

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 El Tor в современный период пандемии холеры

Смирнова Н.И.[✉], Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В.

Российский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

Аннотация

Введение. Вариабельность генома генетических вариантов возбудителя холеры El Tor обусловила появление штаммов, несущих мутации в различных генах патогенности и лекарственной устойчивости. Такая ситуация требует оценки направления этих изменений для прогнозирования патогенного потенциала ранее неизвестных вариантов и своевременной разработки новых средств диагностики и профилактики.

Цель работы — анализ динамики изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости генетических вариантов *Vibrio cholerae* El Tor из эндемичных по холере стран и России.

Материалы и методы. Использовали секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 104 штаммов *V. cholerae* El Tor, взятых из баз данных NCBI GenBank и European Nucleotide Archive, а также полногеномные сиквенсы, полученные нами. Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы UGEN v.45.1. Для построения дендрограммы по алгоритму максимальной экономии применяли программный пакет «BioNumerics v. 7.6» на основе множественного выравнивания, полученного с помощью программы «Snippy 4.6.0».

Результаты. Сопоставлены секвенированные геномы 103 штаммов геновариантов, выделенных на территории 9 эндемичных стран Азии и Африки, а также в России в 1991–2022 гг. Показано, что процесс изменения генома геновариантов был многоступенчатым и происходил за счет последовательного накопления точечных мутаций в ключевых (*ctxB* и *tcpA*) и дополнительных (*rtxA*) генах патогенности и коровых генах резистентности к антибиотикам (*gyrA*, *parC* и *carR*), а также делецией в мобильном элементе SXT. Наиболее важным стало изменение в гене *ctxB* и появление новых геновариантов с аллелем *ctxB7*, вытеснивших ранее сформированные штаммы. Анализ измененных участков генома 83 штаммов геновариантов из эндемичных регионов выявил 8 генотипов, тогда как штаммы (21 изолят), завезённые в Россию, относились лишь к 5 генотипам, включая высоковирулентные геноварианты с аллелем *ctxB7* и утраченным биоварспецифическим свойством Pol^R за счёт мутации гена *carR*. Установленная тесная филогенетическая связь геновариантов, выявленных в России, со штаммами из эндемичных стран Азии подтверждает их завоз из этого региона.

Заключение. Показано последовательное возникновение и накопление новых мутаций в генах патогенности и лекарственной устойчивости в геноме геновариантов в эндемичных регионах, что приводит к изменению их эпидемически важных свойств. Установлен завоз в Россию новых геновариантов с высокой вирулентностью, что указывает на необходимость постоянной оценки изменений генома этого патогена для своевременной разработки адекватных средств генодиагностики и профилактики.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, геноварианты, изменчивость, вирулентность, лекарственная устойчивость, филогенетические связи

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 El Tor в современный период пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2023;100(5):346–357.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

EDN: <https://www.elibrary.ru/tuekup>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

Analysis of changes in the genome of *Vibrio cholerae* O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic

Nina I. Smirnova[✉], Darya A. Rybalchenko, Yulii V. Lozovsky,
Yaroslav M. Krasnov, Vladimir V. Kuttyrev

Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia

Abstract

Introduction. The genome variability of genetic variants of El Tor cholera agent has led to the emergence of strains carrying mutations in various genes associated with epidemically important pathogen properties. This situation requires an assessment of the trends in these changes in order to predict the pathogenic potential of previously unknown variants and promptly develop new tools for their diagnostics and prevention.

The purpose of this work was to analyze the dynamic changes in pathogenicity and drug resistance genes of *V. cholerae* El Tor genetic variants from endemic countries and Russia.

Materials and methods. We analyzed complete genome nucleotide sequences of 104 *V. cholerae* El Tor strains from the NCBI Gen Bank and European Nucleotide Archive databases, as well as those obtained by us. The nucleotide sequences were analyzed using the UGEN v. 45.1 software. The dendrogram was constructed using maximum parsimony algorithm in BioNumerics v.7.6 software package based on the multiple alignment generated using the Snippy 4.6.0 program.

Results. Genomic sequences of 103 strain genovariants isolated on the territory of nine endemic countries of Asia and Africa, as well as in Russia in 1991-2022, have been compared. It is shown that the process of genovariant genome changing was multistage and occurred due to the continuous accumulation of point mutations in key (*ctxB* and *tcpA*) and additional (*rtxA*) genes of pathogenicity and core genes of antibiotic resistance (*gyrA*, *parC* and *carR*), as well as a deletion in SXT element. The most important was the change in the *ctxB* gene and the emergence of new genovariants with the *ctxB7* allele, which replaced the previously prevalent strains. Analysis of altered genome regions of 83 strains from endemic regions has revealed eight genotypes, while the strains (21 isolates) imported to Russia belonged to only five of them including highly virulent strains with the *ctxB7* allele and lost Pol^R biovar-specific feature due to *carR* gene mutation. The established close phylogenetic relatedness of genovariants from Russia with strains from endemic Asian countries confirms their importation from this region.

Conclusion. The sequential occurrence and accumulation of mutations in the pathogenicity and drug resistance genes in the genome of genovariants in endemic regions have been shown, which leads to a change in their epidemically important features. The importation of new highly virulent genovariants into Russia has been established, which indicates the need for an ongoing assessment of changes in the genome of this pathogen for the timely development of adequate means of gene diagnostics and prevention.

Keywords: *V. cholerae*, genovariants, variability, virulence, drug resistance, phylogenetic relations

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Smirnova N.I., Rybalchenko D.A., Lozovsky Yu.V., Krasnov Ya.M., Kuttyrev V.V. Analysis of changes in the genome of *Vibrio cholerae* O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2023;100(5):346–357.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-389>

EDN: <https://www.elibrary.ru/tuekup>

Введение

Семь известных пандемий холеры были вызваны токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*, относящимися к серогруппе O1 и двум биоварам — классическому и El Tor [1]. Среди них особый интерес представляют штаммы *V. cholerae* El Tor, вызвавшие текущую, 7-ю пандемию холеры, продолжающуюся более 60 лет (с 1961 г.). Постоянные эпидемии и вспышки холеры El Tor в эндемичных

странах Азии, Африки и Америки обуславливают риск завоза этой инфекции на территорию России, не являющейся эндемичной по холере [2].

Установлено, что глобальное распространение холеры из первичного очага (Бенгальского залива) в другие страны мира происходило тремя независимыми, но перекрывающимися волнами [3]. Молекулярно-генетический анализ различных штаммов показал, что на протяжении 3 волн в геноме возбу-

дителя происходили значительные изменения. Эпидемии холеры в 1961–1991 гг. (1-я волна) вызывали токсигенные штаммы с типичными для биовара El Tor свойствами, содержащие в составе профага СТХ^{ElT} гены *ctxAB3*, кодирующие, соответственно, А- и В-субъединицы холерного токсина — ключевого фактора патогенности [4]. Однако в 1991–1994 гг. (начало 2-й волны) в Бангладеш впервые были обнаружены генетически изменённые штаммы, несущие ген *ctxB1* *V. cholerae* классического биовара — возбудителя предыдущих 6 пандемий азиатской холеры. Эти геноварианты возникли, видимо, в результате горизонтального переноса профага СТХ классического типа (СТХ^{class}) с генами *ctxAB1* от *V. cholerae* классического биовара типичным штаммам *V. cholerae* El Tor [5]. Вместе с тем геном геновариантов оказался нестабильным, и в последние два десятилетия в эндемичных регионах появились штаммы с новыми мутациями в мобильных генетических элементах, связанных с патогенностью (остров патогенности VPI-1, профаг СТХφ) или способностью к эпидемическому распространению (остров пандемичности VSP-II) [6, 7]. Возникла мутация в гене *tcpA* из острова патогенности VPI-1, кодирующем основной белок токсин-корегулируемых пилей или TCP — ключевого фактора колонизации. Новый аллель гена *tcpA* обозначили как *tcpA*^{CRIS101} [8] или *tcpA*^{CRIS}. Затем появились штаммы с новым аллелем гена *ctxB* — *ctxB7* [6]. Важным следствием таких мутаций стало усиление вирулентности возбудителя за счёт повышенной продукции холерного токсина [9, 10]. Кроме того, обнаружили вариабельность устойчивости к лекарственным препаратам, связанную с присутствием в геноме разных типов интегративного конъюгативного элемента (integrative conjugating element, ICE) SXT, несущих различный набор генов резистентности к антибиотикам [11]. Более того, у геновариантов появились мутации в коровой области хромосомы. Так, штаммы из 3-й волны в гене *rtxA*, кодирующем многофункциональный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in toxin), имели null-мутацию (аллель *rtxA4*), которая привела к образованию стоп-кодона и утрате биосинтеза этого токсина [12]. Выявлены также 2 точечные мутации в генах *gyrA*(G248T) и *parC*(C254T), кодирующих топоизомеразы, которые обусловили формирование у патогена резистентности к налидиксовой кислоте [13]. Более того, недавно стало известно о возникновении геновариантов с мутацией в регуляторном гене *carR*(G265A), ставшей причиной утраты их устойчивости к полимиксину В — одному из фенотипических маркеров вибрионов El Tor [14].

Появление и широкое распространение различных генетических вариантов возбудителя в эндемичных очагах холеры привело к их завозу на территорию России в период 2-й и 3-й волн пан-

демии. Изучением геновариантов занимались многие исследователи [15–18]. Особое внимание было уделено установлению филогенетических связей штаммов из разных эндемичных и неэндемичных регионов [19–23]. Однако многие вопросы о динамике изменений генома геновариантов в течение длительного периода изучены недостаточно. Так, не проведён сравнительный анализ изменчивости генотипов штаммов геновариантов, выделенных в эндемичных регионах и на территории России в течение длительного периода. Между тем поиск генетических особенностей штаммов, выделенных на различных территориях и в разные временные периоды, представляет значительный интерес для понимания направления изменения вирулентных свойств возбудителя. Более того, сведения о вариабельности генов патогенности и лекарственной устойчивости новых геновариантов в случае их завоза в Россию необходимы для своевременной разработки адекватных генодиагностических и профилактических средств. Всё это определяет актуальность работы.

Цель работы — анализ динамики изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости генетических вариантов *V. cholerae* El Tor из эндемичных стран и России.

Решение поставленных вопросов было основано на анализе сиквенсов полных геномов различных штаммов геновариантов, циркулирующих в последние годы в разных эндемичных регионах и завезённых в Россию. Выбранный подход позволяет получить более полную и достоверную информацию по сравнению с другими методами об изменении указанных генов, расположенных в разных участках хромосомы.

Материалы и методы

В работе использовали секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 86 штаммов геновариантов *V. cholerae* El Tor (1991–2022 гг.), взятых из баз данных NCBI GenBank и European Nucleotide Archive, а также полученные нами сиквенсы 14 штаммов геновариантов, завезённых в Россию в 1993–2014 гг., и 4 штаммов, выделенных во время вспышки холеры в 2011 г. на Украине [24] (таблица).

Для проведения исследований штаммы получали из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где они хранились в лиофилизированном состоянии. Бактерии культивировали в бульоне и агаре LB при 37°C.

Чувствительность 18 штаммов к 2 антибиотикам определяли общепринятым диско-диффузионным методом с использованием полимиксина В (50 мкг) и налидиксовой кислоты (30 мкг) фирм «HiMedia Laboratories Pvt. Ltd» и «Oxoid».

Для проведения секвенирования выполняли выделение и очистку геномной ДНК из бактериаль-

Штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе

Strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, the whole genome nucleotide sequences of which were used in the study

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Алель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
Штаммы из эндемичных стран Азии и Африки Strains from endemic Asian and African countries								
N16961	Бангладеш, 1975 Bangladesh, 1975	<i>ctxB3</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	AE003852, AE003853
V212-1	Индия, 1991 India, 1992	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	ERR018125
VC51	Индия, 1992 India, 1992	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	ERR018124
MJ-1236	Бангладеш, 1994 Bangladesh, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	CP001485
CIRS101	Бангладеш, 2002 Bangladesh, 2002	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ACVW01000000
4519	Индия, 2005 India, 2005	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERR025374
4656	Индия, 2006 India, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013258
4488	Индия, 2006 India, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013234
4551	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERR025357
4623	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013267
4646	Индия, 2007 India, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	ERS013237
VN243P07	Вьетнам, 2007 Vietnam, 2007	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR6027863
IND031	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062980
IND033	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062982
IND041	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062990
IND048	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX062997
VC-6	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308703
VC-14	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308715
VC-19	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308722
VC-16	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308717
VC-8	Непал, 2010 Nepal, 2010	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR308705
BGD043	Бангладеш, 2010 Bangladesh, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179812
BGD113	Бангладеш, 2010 Bangladesh, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179747
NHCM-053	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	GCA001187105
BGD117	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179750
BGD056	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179776
IND051	Индия, 2011 India, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063000
IDH-04808	Индия, 2012 India, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX063018
BGD060	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179773
BGD065	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179774
BGD067	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179777
BGD119	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179752
BGD120	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179753
BGD122	Бангладеш, 2013 Bangladesh, 2013	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179755
BGD082	Бангладеш, 2013 Bangladesh, 2013	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179791
IND071	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063020
IDH-05298	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063023
IND079	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063028
IND082	Индия, 2014 India, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063031
IND090	Индия, 2014 India, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX063039

Продолжение таблицы | Continuation of the Table

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Аллель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
BGD095	Бангладеш, 2014 Bangladesh, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179793
BGD089	Бангладеш, 2014 Bangladesh, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179789
BGD128	Бангладеш, 2015 Bangladesh, 2015	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179758
BGD132	Бангладеш, 2015 Bangladesh, 2015	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179760
Tanz 14	Танзания, 2015 Tanzania, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS2318685
UG026	Уганда, 2015 Uganda, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744332
4621STDY-6714750	Кения, 2015 Kenya, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572785
4621STDY-6714749	Кения, 2015 Kenya, 2015	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572784
UG020	Уганда, 2016 Uganda, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744331
UG010	Уганда, 2016 Uganda, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN08744330
4621STDY-6714780	Кения, 2016 Kenya, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERS1572815
BGD143	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179768
BGD140	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	DRX179766
IND220	Индия, 2016 India, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179803
IND231	Индия, 2016 India, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179808
BGD137	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	DRX179763
CNRVC170168	Йемен, 2016 Yemen, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2265674
CNRVC170175	Йемен, 2016 Yemen, 2016	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269613
NALMLE36	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVL00000000
NALMLE34	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVJ00000000
NALMLE37	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIVM00000000
THSTI_56695	Индия, 2017 India, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2270661
THSTI_56712	Индия, 2017 India, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2270662
CNRVC170179	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269617
CNRVC170208	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269811
CNRVC170197	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	ERR2269710
NALMLE05	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SIUG00000000
NALMLE01	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIUC00000000
NALMLE03	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIUE00000000
NALMLE31	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SIVG00000000
KDCP136	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297670
KDCP183	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	SRR14297546
CMR50	Камерун, 2019 Cameroon, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN16213389
CMR44	Камерун, 2019 Cameroon, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMN16213387
KDCP208	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297682
KDCP245	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297553
KDCP262	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297555
KMCP107	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297699
KMCP145	Бангладеш, 2019 Bangladesh, 2019	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SRR14297701
DMAVC-20	Бангладеш, 2021 Bangladesh, 2021	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514837
DMAVC-1	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514672
DMAVC-16	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514833
DMAVC-19	Бангладеш, 2022 Bangladesh, 2022	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS}	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	SAMD00514836

№ No.	Место и год выделения The site and year of isolation	Аллеель генов Allele of genes			Структура генов Genes structure			Номер доступа в Gen Bank/ENA Gen Bank/ENA access number
		<i>ctxB</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>	
Штаммы из Российской Федерации Strains isolated in the Russian Federation								
*M-1275	Россия, Каспийск, 1993 Russia, Kaspiysk, 1993	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	LRAF00000000
*M-1270	Россия, Набережные Челны, 1993 Russia, Naberezhnye Chelny, 1993	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	VXCC00000000
*M-1293	Россия, Республика Дагестан, 1994 Russia, Dagestan Republic, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	JFFW00000000
I-1181	Россия, Новосибирская область, 1994 Russia, Novosibirsk region, 1994	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	UCN00000000
I-1263	Россия, Иркутск, 1997 Russia, Irkutsk, 1997	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	JPLT00000000
*P-17644	Россия, Ачинск, 1997 Russia, Achinsk, 1997	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	JRTW00000000
*M-1327	Россия, Дагестан, 1998 Russia, Dagestan, 1998	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	LRFE00000000
I-1300	Россия, Южно-Сахалинск, 1999 Russia, Yuzhno-Sakhalinsk, 1999	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	int.	int.	int.	JZCC00000000
*M-1344	Россия, Казань, 2001 Russia, Kazan, 2001	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{ER}</i>	<i>rtxA1</i>	<i>G248T</i>	int.	int.	NEDY00000000
*M-1429	Россия, Белорецк, 2004 Russia, Beloretsk, 2004	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	LAEM00000000
*M1430	Россия, Тверь, 2005 Russia, Tver, 2005	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	AYOM00000000
*P-18899	Россия, Мурманск, 2006 Russia, Murmansk, 2006	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	LAKM00000000
*81	Россия, Ростов-на-Дону, 2014 Russia, Rostov-on-Don, 2014	<i>ctxB1</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JRQM00000000
*L-3226	Россия, Москва, 2010 Russia, Moscow, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JDVX00000000
*L-4150	Россия, Москва, 2010 Russia, Moscow, 2010	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	JNGT00000000
*76	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MPVL00000000
*153	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MWRE00000000
*39	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	MWRC00000000
*186	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	int.	PYBQ00000000
*M1509	Россия, Москва, 2012 Russia, Moscow, 2012	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	AYNL00000000
*3265/80	Россия, Москва, 2014 Russia, Moscow, 2014	<i>ctxB7</i>	<i>tcpA^{CIRS}</i>	<i>rtxA4</i>	<i>G248T</i>	<i>C254T</i>	<i>G265A</i>	JRQL00000000

Примечание. *Штаммы, нуклеотидные последовательности геномов которых секвенированы нами; int. — интактный.
Note. *Nucleotide sequences of strains sequenced by us; int. — intact.

ной суспензии с использованием набора «Аху Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» («Ахуген»). Клетки предварительно обрабатывали мертиолятом натрия до конечной концентрации 1 : 10 000 (0,01%) и прогревали при 56°C в течение 30 мин. Полные геномы холерных вибрионов секвенировали на генетическом анализаторе «Ion PGM» («Thermo Fisher Scientific») с использованием стандартных протоколов подготовки проб и программного обеспечения. Для картирования и поиска единичных

нуклеотидных полиморфизмов (single nucleotide polymorphism, SNP) в полученных прочтениях использовали программный пакет «Snippy v. 4.6.0». Прочтения картировались на геном референсного штамма *V. cholerae* N16961, и затем формировалось множественное выравнивание, содержащее SNP в областях, присутствующих во всех исследуемых геномах. Для построения дендрограммы по алгоритму максимальной экономии применяли программный пакет «BioNumerics v. 7.6».

Результаты

Динамика изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости геновариантов *V. cholerae* El Tor, циркулирующих в Азии и Африке

Для анализа изменений генов патогенности и лекарственной устойчивости мы провели биоинформационный анализ участков генома, содержащих ключевые (*ctxB* и *tcpA*) и дополнительные (*rtxA*) гены патогенности, а также гены резистентности к антибиотикам, локализованные в SXT-элементе и коровой области хромосомы (гены *gyrA*, *parC* и *carR*), 83 сиквенсов клинических штаммов *V. cholerae* El Tor из эндемичных регионов, взятых из международных баз данных. Проведённый анализ штаммов, изолированных на территории Индии, Бангладеш, Непала, Йемена, Вьетнама, Танзании, Кении, Уганды и Камеруна в 1991–2022 гг., позволил выявить заметные различия в их структуре у изолятов, выделенных в разные периоды. Сравнение структуры этих генов у различных вариантов говорит о том, что процесс их изменения происходил на протяжении относительно короткого периода времени и был многоступенчатым.

Из анализа полученных нами данных динамика изменения изучаемых свойств генетических вариантов возбудителя холеры El Tor представляется следующей (рис. 1, а). Первый этап — приобретение исходными геновариантами (*ctxB1*) различных типов SXT-элемента через горизонтальный перенос генов (1993–2001 гг.). Это событие привело к формированию штаммов 2 генотипов, различающихся набором генов резистентности к антибиотикам, — *ctxB1ICEVchBan9*, содержащих 7 генов (*floR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* и *tetAR*), кодирующих резистентность к хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаниламиду, триметоприму и тетрациклину соответственно, и *ctxB1ICEVchInd5*, имеющих лишь 5 генов (*floR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*) при отсутствии генов *tetAR*. Все последующие этапы были связаны с мутациями генов патогенности и коровых генов резистентности к антибиотикам.

Одно из важнейших событий на следующем этапе микроэволюции — появление геновариантов с новыми аллелями ключевых (*tcpA^{CIRS}*) и дополнительных (*rtxA4*) генов патогенности, возникших за счёт несинонимичных однонуклеотидных замен в генах *tcpA*(A266G) и *rtxA1*(G13602A). Более того, одновременно возникли две точечные мутации в генах *gyrA*(G248T) и *parC*(C254T), кодирующих топоизомеразу II (ДНК-гиразу) и топоизомеразу IV, что обеспечило формирование у патогена резистентности к налидиксовой кислоте. Такие геноварианты с генотипом *ctxB1tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*ICEVchInd5*, впервые обнаруженные в 2002 г. в Индии, были повсеместно распространены в эндемичных регионах Юго-Восточной Азии

в 2002–2007 гг. (рис. 1, а). Тем не менее, наряду с ними, в эндемичных регионах Азии продолжали циркулировать штаммы с интактными генами *ctxB1* и *rtxA1*, но с мутациями в генах *tcpA*, *gyrA*, *parC*. Среди них в Индии (2006–2010 гг.) и Бангладеш (2009–2019 гг.) преобладали штаммы с новым типом SXT — SXT^{TET}, в составе которого были гены *tetAR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*, но, в отличие от других SXT, отсутствовал ген *floR*. Генотип таких штаммов был обозначен как *ctxB1tcpA^{CIRS}rtxA1gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*SXT^{TET}*. Вместе с тем распространения таких геновариантов на других территориях не отмечено. Самым существенным изменением генома возбудителя, повлекшим за собой стремительное распространение современных геновариантов, стала мутация в другом ключевом гене патогенности — *ctxB1*. Однонуклеотидная замена цитозина (C) на аденин (A) в позиции 58 привела к возникновению нового аллеля *ctxB7* и появлению ранее неизвестных геновариантов с мутациями в указанных генах патогенности и устойчивости к антибиотикам (генотип *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*ICEVchInd5*). Тем не менее их геном продолжал изменяться.

Значимое изменение, имеющее диагностическое значение, — возникновение дополнительной точечной мутации в регуляторном гене *carR* — замена гуанина на аденин в позиции 265(*G265A*). Такая мутация привела к утрате устойчивости к полимиксину у штаммов *V. cholerae* El Tor — специфического маркера вибрионов этого биовара [10] и появлению популяции с генотипом *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*carR*(G265A)*ICEVchInd5*, повсеместно распространившейся в странах Азии и Африки. Последующая мутация в этих штаммах затронула геном *ICEVchInd5*. Возникла делеция размером около 10 т.п.н., при которой были утрачены 4 гена резистентности к антибиотикам (*floR*, *strA*, *strB* и *sul2*). Сохранился лишь ген *dfrA1*, определяющий устойчивость к триметоприму. Такие новые геноварианты с генотипом *ctxB7tcpA^{CIRS}rtxA4gyrA*(G248T)*parC*(C254T)*carR*(G265A)*ICEVchInd5ΔVRIII* стали широко распространёнными в 2009–2019 гг. в Кении, Танзании, Уганде, а также Бангладеш, Индии, Йемене (рис. 1, а).

Таким образом, среди исследованных штаммов выявлены 8 типов генетических вариантов, различающихся набором изменённых генов патогенности и резистентности к антибиотикам.

Анализ изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости геновариантов возбудителя холеры, выделенных в России

Для выявления изменений в геноме геновариантов, завезённых в Россию в 1993–2014 гг., получили полногеномные сиквенсы 18 токсигенных штаммов, изолированных от больных (15 изолятов)

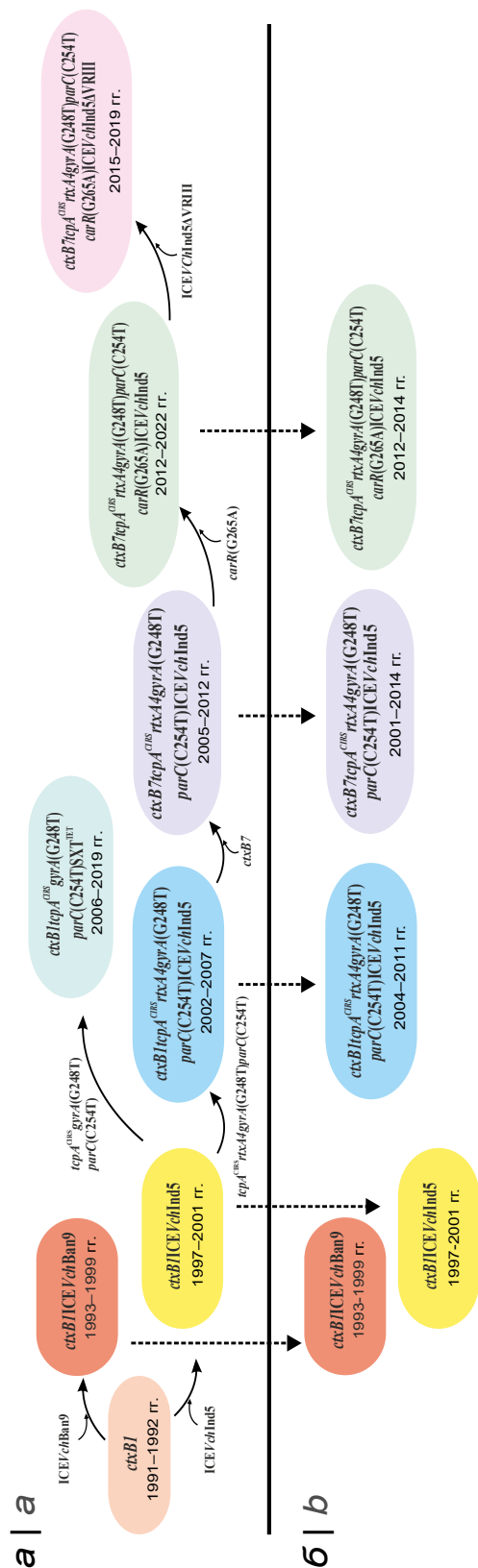


Рис. 1. Динамика изменения свойств штаммов генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории эндемичных по холере стран Азии и Африки (а) и России (б).

Fig. 1. Dynamics of changes in properties of *V. cholerae* O1 El Tor genovariants, isolated in endemic for cholerae Asian and Africa countries (a) and the Russian Federation (b). Vertical dotted lines indicate genotypes of strains imported to Russia from endemic countries.

и из водной среды (1 штамм) на территории России и во время вспышки холеры в 2011 г. на Украине, в Мариуполе (таблица) [24]. Затем провели анализ нуклеотидных последовательностей указанных выше генов патогенности и лекарственной устойчивости этих штаммов и 3 клинических изолятов, сиквенсы которых были получены ранее.

Установлено, что изученные штаммы в зависимости от времени завоза несли в геноме разные аллели ключевых и дополнительных генов патогенности *ctxB*, *tcpA* и *rtxA1*, а также различные типы SXT-элемента. К тому же штаммы различались наличием мутации в генах *gyrA*, *parC* и *carR*, кодирующих резистентность к антибиотикам. На рис. 1, б представлены 5 выявленных генотипов завезённых вариантов возбудителя в Россию (1993–2014 гг.) и на Украину (2011 г.) и показано время их появления на этих территориях. На ранних этапах формирования геновариантов (1994–1999 гг.) в Республику Дагестан, Южно-Сахалинск и Новосибирск из Пакистана, Саудовской Аравии, Китая и Индии соответственно [25] были завезены штаммы с *ctxB1*, в геноме которых присутствовал ICEV/chBan9 (таблица). Практически одновременно (1994–2001 гг.) в другие регионы России (Иркутск, Ачинск, Казань) из Казахстана [18] были занесены геноварианты *ctxB1* с другим типом SXT — ICEV/Ind5. Дальнейшие изменения генома привели к появлению в России других вариантов возбудителя с дополнительными мутациями в генах патогенности и коровых генах антибиотикоустойчивости. В 2004–2014 гг. в Белорецке, Твери, Мурманске и Ростове-на Дону от больных и из водной среды были выделены завезённые в основном из Индии штаммы [17] с новыми аллелями генов *tcpA* и *rtxA1* — *tcpA^{CRS}* и *rtxA4* соответственно (таблица). Более того, эти варианты возбудителя содержали ещё мутации в генах *gyrA* и *parC*, которые привели к резистентности к налидиксовой кислоте. Такие мутации в геноме оказались весьма устойчивыми, поскольку они сохранились у всех вариантов, выявленных впоследствии. Изолированные в более поздний период штаммы (Москва, Мариуполь; 2010–2014 гг.), отличаясь от предшествующих аллелем *ctxB7*, относились к новым генетическим вариантам с повышенным патогенным и эпидемическим потенциалом [6, 7]. Более того, при анализе сиквенсов среди новых вариантов возбудителя с геном *ctxB7* были обнаружены два штамма (Москва, 2010, 2014 гг.) с дополнительной мутацией в гене *carR(C254T)*, повлекшей за собой утрату резистентности к полимиксину В — диагностического маркера вибрионов El Tor (таблица).

Фенотипический анализ 18 штаммов показал, что 12 штаммов (M-1429, M1430, P-18899, 81, L-3226, L-44150, 76, 153, 39, 186, M1509, 3265/80), выделенных в 2004–2012 гг. и имеющих мутации в генах *gyrA* и *parC*, были устойчивы к налидик-

совой кислоте, тогда как 6 штаммов (M-1275, M-1270, M-1293, P-17644, M-1327, M-1344), изолированных ранее (1993–2001 гг.) и сохранивших эти гены интактными, были чувствительны к данному антибиотику. Кроме того, 2 штамма (M1509 и 3265/80) с обнаруженной мутацией в гене *carR* действительно утратили резистентность к полимиксину В (таблица).

Филогенетические связи генотипов возбудителя холеры из эндемичных стран и России

На рис. 2 представлены филогенетические связи 98 штаммов из Азии, Африки и России, установленные на основе их SNP-анализа. При сравнении полных геномов этих штаммов с референсной последовательностью штамма N16961 выявили 1606

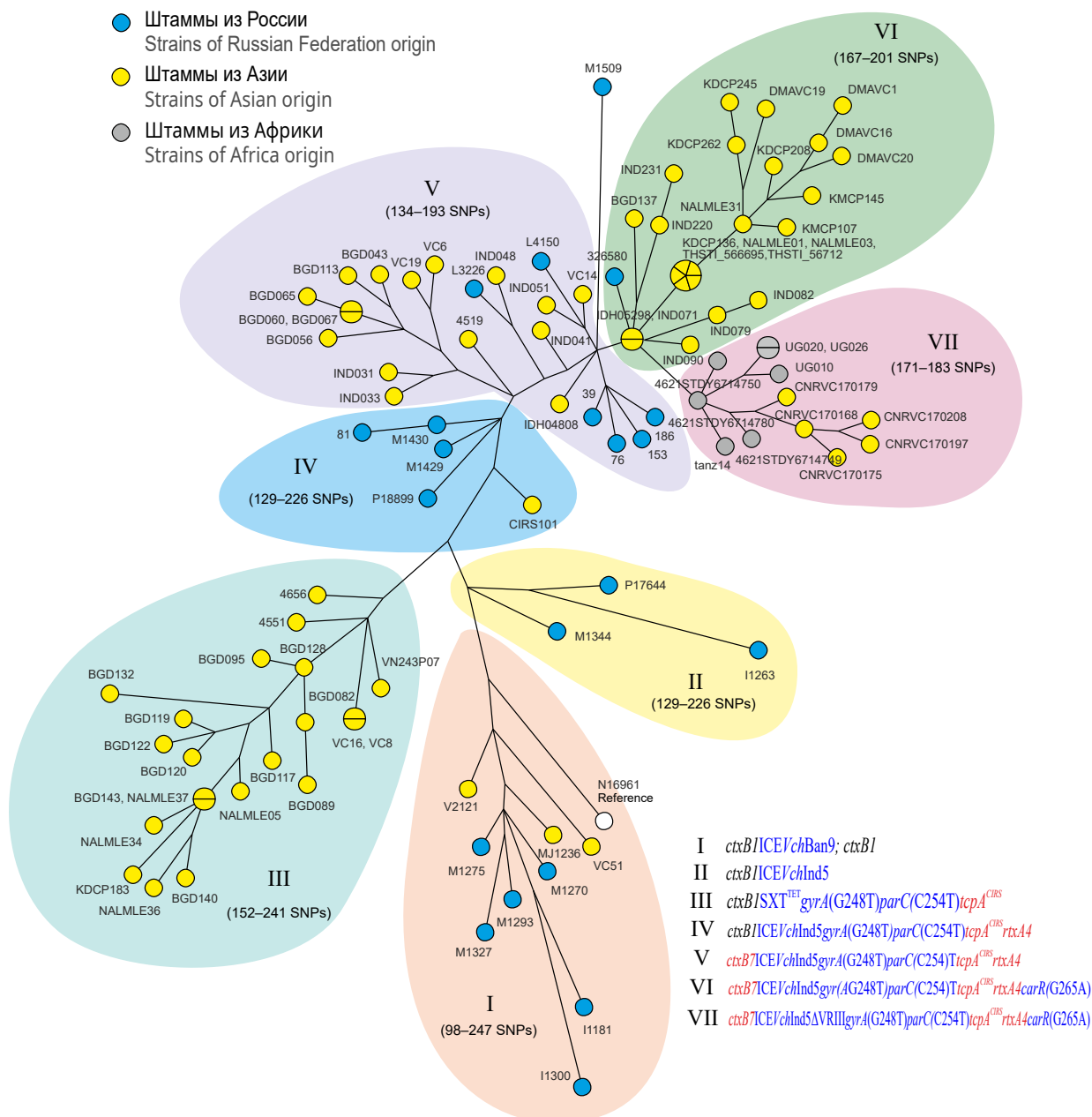


Рис. 2. Филогенетическое дерево штаммов из кластеров I–VII генетических вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, построенное на основе полногеномного SNP-анализа.

Использована программа «BioNumerics v. 7.6», метод — maximum parsimony tree. Красным обозначены гены патогенности, синим — гены лекарственной устойчивости.

Fig. 2. Phylogenetic tree of genovariants of *V. cholerae* strains from clusters I–VII was constructed based on whole-genome SNP analysis.

Analysis was performed in BioNumerics v. 7.6 based on maximum parsimony tree algorithm. Pathogenicity genes are indicated in red, drug resistance genes are indicated in blue.

SNP в коровых генах. Построенное филогенетическое дерево и его анализ показали, что исследуемые генетические варианты возбудителя образуют 7 кластеров, в каждый из которых входили штаммы с определённым генотипом (рис. 2). Так, кластеры I и II состояли из геновариантов, изолированных в начальный период их образования (1993–1998 и 1997–2001 гг. соответственно) и различающихся присутствием в геноме разных типов SXT-элемента. Последующие поэтапные изменения генома возбудителя в процессе эволюции привели к формированию различных групп геновариантов, различающихся новыми мутациями генов патогенности и лекарственной устойчивости и вошедших в состав других 5 кластеров (III–VII), что отражает их геномное разнообразие. Наиболее удалённые от референсного штамма кластеры VI и VII образовали геноварианты, возникшие в последнее десятилетие и несущие сочетание последних наиболее существенных изменений в геноме (*ctxB7*, *carR(C254T)* и *ctxB7*, *carR(C254T)*, ICEVchInd5ΔVRIII) с ранее возникшими мутациями в генах *tcpA*, *rtxA1*, *gyrA* и *parC* (рис. 2). Тем не менее, несмотря на геномное разнообразие, представленные варианты возбудителя, изолированные в разных эндемичных и неэндемичных регионах, филогенетически связаны друг с другом. Следует особо отметить тесную филогенетическую связь геновариантов из России с изолятами из эндемичных стран Юго-Восточной Азии. В частности, такая связь была выявлена между геновариантами, завезёнными в Россию в 2004–2014 гг., и штаммами, циркулирующими в Индии в тот же период.

Обсуждение

Одним из важнейших событий в эволюции возбудителя холеры El Tor является образование первых генетических вариантов (1991 г.) за счёт приобретения им генетического материала от *V. cholerae* классического биовара — гена *ctxB1*. Однако их геном оказался нестабильным, и возникли новые варианты возбудителя с неизвестными ранее свойствами. В нашей работе впервые проведён сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ключевых и дополнительных генов патогенности, а также генов лекарственной устойчивости 104 токсигенных штаммов, циркулирующих в 9 эндемичных регионах и занесённых на территории России на протяжении длительного периода (1991–2022 гг.). Среди 83 исследованных штаммов, изолированных в эндемичных регионах Азии и Африки в 1991–2022 гг., нами выявлены 8 основных типов генетических вариантов, различающихся набором мутантных генов патогенности (точечные мутации в генах *ctxB*, *tcpA* и *rtxA1*) и резистентности к антибиотикам (разные типы SXT, точечные мутации в генах *gyrA*, *parC* и *carR* и делеция в ICEVchInd5).

Анализ динамики изменения их генома на протяжении почти 30 лет показал, что происходило последовательное накопление мутаций в генах, кодирующих эпидемически важные свойства. Следствием этих мутаций, по данным других исследователей, стало усиление вирулентности патогена за счёт повышенной продукции ХТ [9, 10], утрата Pol^{R} — диагностически значимого признака [14], и изменение спектра резистентности к антибиотикам. При этом каждые последующие мутации обеспечивали селективное преимущество новых геновариантов, выражающееся в большой скорости распространения и вытеснении ими ранее сформированных штаммов [1]. Наиболее существенной стала мутация в гене *ctxB1*, обусловившая появление штаммов с аллелем *ctxB7* в дополнение к другим мутациям в генах патогенности и лекарственной устойчивости. Согласно показанной нами динамике изменения генома именно эти варианты, возникшие в современный период пандемии, широко распространены в странах Азии (Индии, Бангладеш, Йемен) и Африки (Танзания, Уганда, Кения), что полностью согласуется с данными других исследователей [1, 9]. Такая ситуация позволяет прогнозировать их появление на территории России в случае завоза возбудителя холеры в результате расширения экономических и туристических связей с указанными регионами. Однако вопрос о том, какой из известных вариантов станет доминирующим в ближайшие годы, остаётся открытым, поскольку продолжающиеся изменения генома являются, видимо, одним из основных механизмов реализации стратегии выживания патогена как в организме хозяина, так и в меняющейся окружающей среде.

Поскольку возможность таких событий подтверждена выявлением в России различных генетически изменённых штаммов, встал вопрос о динамике изменения их генотипа. Получены сиквенсы геномов 18 штаммов, изолированных в России и на Украине (Мариуполь). Среднее значение покрытия полных последовательностей геномов составило 66,5. Проведённый нами анализ этих сиквенсов, а также 3 сиквенсов, полученных ранее, показал, что динамика изменения генов патогенности и лекарственной устойчивости этих изолятов на протяжении более 20 лет (1993–2014 гг.) полностью соответствовала таковой штаммов, циркулирующих в эндемичных регионах в разные периоды. Важен установленный нами факт, что в последнее десятилетие были завезены новые геноварианты с высокой вирулентностью и изменённым диагностическим свойством за счёт мутаций в генах *ctxB1* и *carR*. Однако, согласно нашим данным, уровень геномного разнообразия вариантов возбудителя из России был несколько ниже, чем в эндемичных регионах. Так, пока не обнаружены штаммы с утраченными генами резистентности к 4

антибиотикам (*floR*, *strA*, *strB* и *sul2*) за счёт протяжённой делеции SXT-элемента.

При проведении филогенетического анализа установлено не только геномное разнообразие геновариантов, но и доминирование в настоящее время в эндемичных регионах недавно возникших вариантов с дополнительными мутациями в генах вирулентности и лекарственной устойчивости, которые усилили их патогенный потенциал. Показанные изменения генома возбудителя в эндемичных регионах указывают на необходимость постоянной их оценки для своевременной разработки адекватных средств генодиагностики и профилактики. Обнаружение в России новых геновариантов с ранее неизвестными мутациями и возможные новые их завозы требует разработки быстрых способов их идентификации, что будет способствовать повышению эффективности эпидемиологического надзора за холерой. В частности, полученные данные были использованы нами для разработки быстрых способов идентификации новых геновариантов с изменёнными генами патогенности и утраченным биовар-специфическим свойством методом мультилокусной полимеразной цепной реакции, что существенно ускорит их генодиагностику.

Выводы

1. Среди изученных геновариантов из 9 эндемичных стран Азии и Африки выявлены 8 генотипов, различающихся мутациями в генах патогенности и лекарственной устойчивости. Среди них глобальное распространение имеют новые высоковирулентные геноварианты с аллелем *ctxB7*.

2. Геноварианты, завезённые в Россию, относились к 5 генотипам, включая штаммы с аллелем *ctxB7* и потерянным биовар-специфическим свойством PoI^R. Установленная их тесная филогенетическая связь со штаммами из эндемичных стран Азии подтверждает их завоз из этого региона.

3. Геномное разнообразие вариантов возбудителя холеры в эндемичных регионах и их реальная возможность завоза в Россию указывают на необходимость постоянного молекулярно-генетического мониторинга возбудителя для выявления изменённых генов патогенности и лекарственной устойчивости с целью своевременной разработки адекватных средств диагностики и профилактики.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

- Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect. Genet. Evol.* 2021;89:104726. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104726>
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021;(1):43–51.
- Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2021;(1):43–51. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-43-51> EDN: <https://elibrary.ru/fdeehm>
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N., et al. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011; 477(7365):462–5. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature10392>
- Pant A., Das B., Bhadra R.K. CTX phage of *Vibrio cholerae*: Genomics and applications. *Vaccine.* 2020;38(Suppl. 1):A7–12. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.034>
- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002;40(9):3296–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002>
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010;18(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
- Pant A., Bag S., Saha B., et al. Molecular insights into the genome dynamics and interactions between core and acquired genomes of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2020;117(38):23762–73. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2006283117>
- Reimer A.R., Van Domselaar G., Stroika S., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2011;17(11):2113–21. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1711.110794>
- Ghosh P., Sinha R., Samanta P., et al. Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 strains manifest higher virulence in animal models. *Front. Microbiol.* 2019;10:111. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00111>
- Naha A., Mandal S.R., Samanta P., et al. Deciphering the possible role of *ctxB7* allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(4):e0008128. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008128>
- Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., et al. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014;5(4):e01356–14. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01356-14>
- Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA*-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio.* 2013;4(2):1–9. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.00624-12>
- Kim H.B., Wang M., Ahmed S., et al. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; (54):799–803. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01045-09>
- Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020;88(5):e00080–20. DOI: <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариативность генома изменённых вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, завезённых на территорию России в современный период. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2011;26(3):102–10. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutuyev V.V. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology.* 2011;26(3):102–10. DOI: <https://doi.org/10.3103/S0891416811030062> EDN: <https://elibrary.ru/ofaiwz>

16. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2017;22(4):195–200. Vodopyanov A.S., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P., Mishankin B.N. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items*. 2017;22(4):195–200. DOI: <http://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> EDN: <https://elibrary.ru/zhlhhlh>
17. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A. и др. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):17–26. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., et al. Endemic cholera in India and imported cholera in Russia: What is common? *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):17–26. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26>
18. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Олейников И.П. Совершенствование методики SNP-типирования штаммов *Vibrio cholerae* на основе анализа первичных данных полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2020;97(6):587–93. Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Vodopyanov S.O., Oleinikov I.P. Improvement of the technique of SNP-typing of *Vibrio cholerae* strains on the basis of the analysis of the primary data of whole genome sequencing. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2020;97(6):587–93. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-6-9> EDN: <https://elibrary.ru/iskwwe>
19. Кулешов К.В., Маркелов М.Л., Дедков В.Г. и др. Филогенетический анализ геномов штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2013;90(6):13–20. Kuleshov K.V., Markelov M.L., Dedkov V.G., et al. Phylogenetic analysis of genomes of *Vibrio cholerae* strains isolated on the territory of Rostov region. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2013;90(6):13–20. EDN: <https://elibrary.ru/tlfzut>
20. Kuleshov K.V., Vodopyanov S.O., Dedkov V.G., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016;22(11):2006–8. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
21. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018;60:80–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.023>
22. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н. и др. MLVA-типирование клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* биотипе El Tor, изолированных в России и Украине в период седьмой пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии*. 2018;95(6):37–43. Savelieva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., et al. MLVA-typing of clinical stamps of genetically changed *Vibrio cholerae* biotype El Tor insulated in Russia and Ukraine in the period of seventh pandemic cholera. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(6):37–43. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43> EDN: <https://elibrary.ru/vzvtmj>
23. Смирнова Н.И., Баданин Д.В., Рыбальченко Д.А. и др. Изменчивость генома холерных вибрионов Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды текущей пандемии холеры. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2021;39(2):25–37. Smirnova N.I., Badanin D.V., Rybalchenko D.A., et al. Variability of the genome of El Tor cholera vibrios isolated before the onset and in different periods of the current pandemic. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2021;39(2):25–37. DOI: <https://doi.org/10.17116/molgen20213902125> EDN: <https://elibrary.ru/bvffnd>
24. Ляшко В.К. Вспышка холеры в 2011 году в Донецкой области, Украина. *Эпидемиол.* 2012;13(3):117–20. Lyashko V.K. Cholera outbreak in 2011 in Donetsk region, Ukraine. *Epidemiol.* 2012;13(3):117–20.
25. Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н. и др. Холера Эль-Тор на современном этапе пандемии: эволюция возбудителя, клинико-эпидемиологические особенности, лабораторная диагностика. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(5):917–26. Savelieva I.V., Kulichenko A.N., Saveliev V.N., et al. El Tor cholera at the contemporary stage of the seventh pandemic: pathogen evolution, clinical and epidemiological features, laboratory diagnostics. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(5):917–26. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ETC-1476>

Информация об авторах

Смирнова Нина Ивановна[✉] — д.б.н., проф., г.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, rusrap1@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Рыбальченко Дарья Александровна — м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>

Лозовский Юлий Владиславович — к.м.н., м.н.с. лаб. патогенных вибрионов Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>

Краснов Ярослав Михайлович — к.х.н., зав. лаб. геномного и протеомного анализа Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Кутырев Владимир Викторович — д.м.н., проф., академик РАН, директор Российского противочумного института «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 07.07.2023;
принята к публикации 30.09.2023;
опубликована 28.10.2023

Information about the authors

Nina I. Smirnova[✉] — D. Sci. (Biol.), Prof., chief researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, rusrap1@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Darya A. Rybalchenko — junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>

Yulii V. Lozovskiy — Cand. Sci. (Med.), junior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>

Yaroslav M. Krasnov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Vladimir V. Kutyrev — D. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Director, Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data of the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 07.07.2023;
accepted for publication 30.09.2023;
published 28.10.2023