https://doi.org/10.17116/molgen20213902125

Изменчивость генома холерных вибрионов Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды текущей пандемии холеры

© Н.И. СМИРНОВА, Д.В. БАДАНИН, Д.А. РЫБАЛЬЧЕНКО, Я.М. КРАСНОВ, А.А. КРИЦКИЙ, Ю.В. ЛОЗОВСКИЙ, А.В. ФЕДОРОВ, В.В. КУТЫРЕВ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт "Микроб"», Саратов, Россия

РЕЗЮМЕ

Введение. Нестабильность генома возбудителя холеры приводит к появлению его новых вариантов с измененными эпидемически значимыми свойствами. Это определяет актуальность исследования динамики изменений структуры генов патогенности и персистенции холерных вибрионов, выделенных через длительные периоды времени.

Материал и методы. Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 44 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды текущей пандемии, среди которых 29 было выявлено в России. Для SNP-типирования использовали алгоритм Байесовского эволюционного анализа с применением программы BEAST v2.5.1.

Результаты и обсуждение. На основе SNP-анализа показано, что занос эпидемически опасных штаммов в Россию (1970—2014 гг.) совпадал с временны́м периодом трех различных волн глобального распространения холеры в мире. Сравнение нуклеотидных последовательностей участков генома холерных вибрионов, определяющих вирулентность и способность к эпидемическому распространению, подтвердило многоступенчатость и быстроту их изменения. Впервые установлено, что геномы островов патогенности VPI-1 и VPI-2 предпандемических штаммов содержат различные мутации, которые отличают их от генома пандемических штаммов. В то же время выявлена консервативность нуклеотидной последовательности всех изученных генов персистенции из VPI-2 и EPI пандемических изолятов. Напротив, у современных нетоксигенных штаммов *ctxA*$^-$*tcpA*$^-$ обнаружена существенная вариабельность генов персистенции, входящих в состав этих мобильных элементов.

Заключение. Новые данные о структуре участков генома холерных вибрионов, связанных с персистенцией, могут быть использованы для дифференциации холерных вибрионов с разной эпидемической значимостью.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae, полногеномная последовательность, биоинформационный анализ, мобильные элементы, гены вирулентности и персистенции.*

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

Смирнова Н.И. — https://orcid.org/0000-0002-7115-6286; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Баданин Д.В. — https://orcid.org/0000-0002-9662-8438; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Рыбальченко Д.А. — https://orcid.org/0000-0002-3117-8229; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Краснов Я.М. — https://orcid.org/0000-0002-4909-2394; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Крицкий А.А. — https://orcid.org/0000-0002-5506-4285; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Лозовский Ю.В. — https://orcid.org/0000-0003-4382-7254; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Федоров А.В. — https://orcid.org/0000-0001-7190-4427; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Кутырев В.В. — https://orcid.org/0000-0003-3788-3452; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Автор, ответственный за переписку: Смирнова Н.И. — e-mail: rusrapi@microbe.ru

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Смирнова Н.И., Баданин Д.В., Рыбальченко Д.А., Краснов Я.М., Крицкий А.А., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Кутырев В.В. 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. https://doi.org/10.17116/molgen20213902125

Variability of the genome of El Tor cholera vibrios isolated before the onset and in different periods of the current pandemic

© N.I. SMIRNOVA, D.V. BADANIN, D.A. RYBAL'CHENKO, YA.M. KRASNOV, A.A. KRITSKY, YU.V. LOZOVSKY, A.V. FEDOROV, V.V. KUTYREV

FGHI Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

ABSTRACT

Introduction. Genome instability of the cholera agent leads to emergence of its new variants with altered epidemically significant features. It determines the relevance of investigation of the dynamics in pathogenicity gene structure and cholera vibrio persistence changes over extended periods of time.

Materials and methods. Bioinformatic analysis of whole genome nucleotide sequences of 44 toxigenic and non-toxigenic *V. cholerae* O1 strains, biovar El Tor, isolated before the onset and in different periods of the current pandemic, out of which 29 were found in Russia. SNP-typing applying Bayesian evolutionary analysis, using BEAST v2.5.1 software package.

Results and discussion. Based on SNP-analysis, it was demonstrated that importation of epidemically hazardous strains into the territory of Russia (1970—2014) overlapped with three different waves of global spread of cholera across the world. Nucleotide sequence comparison of genomic regions, defying their virulence and ability to spread epidemically confirmed multi-layered rap-

id changes in cholera vibrios in the process of evolution. For the first time ever, it was established that genomes of pathogenicity islands, VPI-1 and VPI-2, of pre-pandemic strains contained different mutations, which distinguished them from the genome of pandemic strains. At the same time, we revealed conservation of nucleotide sequence of all the studied persistence genes from VPI-2 and EPI of pandemic isolates. On the contrary, modern non-toxigenic strains *ctxA*-*tcpA*- show considerable variability of persistence genes included into the structure of these mobile elements.

Conclusion. New data on the structure of regions of the genome of Vibrio cholerae associated with persistence can be used to differentiate vibrio cholerae with different epidemic significance.

Keywords: *Vibrio cholerae, whole genome sequence, bioinformatic analysis, mobile elements, virulence and persistence genes.*

INFORMATION ABOUT THE AUTHORS:
Smirnova N.I. — https://orcid.org/0000-0002-7115-6286; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Badanin D.V. — https://orcid.org/0000-0002-9662-8438; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Rybal'chenko D.A. — https://orcid.org/0000-0002-3117-8229; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Krasnov Ya.M. — https://orcid.org/0000-0002-4909-2394; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Kritsky A.A. — https://orcid.org/0000-0002-5506-4285; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Lozovsky Yu.V. — https://orcid.org/0000-0003-4382-7254; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Fedorov A.V. — https://orcid.org/0000-0001-7190-4427; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Kutyrev V.V. — https://orcid.org/0000-0003-3788-3452; e-mail: rusrapi@microbe.ru
Corresponding author: Smirnova N.I. — e-mail: rusrapi@microbe.ru

TO CITE THIS ARTICLE:
Smirnova NI, Badanin DV, Rybal'chenko DA, Krasnov YaM, Kritsky AA, Lozovsky YuV, Fedorov AV, Kutyrev VV. Variability of the genome of El Tor cholera vibrios isolated before the onset and in different periods of the current pandemic. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya (Molecular Genetics, Microbiology and Virology)*. 2021;39(2):25–37. (In Russ.). https://doi.org/10.17116/molgen20213902125

Введение

Реальная опасность эпидемии холеры, особо опасной инфекционной болезни, для Российской Федерации определяется возможностью заноса возбудителя из множества эндемичных очагов в результате интенсивной миграции населения. Возбудитель первых шести пандемий азиатской холеры (1817—1923 гг.) *Vibrio cholerae* O1-серогруппы относится к классическому биовару, который к концу прошлого столетия был вытеснен *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, вызвавшем в 1961 г. текущую 7-ю пандемию холеры [1, 2]. О непатогенных холерных вибрионах этого биовара впервые стало известно в 1905 г. после выделения их от паломников на карантинной станции Эль Тор Синайского полуострова. Первые сведения о вирулентных клонах вибрионов Эль Тор появились в 1937 г. после вызванной ими вспышки холеры на о. Целебес в Индонезии. Тем не менее эти предпандемические штаммы оказались неспособными к широкому распространению за пределы основного очага [3].

Глобальное распространение холеры Эль Тор из Индонезии в район Бенгальского залива, а оттуда во многие страны мира началось лишь в 1961 г. и происходило тремя перекрывающимися волнами [4, 5]. Появление пандемического потенциала у вибрионов Эль Тор было обусловлено изменением структуры и функции их генома. Секвенирование генома возбудителя 7-й пандемии показало присутствие в клетках двух кольцевых хромосом (большой и малой), состоящих из коровых и приобретенных через горизонтальный перенос генов в составе мобильных генетических элементов [6]. Среди последних большой интерес представляли гены патогенности и персистенции, входящие в состав профага CTXφ (от cholera toxin), островов патогенности VPI-1 и VPI-2 (от *Vibrio* Pathogenicity Island), острова персистенции в окружающей среде EPI (от Environmental Persistence Island) [7—12]. Структура таких генов возбудителя холеры Эль Тор отличалась от таковой возбудителя азиатской холеры. Так, различия в структуре генов *ctxAB*, кодирующих холерный токсин, или CT, и входящих в состав генома профага CTXφ, заключались в разных нуклеотидных последовательностях гена репрессора *rstR*, а также гена *ctxB*. Аллели указанных генов у классических вибрионов были обозначены как $rstR^{Class}$ и $ctxB^{Class}$, или *ctxB1*, у вибрионов Эль Тор — как $rstR^{Elt}$ и $ctxB^{Elt}$, или *ctxB3*. Нуклеотидная последовательность гена *tcpA*, входящего в состав VPI-1 и определяющего продукцию основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей (или TCP от Toxin-Coregulated Pilus), обеспечивающих колонизацию вибрионами тонкого кишечника человека, была также разной. У классических вибрионов присутствовал аллельный вариант $tcpA^{Class}$, а у вибрионов Эль Тор — $tcpA^{Elt}$. Кроме того, в геноме вибрионов Эль Тор появились уникальные участки ДНК, названные островами пандемичности VSP-I и VSP-II (от *Vibrio* Seventh Pandemic island), которые обусловили появление пандемического потенциала [5, 11, 12].

Дальнейшая эволюция возбудителя привела к возникновению его геновариантов в начале 90-х годов прошлого столетия. Их формирование связано с приобретением типичными пандемическими штаммами вибрионов Эль Тор горизонтально перенесенных генов холерных классических вибрионов —

всего профага CTXφ, включая гены *rstR*^{Class} и *ctxB1*, или только гена *ctxB1*. Повышенный патогенный и эпидемический потенциал геновариантов обусловил повсеместное вытеснение ими типичных вибрионов Эль Тор [5, 13]. Но их геном оказался весьма нестабильным. Появились дополнительные точечные мутации в генах вирулентности *ctxB1* и *tcpA*^{Elt}. В результате возникли новые варианты возбудителя с ранее неизвестными аллелями ключевых генов вирулентности — аллелем *ctxB7,* отличающимся от аллеля *ctxB1* одной дополнительной мутацией (C→A в позиции 58), и аллелем *tcpA*^{CIRS}, имеющим нуклеотидную замену A на G в позиции 266 [14—16]. К тому же у новых вариантов произошла потеря большого участка ДНК в геноме VSP-II [16—19].

Вместе с тем во время эпидемий и в межэпидемический период в водных экосистемах разных стран, включая Россию, были обнаружены нетоксигенные эпидемически безопасные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, лишенные генов CT и вызывающие лишь отдельные случаи острых кишечных инфекций [20, 21].

В связи с выраженными генетическими различиями между разными штаммами представляется важным изучение динамики изменения генома вибрионов Эль Тор на протяжении более 100 лет. Несмотря на большой интерес к этой проблеме, до сих пор отсутствуют четкие представления о распространенности мутаций в генах патогенности и персистенции в природных популяциях холерных вибрионов, изолированных в разные временные периоды. Остаются неясными эволюционные связи холерных вибрионов разной эпидемической значимости. Между тем появление технологии секвенирования позволяет значительно углубить наши знания о перестройках генома холерных вибрионов, значимых в их эволюции.

Цель настоящей работы — поиск и сравнительный анализ изменений структуры генов патогенности и персистенции холерных вибрионов, выделенных через длительные периоды времени на территории России и других стран, на основе биоинформационного анализа секвенированных нуклеотидных последовательностей полных геномов древних и современных изолятов.

Материалы и методы

Штаммы бактерий. В работе использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 44 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды текущей пандемии, а также в период эпидемического благополучия по холере. Нуклеотидные последовательности штаммов были получены нами ранее (29 штаммов) или взяты из NCBI GenBank (15 штаммов).

Секвенирование полных геномов холерных вибрионов проводили на платформе Ion PGM (Ion Torrent, США) с использованием стандартных протоколов пробоподготовки и программного обеспечения [21].

Биоинформационный анализ. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей штаммов *V. cholerae* по мобильным элементам проводили относительно последовательности генома референсного штамма *V. cholerae* N16961. Для выравнивания полногемномных последовательностей и выявления делеций, инсерций использовали программу Mauve (http://darlinglab.org/mauve/mauve.html). Поиск единичных точечных мутаций (SNPs) и контроль достоверности результатов осуществляли картированием ридов и собранных в контиги фрагментов генома исследуемых штаммов посредством программы Snippy (https://github.com/tseemann/snippy). Визуализацию результатов картирования производили при помощи программы Ugene (http://ugene.net/ru/).

SNP-анализ. Для SNP-типирования использовали алгоритм Байесовского эволюционного анализа с применением программы BEAST v2.5.1. Построение филогенетического дерева провели на основе SNP-матрицы, полученной путем попарного сравнения с геномом референсного штамма при помощи программы Snippy.

Результаты и обсуждение

Филогенетические связи холерных вибрионов Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды 7-й пандемии холеры. Поскольку однозначные данные о происхождении холерных вибрионов Эль Тор разной эпидемической значимости до сих пор отсутствуют, мы провели филогенетический анализ «древних» нетоксигенных и токсигенных штаммов, изолированных от людей до начала текущей пандемии, клинических токсигенных штаммов, выявленных в период пандемии, а также нетоксигенных штаммов, выделенных из внешней среды в настоящее время**.** На **рис. 1** изображено филогенетическое дерево, построенное на основании анализа 44 861 коровых SNPs полногеномных последовательностей 44 штаммов, из которых 29 было выявлено в России и сопредельных странах. Установлено четкое деление взятых штаммов на пять основных кластеров **(см. рис. 1, а)**. Наиболее «древние» предпандемические нетоксигенные штаммы (1910 г., 1938 г.) образовали отдельный кластер I, который может быть предшественником вибрионов кластера III, состоящего из пандемических токсигенных штаммов (1961—2014 гг.) **(табл. 1)**. Отличия штаммов из кластеров I и III от референсного N16961 составляли в среднем 853—871 SNPs и 5—103 SNPs соответственно. Кластер II включал предпандемические изоляты, выявленные во время локальной вспышки холеры (1937 г.), которые, вероятно, принадлежат к отдельной филогенетической

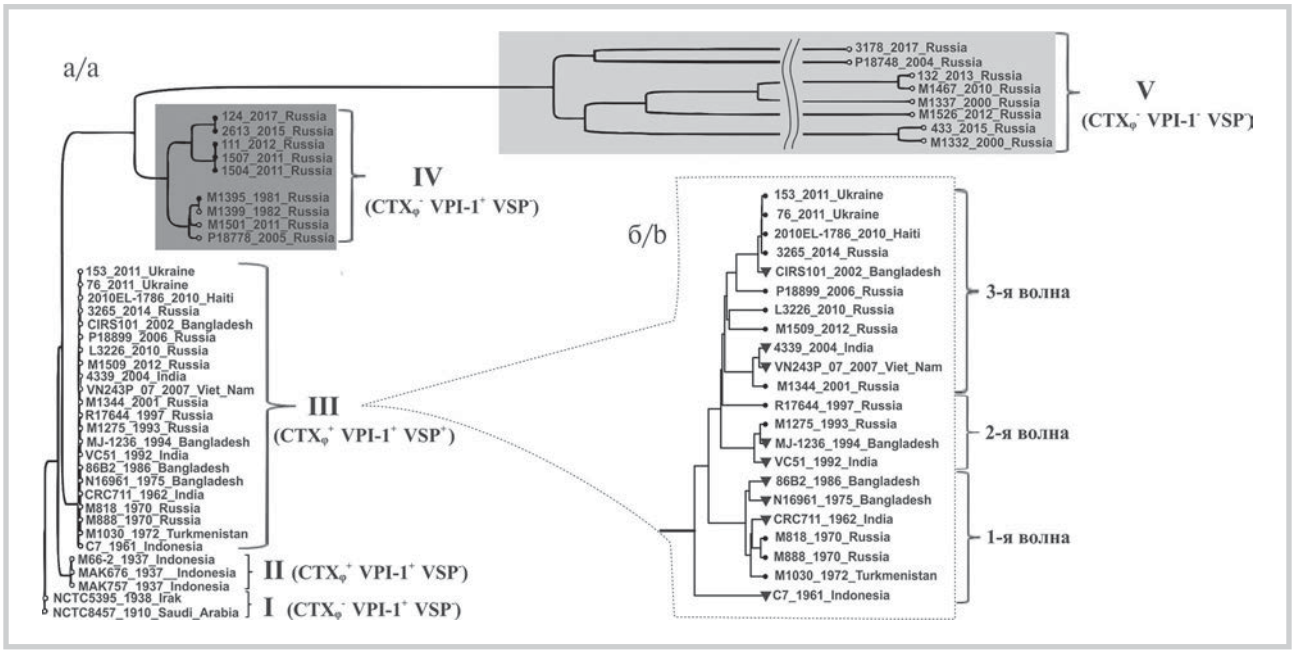


Рис.1. **Схематическое изображение филогенетического дерева по данным анализа 44 861 коровых SNPs в полногеномных последовательностях 44 токсигенных и нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор.**

а — филогенетические связи 44 штаммов разной эпидемической значимости, выделенных до начала и в разные периоды 7-й пандемии холеры (1910—2017 гг.); б — эпидемически опасные штаммы, занесенные в Россию и сопредельные страны с различными волнами 7-й пандемии холеры; черными треугольниками обозначены штаммы, распространенные из первичного очага холеры с известной волной 7-й пандемии.

линии, поскольку их отличия от референсного достигали 1190—1243 SNPs. Дивергенция штаммов этого кластера от «древних» нетоксигенных штаммов коррелировала с приобретением ими генов холерного токсина в составе профага CTXφ. Обособление кластера III было связано с формированием генома холерных вибрионов, ставших способными к широкому распространению. Показано, что занос эпидемически опасных штаммов в Россию, происходящий на протяжении 44 лет (1970—2014 гг.), совпадал с временным периодом трех разных волн глобального распространения возбудителя в мире из первичного очага. Об этом свидетельствует четкое разделение штаммов, выявленных в России, на 3 группы и присутствие в каждой из них контрольных штаммов из эндемичных очагов с известной принадлежностью к каждой волне пандемии (C7, CRC711, N16961, 86B2 — 1 волна; VC51, MJ-1236 — 2; VN243P_07, 4339, CIRS101 — 3) **(см. рис. 1, б)**. Тем не менее высокий уровень филогенетического родства штаммов, выделенных на территории России и других стран через длительные периоды времени от начала 7-й пандемии, свидетельствует о едином источнике их происхождения, что полностью согласуется с результатами других исследователей [4, 22, 23].

Что касается нетоксигенных вибрионов, изолированных из внешней среды на территории России и вошедших в состав кластеров IV и V, то очевидна их значительная удаленность от всех клинических изолятов. Однако штаммы из кластера IV, имеющие в геноме VPI-1 и отличающиеся от референсного по 3195—5099 SNPs, филогенетически были более близки к пандемическим токсигенным штаммам по сравнению с изолятами из кластера V, различия которых с референсным достигали 16154—16960 SNPs. Такая ситуация может указывать на их происхождение от токсигенных. Генетические же связи между нетоксигенными штаммами, выделенными до текущей пандемии и в современный период на территории России, оказались весьма слабыми. Таким образом, на основании данных полногеномного секвенирования с последующим анализом коровых SNPs впервые проведена оценка филогенетических связей токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов, выделенных в России и ряде сопредельных стран, с различными группами предпандемических штаммов. Эти данные позволили высказать предположение о происхождении эпидемически опасных штаммов, а также показали, что их занос в Россию был связан с тремя отдельными волнами пандемии холеры.

Выявление различий в распространенности и структуре мобильных элементов с основными генами патогенности и эпидемичности среди разных штаммов. В результате биоинформационного анализа секвенированных полногеномных последовательностей 37 штаммов были показаны различия в распространенности мобильных элементов

***Таблица 1*. Штаммы *V.cholerae* биовара Эль Тор, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе**

Штамм	Место и год выделения	Источник	№ доступа в GenBank
NCTC8457	Саудовская Аравия, 1910	Человек	NZ_AAWD01000000
MAK676	Индонезия, о.Целебес, 1937	Человек	JRBD00000000
MAK757	Индонезия, о.Целебес, 1937	Человек	AAUS00000000
MAK66-2	Индонезия, о.Целебес, 1938	Человек	CP001233, CP001234
NCTC5395	Ирак, 1938	Человек	CP013137
C7*	Индонезия, 1961	Человек	SRR6027720
CRC711*	Индия, 1962	Человек	CP013303
M818	РФ, Саратов, 1970	Человек	LAHM00000000
M888	РФ, Астрахань, 1970	Человек	LRBH00000000
M1030	Туркмения, 1972	Человек	NEDX00000000
N16961*	Бангладеш, 1975	Человек	AE003852, AE003853
86B2*	Бангладеш, 1986	Человек	SRR6027683
VC51*	Индия, 1992	Человек	ERR018124
M1275	РФ, Дагестан, 1993	Человек	LRAF00000000
MJ-1236*	Бангладеш, 1994	Человек	CP001485, CP001486
P17644	РФ, Ачинск, 1997	Человек	JRTW00000000
M1344	РФ, Казань, 2001	Человек	NEDY00000000
CIRS101*	Бангладеш, 2002	Человек	CWPG00000000
4339*	Индия, 2004	Человек	ERR025361
P18899	РФ, Мурманск, 2006	Человек	LAKM00000000
VN243P_07*	Вьетнам, 2007	Человек	SRR6027863
Л3226	РФ, Москва, 2010	Человек	JDVX00000000
2010E1-1786	Гаити, 2010	Человек	AELH01000000
76	Украина, Мариуполь, 2011	Человек	MPVL00000000
153	Украина, Мариуполь, 2011	Человек	MWRE00000000
M1509	РФ, Москва, 2012	Человек	NEDZ00000000
3265/80	РФ, Москва, 2014	Человек	JRQL00000000
M1395	РФ, Астрахань, 1981	Вода	LQBY00000000
M1399	РФ, Астрахань, 1982	Вода	LQBZ00000000
M1332	РФ, Челябинск, 2000	Человек	PYCE00000000
M1337	РФ, Астрахань, 2000	Человек	NEEB00000000
P18748	РФ, Сочи, 2004	Человек	NIFH00000000
P18778	РФ, Ростов-на-Дону, 2005	Вода	NIFI00000000
M1467	РФ, Калмыкия, 2010	Вода	VTLI00000000
M1501	РФ, Калмыкия, 2011	Человек	LRAE00000000
M1504	РФ, Калмыкия, 2011	Вода	VTLN00000000
M1507	РФ, Калмыкия, 2011	Вода	VTLP00000000
111	РФ, Калмыкия, 2012	Вода	VTLQ00000000
M1526	РФ, Калмыкия, 2012	Вода	VUAA00000000
132	РФ, Калмыкия, 2013	Вода	VUAC00000000
433	РФ, Сочи, 2015	Вода	NEDW00000000
2613	РФ, Калмыкия, 2015	Вода	PYCA00000000
3178	РФ, Калмыкия, 2017	Вода	PYCH00000000
124	РФ, Калмыкия, 2017	Вода	PYCD00000000

Примечание. Жирный шрифт — нуклеотидная последовательность взята из NCBI GenBank; * — штаммы, взятые в качестве контрольных при определении волны распространения исследуемых штаммов в России во время текущей пандемии холеры.

с ключевыми генами патогенности между древними и современными изолятами. Геном предпандемических нетоксигенных штаммов был лишен профага CTXφ, но имел VPI-1 **(см. табл. 1, рис. 1, а)**, что полностью согласуется с данными, полученными ранее [23]. Однако нуклеотидная последовательность гена *tcpA* из VPI-1 отличалась от таковой референсного штамма N16961 по 158 нуклеотидам. Выявленную нами новую аллель данного гена обозначили как $tcpA^{Alt}$ **(рис. 2, б)**. Тем не менее обнаруженные мутации, видимо, не влияли на функциональную активность кодируемого геном белка, поскольку известно, что эти вибрионы колонизировали кишечник людей [23]. Вторую группу препандемических штаммов, выявленных в 1937 г., отличало от первой наличие в их геноме VPI-1 с другим аллелем гена *tcpA* — $tcpA^{Elt,}$, идентичным таковому в N16961, и профага CTXφ холерных классических вибрионов

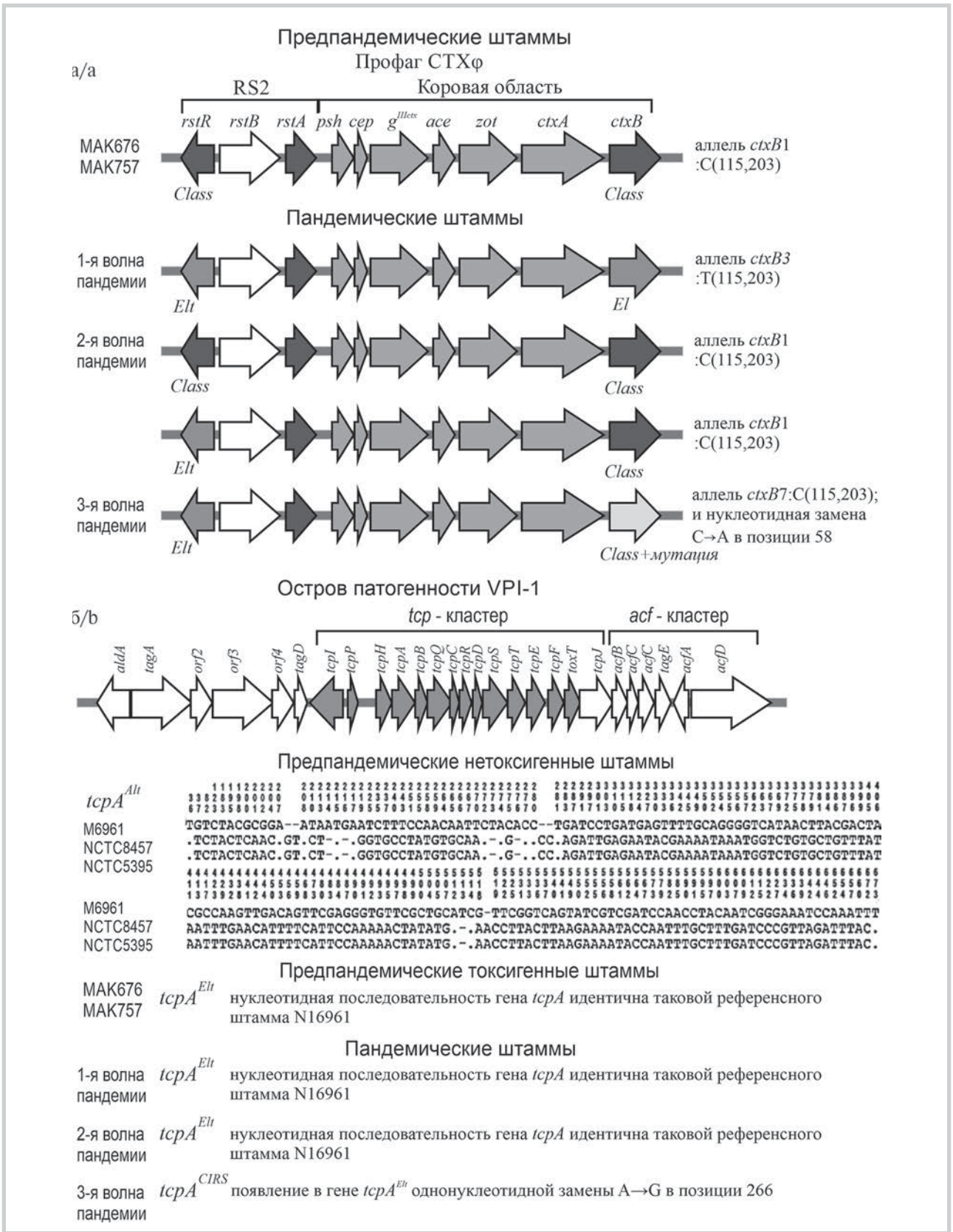


Рис.2. **Схема структуры генома профага CTXφ и острова патогенности VPI-1 *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды 7-й пандемии холеры.**

а — схема структуры генома профага CTXφ; б — схема структуры генома VPI-1 и нуклеотидная последовательность гена *tcpA*; жирным шрифтом выделены мутации в гене $tcpA^{alt}$ — 158 однонуклеотидных замен.

(CTXφ^{Class}) с аллелями *ctxB*^{Class} (или *ctxB1*) и *rstR*$^{Class.}$ **(см. табл. 1, рис. 2, а).** Присутствие в их хромосоме VPI-1 с аллелем *tcpA*^{Elt} исключало их происхождение от нетоксигенных штаммов с аллелем *tcpA*^{Alt}. Этот факт подтверждает независимое происхождение предпандемических клинических штаммов. Следует отметить нестабильное наследование ими профага CTXφ^{Class}, поскольку известны штаммы, утратившие его **(см. табл. 1)**.

Токсигенные штаммы, вызвавшие пандемию холеры, содержали в геноме оба мобильных элемента — профаг CTXφ и VPI-1. Однако их профаг CTXφ нес иные аллели генов *ctxB* и *rstR* — *ctxB*^{Elt} (или *ctxB3*) и *rstR*^{Elt}, тогда как структура VPI-I с аллелем *tcpA*^{Elt} была идентична таковой предпандемических токсигенных штаммов **(см. рис. 2, а, б)**. Более того, в их геноме присутствовали новые участки ДНК — острова пандемичности VSP-I и VSP-II. Именно такие штаммы (M818, M888, M1030), сформированные в Юго-Восточной Азии к 1961 г., впервые были занесены в Россию (1970 г.) и Туркменистан (1972 г.) во время первой волны пандемии **(см. табл. 1)**. Вторая волна пандемии была связана с появлением в начале 90-х годов на эндемичных по холере территориях атипичных штаммов возбудителя с гибридным профагом CTXφ, имеющим аллели *ctxB1* и *rstR*^{Elt}, и их заносом в Россию в 1993—2001 гг. (M1275, P17644, 1344). Генетической меткой штаммов, занесенных с третьей волной (2006—2014 гг.) и вызвавших в России (P18899, L3226, M1509, 3265) и Украине (153, 76) отдельные случаи или локальную вспышку холеры, стал новый аллель гена *tcpA* в VPI-1 — *tcpA*^{CIRS}. Кроме того, штаммы, изолированные в более поздний период 3-й волны, отличались наличием нового аллельного варианта *ctxB*7 в геноме CTXφ, появившегося в результате дополнительной мутации **(см. табл. 1, рис. 2).** Основным последствием таких изменений в генах *ctxB* и *tcpA* стало повышение вирулентности возбудителя [14]. И, наконец, следует особо отметить, что у штаммов, занесенных в Россию и Украину с 3-й волной пандемии, в геноме VSP-II появилась протяженная делеция размером 13105 пн, включающая 21 ген. Возможно, что образование такой делеции происходило в несколько этапов, так как были выявлены штаммы, у VSP-II которых потерянный участок затрагивал лишь 4 гена.

Среди исследуемых нетоксигенных штаммов в геноме семи изолятов присутствовал VPI-1 с аллелем *tcpA*^{Elt}, идентичным таковому токсигенных штаммов из 1-й и 2-й волн пандемии. Эти данные свидетельствует в пользу нашего предположения о наличии общей предковой формы таких нетоксигенных изолятов и токсигенных штаммов. Геном других нетоксигенных вибрионов был лишен всех мобильных элементов, связанных с патогенностью **(см. табл. 1)**.

Таким образом, приведенные выше сведения подтвердили многоступенчатость и быстроту изменения участков генома холерных вибрионов Эль Тор, определяющих их вирулентные свойства и способность к эпидемическому распространению. Впервые выявлена новая аллель гена *tcpA* в VPI-1 «древних» нетоксигенных штаммов. Вирулентность первых клинических штаммов обусловлена присутствием в их геноме VPI-1 с геном *tcpA*^{Elt} и профага холерных классических вибрионов. Подтверждено отсутствие в их геноме двух островов пандемичности, что, вероятно, является причиной их неспособности к эпидемическому распространению. В отличие от «древних» токсигенных изолятов в геноме эпидемически опасных штаммов, занесенных в Россию с первой волной пандемии, появились три новых мобильных элемента — профаг CTXφ^{Elt} с ранее неизвестными аллелями *ctxB*^{Elt} (или *ctxB*3) и *rstR*^{Elt}, а также два острова пандемичности — VSP-I и VSP-II. Все последующие этапы изменения генома возбудителя холеры Эль Тор, обнаруженные почти через 30 лет после его возникновения, обусловлены как получением им нового генетического материала (гена *ctxB1*) от классических вибрионов, так и возникновением мутаций разного типа в ключевых генах вирулентности и эпидемичности. Все это свидетельствует о нестабильности участков генома, связанных с вирулентностью. Что касается нетоксигенных вибрионов, циркулирующих в водоемах России, то среди них выявлены вибрионы, в геноме которых присутствовал VPI-1 с геном *tcpA*^{Elt}, что указывает на их возможную филогенетическую связь с эпидемически опасными штаммами.

Изменчивость генов персистенции, входящих в состав острова патогенности VPI-2 и острова персистенции в окружающей среде EPI. Далее, мы попытались оценить изменчивость генов персистенции вибрионов Эль Тор, входящих в состав VPI-2 и EPI. В отличие от мобильных элементов вирулентности, VPI-2 и EPI присутствовали в геноме всех исследуемых штаммов независимо от времени их выделения **(см. табл. 1)**. Для выяснения изменения их структуры в ходе эволюции на первом этапе работы провели сравнение структуры VPI-2 (57,3 т.п.н.), содержащего 11 генов *nan-nag* области, значимых для выживания вибрионов в разных экологических нишах — в водной среде и организме человека [25, 26]. Оказалось, что VPI-2 «древних» нетоксигенных штаммов не отличался по структуре от референсного штамма и содержал все 3 основных блока генов — гены системы рестрикции/модификации, область *nan-nag* и гены, гомологичные генам фага Mu **(рис. 3, а, б)**. Вместе с тем впервые установили, что предпандемические токсигенные штаммы имели делетированный VPI-2 размером 42,4—46,6 т.п.н., утративший блок фаговых генов, включая в ряде случаев (штамм MAK757) и прилежащие к нему гены **(см. рис. 3, в)**. В отличие от них в хромосоме всех изученных токсигенных штаммов, изолированных в период пандемии, присутствовал интактный VPI-2 **(см. рис. 3,г)**. Неток-

Таблица 2. **Молекулярно-генетические особенности мобильных генетических элементов, связанных с вирулентностью и персистенцией, различных штаммов *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор**

Штамм	CTXφ		VPI-1	VPI-2	VSP-I	VSP- II	EPI
	ctxB	rstR	tcpA				
Предпандемические штаммы (токсигенные и нетоксигенные)							
NCTC5395	—	—	$tcpA^{alt}$	+	—	—	EPI н.з.
MAK676	ctxB1	$rstR^{cla}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
MAK757*	ctxB1	$rstR^{cla}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
MAK66-2*	ctxB1	$rstR^{cla}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
NCTC8457	—	—	$tcpA^{alt}$	+	—	—	EPI н.з.
Пандемические штаммы (токсигенные)							
C7(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+ н.з.	+	+	+
CRC711(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+ н.з.	+	+	+
M818(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	+ н.з.	+	EPI н.з.
M888(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	+ н.з.	+	EPI н.з.
M1030(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+	+	+ н.з.	+
N16961(1в)	ctxB3	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+	+	+	+
86B2(1в)	-	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+ н.з.	+	+	+
VC51(2в)	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	VSP- IΔ	-	+
M1275	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	+	+	+
MJ-1236(2в)	ctxB1	$rstR^{Class}$	$tcpA^{El}$	+ н.з.	+	+	+
P17644	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	+ н.з.	+ н.з.	VSP- IIΔ	EPI н.з.
M1344	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	+	+ н.з.	EPI н.з.
CIRS101(3в)	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+ н.з.	+	VSP- IIΔ	+
4339 (3в)	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	VPI-2Δ	+	VSP- IIΔ	+
P18899(3в)	ctxB1	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	VPI-2Δ	+	VSP- IIΔ	EPI н.з.
VN243P_07(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+	+	VSP- IIΔ	+
Л3226(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+	+	VSP- IIΔ	+
2010E1-1716(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+ н.з.	+	VSP- IIΔ	+
76(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	VPI-2Δ	+	VSP- IIΔ	+
153(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+ н.з.	+	VSP- IIΔ	+
M1509(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+ н.з.	+ н.з.	VSP- IIΔ	EPI н.з.
3265/80(3в)	ctxB7	$rstR^{El}$	$tcpA^{CIRS}$	+ н.з.	+ н.з.	VSP- IIΔ	EPI н.з.
Нетоксигенные штаммы							
M1395	—	—	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
M1332	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
M1337	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
P18748	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
P18778	—	—	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
M1467	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
M1501	—	—	$tcpA^{El}$	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
M1504	—	—	$tcpA^{El}$	+	—	—	EPI н.з.
M1507	—	—	$tcpA^{El}$	+	—	—	EPI н.з.
111	—	—	$tcpA^{El}$	+	—	—	EPI н.з.
M1517	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
132	—	—	—	VPI-2Δ	—	—	EPI н.з.
2613	—	—	$tcpA^{El}$	+	—	—	EPI н.з.

Примечание. * — «+» — присутствие интактного мобильного элемента; «—» — отсутствие мобильного элемента; н.з. — нуклеотидная замена.

сигенные штаммы, выделенные из водной среды в современный период, отличались от «древних» нетоксигенных изолятов большой вариабельностью VPI-2. В хромосоме 69,2% исследуемых штаммов, обитающих в воде и лишенных другого острова патогенности — VPI-I, присутствовал дефектный VPI-2, сохранивший лишь центральный блок генов, связанных в основном с утилизацией аминосахаров и сиаловых кислот (VC1773 — VC1784). При этом размер делеции VPI-2 у разных штаммов был неодинаков и колебался от 37,3 до 45,8 т.п.н. **(см. рис. 3, д)**. Однако ряд нетоксигенных штаммов, в геноме которых присутствовал VPI-1, несли интактный VPI-2 **(см. рис. 3, г)**.

Далее мы определили вариабельность кластера генов *nan-nag* VPI-2, вовлеченных в расщепление (*nanH*), транспорт (*dctPQM*) и катаболизм сиаловой кислоты [26]. Сравнение нуклеотидной последовательности этих генов у «древних» предпандемических

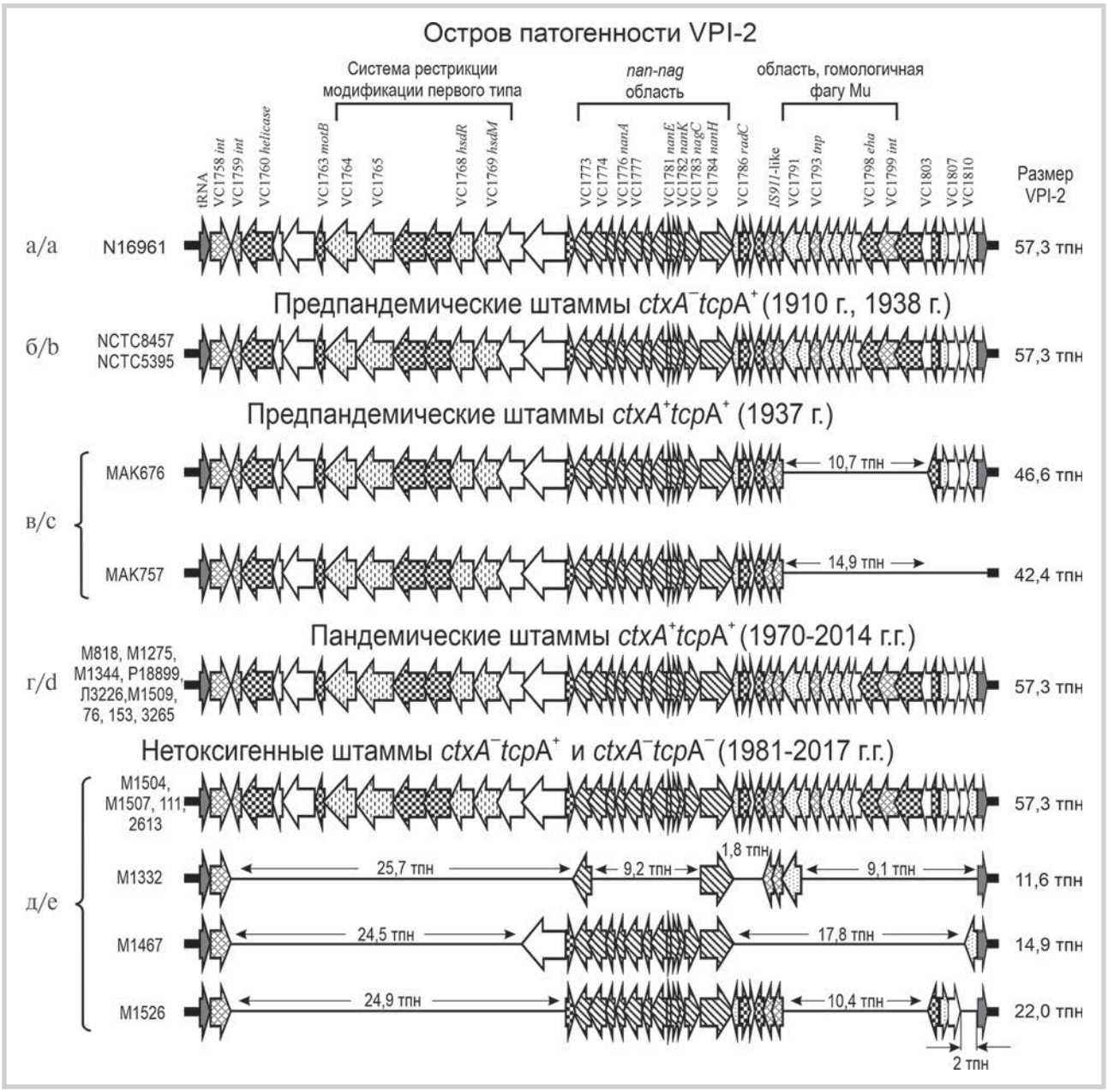


***Рис. 3*. Схема структуры генома острова патогенности VPI-2 *V.cholerae* биовара Эль Тор, выделенных до начала и в разные периоды 7-й пандемии холеры.**

а — схема структуры острова патогенности VPI-2 референсного эпидемически опасного штамма N16961; б — структура VPI-2 древних нетоксигенных штаммов NCTC8457, NCTC5395; в — структура VPI-2 токсигенных предпандемических штаммов MAK676 и MAK757; г — структура VPI-2 токсигенных эпидемически опасных штаммов; д — структура VPI-2 нетоксигенных штаммов, выделенных в современный период.

и современных пандемических штаммов показало их идентичность. Это означает, что на протяжении более 100 лет указанные гены не претерпели никаких изменений. Вместе с тем, несмотря на их консервативный характер у всех изученных штаммов, выделенных от людей, мы обнаружили, что у нетоксигенных вибрионов, циркулирующих в воде открытых водоемов, картина была иной. Среди 13 изученных у 9 изолятов с делетированным VPI-2, сохранивших лишь центральный блок генов, во всех генах кластера *nan-nag* было выявлено множество синонимичных и несинонимичных однонуклеотидных замен — от 1 до 88. Более того, 2 штамма (132, M1332) утратили 7-9 генов этой области **(табл. 3)**. Ничего подобного не происходило у штаммов, сохранивших интактный VPI-2. В отличие от изолятов с делетированным VPI-2, у этой группы вибрионов (M1504, M1507, 111 и 2613) гены кластера *nan-nag* не были затронуты мутациями **(см. табл. 3)**. Эти факты указывают на то, что появление точечных мутаций в генах области *nan-*

Таблица 3. **Изменение нуклеотидной последовательности генов метаболизма сиаловой кислоты и нейраминидазы из острова патогенности VPI-2 в нетоксигенных штаммах *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных из водной среды в разные временные периоды**

Штамм	Число полиморфных сайтов в генах метаболизма сиаловой кислоты и нейраминидазы										
	nanM (vc1773)	*nanM* (vc1774)	*rpiR* (vc1775)	*nanA* (vc1776)	*dctQ* (vc1777)	*dctP* (vc1778)	*dctM* (vc1779)	*nanE* (vc1781)	*nanK* (vc1782)	*nagA1* (vc1783)	*nanH* (vc1784)
M1395*	41 (19/22)	27 (12/15)	6 (1/5)	7 (1/6)	73 (5/68)	60 (16/44)	88 (10/78)	12 (3/9)	33 (10/23)	49 (14/25)	66 (19/47)
M1332*	Δ70% гена	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	78 (27/51)
M1337*	32 (13/19)	11 (4/7)	7 (1/6)	7 (1/6)	9 (0/9)	1 (0/1)	25 (5/20)	11 (1/10)	46 (9/37)	49 (15/24)	114 (31/83)
P18748*	35 (15/20)	11 (3/8)	6 (1/5)	8 (2/6)	5 (0/5)	0	11 (2/9)	0	1 (0/1)	9 (4/5)	69 (20/49)
P18778*	41 (19/22)	27 (12/15)	6 (1/5)	7 (1/6)	73 (5/68)	60 (16/44)	88 (10/78)	12 (3/9)	33 (10/23)	49 (14/25)	66 (19/47)
M1467*	32 (13/19)	11 (4/7)	7 (1/6)	7 (1/6)	9 (0/9)	1 (0/1)	25 (5/25)	12 (1/11)	46 (9/37)	48 (15/23)	79 (24/55)
M1501*	41 (19/22)	27 (12/15)	6 (1/5)	7 (1/6)	73 (5/68)	60 (16/44)	88 (10/78)	12 (3/9)	33 (10/23)	49 (14/25)	66 (19/47)
M1504**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1507**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
M1526*	36 (17/22)	11 (4/7)	7 (1/6)	12 (3/9)	8 (1/7)	1 (0/1)	22 (5/17)	9 (1/8)	46 (13/33)	41 (17/24)	78 (26/52)
111**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
132*	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ8% гена	47 (10/37)	48 (15/23)	79 (24/55)
2613**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Примечание. Гены кодируют: *nanM* — N-ацетилнейраминовую эпимеразу; *rpiR* — гипотетический белок регулятор транскрипции HTH-типа RipR; *nanA* — N-ацетилнейраминовую лиазу; *dctQ* — C4-дикарбоксилатный TRAP транспортер белка малой пермеазы DctM; *dctP* — C4-дикарбоксилат-связывающий периплазматический белок DctM; *dctM* — C4-дикарбоксилатный TRAP транспортер белка большой пермеазы DctM; *nanE* — гипотетическую N-ацетилманнозамин-6-фосфат 2-эпимеразу; *nanK* — N-ацетилманнозамин киназу; *nagA1* — N-ацетилглюкозамин-6-фосфат деацетилазу; *nanH* — нейраминидазу; в скобках указано число однонуклеотидных синонимичных/несинонимичных замен; * — штаммы с делетированным VPI-2; ** — штаммы с интактным VPI-2.

nag коррелировало с возникновением делеционных перестроек в геноме VPI-2. Причина появления множественных мутаций в генах нетоксигенных вибрионов с нарушенной структурой VPI-2 остается непонятной. Можно было бы предположить, что эти мутации — следствие длительного и сильного стрессового воздействия водной среды на вибрионы. Но наряду с ними в водной среде обитают нетоксигенные вибрионы с интактным VPI-2, у которых в этих генах мутаций не выявлено. Приблизить нас к ответу могут только дополнительные исследования.

Наиболее существенный для сохранения холерных вибрионов в окружающей среде остров персистенции EPI (16,7 т.п.н.) содержит 17 генов, объединенных в 2 оперона: секреторный (*mshHIJKLMNEGF*) и структурный (*mshBACDOPQ*). Эти гены кодируют и контролируют продукцию маннозочувствительных пилей адгезии, участвующих в образовании биопленки, в составе которой вибрионы защищены от действия стрессовых факторов [9, 27]. При сравнении нуклеотидной последовательности этих генов токсигенных и нетоксигенных предпандемических изолятов, а также пандемических штаммов с таковыми референсного штаммы мы не выявили больших изменений. Единичные нуклеотидные замены были лишь в нескольких генах **(табл. 4)**. Следовало бы ожидать, что столь важные для выживания клетки гены должны быть консервативными и у нетоксигенных вибрионов, сохраняющихся в течение длительного периода в водной среде. Однако нуклеотидные последовательности всех генов *msh* нетоксигенных вибрионов *ctxA*$^-$*tcpA*$^-$ несли синонимичные и несинонимичные замены — от 1 до 65 **(см. табл. 4)**. В нетоксигенных штаммах *ctxA*$^-$*tcpA*$^+$ лишь немногие гены были затронуты мутациями **(см. табл. 4).** Причина таких явных различий в вариабельности генов *msh* между нетоксигенными штаммами, обитающими в одинаковых условиях водной среды, но имеющими существенные геномные отличия, пока неясна. Однако независимо от объяснений этого явления, накопление мутаций в генах персистенции в популяции нетоксигенных вибрионов представляется целесообразным для их лучшей адаптации к меняющимся условиям водной среды. Таким образом, обнаружение VPI-2 и EPI во всех геномах изученных штаммов, включая самые древние, свидетельствует о том, что эти острова являются одними из «старейших», приобретение которых их предшественником обеспечило появление у них адаптивного механизма для выживаемости в разных экологических нишах. Выявленная консервативность нуклеотидной последовательности практически всех генов из области *nan-nag* VPI-2 и генов *msh,* входящих в состав EPI, у предпандемических и пандемических изолятов связано, видимо, с их функциональной значимостью для клетки во время пребывания вибрионов в относительно постоянной среде в организме человека.

Таблица 4. **Частота изменения нуклеотидной последовательности генов *msh* из острова персистенции EPI токсигенных и нетоксигенных штаммов разных генотипов *V.cholerae* O1 биовара Эль Тор**

Год выделения	Генотип	Число штаммов	Число штаммов с полиморфными сайтами в генах *msh*													
			mshH*	mshI	mshJ*	mshK	mshL*	mshM*	mshN*	mshE*	mshG*	mshF	mshB	mshA*	mshC*	mshD*	mshO*	mshP*	mshQ*
Нетоксигенные предпандемические штаммы (клинические):																			
1910, 1938	ctxA⁺tcpA⁺VSP⁻	2	2 (1—3)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Токсигенные предпандемические штаммы (клинические):																			
1937	ctxA⁺tcpA⁺VSP⁺	2	2 (1—2)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 (1)	0
Токсигенные пандемические штаммы (клинические):																			
1961—2014	ctxA⁺tcpA⁺VSP⁻	22	0	0	5 (1)	0	1 (1)	2 (1—4)	1 (1)	5 (1—8)	2 (1—6)	0	0	1 (1)	1 (1)	0	1(1)	0	4 (1—10)
Нетоксигенные штаммы (водная среда):																			
1981—2012	ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺	7	6 (3—24)	0	3 (1)	0	0	2 (11)	0	1 (1)	0	0	0	0	1 (1)	1(1)	0	0	1 (1)
2000—2015	ctxA⁺tcpA⁻VSP⁺	6	7 (20—29)	7 (1—18)	7 (2—10)	3 (4)	6 (23—30)	6 (8—14)	6 (16—34)	6 (31—65)	6 (10—36)	6 (2—9)	6 (7—8)	5 (3—4)	6 (17—22)	6 (9—32)	5 (10—16)	5 (7—50)	2 (1—4)

Примечание. Гены кодируют: *mshH* — секреторный белок пилей MshH; *mshI* — секреторный белок пилей MshI; *mshJ*- АТФ-азу; *mshK* — секреторный белок пилей MshK; *mshL* — секреторный белок пилей MshL; *mshM* — секреторный белок пилей MshM; *mshN* — белок цитоплазматической мембраны MshN; *mshE* — белок-порин внешней мембраны; *mshG* — секреторный белок пилей MshG; *mshF* — секреторный белок пилей MshF; *mshB* — структурный белок пилей MshB; *mshA* — основная субъединица белка пилей; *mshC* — структурный белок пилей MshC; *mshD* — структурный белок пилей MshD; *mshO* — структурный белок пилей MshO; *mshP* — структурный белок пилей MshP; *mshQ* — структурный белок пилей MshQ; * — в скобках указано общее число SNPs.

Эти гены оказались стабильными и у современных нетоксигенных вибрионов, обитающих в воде, в геноме которых имелись интактные VPI-1 и VPI-2. Однако ситуация резко меняется при смене геномного портрета вибрионов. Впервые обнаружена существенная вариабельность указанных генов у водных вибрионов с делетированным VPI-2, а также прямая связь между высоким уровнем мутации генов персистенции, расположенных на разных мобильных элементах, и утратой значительной части генома VPI-2. Причина такой интенсивной перестройки генома этих вибрионов, широко распространенных в водоемах России, пока не совсем ясна. Вряд ли можно утверждать, что выявленные генетические события происходят только под давлением стрессовых факторов среды, поскольку в этих же водоемах встречаются нетоксигенные вибрионы с интактными VPI-2 и EPI. Возможно, что общее нарушение структуры генома вибрионов также имеет отношение к возникновению многочисленных однонуклеотидных замен в разных генах.

Заключение

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов исторически давних и современных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор подтвердил, что появление вирулентных штаммов связано с приобретением ранее непатогенными вибрионами профага CTXφ с генами CT. Однако история возникновения самых первых и современных клинических изолятов была, видимо, разной, поскольку отсутствует полное сходство их профагов (CTXφ^{Class} и CTXφ^{Elt}). Наиболее «древние» мобильные элементы вибрионов Эль Тор — это острова патогенности VPI-1 и VPI-2, а также остров персистенции EPI, необходимые для колонизации кишечника человека и выживания в меняющихся условиях внешней среды. Ранее неизвестные отличия нуклеотидной последовательности гена *tcpA* из VPI-1 нетоксигенных и токсигенных предпандемических штаммов обусловлены, возможно, их разными предшественниками. Об этом свидетельствуют и выявленные нами различия между геномами VPI-2 этих штаммов, выражавшиеся в делеции этого ОП размером 10,7—14,9 тпн у токсигенных изолятов. Кроме того, очевидным становится тот факт, что VPI-2, обнаруженный в геноме как предпандемических, так и пандемических штаммов, не может быть генетической меткой последних, как утверждалось ранее [10].

Что касается эпидемически опасных штаммов, то их занос в Россию в течение 44 лет происходил на протяжении 3 разных волн пандемии. Об этом свидетельствует характер кластеризации пандемических маркерных штаммов и взятых в анализ изолятов из России при их типировании по коровым SNPs. Выявлены две следующие особенности их геномов.

Первая — стабильность «старейших» мобильных элементов VPI-2 и EPI, предназначенных для обеспечения персистенции холерных вибрионов во внешней среде. Входящие в их состав гены, значимые для сохранения вибрионов в условиях стресса, в основном оставались неизмененными в течение указанного периода времени. Вторая — быстрые эволюционные изменения генов мобильных элементов, связанных с вирулентностью возбудителя и способностью штамма вызывать развитие эпидемического процесса. Геном впервые появившихся пандемических штаммов оставался относительно стабильным на протяжении почти 30 лет (1961—1993 гг.) Однако после первых преобразований, обусловленных получением нового аллеля гена *ctxB* (*ctxB1*) от классических вибрионов, наиболее значимые для вирулентности и эпидемичности участки его генома стали претерпевать различные изменения. Начиная с 2006 г. в России выявили штаммы с ранее неизвестными аллелями генов *ctxB* (*ctxB*7) и *tcpA* (*tcpA*^{CIRS}). Появление точечных мутаций в этих генах вирулентности, как правило, сопровождалось делецией многих генов в VSP-II. Такая изменчивость возбудителя холеры Эль Тор в современный период эволюции указывает на усиление его вирулентности и повышение эпидемического потенциала, что подтверждено другими исследователями [5, 15].

В то же время для нетоксигенных вибрионов, изолированных в России и лишенных не только CTXφ, но и VPI-I, характерна иная закономерность — четко выраженная нестабильность мобильных элементов персистенции VPI-2 и EPI, выражающаяся как в потере протяженных участков ДНК, так и в возникновении множественных однонуклеотидных замен в сохранившихся генах. Обнаруженные изменения, вероятно, имеют большую селективную ценность, поскольку эти вибрионы способны к длительному сохранению в неблагоприятных условиях водной среды.

В целом результаты анализа геномных последовательностей «древних» и современных штаммов позволили глубже понять динамику изменения генома холерных вибрионов Эль Тор в процессе эволюции, а также получить новую информацию о структуре генома «древних» штаммов и различиях в стабильности мобильных элементов вирулентности и персистенции между токсигенными и нетоксигенными изолятами. Более того, новые данные о структуре участков генома холерных вибрионов, связанных с персистенцией, могут быть использованы для дифференциации холерных вибрионов с разной эпидемической значимостью.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа не имела финансирования.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Kaper JB, Morris JG, Levine MM. Cholera. *Clin Microbiol Rev.* 1995;8:48-86. https://doi.org/10.1128/cmr.8.1.48
2. Миронова Л.В. Современные представления о закономерностях эпидемического процесса при холере: экологические и молекулярно-биологические аспекты. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018;23(5):242-250.
Mironova LV. Current conceptions concerning the objective laws of a cholera epidemic process: ecological and molecular biological aspects. *Epidemiologiya i Infectionnye bolezni*. 2018;23(5):242-250. (In Russ.).
https://doi.org/10.18821/1560-9529-2018-23-5-242-250
3. Tanamal ST. Notes on paracholera in Sulawesi (Celebes). *Am J Trop Med Hyg.* 1959;8(1):72-78.
https://doi.org/10.4269/ajtmh.1959.8.72
4. Mutreja A, Kim DW, Thomson N, Connor TR, Lee JH, Kariuki S et al. Evidence for several waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011;477(7365):462-465.
https://doi.org/10.1038/nature10392
5. Ramamurthy T, Mutreja A, Weill FX, Das B, Ghosh A, Nair GB. Corrigendum: revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of Vibrio cholerae. *Front Public Health*. 2019;7:237.
https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00237
6. Heidelberg JF, Elsen JA, Nelson WC, Clayton RA, Gwinn ML, Dodson RJ et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen Vibrio cholerae. *Nature.* 2000;406:477-483.
https://doi.org/10.1038/35020000
7. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996;272(5270):1910-1914.
https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910
8. Karaolis DK, Johnson JA, Bailey CC, Boedeker EC, Kaper JB, Reeves PR. A Vibrio cholerae pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95(6):3134-3139.
https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3134
9. Marsh JW. and Taylor RK. Genetic and transcriptional analyses of the Vibrio cholerae mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus. *J Bacteriol.* 1999;181(4):1110-1117.
https://doi.org/10.1128/jb.181.4.1110-1117.1999
10. Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel Vibrio pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic Vibrio cholerae isolates. *Microbiology.* 2002;148:3681-3693.
https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3681
11. Dziejman M, Balon E, Boyd D, Fraser CM, Heidelberg JF, Mekalanos JJ. Comparative genomic analysis of Vibrio cholerae: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99(3):1556-1561.
https://doi.org/10.3410/f.1004686.53905
12. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика.* 2013;49(9):036-1047.
Smirnova NI, Zadnova SP, Agafonov DA, Shashkova AV, Cheldyshova NB, Cherkasov AV. Comparative Molecular-Genetic Analysis of Mobile Elements in Natural Strains of Cholera Agent. *Russian Journal of Genetics.* 2013;49(9):036-1047. (In Russ.).
https://doi.org/10.7868/S0016675813090087
13. Nair GB, Faruque SM, Bhuiyan NA, Kamruzzaman M, Siddique AK, Sack DA. 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):3296-3299.
https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002
14. Son MS, Megli CJ, Kovacikova G, Qadri F, Taylor RK. Characterization of Vibrio cholerae O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3739-749.
https://doi.org/10.1128/JCM.01286-11

15. Kim EJ, Lee CH, Nair GB, Kim DW. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of Vibrio cholerae O1. *Trends Microbiol.* 2015;23(8):479-489.
https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.03.010

16. Weill FX, Domman D, Njamkepo E, Almesbahi AA, Naji M, Nasher SS. et al. Genomic insights into the 2016—2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019;565(7738):230-233.
https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3

17. Taviani E, Grim CJ, Choi J, Chun J, Haley B, Hasan NA et al. Discovery of novel Vibrio cholerae VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. FEMS Microbiol. *Lett.* 2010;308(2):130-137.
https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x

18. Imamura D, Morita M, Sekizuka T, Mizuno T, Takemura T, Yamashiro T, et al. Comparative genome analysis of VSP-II and SNPs reveals heterogenic variation in contemporary strains of Vibrio cholerae O1 isolated from cholera patients in Kolkata, India. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11(2):e0005386.
https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005386

19. Baddam R, Sarker N, Ahmed D, Mazumder R, Abdullah A, Morshed R. et al. Genome dynamics of Vibrio cholerae isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2020;11;11(1). pii: e03339-19.
https://doi.org/10.1128/mBio.03339-19

20. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Самородова А.В., Тюленева Е.Г., Монахова Е.В. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2006—2015 гг. прогноз на 2016 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016;1:20-27.
Titova SV, Moskvitina EA, Kruglikov VD, Samorodova AV, Tyuleneva EG, Monakhova EV et al. Cholera: Analysis of Epidemiological Situation across the World and in Russia within a Period of 2006—2015. *Problems of Particularly Dangerous Infections.* 2016;1:20-27. (In Russ.).
https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-1-20-27

21. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Щелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов Vibrio cholerae O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2018;3:76-86.
Smirnova NI, Agafonova EYu, Shchelkanova EYu, Agafonov DA, Krasnov YaM, Livanova LF, Kutyrev VV. Genomic diversity of non-toxigenic Vibrio cholerae O1 strains, isolated in the territory of Russia and neighboring states. *Molecular Genetics Microbiology and Virology.* 2018;3:76-86. (In Russ.).
https://doi.org/10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84

22. Кулешов К.В., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Керманов А.В. и др. Филогенетический анализ геномов штаммов Vibrio cholerae, выделенных на территории Ростовской области. *Журн микробиол, эпидемиол и иммунобиол.* 2013;6:13-20.
Kuleshov KV, Markelov ML, Dedkov VG, Vodop'ianov AS, Kermanov AV, Pisanov RV. Phylogenetic analysis of genomes of Vibrio cholerae strains isolated on the territory of Rostov region. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol.* 2013;6:13-20. (In Russ.).

23. Hu D, Liu B, Feng L, Ding P, Guo X, Wang M et al. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2016;113(48):7730-7739.
https://doi.org/10.1073/pnas.1608732113

24. Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. *Генетика.* 2005;41(1):1-10.
Osin AV, Nefedov KS, Eroshenko GA, Smirnova NI. Comparative genomic analysis of Vibrio cholerae El Tor preseventh and seventh pandemic strains isolated in various periods. *Russian Journal of Genetics.* 2005;41(1):53-62 (In Russ.).
https://doi.org/10.1007/s11177-005-0007-y

25. Taylor G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. *Curr Opin Struct Biol.* 1996;6(6):830-837.
https://doi.org/10.1016/s0959-440x(96)80014-5

26. Almagro-Moreno S, Boyd EF. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic Vibrio cholerae in the mouse intestine. *Infect Immun.* 2009;77(9):3807-3816.
https://doi.org/10.1128/IAI.00279-09

27. Watnick PI, Fullner KJ, Kolter R. A role for the mannose-sensitive hemagglutinin in biofilm formation by Vibrio cholerae El Tor. *J Bacteriol.* 1999;181(11):3606-3609.
https://doi.org/10.1128/jb.181.11.3606-3609.1999

Поступила в редакцию 24.03.2020
Received 24.03.2020
После доработки 25.03.2020
Revised 25.03.2020
Принята к публикации 26.03.2020
Accepted 26.03.2020