном которых претерпел дальнейшие изменения.

Обсуждение

Проведенные нами экспериментальные исследования показали высокий уровень нестабильности генома возбудителя текущей пандемии холеры, что привело к возникновению природных атипичных штаммов с повышенной вирулентностью, которые в свою очередь продолжают изменяться. При сравнительном анализе нуклеотидной последовательности генов *ctxB* и *tcpA*, кодирующих ключевые факторы патогенности и входящие в состав профага CTXφ и острова патогенности VPI-1, соответственно, найдены различия между атипичными штаммами возбудителя холеры Эль-Тор, изолированными в разные временные периоды. Отличием измененных штаммов, выделенных в более поздний период (1997–2012 гг.), стало появление в их генах *ctxB* и *tcpA* различного типа мутаций (однонуклеотидные замены и вставки), которые могут привести к изменению их вирулентных свойств. При этом наиболее выраженным был полиморфизм гена *tcpA*, с которым может быть связано усиление транскрипции этого гена и, как следствие, повышение продукции бактериальной клеткой белка TcpA — основного компонента ключевого фактора колонизации. Такие различия в структуре генов, связанных с вирулентностью, могли появиться в результате межгенных или внутригенных рекомбинационных процессов в ходе микроэволюции.

Другим участком хромосомной ДНК, вызывающим повышенный интерес исследователей, является остров пандемичности VSP-II, роль которого в адаптации возбудителя холеры к окружающей среде пока не совсем ясна. Сравнительный анализ полученных нами нуклеотидных последовательностей VSP-II изучаемых штаммов с последовательностями VSP-II, представленными в Международной базе данных GenBank, показал, что штаммы, выделенные на территории РФ в 2004–2012 гг., действительно имели тот же делетированный вариант этого острова пандемичности, что и измененные высокопатогенные штаммы из Бангладеш (2008 г.) и Гаити (2010 г.) с высоким эпидемическим потенциалом. Это означает, что атипичные штаммы продолжают претерпевать различные генетические изменения, касающиеся не только генов патогенности, но и острова пандемичности VSP-II. Причину возникновения протяженных делеций в VSP-II у атипичных штаммов еще предстоит установить. Можно лишь предполагать, что потеря значительной части VSP-II явилась следствием адаптивных изменений в естественных популяциях в ответ на различные климатические и антропогенные воздействия. Тем не менее важно то, что геномные перестройки в этом участке ДНК привели, видимо, к существенным функциональным изменениям других генов, обеспечивающих жизнеспособность клетки, что отразилось на эпидемическом потенциале штаммов. Таким образом, исследования показали, что геномы относительно недавно возникших атипичных штаммов очень динамичны за счет возникающих новых мутаций. Постоянные преобразования генома возбудителя холеры Эль-Тор являются, по всей вероятности, одним из основных механизмов реализации стратегии выживания патогена в меняющихся условиях окружающей среды.

Выявленные генетические различия штаммов возбудителя холеры, изолированных в разные временные периоды, позволили дифференцировать их методом MLVA на 5 кластеров, каждый из которых содержал штаммы с определенным генотипом. При этом особого внимания заслуживает возможность выявления этим методом штаммов, возникших в 2004–2012 гг. и отличающихся от предыдущих более значительными мутациями генов, связанных с вирулентными и адаптивными свойствами патогена.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о том, что в ходе непродолжительной микроэволюции атипичных пандемических штаммов возбудителя холеры Эль-Тор возникли новые варианты, структура и функция геномов которых отличаются от всех ранее известных штаммов. Геномные вариации были результатом событий двух типов: небольших изменений в структуре ключевых генов вирулентности *ctxB* и *tcpA* за счет точковых мутаций (однонуклеотидные замены и вставка), а также протяженной делеции острова пандемичности VSP-II, связанного, видимо, с эпидемическим потенциалом — способностью штаммов вызывать развитие эпидемического процесса.

Важно отметить высокую селективную ценность обнаруженных изменений генома, поскольку недавно сформированные атипичные штаммы, несущие дополнительную мутацию, вытеснили ранее возникшие варианты во многих эндемичных по холере регионах [6, 8]. Об этом свидетельствует и тот факт, что на территории РФ все эпидемические осложнения за последнее десятилетие были вызваны именно такими атипичными штаммами с измененной структурой VPI-1 и VSP-II. Это означает, что представленная динамика геномных вариаций, приводящих к функциональным изменениям, позволяет говорить о том, что в современный период микроэволюции изменчивость возбудителя холеры может быть направлена на усиление его вирулентности и повышение эпидемического потенциала. В целом проведенные исследования молекулярно-генетических особенностей современных штаммов возбудителя холеры Эль-Тор, занесенных на территорию РФ из эндемичных по холере регионов, позволят глубже понять механизм патогенеза холеры. Более того, новая информация о структуре участков генома атипичных штаммов, связанных с вирулентностью, уже использована нами для разработки новых средств генодиагностики [10].

Заключение

Проведен сравнительный молекулярно-генетический анализ клинических высоковирулентных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, выделенных на территории Российской Федерации в разные периоды (1970–2012 гг.) текущей пандемии холеры. Установлено, что в последние два десятилетия (1993–2012 гг.) все локальные вспышки либо спорадические случаи холеры были вызваны атипичными штаммами, структура генома которых отличается от предыдущих наличием точковых мутаций в ключевых генах вирулентности, а также протяженной делецией в острове пандемичности VSP-II, определяющим, видимо, адаптивные свойства патогена. Установлена возможность дифференциации штаммов с разным генотипом методом MLVA. Показано, что изменения генома пандемических штаммов возбудителя холеры Эль-Тор в процессе микроэволюции происходили на протяжении относительно короткого времени и были многоступенчатыми. Представленные данные указывают на возможность усиления вирулентности и повышение эпидемического потенциала возбудителя в современный период его эволюции. Такая ситуация указывает на необходимость разработки новых генодиагностических и профилактических препаратов.

Конфликт интересов

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант 12-04-00285а.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chun J., Grim C.J., Hasan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J., Taviani E., Jeon Y.S., Kim D.W., Lee J.-H., Brettin T.S., Bruce D.C., Challacombe J.F., Detter J.C., Han C.S., Munk A.A., Chertkov O., Meincke I., Saunders E., Walters R.A., Hug A., Nair G.B., Colwell R.R. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009; 106 (36): 15442–15447.
2. Ali M., Lopez A. L., You Y.A., Kim Y. E., Sah B., Maskery B., Clemens J. The global burden of cholera. *Bull World Health Organ*. 2012; 90 (3): 209–218.
3. Banerjee R., Das B., Nair G.B., Basak S. Dynamics in genome evolution of *Vibrio cholerae*. *Inf. Genet. Evolution*. 2014; 1–10.
4. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2010; 4: 11–19.

5. Gill D.M., Meren R. ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75: 3050–3054.
6. Son M.S., Megli C.J., Kovacicikova G. Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49 (11): 3739–3749.
7. Safa A., Nair G. B., Kong R. Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18 (1): 46–54.
8. 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 islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308: 130–137.
9. Reimer A.R., Van Domselaar G., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C., Talkington D., Rowe L., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Sammons S., Dahourou G. A., Boney J., Smith A. M., Mabon P., Petkau A., Graham M., Gilmour M.W., Gerner-Smidt P. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17 (11): 2113–2121.
10. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Варибельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период. *Мол. генет., микробиол. и вирусол.* 2011; 4: 11–18.
11. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Nature.* 1977; 74 (12): 5463–5467.
12. Danin-Poleg Y., Cohen L.A., Gancz H., Broza Y.Y., Goldshmidt H., Malul E., Valinsky L., Lerner L., Broza M., Kashi Y. *Vibrio cholerae* strain typing and phylogeny study based on simple sequence repeats. *J. Clin. Microbiol.* 2007; 45 (3): 736–746.
13. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C. M., Heidelberg J. F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99 (3): 1556–1561.
14. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J., Haft D.H., Hickey E.K., Peterson J.D., Umayam L., Gill S.R., Nelson K.E., Read T.D., Tettelin H., Richardson D., Ermolaeva M.D., Vamathevan J., Bass S., H. Qin, Dragoi I., Sellers P., McDonald L., Utterback T., Fleishmann R.D., Nierman W.C., White O., Salzberg S.L., Smith H.O., Colwell R.R., Mekalanos J.J., Venter J.C., C.M. Fraser. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature.* 2000; 406: 477–483.
15. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., Siddique A.K., Qadri F., Izumia H., Nair G.B., Watanabe H. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52 (6): 314–317.
16. Choi S. Y., J. H. Lee, Jeon Y. S. et al. Multilocus variable-number tandem repeat analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains harbouring classical toxin B. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59 (3): 763–769.

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Смирнова Нина Ивановна, доктор биологических наук, профессор, заведующая отделом микробиологии Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел: +7 (8452) 26-47-23, e-mail: gusrapi@microbe.ru

Агафонов Дмитрий Алексеевич, аспирант лаборатории патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел: +7 (8452) 26-47-23, e-mail: gusrapi@microbe.ru

Кульшань Татьяна Алексеевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел: +7 (8452) 26-47-23, e-mail: gusrapi@microbe.ru

Краснов Ярослав Михайлович, кандидат химических наук, заведующий лабораторией геномного и протеомного анализа Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел: +7 (8452) 26-47-23, e-mail: gusrapi@microbe.ru

Кутырев Владимир Викторович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАМН, директор Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб»

Адрес: 410005, Саратов, ул. Университетская, д. 46, тел: +7 (8452) 26-21-31, e-mail: gusrapi@microbe.ru