

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 579.843.1:579.253].083.1

Кульшань Т.А., Челдышова Н.Б., Гусева Н.П., Смирнова Н.И.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УЧАСТКОВ ГЕНОМА, СВЯЗАННЫХ С ВИРУЛЕНТНОСТЬЮ, У ПРИРОДНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО И ЭЛЬ ТОР-БИОВАРОВ

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», 410005, Саратов, ул. Университетская, 46

Методами ПЦР и фрагментарного секвенирования проведен сравнительный анализ участков генома, связанных с вирулентностью, у различных штаммов *V. cholerae*: классического биовара, а также типичных и генетически измененных штаммов биовара Эль Тор. Показано, что геном *V. cholerae* классического биовара более стабилен по сравнению с таковым *V. cholerae* Эль Тор. Установлено присутствие в геноме Эль Тор-вибрионов протяженных переменных участков, несущих гены патогенности. Обнаружено также, что в отличие от классических холерных вибрионов в геноме возбудителя холеры Эль Тор отсутствует CRISPR-система, ограничивающая горизонтальный перенос генов. Выявленные особенности структуры генома *V. cholerae* Эль Тор могут быть использованы для разработки нового поколения генодиагностических препаратов, а также для совершенствования молекулярно-эпидемиологического мониторинга при холере.

Ключевые слова: возбудитель холеры; гены патогенности; вариабельность генома; CRISPR-система.

T. A. Kul'shan, N. B. Cheldyshova, N. P. Guseva, N. I. Smirnova

COMPARATIVE ANALYSIS OF THE GENOME REGIONS ASSOCIATED WITH VIRULENCE IN ORIGINAL CLASSIC AND EL TOR BIOVAR OF *VIBRIO CHOLERAЕ* STRAINS

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", 46, Universitetskaya str., Saratov, Russian Federation, 410005

The comparative analysis of the genome regions associated with virulence in various *V. cholerae* strains: classical biovar, as well as typical and genetically altered strains of El Tor biovar was performed with the use of PCR assays and fragment sequencing. *V. cholerae* classical biovar genome was demonstrated to be more stable in comparison with the same in *V. cholerae* El Tor biovar. Within the genome of El Tor vibrios there were identified extensive variable regions carrying pathogenicity genes. It was also found that unlike classical cholera vibrios, in the *V. cholerae* El Tor genome there is absent CRISPR-system limiting horizontal transfer of the genes. The obtained data concerning these structural peculiarities of *V. cholerae* El Tor genome may be used in the delivery of the new generations of gene-diagnostic preparations and for improvement of molecular-epidemiological monitoring in case of cholera.

Key words: cholera agent; pathogenicity genes; genome variability; CRISPR-system.

Холера – особо опасная инфекционная болезнь, которая приводит к серьезному экономическому и социальному ущербу. Число больных холерой за последние 10 лет (2003–2012) составляет свыше 2 200 000 человек [4]. Возбудителем холеры являются *Vibrio cholerae* O1- и O139-серогрупп. Холерные вибрионы O1 серогруппы представлены двумя биоварами, отличающимися друг от друга по фенотипическим и генетическим свойствам: классическим, вызвавшим, видимо, первые шесть пандемий холеры, и биоваром Эль Тор, являющимся возбудителем текущей седьмой пандемии.

За время эволюции возбудитель холеры Эль Тор претерпел значительные изменения, чему во многом способствовало присутствие в его геноме значительного количества мобильных генетических элементов (МГЭ), таких как профаги (CTXφ и RS1φ), острова патогенности (VPI-1 и VPI-2), пандемичности (VSP-I и VSP-II) и персистенции (EPI), интегронный остров, а также транспозоны и IS-элементы [9, 21]. Благодаря пластичности генома возбудитель

холеры способен обитать в различных экологических нишах – в организме человека и водной среде. Кроме того, присутствие МГЭ делает геном *V. cholerae* нестабильным, что проявляется в утрате и/или приобретении новой генетической информации, включая гены вирулентности. Так, в начале 90-х годов прошлого столетия появились высоковирулентные геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор [3, 7, 8, 19, 22, 23]. Эти штаммы отличались от типичных изолятов возбудителя присутствием в геноме профага CTXφ, кодирующего холерный токсин (СТ – от *cholera toxin*), гена *ctxB* классического типа (*ctxB1*), характерного для *V. cholerae* классического биовара. Несмотря на то что *V. cholerae* классического биовара к 1923 г. утратил эпидемическую значимость, этот возбудитель остается природным резервуаром генов патогенности. В то же время до сих пор отсутствуют полные данные о генетическом разнообразии штаммов возбудителя холеры этого биовара. Между тем такие сведения крайне необходимы для разработки нового поколения диагностических и профилактических препаратов, а также для оптимизации эпидемиологического надзора. В связи с этим цель работы состояла в проведении сравнительного анализа структуры участков генома, связанных с

Для корреспонденции: Кульшань Татьяна Алексеевна, канд. мед. наук, науч. сотр. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», e-mail: rusrap1@microbe.ru

вирулентностью и жизнеобеспечением у природных штаммов *V. cholerae* O1.

Материалы и методы

В работе был использован 271 штамм холерного вибриона, из которых 40 штаммов относились к классическому биовару, выделенные в 1937–1962 гг. в России и ряде государств Азии (Афганистан, Пакистан, Индия, Китай, Корея), и 231 штамм принадлежал биовару Эль Тор, изолированных в 1970–2010 гг. в России, Украине и Узбекистане. Штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий. Все штаммы выращивали на агаре LB, pH 7,2 в течение 16–18 ч при температуре 37°C.

Выделение бактериальной ДНК. ДНК выделяли из клеток *V. cholerae* стандартным методом [2]. Полученные образцы, содержащие тотальную ДНК холерного вибриона, использовали для амплификации фрагментов генов.

Полимеразную цепную реакцию проводили с помощью олигонуклеотидных праймеров, синтезированных в ЗАО «Синтол» (Россия) на программируемом амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Продукты, полученные в ПЦР, анализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. В качестве контроля молекулярной массы использовали коммерческие маркеры GenRuler TM 100 bp DNA Ladder (MBI Fermentas, Литва). Фотодокументирование результатов проводили в системе для геледокументации VersaDoc фирмы BIORAD (США) с использованием программы Quantity One v 4.6.9 (BIORAD, США).

Секвенирование геномной ДНК проводили на приборе 3500xL Genetic Analyzers (Applied Biosystems, США) по методу F. Sanger, 1977. Полученные последовательности анализировали с использованием программы Mega 5.0 и выравнивали с соответствующим участком прототипных последовательностей референтных штаммов *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор и *V. cholerae* O395 классического биовара, депонированных в базе данных GenBank.

Результаты и обсуждение

Поскольку совместное существование холерных вибрионов двух биоваров в эндемичных по холере регионах в течение довольно длительного периода могло привести к появлению ряда штаммов *V. cholerae* классического биовара с измененным геномом как за счет обмена генетической информацией с *V. cholerae* биовара Эль Тор, так и в результате накопления различных мутаций, возникающих под действием изменяющейся окружающей среды, на первом этапе работы методом ПЦР было определено присутствие в геноме 40 штаммов *V. cholerae* классического биовара 20 генов вирулентности и жизнеобеспечения, локализованных на семи МГЭ (табл. 1). Установлено, что у всех изученных штаммов присутствовали 15 тестируемых генов, локализованных в коровой части хромосомы (*toxR*, *hapA*, *rtxA*, *attRS*),

а также на четырех МГЭ – профаге СТХφ (*ctxA*, *zot*, *ace*), островах патогенности VPI-1 (*tcpA*, *toxT*, *aldA*, *mop*) и VPI-2 (*hel1760*, *nanH*, *rep1803*), островах персистенции EPI (*mshA*). Вместе с тем в их геноме отсутствовали 5 генов (*rstC*, *deo0175*, *tnp0185* и *vc0490*, *vc0496*), входящих в состав трех МГЭ (RS1φ, VSP-I и VSP-II). Поскольку указанные гены являются генетическими маркерами этих МГЭ, полученные данные означают отсутствие в геноме классических вибрионов профага RS1φ и острова

Таблица 1

Гены вирулентности и жизнеобеспечения

Место локализации	Название гена	Продукт или функция
Профаг СТХφ	<i>ctxA</i>	A-субъединица СТ
	<i>ctxB</i>	B-субъединица СТ
	P _{ctxAB}	Промотор <i>ctxAB</i>
	<i>zot</i>	Токсин зонального поглощения
	<i>ace</i>	Дополнительный СТ
Профаг RS1φ	<i>rstC</i>	Антирепрессор <i>rstR</i>
Остров патогенности VPI-1	<i>tcpA</i> ^{ElTor/} <i>tcpA</i> ^{Class}	Основная субъединица TCP классических и Эль Тор-вибрионов
	<i>toxT</i>	Регуляторный белок
	<i>aldA</i>	Альдолаза
	<i>mop</i>	Цинксодержащая периплазматическая протеаза
Остров патогенности VPI-2	<i>hel1760</i>	Хеликаза
	<i>nanH</i>	Нейраминидаза
	<i>rep1803</i>	Гипотетический белок
Остров пандемичности VSP-I	<i>deo0175</i>	Деоксицитидилат диаминазоподобный белок
	<i>tnp0185</i>	Транспозаза
Остров пандемичности VSP-II	<i>vc0490</i>	Связанный с плазмидой белок
	<i>vc0496</i>	Гипотетический белок
Остров персистенции EPI	<i>mshA</i>	Основная субъединица маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей
Коровая область хромосомы	<i>attRS</i>	Сайт для внедрения в хромосому профага СТХφ
	<i>toxR</i>	Регуляторный белок
	<i>rtxA</i>	RTX-токсин
	<i>hapA</i>	Растворимая гемагглютинин-протеаза
SXT-генетический элемент	<i>dfrA</i>	Резистентность к триметоприму
	<i>strB</i>	Резистентность к стрептомицину
	<i>sulII</i>	Резистентность к сульфаметоксазолу
CRISPR-система	SXT	Область SXT-элемента
	<i>cas3</i>	Нуклеаза/хеликаза-ограничение горизонтального переноса генов

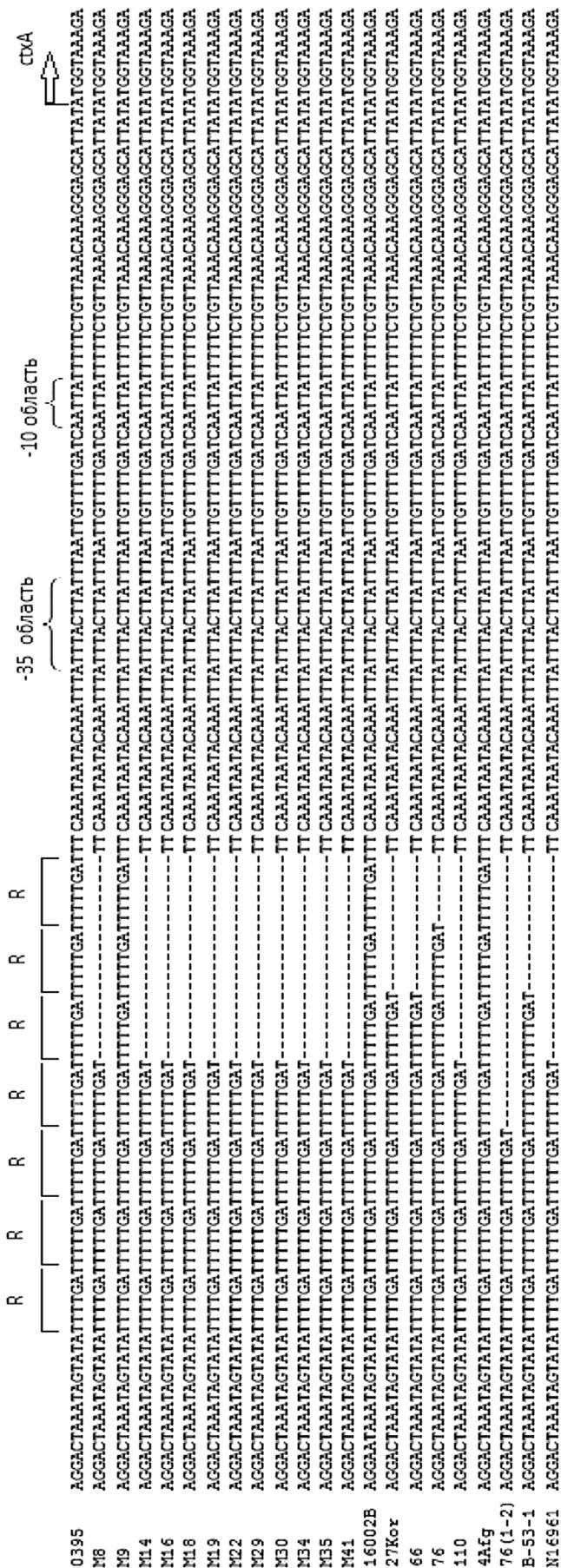


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности промоторной области генов *ctxAB* классических штаммов *V. cholerae*. R означает нуклеотидную последовательность повторов TTTTGAT, являющихся сайтами связывания с регуляторным белком ToxR. O395 и N16961 – референсные штаммы *V. cholerae* соответственно классического и Эль Тор-биоваров (нуклеотидные последовательности взяты из GenBank). M8, M9, M14, M16, M18, M19, M22, M29, M30, M34, M35, M41, 16002B, 27Koz, 66, 76, 110, 44fg, 76(1-2), B-53-1 – штаммы классического биовара.

пандемичности VSP-II, что согласуется с данными зарубежных авторов [15, 24].

Несмотря на указанную стабильность набора генов вирулентности, патогенности и персистенции, штаммы холерного вибриона в процессе эволюции могли приобрести мутации в данных генах. Для решения этого вопроса мы провели сравнительный анализ нуклеотидной последовательности двух наиболее варибельных участков профага СТХφ (гена *ctxB* и промоторной области оперона *ctxAB*) и гена *tcpA*, входящего в состав VPI-1 у 20 штаммов *V. cholerae* классического биовара, изолированных в разные временные периоды (1942–1962). При исследовании нуклеотидных последовательностей гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу СТ, было установлено, что все изученные штаммы содержали один и тот же аллель этого гена, а именно *ctxB1*, характерный для референсного штамма *V. cholerae* O395 классического биовара.

Что касается второго участка генома профага СТХφ – промоторной области оперона *ctxAB* (P_{ctxAB}), то ранее, до начала проведения наших экспериментов, было установлено, что классические вибрионы содержат в ней 7–8 копий повторов TTTTGAT. Вместе с тем в результате сравнения нуклеотидной последовательности промоторной области оперона *ctxAB* у 20 штаммов нами была выявлена их неоднородность. Оказалось, что лишь 3 из 20 изученных штаммов имели 7 копий гептаповторов. У 1 штамма было обнаружено 6 копий этой регуляторной последовательности. Следующая группа изолятов (3 штамма) содержала 5 копий TTTTGAT. Для самой большой группы штаммов (12 изолятов) было характерно присутствие в P_{ctxAB} четырех копий гептаповторов. И наконец, был обнаружен 1 штамм с тремя копиями TTTTGAT (рис. 1).

Секвенирование гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу токсин-корегулируемых пилей, у тех же 20 штаммов показало, что структура этого гена была идентична таковой референсного штамма O395 лишь у 5 штаммов, в то время как у 15 штаммов (или 75% от числа изученных) в гене *tcpA* в позиции 117 впервые была выявлена однонуклеотидная синонимичная замена гуанин на тимин (G/T) (рис. 2), которая не приводила к изменению белка TcpA.

Другая важная особенность возбудителя азиатской холеры состоит в том, что в его геноме имеется недавно описанная CRISPR-система (*Clustered Regularly Interspaced*

```

          10          20          110          120          660
O395  ATGCAATTAT TAAAACAGCT TTCTAGGCAT TATGGGGGTG CCGCGTTGCA TTTGGT
M8    .....
M9    .....
M14   .....
M16   .....
M18   .....
M19   .....
M22   .....
M29   .....
M30   .....
M34   .....
M35   .....
M41   .....
16002B .....
27Kor .....
66    .....
76    .....
110   .....
4Afg  .....
76(1-2) .....
B-53-1 .....
N16961 ATGCAATTAT TAAAACAGCT TTCTGGGTAT TATGGGTGTG CACAGAAGTT TTTGGT

```

Рис. 2. Нуклеотидная последовательность фрагментов гена *tcpA* изученных штаммов *V. cholerae* классического биовара. M8, M9, M14, M16, M18, M19, M22, M29, M30, M34, M35, M41, 1600B, 27Kor, 66, 76, 110, 4Afg, 76(1-2), B-53-1 – штаммы *V. cholerae* классического биовара; O395 и N16961 – референсные штаммы *V. cholerae* соответственно классического и Эль-Тор-биоваров, нуклеотидные последовательности гена *tcpA* которых представлены в GenBank. Идентичные нуклеотидные обозначены точками.

Shot Palindromic Repeats) [6,10,18]. Обнаружение ранее лишь у одного штамма этого биовара (*V. cholerae* O395) CRISPR-системы [14], которая защищает клетку от проникновения чужеродной ДНК, позволяет

предположить, что именно эта система могла быть одной из причин относительной стабильности генома возбудителя азиатской холеры. Для проверки этого предположения мы определили присутствие

Таблица 2

Генотипы природных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенных в РФ, Украине и Узбекистане в период 7-й пандемии холеры

Характеристика генома																Количество штаммов	
CTXφ		VPI-I		VPI-II		VSP-I		VSP-II		EPI		CRISPR-система					
<i>ctxA</i>	<i>zot</i>	<i>rstC</i>	<i>tcpA</i>	<i>toxT</i>	<i>aldA</i>	<i>mop</i>	<i>nanH</i>	<i>tnp0185</i>	<i>vco0490</i>	<i>vco0496</i>	<i>mshA</i>	<i>hapA</i>	<i>cas3</i>	<i>strB</i>	<i>dfrA</i>	SXT	
Штаммы, выделенные от людей																	
Типичные штаммы, выделенные в 1970–1990 гг.																	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/н.о	-	20/17
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	н.о	-	1
-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	3
Измененные варианты, выделенные в 1988–2010 гг.																	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	15
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	8
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	н.о	н.о	11
Штаммы, выделенные из внешней среды																	
+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/н.о	-	12/13
-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	н.о	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	н.о	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+/н.о	-	1/68
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+/н.о	-	1/15
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	н.о	-	8
-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	н.о	-	13
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	н.о	-	1
-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	н.о	-	2
-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	н.о	-	1
-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	н.о	-	2

CRISPR-системы в геноме 25 штаммов *V. cholerae* классического биовара. Для ПЦР-идентификации CRISPR-системы был выбран ген *cas3*, кодирующий нуклеазу/хеликазу, которая производит разрезание чужеродной ДНК и находится в непосредственной близости от CRISPR-кассеты. В результате было установлено присутствие гена *cas3* и, следовательно, CRISPR-системы в хромосоме всех 25 изученных штаммов *V. cholerae* классического биовара.

Таким образом, несмотря на давнее возникновение возбудителя азиатской холеры, изученные участки его генома в целом остаются стабильными, поскольку не было выявлено штаммов с утратой хотя бы одного из 15 тестируемых генов, размещенных как в коровой области хромосомы, так и на четырех указанных выше МГЭ. Это, возможно, обусловлено присутствием CRISPR-системы, ограничивающей горизонтальный перенос генов от неизвестных доноров в геном *V. cholerae* классического биовара. Вместе с тем представленные данные свидетельствуют о том, что штаммы холерного вибриона классического биовара различаются между собой по структуре промоторной области оперона *ctxAB*, а также гена *tcpA*, кодирующих ключевые факторы патогенности.

Далее с помощью ПЦР мы изучили присутствие тех же 25 генов в геноме 92 клинических штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных в 1970–2010 гг. на территории России, Украины и Узбекистана (табл. 2). Оказалось, что все тестируемые гены коровой области хромосомы (*toxR*, *hapA*, *rtxA*, *attRS*) присутствовали в хромосоме всех изученных штаммов. Что касается МГЭ, то в геноме 96% штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор помимо четырех геномных островов (CTXφ, VPI-1, VPI-2, EPI), обнаруженных у *V. cholerae* классического биовара, имелись три дополнительных генных блока – профаг RS1φ и два острова пандемичности VSP-I, VSP-II. Эти данные полностью совпадают с ранее опубликованными результатами и говорят о том, что возбудитель холеры Эль Тор, мог приобрести их в процессе эволюции через горизонтальный перенос генетической информации от неизвестных до сих пор доноров [16, 20]. В связи с этим особого внимания заслуживает тот факт, что, согласно нашим данным, ни один из исследованных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор не имел гена *cas3* и, следовательно, CRISPR-системы, которая могла бы ограничить горизонтальный перенос генов.

На следующем этапе нашей работы мы оценили вариабельность генома клинических штаммов *V. cholerae* Эль Тор-биовара. В результате исследования было установлено, что среди 92 штаммов 4 изолята были лишены профага CTXφ, кодирующего CT, либо несли дефектный профаг, не имеющий гена *ctxA*. К тому же один нетоксигенный штамм (M885) был лишен и второго профага RS1φ. Кроме того, у трех штаммов (M867, M868, M870) наряду с отсутствием гена *ctxA* из профага CTXφ не было

островов пандемичности VSP-I и VSP-II, а остров патогенности VPI-2 был дефектным, поскольку не содержал краевых генов *hel1740* и *rep1803* при наличии гена *nanH*.

Таким образом, генетическое разнообразие клинических штаммов *V. cholerae* Эль Тор выражалось в следующем: отсутствие профагов CTXφ и RS1φ, островов пандемичности VSP-I и VSP-II, а также наличие дефектного профага CTXφ и острова патогенности VPI-2. Это означает, что в отличие от *V. cholerae* классического биовара геном *V. cholerae* биовара Эль Тор является нестабильным за счет структурных изменений, связанных с мобильными элементами. При этом среди изученных МГЭ наиболее вариабельным оказался геном профага CTXφ.

Появление генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, несущих ген *ctxB1* (классического типа), отличающийся от *ctxB3* (характерный для Эль Тор-биовара) наличием двух однонуклеотидных замен в положениях 115 и 203 (С/Т), привело к тому, что геноварианты стали более вирулентными по сравнению с типичными изолятами [19] и вытеснили типичные Эль Тор-штаммы во многих эндемичных по холере регионах, что определяет реальную возможность завоза данного возбудителя на территорию России [1, 3, 4, 7, 8]. В связи с этим на следующем этапе работы у изучаемых Эль Тор-штаммов было проведено секвенирование гена *ctxB* из профага CTXφ, которое показало, что все штаммы, выделенные на территории России после 1990 г. несли аллельный ген *ctxB1*, т. е. были геновариантами возбудителя холеры Эль Тор. Обнаружение в геноме изученных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор генов классического холерного вибриона подтверждает возникновение в современный период 7-й пандемии холеры природных генетически измененных штаммов ее возбудителя в результате горизонтального переноса генов холеры [7, 8, 11, 19, 23].

Особый интерес заслуживает вопрос о присутствии в геноме клинических штаммов возбудителя холеры Эль Тор SXT^{ET} – генетического элемента, ответственного за распространение бактериальных генов лекарственной устойчивости. В результате установлена четкая временная связь между обнаружением первого источника SXT^{M010} – генетического элемента - *V. cholerae* O139 и появлением штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам, кодируемым генами этого элемента. Так, штаммы, выделенные до 1993 г., были лишены данного элемента, в то время как все штаммы, выделенные позже, несли в своем геноме SXT-элемент с генами лекарственной устойчивости к сульфаметоксазолу, триметоприму и стрептомицину и были чувствительны к указанным препаратам, что согласуется с ранее полученными данными [5, 12] (см. табл. 2). Присутствие SXT-элемента в хромосоме всех исследованных нами генетически измененных штаммов *V. cholerae* биова-

ра Эль Тор, начиная с 1993 г., может означать, что в природных популяциях *V. cholerae* Эль Тор-биовара довольно часто происходил генетический обмен как с *V. cholerae* классического биовара, так и с *V. cholerae* O139.

Поскольку холерные вибрионы представляют собой группу бактерий, которые являются автохтонными для речных, прибрежных и устьевых экосистем, а водная среда выступает в качестве основного источника передачи данного возбудителя и способствуют обширным генетическим взаимодействиям между различными штаммами *V. cholerae* [13, 16], то на следующем этапе работы было изучено 139 штаммов, изолированных на разных территориях из водных источников (1970–2004). Обнаружено, что все исследованные штаммы были лишены SXT-генетического элемента и представляли собой три большие группы (см. табл. 2). В 1-ю группу входили 85 (61%) типично водных штаммов, содержащих лишь гены коровой области хромосомы (*rtxA*, *hapA*, *toxR*) и ген *mshA* острова персистенции, 72 из них содержали и ген *attRS*. 2-я группа содержала 25 (18%) штаммов, несущих в своем геноме, помимо генов коровой области хромосомы все МГЭ, кроме SXT – генетического элемента. 3-ю группу составляли 29 (21%) штаммов, претерпевших ряд геномных перестроек: 1) утрату генов профагов CTXφ и RS1φ (гены *ctxA*, *zot*, *ace*, *rstC*) – 3 штамма при наличии других тестируемых генов; 2) присутствие в геноме авирулентных штаммов гена *nanH* из ОП VPI-2 – 14 штаммов; 3) сохранение дефектных островов пандемичности VSP-I и VSP-II, так как в их геноме был выявлен один из генов, входящих в состав данных МГЭ – *deo0175*, *tnp0185*, *vco0490*, *vco0496* – 12 штаммов (см. табл. 2). Особенности генотипа таких штаммов подтверждают ранее высказанное предположение, что они могли произойти от вирулентных в результате утраты ими в водной среде МГЭ, несущих ключевые гены патогенности.

Таким образом, выявленный нами высокий уровень генетического разнообразия природных штаммов возбудителя холеры, изолированных из воды открытых водоемов, указывает на необходимость проведения постоянного молекулярно-эпидемиологического мониторинга внешней среды.

Заключение

В целом полученные данные о генетическом разнообразии штаммов возбудителя холеры двух биоваров с помощью ПЦР и метода секвенирования показали, что геном штаммов *V. cholerae* классического биовара, несмотря на более древнее происхождение, является более стабильным по сравнению с таковым *V. cholerae* биовара Эль Тор. Из восьми тестируемых мобильных элементов (CTXφ, RS1φ, VPI-1, VPI-2, VSP-I, VSP-II, EPI, SXT) в геноме всех проверенных штаммов этого возбудителя присутствует только четыре (CTXφ, VPI-1, VPI-2, EPI). Другая важная особенность этого возбудителя состоит в том, что в хромосоме всех штаммов *V. cholerae* классического

биовара имеется CRISPR-система, которая могла создать препятствия получению этим возбудителем дополнительной генетической информации через горизонтальный перенос генов. Вместе с тем мы впервые независимо от недавно проведенных исследований [3, 17] обнаружили у классических вибрионов вариативность двух участков генома, связанных с вирулентностью – промоторной области оперона *ctxAB* и гена *tcpA*, входящих в состав профага CTXφ и острова патогенности VPI-1, кодирующих биосинтез СТ и токсинорегулируемых пилей. Выявленная вариативность проявляется в разном количестве повторов TTTTGAT в промоторной области *ctxAB* у разных штаммов, а также однонуклеотидной синонимической замене в гене *tcpA* (G/T). Следствием такой изменчивости структуры генома классических вибрионов может быть различный уровень продукции СТ у разных штаммов.

Что касается эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, то для их генома характерно наличие протяженных вариативных участков, в состав которых входят профаги CTXφ и RS1φ, остров патогенности VPI-2 и остров пандемичности VSP-II. Вариативность генома возбудителя холеры Эль Тор выражается в потере различных фрагментов ДНК, связанных с патогенностью и эпидемическим потенциалом. Другой важный механизм генетической изменчивости штаммов этого биовара – приобретение нового генетического материала через горизонтальный перенос. Эволюционно значимый результат таких событий – появление штаммов, несущих конъюгативный SXT-элемент с четырьмя генами устойчивости к лекарственным препаратам, а также возникновение геновариантов возбудителя с повышенной вирулентностью. Выявленное широкое генетическое разнообразие изученных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор может быть отражением различных экологических условий обитания, а также продолжающейся эволюции генома этого возбудителя.

Таким образом, проведенное исследование позволило получить более полные сведения о структуре генома значительного количества штаммов *V. cholerae* классического и Эль Тор-биоваров, выделенных на разных эндемичных по холере территориях и занесенных на территорию России. Эти сведения необходимы для разработки нового поколения холерных генодиагностических препаратов, а также могут быть использованы для совершенствования молекулярно-эпидемиологического мониторинга внешней среды.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Арешина О.А., Адаменко О.Л. Оценка эпидемиологической обстановки по холере в мире в современный период. Прогноз. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 1 (107): 16–9.
2. Методические указания (МУ) 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». М; 2010.

3. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Кожевникова А.С. и др. Молекулярно-генетический анализ эпидемически опасных штаммов *Vibrio cholerae* Eltor, изолированных в Сибирском и Дальневосточном регионах России. Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. 2012; 2: 13 - 20.
4. Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне. Проблемы особо опасных инфекций. 2012; 1 (111): 11–16.
5. Подшивалова М.В., Захарова И.Б., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Распространенность интегронов класса I и SXT-элементов в изолятах *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Волгоградской области. В кн.: Холера и патогенные для человека вибрионы: Материалы проблемной комиссии. Ростов-н/Д; 2007; 20: 105–8.
6. Пугач К.С., Лопатина А.В., Северинов К.С. CRISPR-системы адаптивного иммунитета прокариот. Молекулярная биология. 2012; 46 (2): 195–203.
7. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабеньшев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. Эпидемиология и инфекционные болезни. 2012; 5: 31–5.
8. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, завезенных на территорию России в современный период. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011; 4: 11–8.
9. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция возбудителя холеры. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2004; 4: 3–13.
10. Шашкова А.В., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Структура и функциональная роль CRISPR-системы бактерий. Проблемы особо опасных инфекций. 2011; 2 (108): 49–52.
11. Borkakoty B., Biswas D., Devi U. et al. Emergence of classical ctxB genotype 1 and tetracycline resistant strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Assam, India. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 2012; 106 (6): 382–6.
12. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J. et al. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72 (4): 3054–7.
13. Chakraborti S., Mukhopadhyay A.K., Bhadra R.K. et al. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66 (9) 4022–8.
14. Chakraborty S., Waise T.M.Z., Hassan F. et al. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholera* O395. In Silico Biol. 2009; 9 (4): 245–54.
15. Dziejman M., Balon E., Boydet D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99: 1556–61.
16. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. Review. 2012; 3 (7): 1–10.
17. Halder K., Das B., Nair B. et al. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholera* O1 El Tor hybrid strain. Microbiology. 2010; 156: 99–107.
18. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V. et al. A DNA repair system specific for thermophilisarchaea and bacteria predicted by genomic context analysis. Nucl. Acids Res. 2009; 30: 482–96.
19. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. and Immunol. 2008; 52 (6): 314–7.
20. Murphy R.A., Boyd E.F. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. J. Bacteriol. 2008; 190 (2): 636–47.
21. Mutreja A., Thomson N.R., Connor T.R. et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. Nature. 2011; 477: 462–5.
22. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2006; 44: 4211–3.
23. 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.
24. O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J. et al. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26,9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43,4 kb genomic island in *V. vulnificus*. Microbiology. 2004; 150: 4053–63.

REFERENCES

1. Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Areshina O.A., Adamenko O.L. Assessment of epidemiological situation for cholera in the world in the modern period. Plague. 2011; 1 (107): 16–9 (in Russian).
2. Metodicheskie ukazaniya (MU) 1.3.2569-09. Organization of the laboratories using nucleic acid amplification techniques when working with material containing microorganisms Groups I–IV pathogenicity. Moscow; 2010 (in Russian).
3. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Kozhevnikova A.S. et al. Molecular genetic analysis of infectious strains of *Vibrio cholerae* Eltor, isolated in the Siberian and Far Eastern regions of Russia. Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya. 2012; 2: 13–20 (in Russian).
4. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kругликов V.D. Cholera in the beginning of XXI century. Forecast at the global level. Plague. 2012; 1 (111): 11–6 (in Russian).
5. Podshivalova M.V., Zakharova I.B., Viktorov D.V., Alekseev V.V. The prevalence of class I integrons and SXT-elements in isolates of *Vibrio cholerae*, isolated in the Volgograd region. In: Cholera and human pathogenic vibrio. Materials probl. Commission. Rostov-na-Donu, 2007; 20: 105–8 (in Russian).
6. Pugach K.S., Lopatina A.V., Severinov K.S. CRISPR-adaptive immunity prokaryotes. Mol. biol. 2012; 46 (2): 195–203 (in Russian).
7. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshev B.V., Kulichenko A.N. The evolution of the pathogen, clinical and epidemiological features of modern cholera El Tor. Epidemiology. inf. disease. 2012; 5: 31–5 (in Russian).
8. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. The variability of the genome modified versions *Vibrio cholerae* El Tor biovar, imported into the territory of Russia in the modern period. Mol. genet., microbiol., virological. 2011; 4: 11–8 (in Russian).
9. Smirnova N.I., Kutyrev V.V. The evolution of the cholera pathogen. Mol. genet., microbiol., virological. 2004; 4: 3–13 (in Russian).
10. Shashkova A.V., Goryaev A.A., Smirnova N.I. Structure and functional role of the CRISPR-system bacteria. Plague. 2011; 2 (108): 49–52 (in Russian).
11. Borkakoty B., Biswas D., Devi U. et al. Emergence of classical ctxB genotype 1 and tetracycline resistant strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor in Assam, India. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 2012; 106 (6): 382–6.
12. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J. et al. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2006; 72 (4): 3054–7.
13. Chakraborti S., Mukhopadhyay A.K., Bhadra R.K. et al. Virulence genes in environmental strains of *Vibrio cholerae*. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66 (9) 4022–8.
14. Chakraborty S., Waise T.M.Z., Hassan F. et al. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholera* O395. In Silico Biol. 2009; 9 (4): 245–54.
15. Dziejman M., Balon E., Boydet D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2002; 99: 1556–61.
16. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. Review. 2012; 3 (7): 1–10.

17. Halder K., Das B., Nair B. et al. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain. *Microbiology*. 2010; 156: 99–107.
18. Makarova K.S., Aravind L., Grishin N.V. et al. A DNA repair system specific for thermophilisarchaea and bacteria predicted by genomic context analysis. *Nucl. Acids Res.* 2009; 30: 482–96.
19. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. and Immunol.* 2008; 52 (6): 314–7.
20. Murphy R.A., Boyd E.F. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J. Bacteriol.* 2008; 190 (2): 636–47.
21. Mutreja A., Thomson N.R., Connor T.R. et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477: 462–5.
22. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 4211–3.
23. 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.
24. O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J. et al. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26,9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43,4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology*. 2004; 150: 4053–63.

Поступила 11.13

Received 11.13

Сведения об авторах:

Челдышова Надежда Борисовна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», E-mail: rusrap1@microbe.ru; **Гусева Наталья Петровна**, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», e-mail: rusrap1@microbe.ru; **Смирнова Нина Ивановна**, д-р биол. наук, проф., зав. отд. микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», e-mail: rusrap1@microbe.ru

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.921.5-036.22«2009–2013»

Яковлев А.А.¹, Котлярова С.И.², Мусатов В.Б.¹, Федуняк И.П.³, Карнаухов Е.В.², Вашукова С.С.⁴, Иванова Е.Н.²

ТРИ ЭПИДЕМИЧЕСКИХ СЕЗОНА ГРИППА 2009–2013 гг.

¹ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская набережная, 7/9; ²СПБ ГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, 191167, Санкт-Петербург, ул. Миргородская, 3; ³ГБОУ ВПО «Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 191015, Санкт-Петербург, ул. Кирочная, 41; ⁴СПБ ГБУЗ Городской клинико-диагностический центр (вирусологический), 191167, Санкт-Петербург, ул. Миргородская, 3, литер Д.

Настоящая публикация посвящена сравнительному эпидемиологическому и этиологическому анализу гриппа сезонов 2009–2010, 2011 и 2013 гг. В статье приведены количественные данные о госпитализации пациентов в инфекционный стационар в период эпидемических сезонов с анализом календарного времени, длительности и пиков массового поступления. Приведены также данные об этиологической структуре гриппа в каждый эпидемический сезон. Проанализирована летальность от гриппа в целом и гриппа А(Н1)рdm09. Уточнены сходства и различия эпидемических сезонов в указанные годы.

Ключевые слова: пандемический грипп А(Н1)рdm09; сезонный грипп; эпидемический сезон; подъем заболеваемости; пик поступления; летальность; коморбидность.

Yakovlev A.A.¹, Kotlyarova S.I.², Musatov V.B.¹, Fedunyak I.P.³, Karnaukhov E.V.², Vashukova S.S.⁴, Ivanova E.N.²

THREE EPIDEMIC SEASONS OF FLU OF 2009–2013

¹FGBOU VPO St. Petersburg State University, Department of Infectious Diseases and Epidemiology; 199034, St. Petersburg, University Embankment, 7/9; ²SPB GBUZ Clinical Hospital of Infectious Diseases named after S.P. Botkin; 191167, St. Petersburg, Mirgorodskaya St., 3; ³GBOU VPO North-Western State Medical University named after I.I. Mechnikov; 191015, St. Petersburg, Kirochnaya St., 41; ⁴SPB GBUZ City Clinical Diagnostic Center (Virologic); 191167, St. Petersburg, Mirgorodskaya St., 3, Letter D.

The present publication is devoted to the comparative epidemiological and ethyologic analysis of flu in seasons of 2009–2010, 2011 and 2013. In the article there are presented quantitative data on hospitalization of patients to an infectious hospital in the period of epidemic seasons with the analysis of calendar time, duration and peaks of mass admission. Data on etiological structure of flu are provided for each epidemic season also. The lethality from flu as a whole and from flu А(Н1)рdm09 is analyzed. Similarities and distinctions of epidemic seasons in the specified years are clarified.

Key words: pandemic flu А(Н1)рdm09; seasonal flu; epidemic season; morbidity rate; morbidity peak; lethality; comorbidity.

Для корреспонденции: Яковлев Алексей Аевенирович, гл. врач СПб ГБУЗ Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, зав. каф. инфекционных болезней, эпидемиологии и венерологии СПбГУ, д-р мед. наук, проф.; e-mail: hosp30@mail.rcsm.ru

Возникший пандемический грипп сезона 2009–2010 гг. вызвал новый интерес мировой науки к этому заболеванию. Непрерывный эпидемиологический и вирусологический мониторинг в сезон