

4. Chen Y. S., Lin H. H., Hung C. C. et al. Phenotypic characteristics and pathogenic ability across distinct morphotypes of *Burkholderia pseudomallei* DT. *Microbiol. Immunol.* 2009, 53:184-189.
5. Cheng A. C., Currie B. J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18:383-416.
6. Chin C. Y., Hara Y., Ghazali A. K. et al. Global transcriptional analysis of *Burkholderia pseudomallei* high and low biofilm producers reveals insights into biofilm production and virulence. *J. BMC Genomics.* 2015, 16:471.
7. Currie B. J., Fisher D. A., Howard D. M. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* 2000, 31:981-986.
8. Gierok P., Kohler C., Steinmetz I. et al. *Burkholderia pseudomallei* colony morphotypes show a synchronized metabolic pattern after acute infection. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016, 10(3): e0004483.
9. Howard K., Inglis T. J. Novel selective medium for isolation of *Burkholderia pseudomallei*. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41:3312-3316.
10. Inglis T. J., Sagripanti J. L. Environmental factors that affect the survival and persistence of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, 72:6865-6875.
11. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970, 227:680-685.
12. Tandhavanant S., Thanwisai A., Limmathurotsakul D. et al. Effect of colony morphology variation of *Burkholderia pseudomallei* on intracellular survival and resistance to antimicrobial environments in human macrophages in vitro. *BMC Microbiol.* 2010, 10:303.

Поступила 27.07.18

Контактная информация: Меринова Людмила Константиновна, д.м.н., проф.,
400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7, р.т. (8442) 37-36-74

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Е.Ю.Агафонова, Н.И.Смирнова, Ж.В.Альхова, Я.М.Краснов, Л.Ф.Ливанова, Ю.В.Лозовский, В.В.Кутырев

НЕТОКСИГЕННЫЕ ШТАММЫ VIBRIO CHOLERAЕ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИИ: МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Сравнительный анализ секвенированных нами полных геномов нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и оценка их вирулентности при внутрикишечном заражении новорожденных крольчат. *Материалы и методы.* Полногеномное секвенирование ДНК 26 штаммов проведено с использованием технологии полупроводникового секвенирования. Филогенетические связи штаммов выявлены на основе SNP-анализа. Продукцию гемолизина и гемагглютинин-протеазы оценивали общепринятыми методами. Вирулентность штаммов для крольчат определяли путем их внутрикишечного заражения в дозе 10^7 КОЕ/мл. *Результаты.* На основе анализа полных геномов нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*⁺ и *ctxA**tcpA*⁻ выявлены различия между ними по составу и стабильности структуры мобильных элементов, связанных с патогенностью. Обнаружены также существенные отличия этих штаммов друг от друга по нуклеотидным последовательностям генов *hlyA*, *hapA* и *gtxA*, кодирующих продукцию дополнительных факторов патогенности. Представлены результаты оценки их филогенетических связей. На модельных животных подтверждена неспособность нетоксигенных штаммов *ctxA**tcpA*⁺ и *ctxA**tcpA*⁻ вызывать развитие типичной холерной инфекции. *Заключение.* Получены новые данные о структуре геномов различных нетоксигенных штаммов и их филогенетических связях. На основании результатов заражения модельных животных клетками нетоксигенных штаммов с изученным геномом сделан вывод об их неспособности вызывать развитие типичной холерной инфекции.

Журн.микробиол., 2019, № 2, С. 13—24

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, нетоксигенные штаммы, геном, SNP-анализ, патогенность

NON-TOXIGENIC STRAINS OF VIBRIO CHOLERAЕ BIOVAR EL TOR, ISOLATED IN THE TERRITORY OF RUSSIA: MOLECULAR-GENETIC PECULIARITIES AND PATHOGENIC PROPERTIES

Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Aim. Comparative analysis of the sequenced on our own effort genomes of non-toxigenic strains with different set of pathogenicity genes and assessment of their virulence on the model of intestinal inoculation of newborn rabbits. *Materials and methods.* Whole-genome DNA sequencing of 26 strains was carried out using semiconductor sequencing technology. Haemolysin and hemagglutinin-protease production was evaluated applying conventional methods. Virulence of the strains for newborn rabbits was determined through intraluminal inoculation at the dose of 10^7 CFU/ml. *Results.* On the basis of whole genome analysis of *ctxA tcpA*⁺ and *ctxA tcpA*⁻ non-toxigenic strains, differences in composition and structure stability of mobile elements associated with pathogenicity have been identified. Significant differences in nucleotide sequences of *hlyA*, *hapA*, and *rtxA* genes, encoding production of additional pathogenicity factors, have also been detected. The paper provides the results of assessment of their phylogenetic relations. Experiments on animal models have confirmed the inability of non-toxigenic *ctxA tcpA*⁺ and *ctxA tcpA*⁻ strains to cause the development of typical cholera infection. *Conclusion.* New data on the genome structure of different non-toxigenic strains and their phylogenetic relations have been obtained. Based on the results of inoculation of animal models with cells of non-toxigenic strains with the studied genome the inference is drawn on their inability to cause the development of typical cholera infection.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 13–24

Key words: *Vibrio cholerae*, non-toxigenic strains, genome, SNP-analysis, pathogenicity

ВВЕДЕНИЕ

Эпидемии холеры Эль Тор, особо опасной инфекционной болезни, поражающей тонкий кишечник человека и приводящей к развитию различной степени обезвоживания, до сих пор способны вызывать чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения международного значения. В соответствии с классификацией биологических агентов, вызывающих болезни человека, токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 относят ко II группе патогенности. Эндемичные очаги холеры располагаются в Африке, Латинской Америке и Юго-Восточной Азии. В настоящее время по данным ВОЗ самая сложная ситуация по холере сложилась в Йемене, где зарегистрировано более 1 000 000 больных [18]. Территория Российской Федерации не является эндемичной по холере, поскольку отсутствуют условия для ее укоренения. Относительно редкие эпидемические вспышки или спорадические случаи холеры в России всегда имели заносной характер и были вызваны токсигенными штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Такие штаммы образовали две группы: типичные изоляты и их природные генетические варианты, возникшие в 90-х годах прошлого века в Юго-Восточной Азии и имеющие ряд изменений в геноме [7].

Геном *V. cholerae* представлен двумя хромосомами [13]. К ключевым генетическим маркерам возбудителя холеры, абсолютно необходимым для развития инфекционного процесса, относят гены *tcrA-F* и *stxAB*, размещенные в геноме острова патогенности (ОП) VPI-1 и профага СТХφ соответственно. Гены *tcrA-F* кодируют основной фактор колонизации тонкого кишечника — токсин-корегулируемые пили (ТСП), а гены *stxAB* определяют биосинтез прикрепившимися к энтероцитам вибрионами секретируемого холерного энтеротоксина (СТ), вызывающего развитие холерогенного эффекта — основного клинического симптома при холере [8, 10].

Вместе с тем, в различных регионах России в поверхностных водоемах ежегодно, помимо нетоксигенных холерных вибрионов не O1/не O139 серогрупп, обнаруживают значительное количество штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль

Тор, не имеющих профага СТХφ с генами холерного токсина, которые относят к иной группе патогенности, а именно к III. Такие нетоксигенные штаммы могут вызывать единичные или групповые случаи острых кишечных инфекций, не способных к эпидемическому распространению [8,16].

Источник нетоксигенных холерных вибрионов в водоемах России пока точно не установлен. Одни исследователи считают, что присутствие нетоксигенных вибрионов в поверхностных водоемах ряда регионов может указывать на загрязнение последних при попадании в них недостаточно очищенных и обеззараженных хозяйственно-бытовых сточных вод [3]. Согласно другой точке зрения нетоксигенные вибрионы являются частью естественной гетерогенной микрофлоры воды поверхностных водоемов («водные» вибрионы Эль Тор) [17], достаточно устойчивой к воздействию стрессовых факторов, и в водоемах с благоприятными условиями могут сохраняться достаточно длительный период времени — до 9 месяцев и более [2, 6]. Однако механизм, обеспечивающий такие процессы, еще недостаточно исследован на уровне функционирования бактериального генома и регуляции метаболизма. Известно лишь о значительном диапазоне генетической изменчивости, выражающейся в присутствии в геноме нетоксигенных штаммов разного набора генов. Так, среди нетоксигенных вибрионов изредка выявляли изоляты, содержащие гены *tcpA-F*, определяющие продукцию одного из ключевых факторов патогенности — токсин-корегулируемых пилей (ТСП), обеспечивающих колонизацию вибрионами тонкого кишечника [1, 8]. Более широко распространены нетоксигенные вибрионы, не имеющие генов *tcpA-F*, но с различными генами, кодирующими дополнительные факторы патогенности: генами термолabileного гемолизина (*hlyA*), растворимой гемагглютинин-протеазы (*hapA*), цитотоксина RTX (*rtxA*) [2, 8, 16]. Вероятно, эти вибрионы при отсутствии холерного токсина в восприимчивом организме могут реализовывать второстепенные факторы патогенности, вызывая патологический процесс (гастроэнтериты), отличающийся от типичной холерогенной реакции, наблюдаемой при действии холерного токсина. Тем не менее, до сих пор появляются отдельные сообщения о том, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор могут вызывать единичные и групповые заболевания холерой [4, 5]. Такая ситуация ставит вопрос о более глубоком изучении их генетической организации, выявлении уровня экспрессии генов, кодирующих дополнительные факторы патогенности, и оценки патогенности нетоксигенных штаммов с установленной структурой генома.

Цель работы — сравнительный анализ полных геномов нетоксигенных штаммов с разным набором генов патогенности и оценка их вирулентности при внутрикишечном заражении новорожденных крольчат.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектами исследования служили 26 токсигенных (7 изолятов) и нетоксигенных (19 изолятов) штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в различных регионах Российской Федерации (1970 — 2017 гг.) и сопредельных стран: в Украине (1995, 2011 гг.) и Туркменистане (1965, 1972 гг.). Все штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где их хранили при 4°C в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре LB (Luria-Bertani) при 37°C.

Производство растворимой гемагглютинин/протеазы (НА/Р) или термолabileного гемолизина определяли путем нанесения изолированных колоний штаммов *V. cholerae* методом реплик на пластинку агара (рН 7,2), содержащего соответственно либо 10% обезжиренного молока, либо 3% взвесь эритроцитов барана. Оценку результатов проводили согласно общепринятым методам [9, 11].

Вирулентность штаммов определяли по методу Dutta N.K. and Habbu M.K [9]. Крольчат возрастом 8-10 дней и массой 130-160 г заражали внутрикишечно 4-часовой агаровой культурой, выращенной при температуре 37°C, в концентрации 10⁷ КОЕ в 0,2 мл 0,9% р-ра NaCl, строго соблюдая условия, предъявляемые к проведе-

нию экспериментальных исследований на животных. Наблюдения за ними вели в течение 48 ч. Всех погибших или усыпленных хлороформом животных вскрывали для оценки развития специфического инфекционного процесса. Работу с животными проводили в соответствии с руководством и правилами по обращению, уходу и защите лабораторных животных (http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/home_en.htm). Протоколы экспериментов на животных были одобрены Комиссией по биоэтике РосНИПЧИ «Микроб» (разрешение №1 от 13.01.2017 г.).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили из бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора «ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit» (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Предварительно клетки были обработаны мертиолятом натрия до конечной концентрации 1:10000 (0,01%) и прогреты при 56°C в течение 30 мин.

Полногеномное секвенирование ДНК штаммов проводили с использованием технологии полупроводникового секвенирования на системе Ion PGM (Ion Torrent, Thermo Fisher Scientific, США). Подготовку библиотек для секвенирования осуществляли в соответствии с рекомендациями производителя. Единичные чтения (риды) были отфильтрованы по качеству программным пакетом Ion Torrent Suite v. 5.4. Затем перед сборкой все риды длиной менее 100 нуклеотидов удалял из полученных данных. Сборку геномов *de novo* в контиги проводили с помощью программы Newbler GS Assembler v. 2.6. Поиск SNP в геномах осуществляли с помощью программы Realphy 1.10, используя в качестве референсной последовательности геном штамма *V. cholerae* N16961 (NC_002505). Для изучения филогенетического распределения штаммов на основе анализа SNP 26 геномов штаммов *V. cholerae* использовали программный пакет Beast 2.4.0. Байесовский анализ проводили с использованием модели General Time Reversible (TR). Оценку параметров филогенетического дерева проводили в программе Tracer v. 1.6. Полученное филогенетическое дерево визуализировали в программе Figtree v. 1.4.3. Эксперименты ставили в 3-кратной повторности.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнительный анализ секвенированных нами полных геномов 19 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных как из воды поверхностных водоемов, так и от человека, и семи токсигенных изолятов, взятых для сравнения, позволил выявить три основные группы, различающиеся по составу мобильных элементов, связанных с вирулентностью, а также по нуклеотидной последовательности их генов (табл.). В первую в качестве исходного контроля входили токсигенные типичные штаммы, вызвавшие начало 7 пандемии и содержащие в геноме гены СТ вибрионов Эль-Тор (ctxAB^{Eltor}), а также геноварианты возбудителя, возникшие в 1991 г. в Юго-Восточной Азии, получившие через горизонтальный перенос гены СТ холерных вибрионов классического вибриона (ctxAB^{Class}) — возбудителя предыдущих пандемий азиатской холеры. Эти штаммы были выделены в разные годы (1970-2014 гг.) и на различных территориях от больных (M888, M1275, P18899, L3226, 76, 3265/80) либо из внешней среды (301). Более того, они были занесены в Россию из разных эндемичных по холере регионов (Иран, Индия, Пакистан, Непал). Сравнение их генома с последовательностью генома типичного штамма N16961, взятого в качестве референсного, подтвердило наличие в их первой хромосоме профага СТХф и ОП VPI-1 с ключевыми генами вирулентности — генами СТ (ctxAB) и TCR (tcpA-F), которые являются генетической основой эпидемической опасности штаммов. В состав СТХф входили также гены двух дополнительных токсинов Zot (от zonula occludens toxin) и Ace (от accessory cholera enterotoxin), а VPI-1 содержал весь набор основных регуляторных генов (toxT, tcpP и tcpH), контролирующей экспрессию генов СТ и TCR, а также структурный ген tcpA, кодирующий основную субъединицу TCR. Его нуклеотидная последовательность у типичного штамма (M888) была идентична таковой штамма N16961, содержащего ген tcpA^{Eltor}, тогда как геноварианты (M1275, P18899, L3226, 76, 3265/80, 301) несли аллель tcpA^{CIRS}, для

Присутствие структурных и регуляторных генов патогенности в геноме токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор

Штамм	Место выделения и год	Мобильные элементы							Коровая часть хромосомы			
		CTXφ			VPI-1				VPI-2	hlyA	hapA	rtxA
		ctxAB	zot	ace	tcpA	tcpP	tcpH	toxT	nanH			
M888	Астрахань, 1970	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1275	Дагестан, 1993	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L3226	Москва, 2010	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
76	Мариуполь, 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
301	Таганрог, 2011	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M139	Туркмения, 1965	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M1399	Астрахань, 1982	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
56	Мариуполь, 1995	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
P18778	Ростов. обл., 2005	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M1501	Калмыкия, 2011	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2613	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2687	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
2688	Калмыкия, 2015	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
124	Калмыкия, 2017	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M988	Туркмения, 1972	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1332	Челябинск, 2000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1337	Астрахань, 2000	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
P18748	Сочи, 2004	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2403	Одесса, 2011	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
M1522	Казань, 2014	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8	Калмыкия, 2014	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
433	2015, Сочи	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2843	Калмыкия, 2016	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3178	Калмыкия, 2017	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+

Примечание. * В скобках указано число замен (несинонимичных/синонимичных).

которого характерна несинонимичная замена аденина (А) на гуанин (G) в позиции 266 [12] (табл., указано только пять штаммов). Геном всех токсигенных штаммов имел и второй ОП — VPI-2 протяженностью 57,3 т.п.н., содержащий кластер генов, кодирующих систему рестрикции — модификации, а также кластер генов, происходящих от бактериофагов. Кроме того, в его состав входил локус VC1773-VC1784 с генами, кодирующими белки, участвующие в утилизации N-ацетилглюкозамина и сиаловой кислоты (*nan-nag* — область), используемых в качестве источника углерода, и ген нейраминидазы (*nanH*), усиливающий связывание энтеротоксина с эпителием клеток тонкого кишечника путем расщепления полисиалоганглиозидов до моносиалоганглиозидов GM1, являющегося рецептором для этого белка [14]. Нуклеотидная последовательность этого ОП у изученных токсигенных штаммов не отличалась от таковой референсного штамма. Помимо мобильных элементов, мы провели также анализ неуклеотидных последовательностей ряда генов коровой части хромосом, стабильно наследуемых всеми холерными вибрионами: *hlyA*, *harA* и *rtxA*. Выбор этих генов был обусловлен тем, что их продукты обеспечивают не только метаболическую возможность адаптации вибрионов к разным условиям обитания в водной среде, но и относятся к дополнительным факторам патогенности. Ген *hlyA* кодирует гемолизин/цитотоксин, *harA* определяет биосинтез гемагглютинин/протеазы, *rtxA* отвечает за продукцию мультифункционального цитотоксина RTX (*repeats in toxin*) [12, 16]. Если между нуклеотидными последовательностями генов *hlyA* и *harA* исследуемых и референсного штамма не было отличий, то в гене *rtxA* все геноварианты содержали одну замену G/A в позиции 13602, что привело к образованию стоп-кодона, преждевременно завершающего биосинтез этого белка (табл.). Таким образом, геном изученных токсигенных штаммов содержал весь набор основных и дополнительных генов вирулентности, характерных для референсного штамма. Исключением были лишь геноварианты возбудителя, число однонуклеотидных замен в геноме которых было незначительно. Генотип токсигенных штаммов обозначили как *ctxA⁺tcpA⁺*.

Вторая группа состояла из девяти нетоксигенных штаммов, выделенных в разные временные периоды (1965-2017 гг.) в различных регионах РФ, а также в Украине и Туркмении (табл.). Все эти штаммы были лишены профага СТХφ с ключевыми (*ctxAB*) и дополнительными (*zot* и *ace*) генами токсинов. Однако эти вибрионы имели в геноме весь блок генов, входящих в состав ОП VPI-1 — второго ключевого мобильного элемента, продукты которого абсолютно необходимы для колонизации вибрионами тонкого кишечника (табл.). Тем не менее, согласно результатам сравнительного биоинформационного анализа, проведенного с помощью программы Mauve 2.4.0, нуклеотидная последовательность VPI-1 ни одного из взятых нетоксигенных изолятов не была идентична таковой референсного токсигенного штамма. Отличия генома VPI-1 проявлялись в наличии в разных генах и межгенных пространствах разного типа мутаций: одиночных нуклеотидных замен, а также вставок и делеций разной протяженности (от 1 до 31 п.н.). Сравнение нуклеотидных последовательностей отдельных генов, наиболее важных для проявления вирулентных свойств — структурного гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу ТСР, и ключевых регуляторных генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH*, контролирующих экспрессию основных генов вирулентности, выявило следующее. Нуклеотидная последовательность *tcpA* восьми нетоксигенных штаммов оказалась идентичной таковой референсного штамма N16961. Лишь у одного штамма (M1501, Калмыкия, 2011) ген *tcpA* имел несинонимичную замену в позиции 626 (A/T) (табл.). Результаты анализа последовательностей трех регуляторных генов *toxT*, *tcpP* и *tcpH* показали полное сходство двух первых генов с таковыми токсигенных штаммов. Однако у пяти нетоксигенных штаммов (56, 2613, 2687, 2688, 124), четыре из которых выделены в Республике Калмыкия в 2015-2017 гг., структура гена *tcpH* была иной, поскольку в позиции 146 присутствовала одна замена — C/G. Выявленная генетическая особенность штаммов, выделенных в одном и том же регионе, позволяет полагать о циркуляции в указанные выше годы на территории Калмыкии одной и той же популяции вибрионов. Штамм M501,

выявленный в том же регионе в 2011 г. и имеющий иной генетический маркер (однонуклеотидную замену в гене *tcpA*), вероятно, относился к другой обособленной популяции вибрионов. Таким образом, несмотря на выявленные отличия генома VPI-1 холерных вибрионов первой и второй групп, у всех изученных нетоксигенных штаммов, за исключением M1501, основные структурные и регуляторные гены вирулентности *tcpA*, *toxT* и *tcpP* были идентичны этим генам типичных штаммов возбудителя холеры Эль Тор из первой группы. Точечную мутацию, выраженную в замене одного нуклеотида на другой, выявили лишь в гене *tcpH*. Генотип этих штаммов обозначили *ctxA⁻tcpA⁺*.

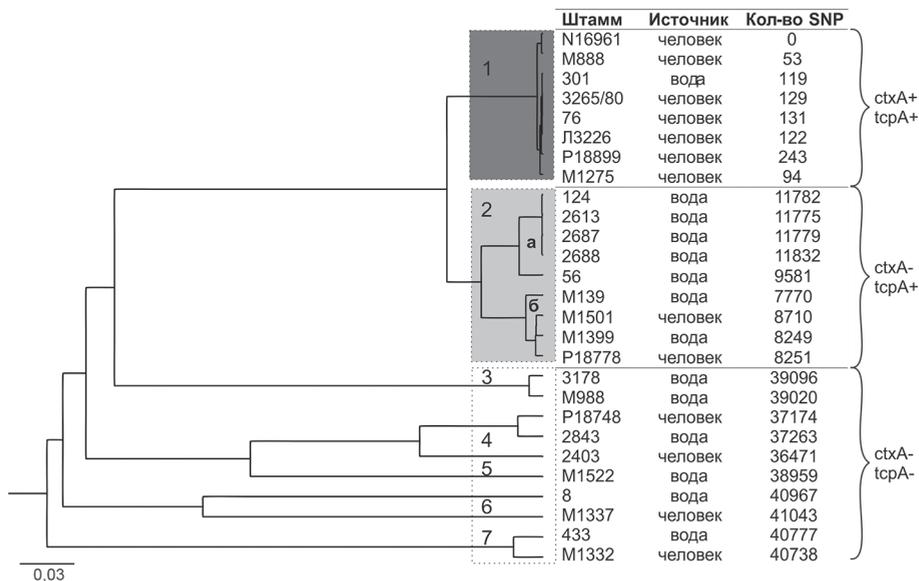
Установлено также присутствие в геноме штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* ОП VPI-2. Результаты сравнительного анализа его нуклеотидной последовательности, проведенного также с помощью программы Mauve 2.4.0, показал на гетерогенность структуры VPI-2 у этих вибрионов. Среди девяти изолятов *ctxA⁻tcpA⁺* лишь у пяти (56, 2613, 2687, 2688, 124, M988) этот ОП был идентичен по структуре таковому токсигенных штаммов. Следует отметить, что четыре из них выделили в Калмыкии в 2015-2017 гг. и согласно нашему предположению, высказанному выше, они были представителями одной и той же популяции, циркулирующей на этой территории. В то же время, четыре штамма (M139, M1399, P18778 и M1501), изолированные, помимо M1501, в других географически обособленных регионах, утратили значительную часть этого «острова» размером 34046-34826 п.н., включающую практически все гены рестрикции — модификации, а также фагоподобные гены. Сохранился только центральный «район» этого ОП, содержащий ген *panH* и прилежащую к нему область *pan-nag*. Однако в гене *panH* появились многочисленные однонуклеотидные замены — 17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных (табл.). Что касается генов коровой области *hlyA*, *harA* и *rtxA*, то мутациями были затронуты лишь два из них — *hlyA* и *rtxA*. Почти 90,0% штаммов в гене *hlyA* несли единственную несинонимичную замену тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 1358. В гене *rtxA* были также две несинонимичные замены G/A и A/G в позициях 6901 и 8731 соответственно, возможно не затрагивающие экспрессию этого гена (табл.).

Иную картину наблюдали при анализе генома нетоксигенных штаммов, относящихся к третьей группе, генотип которых обозначили *ctxA⁻tcpA⁻* из-за отсутствия не только профага СТХφ, но и ОП VPI-1. Из 10 изученных два штамма (M1332 и 433) практически утратили и ОП VPI-2, сохранив лишь единичные концевые гены. Протяженность их делеции составила 50505 — 50495 п.н. У восьми других этот мобильный элемент нес также делеции, но их протяженность была меньше — 339932 — 39076 п.н. По сравнению с интактным VPI-2 эти штаммы были лишены двух больших участков ДНК, содержащих гены рестрикции — модификации и фагоподобные гены. В состав их ОП входили лишь кластер генов *pan-nag*, а также ген *panH*. Учитывая функциональную важность гена *panH*, мы сравнили его нуклеотидную последовательность у всех штаммов, сохранивших часть генома VPI-2, с таковой референсного штамма и обнаружили большое число замен в нем. Их количество варьировало от 11-23 несинонимичных до 42-67 синонимичных в зависимости от штамма (табл.). Нуклеотидная последовательность коровых генов этой группы вибрионов также отличалась от таковой как токсигенных, так и нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* многочисленными однонуклеотидными заменами. Так, в гене *hlyA* штаммов *ctxA⁻tcpA⁻* общее количество синонимичных и несинонимичных замен в нем достигало 38-67 (табл.). Но наиболее высокий уровень вариабельности нуклеотидной последовательности был характерен для гена *rtxA*. В разных позициях в зависимости от штамма выявили 11-56 несинонимичных и 19-170 синонимичных однонуклеотидных замен (табл.).

Таким образом, обнаружено, что две исследованные группы нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻* имели четкие отличия друг от друга. Во-первых, в состав первой хромосомы штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* был внедрен геном ОП VPI-1, тогда как изоляты *ctxA⁻tcpA⁻* не имели его. Во-вторых, если более 55,0% изученных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* несли в геноме интактный VPI-2 и лишь около 44,0%

содержали протяженные делеции в этом мобильном элементе, то в случае изолятов $ctxA^-tcpA^-$ картина была другой. Число штаммов с делетированным ОП возрастало до 80,0%, а 20,0% были лишены его. В третьих, изоляты $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$ имели разные аллели генов *hlyA*, *hapA* и *gtxA*, что не исключает продукцию ими различающихся по биологической активности таких дополнительных факторов патогенности как гемолизин/цитотоксин, гемагглютинин/протеаза и цитотоксин RTX.

Столь значимые различия в структуре генома сравниваемых групп штаммов ставят вопрос об их филогенетических связях. Для его решения провели филогенетическую реконструкцию 26 штаммов: семи токсигенных $ctxA^+tcpA^+$ и 19 нетоксигенных (девять изолятов $ctxA^-tcpA^+$ и десять — $ctxA^-tcpA^-$), выполненную методом SNP-типирования. При сравнении их нуклеотидной последовательности с таковой референсного штамма N16961 обнаружили 108292 одиночных нуклеотидных замен, или SNPs, в 99419 генах коровой части генома длиной 3234049 п.н. и 8873 межгенных пространствах. На основе анализа единичных полиморфных нуклеотидов в геноме этих штаммов построили филогенетическое дерево (рис.), на котором показано, что все токсигенные штаммы формировали отдельный кластер. В него входил референсный штамм N16961 из Бангладеш (1975 г.), являющийся типичным и отличающийся от других штаммов этого кластера 53–243 SNPs. При этом наиболее значимые различия по нуклеотидным заменам (111–231) были между N16961 и геновариантами, занесенными на территорию России и Украины в более поздние годы — 2006–2014. Нетоксигенные штаммы $ctxA^-tcpA^+$ (9 изолятов) сформировали второй кластер, отличия которых от референсного штамма достигали 5602–8022 SNPs. Более того, эта группа штаммов оказалась генетически гетерогенной — различия между ними составляли от 9 до 7813 SNPs. Этот кластер включал, по крайней мере, две подгруппы (кластер 2, подгруппы а, б). В подгруппу а вошли четыре штамма из Калмыкии (124, 2613, 2687, 2688). Это служит в пользу нашего предположения относительно их принадлежности к одной и той же популяции, циркулировавшей в водоемах этого региона в 2015–2017 гг. Вместе с тем, штамм M1501, выделенный также в этом регионе в 2011 г., но вошедший в подгруппу б, относился, видимо, к другой популяции вибрионов. В целом кластер 2, состоящий из нетоксигенных штаммов с генотипом $ctxA^-tcpA^+$, и кластер 1, включающий токсигенные изоляты, различались между собой в среднем



Филогенетическое дерево токсигенных и нетоксигенных штаммов *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Темно-серым выделен кластер токсигенных штаммов $ctxA^+tcpA^+$, светло-серым — кластер нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+$; белым обозначены кластеры нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-$.

по 9662 SNPs. Выявлено также 3037 SNPs, специфичных для 2 кластера. Несмотря на явное отсутствие генетической близости, представленные данные филогенетического анализа позволяют говорить о возможном существовании в далеком прошлом общего предка токсигенных и нетоксигенных $ctxA^-tcpA^+$ штаммов, дальнейшая дивергенция которых привела к формированию двух кластеров. Что касается нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-$, то совершенно очевидна их значительная удаленность от первых двух кластеров, а также высокий уровень их гетерогенности. Таким образом, байесовский анализ однонуклеотидных полиморфизмов на основании полного геномного секвенирования 28 исследуемых штаммов показал их филогенетические взаимосвязи. Группа токсигенных штаммов оказалась монофилетической, имеющей от 47 до 232 SNPs в консервативной части генома в сравнении с референсным, что может указывать на единый источник их происхождения. Нетоксигенные штаммы разделились на разные филогенетические группы, отличающиеся друг от друга по SNPs. Четко выражена обособленность широко распространенных в водоемах нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-$, вошедших в 3-7 кластеры за счет высокой генетической вариабельности коровой части генома, от довольно редко выделяемых из внешней среды второй группы штаммов $ctxA^-tcpA^+$.

Поскольку сведения о взаимосвязи структуры генома *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и их ролью в патогенезе холеры остаются противоречивыми, мы изучили патогенные свойства 12 нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-$ (пяти изолятов) и $ctxA^-tcpA^+$ (семи изолятов) с известной и представленной выше структурой генома на модельных животных — 7-8-дневных крольчатах (40 животных). Кроме того в качестве контроля 15 животных заразили пятью токсигенными штаммами (M888, 76, L3226, M1275, 301), содержащими профаг СТХφ с генами холерного токсина. Проведенные исследования показали, что только токсигенные штаммы вызывали у животных развитие выраженной холерогенной реакции, типичной при экспериментальной холере — перерастяжение толстого кишечника прозрачной жидкостью и растяжение тонкого кишечника полупрозрачным содержимым. Вместе с тем, в случае нетоксигенных холерных вибрионов, независимо от их генотипа, ни в одном случае не наблюдали развития холерогенной реакции. У животных либо не было видимых изменений в кишечнике, либо были изменения, характерные для энтеропатогенного эффекта — слабое или умеренное растяжение кишечника мутной непрозрачной жидкостью, часто с образованием газов. Отдельного упоминания заслуживает тот факт, что среди изученных нетоксигенных штаммов со слабой энтеропатогенной реакцией были два штамма (M1332 $ctxA^-tcpA^-$ и P-18778 $ctxA^-tcpA^+$), выделенные от людей в Челябинске (2000 г.) и Ростовской области (2005 г.) соответственно и отнесенные ранее рядом исследователей к группе нетоксигенных изолятов, способных вызывать холеру [4, 5].

Принимая во внимание присутствие в геноме нетоксигенных вибрионов генов дополнительных факторов патогенности, которые могли вызвать энтеропатогенную реакцию, мы определили уровень экспрессии *hlyA* и *hapA*, полагая, что он будет различным у штаммов $ctxA^-tcpA^-$ и $ctxA^-tcpA^+$ из-за выявленных различий между ними в нуклеотидной последовательности этих генов. Однако наше предположение не подтвердилось, так как уровень продукции гемолизина и гемагглютинин/протеазы у обеих групп холерных вибрионов был примерно одинаков. Более того, экспрессия этих генов практически у всех нетоксигенных штаммов была эффективной, что может указывать на реально большой вклад их продуктов в энтеропатогенность вибрионов.

Таким образом, проведенный сравнительный анализ инфекционного процесса у лабораторных животных, зараженных токсигенными и нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с известной структурой генома подтвердил определяющую роль холерного токсина в развитии специфического холерогенного синдрома. При отсутствии этого ключевого фактора патогенности нетоксигенные штаммы могут быть причиной лишь энтеропатогенного эффекта, вызванного, видимо, дополнительными токсинами.

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты мониторинга вибриофлоры водных объектов в РФ показали, что на фоне эпидемиологического благополучия регистрируется ежегодное выделение нетоксигенных штаммов холерного вибриона O1 серогруппы биовара Эль Тор. Только за последнее десятилетие было обнаружено более 700 нетоксигенных штаммов, выделенных из внешней среды и людей, среди которых примерно 98% не имели ключевых генов патогенности и эпидемичности (генотип $ctxA^-tcpA^-$) и лишь около 2% генотипом $ctxA^-tcpA^+$ содержали в геноме ОП VPI-1 с генами основного фактора колонизации. При этом на отдельных территориях РФ (Республика Калмыкия, Краснодарский край, Ростовская область, Приморский край) нетоксигенные холерные вибрионы выявляли наиболее часто [1 — 3].

Анализ генома секвенированных нами 19 природных нетоксигенных штаммов, выделенных на территории РФ и сопредельных государств, позволил получить новые сведения относительно их генетических свойств. Установлено, что почти 90% изученных штаммов $ctxA^-tcpA^+$ в геноме VPI-1 несли ген $tcpA$ типичных штаммов возбудителя холеры Эль Тор. В целом же структура VPI-1 у изолятов $ctxA^-tcpA^+$ была очень сходной или идентичной таковой токсигенных вибрионов Эль Тор. Геном другого ОП VPI-2, общего для двух групп штаммов $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$, оказался нестабильным. Впервые выявлено и подтверждено, что более 40% изолятов $ctxA^-tcpA^+$ несли делетированный VPI-2 и имели от 17-19 до 46-47 несинонимичных и синонимичных однонуклеотидных замен соответственно в гене $panH$, размещенном на этом ОП. Холерные вибрионы $ctxA^-tcpA^-$ либо не имели VPI-2, либо редукция его генома была еще более выраженной. Важно отметить, что у всех нетоксигенных штаммов с делетированным VPI-2 в его геноме сохранился участок ДНК, содержащий ген нейраминидазы и гены утилизации аминокислот и сиаловых кислот, что, видимо, связано с их большой ролью в процессе выживания вибрионов в стрессовых условиях водной среды [14]. Обнаружены также значительные различия между изолятами $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$ по нуклеотидной последовательности генов коровой области хромосомы — $hlyA$, $hapA$ и $gtxA$. У штаммов $ctxA^-tcpA^-$ однонуклеотидных несинонимичных замен в этих генах было в 53 раза больше по сравнению с изолятами $ctxA^-tcpA^+$, а синонимичных — в 172 раза. Возможно, такие различия в сравниваемых участках генома штаммов являются следствием адаптации вибрионов к меняющимся условиям окружающей среды и отражением степени их филогенетической удаленности друг от друга.

Действительно, реконструкция филогении их геномов подтвердило это предположение. Группа токсигенных штаммов, независимо от времени, места и источника их выделения, вошла в один кластер с наличием в их геноме от 53 до 243 SNPs по сравнению с типичным референсным штаммом N16961, что указывает на их клональное происхождение. Эти данные полностью согласуются с результатами других исследователей [2, 12]. Нетоксигенные штаммы образовали отдельные кластеры. Кластер 2 включал штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^+$ и отличался от кластера токсигенных штаммов в среднем на 9662 SNPs, что дает возможность говорить об их давней обособленности друг от друга. Тем не менее, наличие в их геноме VPI-1, идентичного или сходного с таковым возбудителя холеры Эль Тор, небольшие различия в нуклеотидной последовательности изученных генов коровой части хромосомы могут указывать на существование общего предка у штаммов первых двух кластеров. Период обособления 1 кластера от 2 мог быть, видимо, связан с приобретением нетоксигенными клонами в эндемичных очагах, расположенных за пределами РФ, через горизонтальный перенос новых мобильных элементов (профагов вирулентности, островов пандемичности), необходимых для формирования возбудителя холеры Эль Тор. Выявление штаммов $ctxA^-tcpA^+$ на территории РФ, способных к сохранению в водной среде в течение достаточно продолжительного времени (до 9 месяцев и более), возможно, обусловлено их заносом. Это предположение полностью согласуется с точкой зрения других исследователей [1, 2, 6], однако прямых доказательств такого процесса пока нет. В этой связи, принципиально важным является вопрос о длительности циркуляции одной и той же популяции вибрионов $ctxA^-tcpA^+$ на территории РФ. Согласно нашим данным, полученным при анализе

генома пяти штаммов, изолированных в Калмыкии в 2011-2017 гг., можно говорить, что четырех из них (124, 2613, 2687, 2688) являются, видимо, представителями одной и той же популяции, циркулирующей в этом регионе длительное время (2015-2017 гг.). Вместе с тем, штамм M1501, выделенный также в этом регионе в 2011 г., относился, видимо, к другой обособленной популяции, появившейся в результате независимого заноса. Однако для полного прояснения этих вопросов нужны дополнительные исследования.

Отдельную ветвь эволюции представляли штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^-$, сформировавшие кластеры 3-7. Огромные отличия этих штаммов, вошедших в состав этих кластеров, от первых двух (39098-41045 SNPs), обнаружение 562-16722 специфичных SNPs, отсутствующих у всех других изученных изолятов, все это свидетельствовало о независимом происхождении указанных вибрионов, широко распространенных в воде поверхностных водоемов России. Более того, уровень генетической вариабельности этих изолятов был очень высок, что может быть следствием пребывания разных штаммов в различных стрессовых условиях окружающей среды. Сравнение последовательностей указанных штаммов показало наличие 562 — 41255 SNPs, отличающих нетоксигенные штаммы в рамках пяти последних кластеров. Эти штаммы, видимо, являются частью естественной гетерогенной микрофлоры воды поверхностных водоемов («водные» вибрионы Эль Тор), представители которой не имеют генетической близости с возбудителем холеры, что полностью совпадает с данными других исследователей [17].

Далее для подтверждения того, что возбудителем холеры могут быть только токсигенные штаммы, мы провели эксперименты по внутрикишечному заражению модельных животных клетками 12 нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$, выделенных в разное время и на различных территориях, полный геном которых был секвенирован. В качестве контрольных образцов для заражения использовали семь вирулентных штаммов также с известной структурой генома. Оказалось, что только токсигенные штаммы вызывали у животных типичную холерную инфекцию. Ни один из проверенных нетоксигенных штаммов, лишенных генов холерного токсина, не был способен к развитию специфической холерогенной реакции у зараженных кроликов. Вместе с тем, нетоксигенные штаммы в ряде случаев вызывали слабый или умеренный энтеропатогенный эффект. Это было ожидаемо, поскольку все проверенные штаммы эффективно продуцировали, по крайней мере, два дополнительных фактора патогенности — термолabileмный гемолизин и гемагглютинин/протеазу, обладающих цитотоксической активностью и способностью разрушать цитокины хозяина, участвующие в мобилизации защитных сил макроорганизма.

Обобщая сказанное, следует отметить, что к холерным вибрионам O1 серогруппы биовара Эль Тор относят как токсигенные, так и нетоксигенные штаммы, различающиеся по молекулярно-биологическим свойствам и эпидемической значимости. Среди изученных 26 штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных как из воды поверхностных водоемов, так и от человека, выявлено три основные группы с разным генотипом: токсигенные $ctxA^+tcpA^+$, взятые для сравнения, нетоксигенные $ctxA^-tcpA^+$ и нетоксигенные $ctxA^-tcpA^-$. На основе анализа секвенированных нами полных геномов нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$, изолированных в разное время на территории различных регионов РФ и сопредельных стран, установлено, что эти штаммы отличаются друг от друга не только по составу и структуре мобильных элементов. Существенными были различия в нуклеотидной последовательности изученных генов коровой области, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Более того, обнаружены огромные отличия штаммов $ctxA^-tcpA^+$ и $ctxA^-tcpA^-$ по количеству однонуклеотидных замен в геноме, достигающих до 39098-41045 SNPs. Большая частота изменений в геноме холерных вибрионов $ctxA^-tcpA^-$, независимо от времени и места их выделения, по сравнению с таковой у изолятов $ctxA^-tcpA^+$, дает веские основания считать, что эти штаммы имеют давнее и независимое происхождение. Длительная циркуляция этих штаммов в водной среде обусловили высокий уровень их генетической вариабельности в результате воздействия различных стрессовых факторов. Высказано предположение о заносе штаммов $ctxA^-tcpA^+$ на территорию РФ. На модели штаммов

с установленной структурой генома экспериментально доказана неспособность нетоксигенных холерных вибрионов вызывать развитие типичной холерогенной реакции у кроликов-сосунков. Вероятно, эти вибрионы реализуют в восприимчивом организме другие факторы патогенности. Однако это заболевание относится к острым кишечным инфекциям, не имеющим, в отличие от холеры, тенденции к эпидемическому распространению.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA*tcpA⁺, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014, 9:32-34.
2. Миронова Л.В. Научное обоснование совершенствования подходов к идентификации и молекулярному типированию *Vibrio cholerae* в системе микробиологического мониторинга. Автореф. дисс. докт. мед. наук. Иркутск, 2017.
3. Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В., Кругликов В.Д., Титова С.В., Иванова С.М., Ковалева Т.В., Анисимова Г.Б. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007—2016 гг. Прогноз на 2017 г. Проблемы особо опасных инфекций. 2017, 1:13-20.
4. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 *ctxA*tcpA⁺. *Журн. микробиол.* 2007, 1:23-29.
5. Ратникова Л.И., Кузьмина Н.Я. Случай холеры в Челябинске. *Эпидемиол. инф. болезней*. 2002, 2:53-54.
6. Сизова Ю.В. Влияние стрессового воздействия на токсинопродукцию и другие свойства холерных вибрионов O1 серогруппы. Автореф. дисс. канд. биол. наук. Саратов, 2017.
7. Смирнова Н.И., Кутырев В.В., Заднова С.П., Краснов Я.М., Горяев А.А., Лозовский Ю.В. Генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в разные периоды 7 пандемии холеры. *Журн. микробиол.* 2011, 3:3-10.
8. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016, 52(9):1029-1041.
9. Dutta N.K., Habbu M.K. Experimental cholera in infant rabbits: a method for chemotherapeutic investigation. *Brit. J. Pharmacol.* 1955, 10:153-9.
10. Dziejman M., Balon E., Boyd D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99(3):1556-1561.
11. Finkelstein R.A., Boesman-Finkelstein M., Chang Y. et al. *Vibrio cholerae* hemagglutinin/protease, colonial variation, virulence, and detachment. *Infect. Immun.* 1992, 60(2):472-478.
12. Hu D., Liu B., Feng L. et al. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2016, 113(48): E7730-E7739.
13. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W. C. et al. M. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholera*. *Nature*. 2000, 406(6795):477-483.
14. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002, 148:3681-3693.
15. Menzl K., Maier E., Chakraborty T. et al. HlyA hemolysin of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Eur. J. Biochem.* 1996, 40:646-654.
16. Olivier V., Haines G. K., Tan Y. et al. Hemolysin and the multifunctional autoprocessing RTX toxin are virulence factors during intestinal infection of mice with *Vibrio cholerae* El Tor O1 strains. *Infect. Immun.* 2007, 75(10):5035-5042.
17. Pang B., Yan M., Cui Z. et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007, 189(13):4837-49.
18. Yemen: Cholera Response Weekly Epidemiological Bulletin: W4 2018. Report from World Health Organization. 28 Jan 2018:1-11.

Поступила 09.04.18

Контактная информация: Смирнова Нина Ивановна, д.б.н., проф.,
410005, Саратов, Университетская, 46, р.т. (8452) 26-47-23