

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

УДК 579.843.1:579.25].083.1

Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Краснов Я.М., Смирнова Н.И.

## АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ ФРАГМЕНТАРНОГО И ПОЛНОГЕНОМНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* КЛАССИЧЕСКОГО БИОВАРА, ВЫЗВАВШИХ ВСПЫШКУ АЗИАТСКОЙ ХОЛЕРЫ В РОССИИ

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

Целью исследования явилось изучение генетических изменений в геноме классических штаммов холерного вибриона, вызвавших атипичную вспышку азиатской холеры в России в 1942–1943 гг. Полногеномное и фрагментарное секвенирование указанных штаммов выявило наличие мутаций в их структурных (*tcpC*, *tcpF*, *tcpS*, *purE*) и регуляторных (*vieA*, *vieS*, *toxR*, *hapR*, *rpoS*, *crp*) генах. Установлено, что гиперпродукция СТ и TCP, а также отсутствие продукции НАР были вызваны мутациями в регуляторных генах (*hapR* и *rpoS*). Ауксотрофность по аденину у штамма *V. cholerae* M-29 связана с мутацией в гене *purE*. Таким образом, атипичность эпидемического и клинического процессов при вспышке холеры в России в 1942–1943 гг. была связана с сочетанием фенотипических особенностей вызвавших ее штаммов (ауксотрофность, гиперпродукция СТ, TCP, отсутствие продукции НАР), обусловленных мутациями в структурных (*purE*) и регуляторных (*hapR* и *rpoS*) генах, с социальными факторами (война, голод, ослабленный организм заключенных).

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; секвенирование; нуклеотидные последовательности; мутации.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015, 20 (5): 24–31.

Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I.

ANALYSIS OF THE FRAGMENTED AND FULL GENOME SEQUENCING OF ATYPICAL *VIBRIO CHOLERAЕ* STRAINS OF THE CLASSICAL BIOVAR, WHICH BROUGHT ABOUT TO THE OUTBREAK OF THE ASIAN CHOLERA IN RUSSIA

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

The aim of the research was the study of genetic changes in the genome of classical strains of *Vibrio Cholerae* which brought about to the atypical outbreak of Asian cholera in Russia in 1942 - 1943. Genome-wide and fragmented sequencing of mentioned strains revealed the presence of mutations in their structural (*tcpC*, *tcpF*, *tcpS*, *purE*) and regulatory (*vieA*, *vieS*, *toxR*, *hapR*, *rpoS*, *crp*) genes. The overproduction of CT and TCP, as well as the lack of production NAR were found to be caused by mutations in regulatory genes (*hapR* and *rpoS*). Adenine auxotrophy in *V. cholerae* strain M-29 is associated with a mutation in a gene *purE*. Thus, atypicality of the epidemic and clinical processes in the outbreak of cholera in Russia in 1942 - 1943 was associated with a combination of phenotypic features (auxotrophy, overproduction CT, TCP, lack of product NAR) of strains which brought it, caused by mutations in the structural (*purE*) and regulatory (*hapR* and *rpoS*) genes with social factors (war, starvation, weakened body of prisoners).

Key words: *Vibrio cholerae*; sequencing; nucleotide sequence; mutation.

For citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(5): 24–31. (In Russ.)

Холера как особо опасная инфекционная болезнь известна с незапамятных времен, когда эпидемии и пандемии, вызванные *Vibrio cholerae* O1-серогруппы классического биовара, ежегодно уносили тысячи жизней. Всего насчитывается 6 пандемий холеры, вызванных *V. cholerae* O1-серогруппы классического биовара. Заболевание характеризовалось тяжелым течением, широким распространением, выраженной дегидратацией, большим количеством алгидных форм и летальных случаев (более 40%) [1]. В середине прошлого столетия холерные вибрионы классического биовара были практически полностью вытеснены *V. cholerae* биовара Эль-Тор, вызвавших седьмую пандемию холеры, продолжающуюся до настоящего

времени. Тем не менее штаммы *V. cholerae* классического биовара до сих пор выделяются из объектов внешней среды на эндемичных по холере территориях, вызывая отдельные локальные вспышки холеры, в том числе совместно с холерными вибрионами биовара Эль-Тор. Так, вспышки и единичные случаи холеры, вызванной штаммами классического биовара, наблюдались в южных регионах Бангладеш в 1982, 1988–1989 гг., в Мексике в 1991–1997 гг., в Иране и Непале в 2012 г. [2–6]. Имеются также сообщения о выявлении в речной и морской воде (1996–1999 и 2006–2009), а также от больных и носителей (1986–2004) как классических, так и гибридных штаммов *V. cholerae*, несущих фено- и генотипические признаки и классического, и Эль-Тор биоваров [7–12]. Все это говорит о том, что классические вибрионы продолжают циркулировать во внешней среде, вызывая угрозу возникновения вспышек холеры и новых штаммов с необычными свойствами.

Для корреспонденции: Челдышова Надежда Борисовна, chelna-25@yandex.ru

For correspondence: Cheldyshova N., e-mail: chelna-25@yandex.ru

На территории России последняя вспышка азиатской холеры наблюдалась в 1942–1943 гг. в нескольких городах Поволжья, Прикаспия и Приуралья. В отличие от предыдущих эпидемий данная вспышка характеризовалась атипичностью инфекционного и эпидемического процессов. Так, несмотря на условия военного времени, для вспышки 1942–1943 гг. были характерны сравнительно низкие показатели заболеваемости (среднегодовой показатель заболеваемости на 100 тыс. населения составил 23,1, что на порядок ниже, чем при эпидемиях 1892–1894 и 1918–1923 гг.), значительный уровень длительного вибрионосительства и легких клинических форм (34–52%) на фоне высокой летальности (42,2%), особенно среди заключенных (57,2%) [13]. Интересен и тот факт, что основным путем передачи инфекции служил контактно-бытовой, а не водный путь, характерный для Поволжского региона.

Проведенное ранее исследование фенотипических свойств штаммов, вызвавших подобное своеобразие вспышки, выявило наличие у них следующих особенностей: суперпродукции основных факторов вирулентности холерного вибриона – холерного токсина (СТ – от *cholera toxin*) и токсинорегулируемых пилей адгезии (TCP – от *toxin coregulated pilus*), высокой вирулентности, практически полного отсутствия продукции растворимой гемагглютинин/протеазы (НАР – от *haemagglutinin/peptidase*) и ауксотрофности (в основном по аденину) [13].

Ответственность за синтез СТ несут гены *ctxAB*, расположенные на мобильном генетическом элементе (МГЭ) – профаге СТХφ. Синтез TCP осуществляет оперон *tcpA-F*, также расположенный на МГЭ - острове патогенности VPI-I. Экспрессия указанных генов вирулентности находится под контролем регуляторного каскада (*tcpPH*, *toxRS* и *toxT*), генов регуляторной системы «*quorum sensing*» (*luxO-P*, *rpoN*, *rpoS*, *hapR*), а также генов *aphAB*, *crp*, *vieABC*, *h-ns* и др. [8, 14–18]. За продукцию НАР отвечает ген *hapA*, контролируемый регуляторной системой «*quorum sensing*» [19, 20].

Ауксотрофность штамма может быть вызвана мутациями в одном из генов, ответственных за обмен соответствующей аминокислоты или азотистого основания. В частности, причиной ауксотрофности по аденину может быть мутация в одном из генов *pur* (*purA*, *purB*, *purE*, *purK* и др.) [21].

Проведенный нами ранее ПЦР-анализ основных структурных и регуляторных генов, ответственных за вирулентность и жизнеобеспечение у штаммов, выделенных в 1942–1943 гг., не выявил каких-либо особенностей [13], в связи с чем было решено провести более глубокое изучение генома данной группы штаммов с помощью секвенирования.

Цель данной работы состояла в изучении генетических изменений в геноме атипичных классических штаммов холерного вибриона, вызвавших вспышку азиатской холеры в России в 1942 - 1943 гг., на основе анализа их фрагментарного и полногеномного сиквенса.

## Материалы и методы

В работе было использовано 12 клинических штаммов *V. cholerae* классического биовара, выделенных от больных в 1942–1943 гг. на территории Саратовской (5 штаммов), Волгоградской (1 штамм), Астраханской областей (3 штамма) и в Уфе (3 штамма), а также 1 штамм, изолированный из воды в Астрахани. Указанные штаммы были получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб», где они хранились в лиофилизированном состоянии. Культивирование бактерий производили на бульоне и агаре Luria-Bertani (LB).

Бактериальную ДНК выделяли с помощью коммерческого набора ДНК-сорб (AmpliSens, Россия) по прилагающейся к нему инструкции. Амплификацию фрагментов генома проводили на программируемом термоциклере с горячей крышкой «БИС M112» с помощью олигонуклеотидных праймеров, представленных в таблице.

Фрагментарное секвенирование ДНК исследуемых штаммов проводили на генетическом анализаторе модели ABI 3500xl. Полученную нуклеотидную последовательность генов анализировали с помощью программы BioEdit 7.1.3 и сравнивали с таковой у референс-штаммов, представленных в базе данных GenBank.

Полногеномное секвенирование ДНК штамма *V. cholerae* М-29 осуществляли на приборе для высокопроизводительного секвенирования «PGM» Ion Torrent. Первичный анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программы Data Collection v 1.0 и Sequencing Analysis Software v. 5.4. Анализ и сравнение полученной полногеномной последовательности с нуклеотидной последовательностью референс-штамма *Vibrio cholerae* O395 классического биовара, полученной из GenBank, осуществляли с помощью программного обеспечения DNASTAR lasergene Version 11.2.1.25 и BioEdit 7.1.3.

## Результаты и обсуждение

На первом этапе исследования мы провели полногеномное секвенирование одного атипичного штамма *V. cholerae* М-29, выделенного в августе 1942 г. на территории Астрахани из испражнений больного (NCBI GenBank: JFGR00000000). Выбранный штамм отличался высокой продукцией СТ и TCP, был ауксотрофом по аденину и не продуцировал НАР.

Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей всех генов (кроме гена *hapR*) штамма М-29 проводился с геномом референс-штамма *V. cholerae* O395 классического биовара (NCBI GenBank: CP000627.1). Что касается гена *hapR*, то в связи с тем, что у референс-штамма O395 отмечается делеция аденина в позиции 200, приводящая к сдвигу рамки считывания [22], сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *hapR* ати-

**Последовательности праймеров, использованных в работе**

Название праймера	Последовательность праймера (5→3')	Длина амплифицируемого фрагмента, п.н.	Авторы
<i>ctxA-1</i>	CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG	740	Fields P. I. et al., 1992.
<i>ctxA-2</i>	CCTGGTACTTCTACTTGAAACG		
<i>ctxB-1</i>	ATGAT'AAAAAT'AAAATTTGG	354	Смирнова Н.И., 2013
<i>ctxB-2</i>	TTAATTTGCCATACTAATTG		
<i>prctxAB-1</i>	ATGGGCGACAGGTCATCACATTTAC	557	«
<i>prctxAB-2</i>	GAACTCAGACGGGATTTGTTAGGCA		
<i>tcpA-fl1</i>	CTTTGTGTGGTTAAATGTGCG	880	«
<i>tcpA-fl2</i>	AATAATCCGACACCTTGTGTTG		
<i>zot1-1</i>	TACCATCTATCCGCTTATCC	653	Рассчитаны авторами
<i>zot1-2</i>	TCGTGGGTGGTCAGGGTAA		
<i>zot2-1s</i>	AACCACGCCTAACATGACC	718	«
<i>zot2-2s</i>	ACCCCGTTTCACTTCTACCC		
<i>orfU1-1s</i>	TCCGCATTTGCTAACCAAG	688	«
<i>orfU1-2s</i>	GACCTGATTGAACGCAGAC		
<i>orfU2-1s</i>	CCGATGTGCGACTTGTCCG	629	«
<i>orfU2-2s</i>	CAGCGAGCAGGGTACTACA		
<i>orfU-ace-1s</i>	AACCCAATCCCACACCACC	649	«
<i>orfU-ace-2s</i>	AGCCTGAAGCAAGATAGCC		
<i>cep-1</i>	ATGACCAGAAAACCTCGAAC	510	«
<i>cep-2</i>	CACGGTAACAATCAGAACA		
<i>prtcpAF-1</i>	TTTCTCGCCTTCCCTTACA	673	«
<i>prtcpAF-2</i>	CATACCCCTTTGACCGGTTT		
<i>prttoxR-1</i>	GGCTTTCGTTGCTGCCTA	636	«
<i>prttoxR-2</i>	GTCATACCGATCCCGTTATCC		
<i>prttoxT-1</i>	AAGGAGATGGAAGTGGTGTG	708	«
<i>prttoxT-2</i>	CTTTCGAGAAGAACCCTGAA		
<i>hapR-1</i>	CAAGGATATACCCCTATGGAC	907	«
<i>hapR-2</i>	TGAAAAAAGCTGCTGCCTTAG		
<i>hapA-1</i>	GTGTTTTTCATTGACTT	682	«
<i>hapA-2</i>	ATCCCATTTGGTCTAGC		
<i>hapA2-1</i>	TGGAAAACGAAAGTGTGCAA	620	«
<i>hapA2-2</i>	GCTGACCTCATGGGCACTAAC		
<i>hapA3-1</i>	TACTCACCGCTTAACGAC	724	«
<i>hapA3-2</i>	CTCAAGCACTTTGCCGACA		
<i>hapA4-1</i>	ACGTGATGGCCGCTCGATA	898	«
<i>hapA4-2</i>	AACTGGCTTCTCGCACC		
<i>vieA-1*</i>	CAGTTGAGCCAGTTGACCTA	573	«
<i>vieA-2</i>	GCCTACCTAAGCCCTACGAA		
<i>vieS-1*</i>	TTATTCGCTCTGATACTGATG	1984	«
<i>vieS-2</i>	TTACGCAGCTCCGAACAAG		

Примечание: \* – праймеры, использованные для ПЦР-анализа.

пичных штаммов проводился с интактной нуклеотидной последовательностью данного гена у штамма *V. cholerae* C6706 (NCBI GenBank: EU523710.1).

Сопоставление геномов штамма М-29 и О395 методом Blast N выявило наличие у штамма М-29 624 одиночных нуклеотидных полиморфизмов.

В первую очередь нас интересовали причины по-

вышенной продукции штаммами СТ и ТСР. Увеличение продукции указанных факторов вирулентности могло быть вызвано мутациями в структурных генах, ответственных за синтез СТ (*ctxAB*) и ТСР (*tcpA-F*), а также изменениями в промоторных областях оперонов *ctxAB* и *tcpA-F*. Для проверки этого предположения мы провели анализ нуклеотидной

последовательности профага СТХф штамма М-29, который показал 100% идентичность с профагом референс-штамма О395. Нам не удалось обнаружить никаких отличий ни в генах *ctxAB*, ни в других генах коровой области профага СТХф и RS2- последовательности. Фага RS1 выявлено не было, что характерно для классических вибрионов. Фрагментарное секвенирование структурных генов профага СТХф (*ctxAB*, *ace*, *zot*, *cep*, *orfU* и *psh*) у остальных 12 атипичных штаммов также не выявило никаких изменений.

Анализ промоторной области оперона *ctxAB* штамма М-29 показал наличие 4 гептаповторов (TTTTGAT), которые являются сайтами связывания для регуляторных белков ToxR и ToxT [16, 23]. Подобное количество гептаповторов в промоторной области *ctxAB* характерно для Эль-Тор вибрионов и нехарактерно для классических вибрионов, несущих обычно 6–8 гептаповторов. Увеличенное вдвое количество гептаповторов в геноме классических вибрионов, по мнению некоторых авторов [16, 23], может быть одной из причин повышенной продукции ими СТ. Фрагментарное секвенирование промоторной области *ctxAB* у 11 из 12 исследованных нами атипичных штаммов также выявило наличие лишь 4 гептаповторов. Только один штамм М-9, выделенный из речной воды в Астраханской области, содержал 7 гептаповторов, как и референс-штамм О395. Таким образом, увеличение продукции СТ у атипичных классических штаммов не было связано с изменениями в генах *ctxAB* или в промоторной области данного оперона.

Сравнительный анализ оперона *tcpA-F* показал наличие у штамма М-29 трех однонуклеотидных несинонимичных замен в генах *tcpC* (A/G в позиции 610 п.н. от начала гена и соответственно Lys/Glu), *tcpF* (A/G в позиции 707 п.н. от начала гена и соответственно Asn/Ser), *tcpS* (T/C в позиции 428 п.н. от начала гена и соответственно Phe/Ser). Продукт гена *tcpF*, белок TсpF, участвует в колонизации и стабилизации биопленки [24]. Белки TсpC и TсpS, кодируемые соответственно генами *tcpC* и *tcpS*, формируют поры, необходимые для транспорта белков TсpF и TсpA на внешнюю мембрану [24, 25]. Можно предположить, что наличие указанных мутаций способствовало более эффективному выходу белков TсpF и TсpA на поверхность клеточной мембраны холерного вибриона. Однако для подтверждения этого предположения необходимо проведение дополнительных исследований.

В промоторной области оперона *tcpA-F* ни у одного из атипичных штаммов изменений выявлено не было.

Следующим этапом нашей работы явилось изучение нуклеотидных последовательностей регуляторных генов, контролирующих продукцию СТ и TCP, а также промоторных областей некоторых регуляторных генов. Из 20 исследованных нами регуляторных генов (*vieAS*, *aphAB*, *tcpPH*, *toxR*, *toxT*, *toxS*,

*hapR*, *h-ns*, *rpoN*, *rpoS*, *ihfAB*, *relA*, *luxO*, *luxU*, *luxP* и *crp*) только 6 генов (*vieA*, *vieS*, *toxR*, *hapR*, *rpoS*, *crp*) отличались по своему нуклеотидному составу от референс-штамма О395. Три из шести указанных генов (*vieA*, *vieS*, *toxR*) оказывают позитивное влияние на гены *ctxAB* и *tcpA*, в то время как гены *hapR*, *rpoS* и *crp* являются негативными регуляторами указанных генов. Ни в одной из 4 промоторных областей ( $P_{toxT}$ ,  $P_{toxR}$ ,  $P_{aphAB}$  и  $P_{tcpPH}$ ) изменений обнаружено не было.

Первое, на что мы обратили внимание, было наличие протяженной делеции, захватывающей сразу 2 гена *vieA* (1560 п.н.) и *vieS* (557 п.н.), составляющих трехкомпонентную систему *vieSAB*. По данным А. Tischler и соавт., [18] данная система снижает концентрацию в клетке с-di-GMP, ингибирующего связывание белка ToxT с промоторами *ctxAB* и *tcpA-F* оперонов. Наличие указанной мутации в генах *vieA* и *vieS* было подтверждено с помощью ПЦР-анализа еще у 9 атипичных штаммов. Однако протяженная делеция в регуляторных генах *vieA* и *vieS*, позитивно регулирующих гены *ctxAB* и *tcpA*, с большей вероятностью привела бы к снижению продукции СТ и TCP, чем к их повышению. Однонуклеотидная несинонимичная замена (A/G в позиции 668 п.н. от начала гена, приводящая к замене His/Arg) обнаруженная нами в глобальном гене-регуляторе *toxR*, не затрагивала ДНК-связывающий домен белка ToxR и вследствие этого вероятно не оказала существенного влияния на экспрессию генов СТ и TCP. Таким образом, мутации в генах, ответственных за позитивную регуляцию генов вирулентности холерного вибриона, видимо не могли привести к повышению экспрессии СТ и TCP.

В связи с этим большой интерес вызвало у нас обнаружение 5 SNP в трех негативных регуляторах генов вирулентности: *hapR*, *rpoS* и *crp*. Два из этих генов – *hapR* и *rpoS* – входят в единую регуляторную систему и тормозят экспрессию гена *aphA*, а через него гены вирулентного каскада (*tcpPH* и *toxT*) и соответственно гены *ctxAB* и *tcpA* [8, 17–20]. Ген *crp* кодирует синтез белка-рецептора CRP, который в комплексе с циклическим аденозинмонофосфатом на поздней стадии инфекционного процесса блокирует связь белков AphA и AphB с *tcpPH*-промотором, в результате чего синтез факторов вирулентности подавляется [8].

Особого внимания, на наш взгляд, заслуживают 2 однонуклеотидные несинонимичные замены: C/T в позиции 337 от начала гена *rpoS*, ведущая к образованию стоп-кодона «Опал», или TGA (рис. 1, а и б) и G/A в позиции 53 гена *hapR*, приводящая к замене аргинина (Arg18) на гистидин (His18). Наличие последней мутации подтверждено фрагментарным секвенированием у 11 из 12 оставшихся штаммов (рис. 2, а и б).

Наличие в гене *rpoS* стоп-кодона в первой трети транслируемой мРНК приводит к образованию дефектного белка RpoS, который не способен к полно-



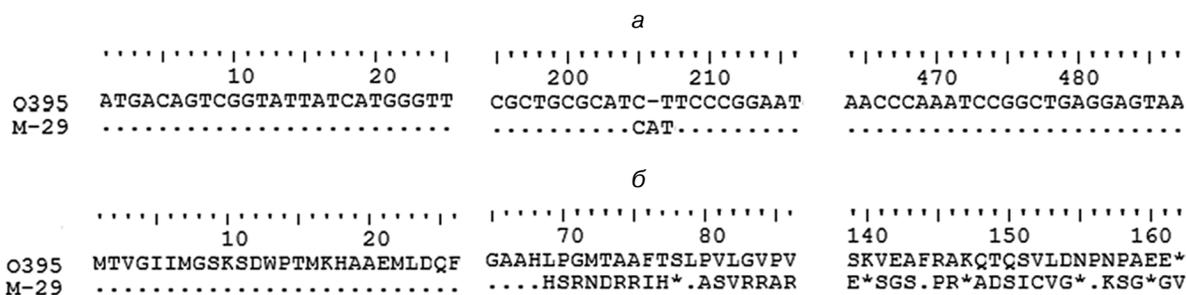


Рис. 3. Фрагменты нуклеотидных последовательностей гена *purE* (а) и аминокислотных последовательностей белка PurE (б) референс-штамма О395 и штамма *V. cholerae* классического биовара М-29, выделенного в 1942 г. в Астрахани.

Идентичные нуклеотиды и аминокислоты обозначены точками. Буквами выделен триплет, содержащий однонуклеотидную вставку в позиции 206 и аминокислоты, не соответствующие таковым, белка PurE референс-штамма *V. cholerae* О395. Звездочками обозначены позиции белка PurE, соответствующие стоп-кодонам.

звания белка HarR с промоторными областями генов *aphA* и *hapA* является и тот факт, что у всех атипичных штаммов практически полностью отсутствовала продукция НАР. Ответственность за синтез НАР несет ген *hapA*, позитивно регулируемый каскадом, в состав которого входят гены *rpoS* и *hapR* [19, 20, 22]. Анализ нуклеотидной последовательности самого гена *hapA* у всех исследованных штаммов не выявил отличий от референс-штамма О395. В то же время фрагментарное секвенирование гена *hapR* подтвердило наличие обеих замен ещё у 11 из 12 штаммов. Только у штамма М-9, выделенного из воды в Астрахани, обладающего продукцией НАР и отличающегося более низкой продукцией СТ и ТСР, чем другие штаммы, выделенные в 1942 г., отличий от штамма О395 выявлено не было. По данным различных американских авторов, повреждение хотя бы одного из регуляторных генов *rpoS* и/или *hapR* ведет к снижению, а то и полному отсутствию продукции у штамма НАР и повышению продукции СТ и ТСР [19, 20]. В связи с этим мы считаем, что наличие значимых мутаций сразу в двух регуляторных генах *rpoS* и *hapR*, оказывающих негативное влияние на регуляторный каскад на поздней стадии инфекционного процесса, может способствовать повышенной продукции СТ и ТСР.

На последнем этапе нашей работы мы изучили причины ауксотрофности штамма *V. cholerae* М-29 по аденину. Анализ полногеномной нуклеотидной последовательности показал, что в геноме штамма М-29 в гене *purE*, ответственном за синтез фосфорилирующей участвующей в метаболизме аденина [21], имелась вставка аденина в позиции 206 от начала гена, приводящая к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона (рис. 3, а и б), что вероятно и послужило причиной ауксотрофности по аденину штамма М-29.

### Заключение

В результате проведенных исследований было показано, что атипичность клинических и эпидеми-

ческих проявлений холеры в России в 1942–1943 гг. была связана с генетическими изменениями вызвавших её штаммов, обусловив наличие у них таких фенотипических особенностей, как ауксотрофность по аденину, гиперпродукция СТ и ТСР, отсутствие продукции НАР.

Ауксотрофность по аденину данной группы штаммов была связана с мутацией в гене *purE*, приводящей к отсутствию фермента фосфорилирующей участвующей в метаболизме аденина. Вследствие этого указанные штаммы, попадая в организм ослабленных голодом и тяжелой работой заключенных, долгое время вызывали типичной клинической картины холеры из-за медленного нарастания клеточной популяции, которая для своего роста требовала наличия аденина. Это же свойство штаммов препятствовало и распространению вибрионов водным путем. Тем не менее штаммы, попавшие в организм человека из-за отсутствия тормозного воздействия белков RpoS и HarR, синтезировали значительное количество ТСР и СТ. Однако активация СТ происходила достаточно медленно из-за практически полного отсутствия НАР, активирующей СТ, путем расщепления его молекулы на 2 субъединицы: А<sub>1</sub> и А<sub>2</sub> [13, 19]. Это способствовало развитию легких и стертых клинических форм. Причиной снижения продукции НАР также являлось отсутствие регуляторных белков RpoS и HarR, иницирующих экспрессию гена *hapA*. Недостаток НАР, разрушающей на поздней стадии эпидемического процесса рецепторы кишечного эпителия, способствуя выходу холерного вибриона во внешнюю среду [13, 19], обусловил длительное сохранение вибрионов внутри кишечника, что препятствовало широкому распространению инфекции. В то же время в кишечнике зараженных людей происходило накопление большого количества холерного и других токсинов, обуславливая высокую летальность среди заключенных.

В результате описанных событий штаммы холерного вибриона, вызвавшие вспышку азиатской холеры в 1942–1943 гг., несмотря на их высокую вирулентность

и гиперпродукцию СТ и ТСР, большую скученность и миграцию населения, вызванных войной, не смогли вызвать широкого эпидемического распространения. Это еще раз подчеркивает тот факт, что при развитии эпидемического процесса следует учитывать влияние большого количества факторов, таких как гено- и фенотипические особенности микроорганизма, организма хозяина-человека, социально-бытовых условий, своевременность проведения противоэпидемических мероприятий и т. д. Отсутствие одного из указанных факторов или их особое сочетание (например, ослабленный голодом организм хозяина и ауксотрофность микроорганизма на фоне мутаций в регуляторных генах) могут оказать значительное влияние на развитие эпидемического процесса.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ганин В.С. Индийская гостя. В кн.: Ганин В.С. *По тропам эпидемических катастроф*. Иркутск: НЦРВХ СО РАМН; 2011: 144–6.
2. Alam M., Islam M.T., Rashed S.M., Johura F.T., Bhuiyan N.A., Delgado G. et al. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2212–6.
3. Bakhshi B., Boustanshenas M., Mahmoudi-aznaveh A. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58 (2): 145–9.
4. Rai K.R., Rai S.K., Bhatt D.R., Kurokuwa M., Ono K., Magar D.T. Study of medically important *Vibrios* in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. Coll. J.* 2012; 14(3): 212–5.
5. Samadi A.R., Shahid N., Eusof A., Yunus M., Huq M.I., Khan M.U. et al. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces El Tor in Bangladesh. *Lancet.* 1983; 321: 805–7.
6. Siddique A.K., Baqui A.H., Eusof A., Haider K., Hossain M.A., Bashir I. et al. Survival of classic cholera in Bangladesh. *Lancet.* 1991; 337: 1125–7.
7. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C. et al. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; 224: 55–62.
8. Kovacicova G., Skorupski K. Overlapping binding sites for the virulence gene regulators *aphA*, *aphB* and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(2): 393–407.
9. Monakchova E.V. Phenotypic and Molecular Characteristics of epidemic and non-epidemic *Vibrio cholerae* Strains Isolated in Russia and Certain Countries of Commonwealth of Independent States (CIS). In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., eds. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera: Infectious Diseases Series*. New York: Humana Press; 2010: 185–201.
10. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. J. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *Clin. Microbiol.* 2002; 40: 3296–9.
11. Na-Ubol M., Srimanote P., Chongsa-Nguan M., Indrawattana N., Sookrung N., Tapchaisri P. et al. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133: 387–94.
12. Pun S.B. The first appearance of classical-like phenotype *Vibrio cholerae* in Nepal. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(4): 183–4.
13. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Кутырев В.В. Молекулярно-генетические особенности штаммов *Vibrio cholerae* *classica*, вызвавших эпидемию азиатской холеры в России в 1942 г. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2001; 4: 12–6.

14. 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): 1036–47.
15. Higgins D.E., DiRita V.J. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the ToxR regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 1994; 14(1): 17–29.
16. Mekalanos J.J., Swartz D.J., Pearson G.D., Harford N., Groyne F., de Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature*. 1983; 306: 551–7.
17. Silva R. S. De, Kovacicova G., Lin W., Taylor R. K., Skorupski K., Kull F.J. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J. Bacteriol.* 2007; 189(15): 5683–91.
18. Tischler A.D., Lee S.H., Camilli A. The *Vibrio cholerae* *vieSAB* locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J. Bacteriol.* 2002; 184(15): 4104–13.
19. Jobling M.G., Holmes R.K. Characterization of *hapR*, a positive regulator of *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi* *luxR* gene. *Mol. Microbiol.* 1997; 26(5): 1023–34.
20. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(4): 773–784.
21. Zalkin H., Dixon J.E. De novo purine nucleotide biosynthesis. *Progr. Nucleic Acid Res Mol. Biol.* 1992; 42: 259–87.
22. Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L., Mekalanos J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 3129–34.
23. Yu R.R., DiRita V.J. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by *toxT* involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* 2002; 43:119–34.
24. Kim T.J., Taylor R.K. *TcpF* is a soluble colonization factor and protective antigen secreted by El Tor and classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* serogroups. *Infect. and Immun.* 2005; 73(8): 4461–70.
25. Bose N., Taylor R.K.J. Identification of a TcpC-TcpQ outer membrane complex involved in the biogenesis of the toxin-coregulated pilus of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(7): 2225–32.

Получено 11.06.15

## REFERENCES

1. Ganin V.S. Indian guest. In: Ganin V.S. *By the Tracks Of Epidemic Catastrophes. [Indiyskaya gostiya. Po tropam epidemicheskikh katastrof]*. Irkutsk: SCRRS SB RAMS; 2011: 144–6.
2. Alam M., Islam M.T., Rashed S.M., Johura F.T., Bhuiyan N.A., Delgado G. et al. *Vibrio cholerae* classical biotype strains reveal distinct signatures in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50(7): 2212–6.
3. Bakhshi B., Boustanshenas M., Mahmoudi-aznaveh A. Emergence of *Vibrio cholerae* O1 classical biotype in 2012 in Iran. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014; 58 (2): 145–9.
4. Rai K.R., Rai S.K., Bhatt D.R., Kurokuwa M., Ono K., Magar D.T. Study of medically important *Vibrios* in the sewage of Katmandu Valley, Nepal. *Nepal Med. Coll. J.* 2012; 14(3): 212–5.
5. Samadi A.R., Shahid N., Eusof A., Yunus M., Huq M.I., Khan M.U. et al. Classical *Vibrio cholerae* biotype displaces El Tor in Bangladesh. *Lancet.* 1983; 321: 805–7.
6. Siddique A.K., Baqui A.H., Eusof A., Haider K., Hossain M.A., Bashir I. et al. Survival of classic cholera in Bangladesh. *Lancet.* 1991; 337: 1125–7.
7. Kokashvili T., Elbakidze T., Jaiani E., Janelidze N., Kamkamidze G., Whitehouse C. et al. Comparative phenotypic characterization of *Vibrio cholerae* isolates collected from aquatic environments of Georgia. *Georgian Med. News.* 2013; 224: 55–62.
8. Kovacicova G., Skorupski K. Overlapping binding sites for the

- virulence gene regulators AphA, AphB, and cAMP-CRP at the *Vibrio cholerae* *tcpPH* promoter. *Mol. Microbiol.* 2001; 41(2): 393–407.
9. Monakhova E.V. Phenotypic and Molecular Characteristics of Epidemic and Non-epidemic *Vibrio cholerae* Strains Isolated in Russia and Certain Countries of Commonwealth of Independent States (CIS). In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K. eds. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera: Infectious Diseases Series*. New York: Humana Press; USA, 2010: 185–201.
  10. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A.J. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *Clin. Microbiol.* 2002; 40: 3296–9.
  11. Na-Ubol M., Srimanote P., Chongsa-Nguan M., Indrawattana N., Sookrungrong N., Tapchaisri P. et al. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. *Indian J. Med. Res.* 2011; 133: 387–94.
  12. Pun S.B. The first appearance of classical-like phenotype *Vibrio cholerae* in Nepal. *N. Am. J. Med. Sci.* 2014; 6(4): 183–4.
  13. Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Zadnova S.P., Kutyrev V.V. Molecular genetic features of *Vibrio cholerae* classica strains which caused an epidemic of Asian cholera in Russia in 1942. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2001; (4): 12–6. (in Russian)
  14. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in natural strains of cholera agent. *Genetika.* 2013; 49(9): 1036–47. (in Russian)
  15. Higgins D.E., DiRita V.J. Transcriptional control of *toxT*, a regulatory gene in the *ToxR* regulon of *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 1994; 14(1): 17–29.
  16. Mekalanos J.J., Swartz D.J., Pearson G.D., Harford N., Groyne F., de Wilde M. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature.* 1983; 306: 551–7.
  17. Silva R. S. De, Kovacicova G., Lin W., Taylor R. K., Skorupski K., Kull F.J. Crystal structure of the *Vibrio cholerae* quorum-sensing regulatory protein HapR. *J. Bacteriol.* 2007; 189(15): 5683–91.
  18. Tischler A.D., Lee S.H., Camilli A. The *Vibrio cholerae* *vieSAB* locus encodes a pathway contributing to cholera toxin production. *J. Bacteriol.* 2002; 184(15): 4104–13.
  19. Jobling M.G., Holmes R.K. Characterization of *hapR*, a positive regulator of *Vibrio cholerae* HA/protease gene *hap*, and its identification as a functional homologue of the *Vibrio harveyi* *luxR* gene. *Mol. Microbiol.* 1997; 26(5): 1023–34.
  20. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(4): 773–84.
  21. Zalkin H., Dixon J.E. De novo purine nucleotide biosynthesis. *Progr. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 1992; 43: 259–87.
  22. Zhu J., Miller M.B., Vance R.E., Dziejman M., Bassler B.L., Mekalanos J.J. Quorum-sensing regulators control virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 3129–34.
  23. Yu R. R., DiRita V. J. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by *ToxT* involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* 2002; 43: 119–34.
  24. Kirn T.J., Taylor R.K. *TcpF* is a soluble colonization factor and protective antigen secreted by El Tor and classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* serogroups. *Infect. and Immun.* 2005; 73(8): 4461–70.
  25. Bose N., Taylor R.K.J. Identification of a *TcpC-TcpQ* outer membrane complex involved in the biogenesis of the toxin-coregulated pilus of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2005; 187(7): 2225–32.

Received 11.06.15

#### Сведения об авторах:

**Крицкий Андрей Александрович**, мл. науч. сотр. лаб. патогенных вибрионов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; **Краснов Ярослав Михайлович**, канд. хим. наук, зав. лаб. геномного и протеомного анализа ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»; **Смирнова Нина Ивановна**, доктор биол. наук, проф., зав. лаб. патогенных вибрионов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

---

#### Опечатка

В выпуске журнала № 4 за 2015 г. на стр. 8 была допущена опечатка.

#### Было напечатано:

Акиншина Ю.А.<sup>1</sup>, Ларичев В.Ф.<sup>2</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1</sup>, Бутенко А.М.<sup>2</sup>, Хуторецкая Н.В.<sup>2</sup>, Сайфуллин М.А.<sup>3</sup>

#### Следует читать:

Акиншина Ю.А.<sup>1</sup>, Ларичев В.Ф.<sup>2</sup>, Козлова А.А.<sup>2</sup>, Сайфуллин М.А.<sup>3</sup>, Марданлы С.Г.<sup>1</sup>, Бутенко А.М.<sup>2</sup>

**Редакция журнала приносит авторам свои извинения.**

---