© Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Савельева И.В., Таран Т.В., Подопригра Е.И., Васильева О.В., Шапаков Н.А., Алехина Ю.А., Куличенко А.Н., 2020

УДК 616.932:579.843.1 «451.18»(479)

Эволюция фенотипических свойств и молекулярно-генетической организации геномов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год

В.Н. Савельев, Д.А. Ковалев, И.В. Савельева, Т.В. Таран, Е.И. Подопригра, О.В. Васильева, Н.А. Шапаков, Ю.А. Алехина, А.Н. Куличенко

ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, ул. Советская, д. 13–15, г. Ставрополь, 355035, Российская Федерация

Резюме: Введение. Формирование высокопатогенных для человека штаммов холерных вибрионов, обладающих устойчивостью к антибиотикам, определяет патогенез, клинику, эпидемиологию и лабораторную диагностику холеры. Необходимо изучение структуры генома холерных вибрионов любых серологических групп, выделяемых при плановом мониторинге объектов окружающей среды или больных ОКИ с целью обнаружения генов токсигенности, присущих эпидемическим штаммам *V. cholerae* O1. Цель исследования. Изучение динамики изменений фенотипических свойств и молекулярно-генетических основ персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год. Материалы и методы. Изучили фенотипические (микробиологический метод) и молекулярно-генетические свойства (с помощью ПЦР) 32 штамма *V. cholerae* O1, выделенные от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе (1970–1998 гг.). Результаты. Показано, что на территориях Кавказа обнаруживались: а) нетоксигенные, типичные по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам штаммы *V. cholerae* O1, Эль Тор, *ctxAB*⁻, *Hly*⁺. Их токсигенный потенциал представлен экзо- и эндотоксинами, отличными от энтеротоксина токсигенного холерного вибриона; б) токсигенные типичные по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам штаммы *V. cholerae* O1, Эль Тор, *ctxAB*^{El+}, *rtxC*⁺, *Hly*⁻ в период эпидемических вспышек холеры заносного характера, продуцирующие энтеротоксин СТ-2, содержащие гены, ответственные за персистентный, патогенный и пандемический потенциал, и в) типичные по основным фенотипическим свойствам, но молекулярно-генетически измененные варианты холерного вибриона биовара Эль Тор – *V. cholerae* O1, Эль Тор *ctxAB*^{Cl+}, *rtxC*⁺, *Hly*⁻. Заключение. Основным проявлением эволюционных изменений типичного токсигенного вибриона биовара Эль Тор явилась замена в его геноме гена *ctxB*^{El} на ген *ctxB*^{Cl}, кодирующий энтеротоксин классического типа (СТ-1), что значительно усилило персистентный, токсический, эпидемический и пандемический потенциал генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор. В геноме данных штаммов присутствует интегративный и конъюгативный элемент SXT с генами полирезистентности к антибиотикам.

Ключевые слова: фенотипические и молекулярно-генетические свойства *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, токсический, эпидемический и пандемический потенциал.

Для цитирования: Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Савельева И.В., Таран Т.В., Подопригра Е.И., Васильева О.В., Шапаков Н.А., Алехина Ю.А., Куличенко А.Н. Эволюция фенотипических свойств и молекулярно-генетической организации геномов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год // Здоровье населения и среда обитания. 2020. № 12 (333). С. 56–61. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61>

The Evolution of Phenotypic Properties and Molecular Genetic Organization of Genomes of *Vibrio Cholerae* O1 El Tor Variant Strains Isolated from Patients and Environmental Objects in the Caucasus in 1970–1998

V.N. Savelyev, D.A. Kovalev, I.V. Savelyeva, T.V. Taran, E.I. Podoprigrora, O.V. Vasilyeva, N.A. Shapakov, Yu.A. Alekhina, A.N. Kulichenko

Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, 13-15 Sovetskaya Street, Stavropol, 355035, Russian Federation

Summary. Introduction: The formation of highly pathogenic strains of *Vibrio cholerae* resistant to antibiotics determines the pathogenesis, clinical picture, epidemiology, and laboratory diagnosis of cholera. It is necessary to study the structure of the genome of *V. cholerae* of any serological groups isolated during routine monitoring of environmental objects or patients with acute intestinal infections in order to detect toxigenic genes inherent to epidemic strains of *V. cholerae* O1. Our objective was to study changes in phenotypic properties and molecular genetic bases of persistence, epidemic and pathogenetic potential of El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 isolated from patients and environmental objects in the Caucasus in 1970–1998. Materials and methods: We studied phenotypic and molecular genetic characteristics of 32 *V. cholerae* O1 strains isolated from patients and environmental objects in the Caucasus (1970–1998) using a microbiological assay and PCR test, respectively. Results: We established that the following biotypes of *V. cholerae* O1 were found in the Caucasus: a) El Tor, *ctxA*⁻, and *Hly*⁺ nontoxigenic strains of *V. cholerae* O1, typical in their phenotypic and molecular genetic properties. Their toxigenic potential is represented by exo- and endotoxins different from the enterotoxin of toxigenic *V. cholerae*; b) toxigenic El Tor, *ctxAB*^{El+}, *rtxC*⁺, and *Hly*⁻ variant biotypes of *V. cholerae* O1, typical in their phenotypic, molecular and genetic properties during outbreaks of invasive cholera, producing a CT-2 enterotoxin and containing genes responsible for persistent, pathogenic and pandemic potential, and c) typical in terms of their main phenotypic characteristics but molecularly genetically altered variants (hybrids) of El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 including El Tor *ctxAB*^{Cl+}, *rtxC*⁺, *Hly*⁻. Conclusions: The main manifestation of evolutionary changes in a typical toxigenic vibrio of the El Tor variant biotype was the replacement of the *ctxB*^{El} gene in its genome with the *ctxB*^{Cl} gene encoding the classical type of enterotoxin (CT-1), which significantly increased the persistent, toxic, epidemic, and pandemic potential of genetically modified variants of El Tor biotype *Vibrio cholerae*. The genome of these strains contains an integrative and conjugative element SXT with genes for antibiotic multi-resistance.

Keywords: phenotypic, molecular and genetic characteristics of El Tor variant of *V. cholerae* O1, toxigenic, epidemic and pandemic potential.

For citation: Savelyev VN, Kovalev DA, Savelyeva IV, Taran TV, Podoprigrora EI, Vasilyeva OV, Shapakov NA, Alekhina YA, Kulichenko AN. The evolution of phenotypic properties and molecular genetic organization of genomes of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strains isolated from patients and environmental objects in the Caucasus in 1970–1998. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2020; (12(333)):56–61. (In Russian) DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61>

Author information: Savelyev V.N., <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>; Kovalev D.A., <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>; Savelyeva I.V., <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>; Taran T.V., <https://orcid.org/0000-0002-4549-9701>; Vasilyeva O.V., <https://orcid.org/0000-0002-8882-6477>; Shapakov N.A., <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>; Alekhina Yu.A., <https://orcid.org/0000-000-9152-4126>; Kulichenko A.N., <https://orcid.org/0000-000-9362-3949>.

Введение. Холера — древняя болезнь человека, насчитывающая более 200 лет своего существования и в настоящее время представляют постоянную угрозу для населения и общественного здравоохранения многих стран мира [1–4]. Продолжающаяся с 1961 г. седьмая пандемия характеризуется интенсивными проявлениями холеры в Африке, Азии, на Американском континенте (остров Гаити) с высокой вероятностью выноса инфекции в другие страны, в том числе и в Россию [5–8]. Седьмая пандемия холеры неоднократно заявляла о себе на Кавказе, традиционно остающемся высокоуязвимым в плане вероятного заноса инфекции из стран ближнего и дальнего зарубежья и последующего широкого распространения инфекции. Так, в семидесятые годы прошлого столетия холера регистрировалась в Азербайджане, Грузии, Дагестане; в восьмидесятые — в Грузии и Азербайджане; в девяностые — в Ставропольском крае, Дагестане, Армении.

Формирование высокопатогенных для человека штаммов холерных вибрионов, обладающих устойчивостью к антибиотикам, определяет патогенез, клинику, эпидемиологию и лабораторную диагностику холеры. У *Vibrio cholerae* O1 основные гены вирулентности кодируют факторы колонизации (ген *tcpA*), токсигенности (оперон *ctxAB*, кодирующий А и В субъединицы холерного энтеротоксина) и являются частью генома лизогенного филаментозного бактериофага СТХφ [9]. Распространение СТХφ может обусловить возникновение новых токсигенных штаммов *V. cholerae* из нетоксигенных предшественников [1]. Установлено, что геном *V. cholerae* O1 содержит уникальный класс интегров, элементов геномной экспрессии, приобретают открытые рамки считывания (ORF), что приводит к функциональным изменениям генома вибриона [10]. Это позволяет бактериям захватывать гены от других микроорганизмов. Поэтому необходимо изучение структуры генома холерных вибрионов любых серологических групп, выделяемых при плановом мониторинге объектов окружающей среды или больных ОКИ, с целью обнаружения генов токсигенности, присущих эпидемическим штаммам *V. cholerae* O1.

Цель исследования: изучение динамики изменений фенотипических свойств и молекулярно-генетических основ персистенции, эпидемического и патогенетического потенциала *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенные от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год.

Материалы и методы. В работе использованы 8 штаммов *V. cholerae* O1, El Tor, выделенные при рутинном методе забора воды в Азербайджане (реки Кура, Аракс) и 3 штамма данных микроорганизмов изолированные в Республике Дагестан (река Терек и канал им. Октябрьской Революции, далее — КОР); 5 штаммов, выделенные от людей в период эпидемических вспышек холеры в Азербайджане

в 1977 и 1985 годах; 16 штаммов *V. cholerae* O1, El Tor, выделенные от людей в Дагестане в период вспышек холеры в 1993, 1994, 1998 гг. Штаммы получены из «Коллекции патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, где хранились в 0,4 % агаре Хоттингера под вазелиновым маслом при температуре 20–25 °С. Для изучения фенотипических и биологических свойств данных штаммов холерных вибрионов применена стандартная методика¹.

Выделение бактериальной ДНК осуществляли в соответствии с инструкцией к набору ДНК-сорб В, «AmpliSens» (Россия). Полученную тотальную ДНК использовали для амплификации фрагментов генома изучаемых штаммов холерных вибрионов.

Молекулярно-генетические исследования заключались в поиске в геномах штаммов *V. cholerae* O1 генов токсигенности, свойственных типичному токсигенному или генетически измененному холерному вибриону биовара Эль Тор, с помощью ПЦР-тест системы «АмплиСенс *V. cholerae*-FL» (Россия) и экспериментальной ПЦР-тест-системы «Гены *Vibrio cholerae* O1 вариант *ctxB*, *rtxC*, FL» (Патент на изобретение № 2732448, РФ)².

Результаты и обсуждение. Фенотипические и биологические свойства *Vibrio cholerae* O1, выделенных из объектов окружающей среды и от человека, представлены в табл. 1, из данных которой следует, что, независимо от места и времени изоляции штаммов изучаемых микроорганизмов, последние являются граммотрицательными, аспорогенными, полиморфными, прямыми или слегка изогнутыми палочками, активно подвижными с одним полярно расположенным жгутиком. Штаммы индофенолоксидазоположительные, ферментирующие глюкозу в аэробных и анаэробных условиях до кислоты (без газа), расщепляющие маннозу, сахарозу, манит, не активные к лактозе, арабинозе, дульциту, инозиту, декарбоксилирующие лизин и орнитин, не обладающие аргининдегидролазой, агглютинирующиеся холерной сывороткой O1 серогруппы и O типовыми Ogawa или Inaba, и таким образом таксономически относятся к роду *Vibrio* семейства *Vibrionaceae*, виду *Vibrio cholerae* O1 серологической группы, сероварам Ogawa или Inaba.

Следует отметить, что штаммы *Vibrio cholerae* O1, выделенные в Азербайджане и Дагестане из воды поверхностных водоемов в период эпидблагополучия, были гемолиз положительными, а выделенные из окружающей среды из тех же объектов в период неблагополучия по холере оказались гемолиз отрицательными. Все исследуемые штаммы *Vibrio cholerae* O1, изолированные от людей с 1970 по 1998 г. в период вспышек холеры, были также гемолиз отрицательными в пробе Грейга. Вместе с тем оказалось (табл. 1), что если типичные токсигенные и нетоксигенные штаммы холерных вибрионов O1 серологической группы (выделенные

¹ МУК 4.2.2218–07 «Лабораторная диагностика холеры». М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2007. 87 с.

² Савельев В.Н., Савельева И.В., Сосунов В.В., Ковалев Д.А., Подопригора Е.И., Васильева О.В., Гусева Л.В. Способ идентификации штаммов *Vibrio cholerae* O1, определения их токсигенности и биовара с дифференциацией на типичные и генетически измененные варианты методом мультиплексной полимеразной цепной реакции и тест-система для его осуществления с учетом результатов в режиме «реального времени». Патент РФ № 2732448, опублик. 24.08.20. Бюл. № 24.

Таблица 1. Биохимическая характеристика штаммов *V. cholerae* выделенных из воды поверхностных водоемов и от людей

Table 1. Biochemical characteristics of *V. cholerae* strains isolated from surface bodies of water and humans

Штаммы <i>V. cholerae</i> O1 №№ / Numbers of <i>V. cholerae</i> O1 strains	сахароза / sucrose	манноза / mannose	арабиноза / arabinose	Хью Лейф-Сона / Hugh Leifson medium		глюкоза / glucose	маннит / mannitol	лактоза / lactose	инозит / inositol	мальтоза / maltose	лизин / lysine	орнитин / ornithine	аргинин / arginine	оксидаза / oxidase	гемоллиз / hemolysis	РВ / polymyxin B, 50 Units	ЭМС / GPE	VP / Voges-Proskauer	фаги / phages	
				O	F														E	C
Азербайджан: <i>V. cholerae</i> O1, Эль Тор, Огава (<i>ctxA</i> -), вода рек Аракса и Куры, эпидблагополучие / Azerbaijan: <i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Ogawa (<i>ctxA</i> -), waters of Rivers Araks and Kura, epidemiological well-being																				
288Az, 1970																				
2407Az, 1984																				
1800Az, 1986	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
2409Az, 1987																				
2384Az, 1987																				
<i>V. cholerae</i> O1, Эль Тор, Огава (<i>ctxA</i> +), вода рек Аракса и Куры в период вспышек холеры / <i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Ogawa (<i>ctxA</i> +), waters of Rivers Araks and Kura, cholera outbreaks																				
S352Az, 1985																				
S385Az, 1985																				
S396Az, 1985	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	-	R	+	+	+	-
S397Az, 1985																				
<i>V. cholerae</i> O1, Эль Тор, Огава (<i>ctxA</i> +), больные в период вспышек холеры / <i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Ogawa (<i>ctxA</i> +), patients, cholera outbreaks																				
123Az, 1977																				
276Az, 1977																				
285Az, 1977	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	-	R	+	+	+	-
363Az, 1985																				
357Az, 1985																				
Дагестан: <i>V. cholerae</i> O1, Эль Тор, Огава (<i>ctxA</i> -), вода реки Терек и КОР, эпидблагополучие / Dagestan: <i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Ogawa (<i>ctxA</i> -), waters of River Terek and October Revolution Canal, epidemiological well-being																				
159D, 1967																				
1860, 1983	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
S546, 1996																				
<i>V. cholerae</i> O1, Эль Тор, Огава (<i>ctxB</i> ^{cl+} , <i>rxC</i> ⁺), больные в период вспышек холеры / <i>V. cholerae</i> O1, El Tor, Ogawa (<i>ctxB</i> ^{cl+} , <i>rxC</i> ⁺), patients, cholera outbreaks																				
169D, 1993	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
1045D, 1993	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
1308D, 1993	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
1726D, 1993	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
7D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
17D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
26D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
S557D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
1971D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
16241D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
10213D, 1994	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
10D, 1998	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
22D, 1998	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
34D, 1998	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-
41D, 1998	a	a	-	+/	+	a	a	-	-	a	+	+	-	+	+	R	+	+	+	-

Примечание к таблице 1: РВ полимиксин В, 50 ЕД; ЭМС эритроциты морской свинки, 2,5%; VP – реакция Фогеса-Проскауэра; E – диагностический бактериофаг Эль Тор в ДРТ; C – диагностический бактериофаг классический в ДРТ; a – кислота; R – устойчивость к полимиксину; S – чувствительность к полимиксину.

Notes: PB, polymyxin B, 50 Units; GPE, guinea pig erythrocytes, 2.5%; VP, Voges-Proskauer test; E, El Tor typing bacteriophage in vibriocidal titer assay; C, classical typing bacteriophage in vibriocidal titer assay; a, acid; R, resistant to polymyxin; S, sensitive to polymyxin.

в 1970–1990 гг.) фенотипически были биоваром Эль Тор (устойчивы к 50 ЕД полимиксина В, агглютинировали эритроциты морской свинки, образовывали ацетилметилкарбинол в реакции Фогес-Проскауэра, лизировались диагностическим бактериофагом Эль Тор II), то часть штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенные в Дагестане в 1993, 1994 и 1998 гг., имели смешанные фенотипические свойства биовара

Эль Тор и классического. Подобные штаммы с неопределенным биоваром обнаруживались в Индии [11] и Тайланде [12]. Полученные данные (табл. 1) свидетельствуют, что в 90-е годы прошлого столетия появились штаммы холерного вибриона O1 серологической группы с типичными фенотипическими признаками биовара Эль Тор, продуцирующие классический тип энтеротоксина (СТ1) и с фенотипическими

признаками биоваров Эль Тор и классического, но также с продукцией энтеротоксина классического типа (СТ1) [2, 19–23].

Традиционные фенотипические тесты, определяющие биовар *V. cholerae* O1, оказались недостаточными для классификации на биовары данного таксона. Очевидно, в существующую схему биотипирования необходимо включить генетические маркеры, то есть маркерные гены классического и Эль Тор биоваров [23].

Молекулярно-генетическую организацию геномов штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor изучали методом ПЦР-анализа на наличие или отсутствие генов, кодирующих токсины: *ctxA*, *ctxB*, *rstR*, *zot*, *ace*, *ompU*, *tcpA*, *rstC*, *rtxC*, *nanH*, *mshA*, *mshQ*, а также с помощью скрининга в геноме данных микроорганизмов наличия

островов персистенции (EPI), патогенности (VP1-1,2), пандемичности (VSP-1,2), интегративного и конъюгативного элемента SXT с генами полирезистентности к антибиотикам.

Полученные результаты представлены в табл. 2, из данных которой следует, что типичный нетоксигенный холерный вибрион Эль Тор (ТНЭ, 8 штаммов) не содержит в своем геноме гены ни коровой, ни области RSII филаментозного фага СТХφ, ни генов фага RSI, а также островов персистенции (EPI), патогенности (VP1-1,2) и пандемичности (VSP-1,2). Биовар атоксигенного холерного вибриона O1 серогруппы определяется общепринятыми фенотипическими тестами.

Девять исследованных типичных токсигенных штаммов биовара Эль Тор (исходно

Таблица 2. Молекулярно-генетические свойства *V. cholerae* O1, выделенных от людей и из объектов окружающей среды на Кавказе в 1970–1998 гг.

Table 2. Molecular genetic characteristics of *V. cholerae* O1 isolated from humans and environmental objects in the Caucasus, 1970–1998

№ п/п	Штаммы <i>V. cholerae</i> O1 El Tor / Strains of El Tor variant of <i>V. cholerae</i> O1	Год, место выделения / Year and place of isolation	Источник / Source	Наличие в геноме генов / Genes in the genome				
				ctxB3	ctxB1	rstC	rtxC	Эль Тор / El Tor
1	288Az	1970, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water*	–	–	+	+	ТНЭ / TN
2	2407Az	1984, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water*	–	–	+	+	ТНЭ / TN
3	1800Az	1986, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water*	–	–	+	+	ТНЭ / TN
4	2384Az	1987, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water*	–	–	+	+	ТНЭ / TN
5	2409Az	1987, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water*	–	–	+	+	ТНЭ / TN
6	S352Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water**	+	–	+	+	ТТЭ / TT
7	S385Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water**	+	–	+	+	ТТЭ / TT
8	S396Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water**	+	–	+	+	ТТЭ / TT
9	S397Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	вода / water**	+	–	+	+	ТТЭ / TT
10	123Az	1977, Азербайджан / Azerbaijan	больной / patient	+	–	+	+	ТТЭ / TT
11	S276Az	1977, Азербайджан / Azerbaijan	больной / patient	+	–	+	+	ТТЭ / TT
12	S285Az	1977, Азербайджан / Azerbaijan	больной / patient	+	–	+	+	ТТЭ / TT
13	S353Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	больной / patient	+	–	+	+	ТТЭ / TT
14	S357Az	1985, Азербайджан / Azerbaijan	больной / patient	+	–	+	+	ТТЭ / TT
15	159D	1967, Дагестан / Dagestan	вода*, КОР / water,* ORC	–	–	+	+	ТНЭ / TN
16	1860D	1983, Дагестан / Dagestan	вода*, КОР / water,* ORC	–	–	+	+	ТНЭ / TN
17	S546D	1996, Дагестан / Dagestan	вода*р. Терек / water,* River Terek	–	–	+	+	ТНЭ / TN
18	169D	1993, Махачкала / Makhachkala	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
19	1045D	1993, Махачкала / Makhachkala	больной / patient	–	+	–	+	ГИЭ / Hybrid
20	1308D	1993, Махачкала / Makhachkala	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
21	1726D	1993, Махачкала / Makhachkala	больной / patient	–	+	–	+	ГИЭ / Hybrid
22	7D	1994, с. Герга / Gerga rural settlement	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
23	17D	1994, с. Герга / Gerga rural settlement	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
24	26D	1994, с. Герга / Gerga rural settlement	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
25	S557D	1994, Пляртинский р-н / Tlyaratinsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
26	1971D	1994, Дербентский р-н / Derbentsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
27	16241	1994, Дагестан, Гергелбский р-н / Dagestan, Gergebelsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
28	10213	1994, Дагестан, Бабаюртовский р-н / Dagestan, Babayurtovsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
29	10D	1998, Дербентский р-н / Derbentsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
30	22D	1998, Дербентский р-н / Derbentsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
31	34D	1998, Дербентский р-н / Derbentsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid
32	41D	1998, Дагестан, Хивский р-н / Dagestan, Khivsky district	больной / patient	–	+	+	+	ГИЭ / Hybrid

Примечание к таблице 1: РВ полимиксин В, 50 ЕД; ЭМС эритроциты морской свинки, 2,5%; VP – реакция Фогеса-Проскауэра; E – диагностический бактериофаг Эль Тор в ДРТ; C – диагностический бактериофаг классический в ДРТ; а – кислота; R – устойчивость к полимиксину; S – чувствительность к полимиксину.

Note: PB, polymyxin B, 50 Units; GPE, guinea pig erythrocytes, 2.5%; VP, Voges-Proskauer test; E, El Tor typing bacteriophage in vibriocidal titer assay; C, classical typing bacteriophage in vibriocidal titer assay; a, acid; R, resistant to polymyxin; S, sensitive to polymyxin.

регистрируемых как доминантный возбудитель холеры Эль Тор с 1961 по 1991 г.), как и референтный штамм № 16961 (Gen Bank), содержащий в своем геноме только эльторовские гены, в числе которых ген *ctxB^{El}*, кодирующий биосинтез холерного энтеротоксина типа СТ-2, а также гены *rstR^{El}* в области RSII и в профаге RS1₀; *rstC* в профаге RS1₀; *rtxC* кластера RTX. Гены *mshQ* и *ompW*; *tcpA^{El}*, *VC1758* и *VC1760*; *VC0175* и *VC0185*, *VC0490* и *VC0493* свидетельствуют о присутствии, соответственно, островов персистенции (EPI), патогенности (VP11,2) и пандемичности (VSP1,2).

Исследуемые гибридные варианты биовара Эль Тор (15 штаммов) в своем геноме содержат, помимо генов биовара Эль Тор, гены классического биовара (*ctxB^{Cl}* и/или *rstR^{Cl}*), а также, как и типичные токсигенные холерные вибрионы ЭльТор, острова персистенции (EPI), патогенности (VP11,2) и пандемичности (VSP1,2), но только у гибридных вариантов биовара Эль Тор обнаруживается интегративный и конъюгативный элемент SXT с генами полирезистентности к антибиотикам. Основным проявлением эволюционных изменений типичного токсигенного вибриона биовара Эль Тор явилась замена гена *ctxB^{El}* на ген *ctxB^{Cl}*, что значительно усилило токсический, эпидемический и пандемический потенциал генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор [24,25].

Следует отметить, что молекулярно-генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, обнаруженных на Кавказе (Дагестан, 1993, 1994, 1998 гг.) и на Украине (1994, 2011 гг.), выявил изменения в структуре профагов CTX₀ и RS1₀ как результат произошедших в девяностые годы XX столетия эволюционных преобразований генома типичного токсигенного холерного вибриона биовара Эль Тор, и представлена различными комбинациями генов патогенности типичного Эль Тор и классического биоваров: *ctxB^{Cl}*, *rstR^{Cl}*, *rstR^{El}*, *rstC*; *ctxB^{Cl}*, *rstR^{EL}*, *rstC*; *ctxB^{Cl}*, *rstR^{Cl}*, *rstC*; *ctxB^{Cl}*, *rstR^{Cl}*, *rstC*. Геном гибридных вариантов биовара Эль Тор обязательно содержит ген *ctxB^{Cl}*, кодирующий биосинтез энтеротоксина классического типа (СТ1), что подтверждается результатами секвенирования амплификата данного гена, полученного в ПЦР: в нуклеотидной последовательности этого гена в положениях 115 и 203 находится цитозин (СТ1), а аминокислотная последовательность «В» субъединицы энтеротоксина в положениях 39 и 68 содержит, соответственно, гистидин (Н) и треонин (Т);

Генотипические профили «гибридных» штаммов холерного вибриона биовара Эль Тор включают гены, находящиеся на функционально значимых мобильных генетических элементах, определяющих патогенный (*ctxAB*, *rstR*, *ace*, *zot*, *ompU*, *tcp^{Cl}*, *tcp^{El}*), пандемичный (*deo 0490*) и персистентный (*mshA*, *mshQ*) потенциал возбудителя холеры, а также гены консервативной части ДНК (*toxR*, *rtxA*, *rtxC*, *hap*).

Заключение

На территориях Кавказа (1970–1998 гг.) в процессе мониторинга больших ОКИ и объектов окружающей среды в целях профилактики холеры обнаруживались: нетоксигенные, типичные по фенотипическим и молекулярно-

генетическим свойствам, штаммы *V. cholerae* O1, Эль Тор *ctxAB*–, Hly+ (в основном из объектов окружающей среды); их токсигенный потенциал представлен экзо- и эндотоксинами, отличными от энтеротоксина токсигенного холерного вибриона; токсигенные типичные по фенотипическим и молекулярно-генетическим свойствам штаммы *V. cholerae* O1, Эль Тор *ctxAB^{EL+}*, *rtxC+* Hly– (от людей и из объектов окружающей среды в период эпидемических вспышек холеры завозного характера), продуцирующие энтеротоксин типа СТ2, содержащие гены, ответственные за персистентный, патогенный и пандемичный потенциал и типичные по основным фенотипическим свойствам, но молекулярно-генетически измененные варианты холерного вибриона биовара Эль Тор – *V. cholerae* O1, Эль Тор *ctxAB^{Cl+}*, *rtxC+*, Hly– (в основном от людей и из объектов окружающей среды непосредственно в очагах холеры завозного характера в период с 1993 по 1998 г. на Кавказе). Основным проявлением эволюционных изменений типичного токсигенного вибриона биовара Эль Тор явилась замена в его геноме гена *ctxB^{El}* на ген *ctxB^{Cl}*, кодирующий энтеротоксин классического типа (СТ1), что значительно усилило персистентный, токсический, эпидемический и пандемический потенциал генетически измененных вариантов холерных вибрионов биовара Эль Тор.

Таким образом, вектор эволюции штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на Кавказе с 1970 по 1998 г., направлен на появление штаммов с высоким эпидемическим потенциалом, обеспечивающим пандемическое распространение холеры Эль Тор в настоящее время.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования – Савельев В.Н., Савельева И.В., Куличенко А.Н.; сбор и обработка материала – Ковалев А.Д., Таран Т.В.; написание текста – Савельева И.В., Подопригора Е.И., Шапаков Н.А.; редактирование – Савельев В.Н.; обзор публикаций по теме статьи – Алехина Ю.А., Васильева О.В.

Финансирование: работа выполнена в рамках НИОКР по заказу Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, регистрационный номер АААА-А19-119032590021-1: «Эволюционный анализ геномов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор и филогеография заносов возбудителя холеры на территорию Северного Кавказа с 1970 по 1998 гг.»

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы (пп. 1–4, 9–12, 15–20, 25 см. References)

- Мазрухо А.Б., Москвитина Э.А., Адаменко О.Л. и др. Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации // Холера и патогенные для человека вибрионы. Матер. совещ. спец-в Роспотребнадзора – Ростов-на-Дону, 2013. Вып. № 26. С. 11–16.
- Москвитина Э.А., Титова С.В., Адаменко О.Л. и др. Перспективы дальнейшего совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации // Холера и патогенные для человека вибрионы. Матер. совещ. спец-в Роспотребнадзора – Ростов-на-Дону, 2014. Вып. № 27. С. 14–18.
- Назаретян А.А., Москвитина Э.А. Холера: Эндемичные территории стран мира. 2007–2011 гг. // Холера и патогенные для человека вибрионы. Матер. совещ. спец-в Роспотребнадзора – Ростов-на-Дону, 2013. Вып. № 26. С. 16–21.

8. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А. и др. Холера в начале века. Прогноз // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2005. № 3. С. 43–48.
13. Савельева И.В., Тюменцева И.С., Афанасьев Е.Н. и др. Оптимизация мониторинга *Vibrio cholerae* O1 в объектах окружающей среды на основе использования магнимоносорбентов. Холера и патогенные для человека вибрионы сб. ст. проблемной комиссии. Ростов-на-Дону, 2016. № 29. С. 196–198.
14. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период // Молекулярная генетика. 2010. № 4. С. 11–19.
21. Савельев В.Н., Куличенко А.Н., Савельева И.В. и др. Совершенствование биотипирования *Vibrio cholerae* O1 в связи с глобальным распространением генетически измененных (гибридных) вариантов биовара Эль-Тор. Холера и патогенные для человека вибрионы: сб. ст. проблемной комиссии. Ростов-н/Д. 2016. № 29. С. 150–153.
22. Смирнова, Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.П. и др. Вариативность генома измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор, изолированных на территории России в современный период // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. № 3. С. 11–17.
24. Смирнова Н.И., Костромитина Е.А., Осин А.В. и др. Вариативность генома штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль-Тор // Вестник РАМН. 2005. № 7. С. 19–26.
12. Na-Ubol M, Srimanote P, Chongsa-Nguan M, et al. Hybrid & El Tor variant biotypes of *Vibrio cholerae* O1 in Thailand. *Indian J Med Res.* 2011; 133(4):387–394.
13. Savelyeva IV, Tyumentseva IS, Afanasyev EN, et al. [Optimization of *Vibrio cholerae* O1 monitoring in environmental objects based on the use of magnomo-nosorbents.] *Cholera and Human Pathogenic Vibrios: Minutes of Rospotrebnadzor Expert Meetings.* Rostov-on-Don, 2016; (29):196–198. (In Russian).
14. Smirnova NI, Goryaev AA, Kutuyev VV. The evolution of the *Vibrio cholerae* genome during the modern period. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya.* 2010; (4):11–19. (In Russian).
15. Waldor MK, Mekalanos JJ. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 1996; 272(5270):1910–1914. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
16. Ansuazzaman M, Bhuiyan NA, Nair GB, et al. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae*. *Emerg Infect Dis.* 2004; 10(11):2057–2059. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1011.040682>
17. Nair GB, Faruque SM, Bhuiyan NA, 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): 3296–3299. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
18. Nair GB, Qadri F, Holmgren J, et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(11):4211–4213. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.01304-06>
19. Safa A, Bhuiyan NA, Nusrin S, et al. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J Med Microbiol.* 2006; 55(Pt 11):1563–1569. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46689-0>
20. Safa A, Sultana J, Cam PD, et al. *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains, Asia and Africa. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(6):987–988. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1406.080129>
21. Savelyev VN, Kulichenko AN, Savelyeva IV, et al. [Improvement of biotyping of *Vibrio cholerae* O1 due to the global spread of genetically modified (hybrid) variants of El Tor biotype.] *Cholera and Human Pathogenic Vibrios: Minutes of Rospotrebnadzor Expert Meetings.* Rostov-on-Don, 2016; (29):150–153. (In Russian).
22. Smirnova NI, Zadnova SP, Shashkova AV, et al. Genome variability in the altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor isolated in Russia. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya.* 2011; (3):11–18. (In Russian).
23. Ghosh-Banerjee J, Senoh M, Takahashi T, et al. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor end classical biotypes. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(11):4283–4286. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.00799-10>
24. Smirnova NI, Kostromitina EA, Osin AV, et al. [Variability of the genome of the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1.] *Vestnik RAMN.* 2005; (7):19–26. (In Russian).
25. Grim CJ, Hasan NA, Taviani E, et al. Genome sequence of hybrid *Vibrio cholerae* O1 MJ-1236, B-33, and CIRS 101 and comparative genomics with *V. cholerae*. *J Bacteriol.* 2010; 192(13):3524–3533. DOI: <https://doi.org/10.1128/JB.00040-10>

References

1. Mazel D, Dychinco B, Webb VA, et al. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. *Science.* 1998; 280:605–608.
2. Safa A, Nair GB, Kong RY. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1):46–54. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
3. Halder K, Das B, Nair GB, et al. Molecular evidence favouring step-wise evolution of Mozambique *Vibrio cholerae* O1 El Tor hybrid strain. *Microbiology (Reading).* 2010; 156(Pt 1):99–107. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.032458-0>
4. Weekly epidemiological record. 293 Cholera, 2009. WHO, Geneva. 2010; 85(31):293–308. Available at: <https://www.who.int/wer/2010/wer8531.pdf> Accessed: 2 Dec 2020.
5. Mazrukho AB, Moskvitina EA, Adamenko OL, et al. [Topical issues of cholera epidemiological surveillance in the Russian Federation.] *Cholera and Human Pathogenic Vibrios: Minutes of Rospotrebnadzor Expert Meetings.* Rostov-on-Don, 2013; (26):11–16.
6. Moskvitina EA, Titova SV, Adamenko OL, et al. [Prospects for further improvement of epidemiological surveillance of cholera in the Russian Federation.] *Cholera and Human Pathogenic Vibrios: Minutes of Rospotrebnadzor Expert Meetings.* Rostov-on-Don, 2014; (27):14–18. (In Russian).
7. Nazaretyan AA, Moskvitina EA. [Cholera: Endemic areas of the countries of the world, 2007–2011.] *Cholera and Human Pathogenic Vibrios: Minutes of Rospotrebnadzor Expert Meetings.* Rostov-on-Don, 2013; (26):16–21. (In Russian).
8. Onishchenko GG, Lomov YuM, Moskvitina EA, et al. Cholera at the beginning of the XXI century. Prognosis. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunologii.* 2005; (3):44–48. (In Russian).
9. Harris JB, LaRocque RC, Qadri F, et al. Cholera. *Lancet.* 2012; 379(9835):2466–2476. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60436-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60436-X)
10. Fasano A, Baudry B, Pumphlin DW, et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which effects intestinal tight junctions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88(12):5242–5246.
11. Raychoudhuri A, Patra T, Ghosh K, et al. Classical ctxB in *Vibrio cholerae* O1, Kolkata, India. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(1):131–132. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1501.080543>

Контактная информация:

Савельев Вилорий Николаевич, заведующий лабораторией диагностики холеры и других кишечных инфекций ФКУЗ Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора
e-mail: Savelev39@inbox.ru

Corresponding author:

Viloriy N. Savelyev, D.M.Sc., Head of the Laboratory for Diagnosis of Cholera and Other Intestinal Infections, Stavropol Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor
e-mail: Savelev39@inbox.ru