

В.Н.Савельев, И.В.Савельева, О.В.Васильева, Б.В.Бабенышев, Д.А.Ковалев, Г.М.Грижебовский, А.Д.Антоненко, Ш.Х.Курбанов, Т.М.Бутаев, А.Н.Куличенко

ЭВОЛЮЦИЯ *VIBRIO CHOLERAE* ELTOR И ОБНАРУЖЕНИЕ ИХ ГЕНОТИПИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ НА КAVKAZE

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Проведен молекулярно-генетический анализ 73 штаммов холерного вибриона эльтор, изолированных от больных в разные годы (1970–1998 гг.) на территории Кавказа. 32 штамма, выделенные в 1970–1990 гг., определены как генотип I (содержит только гены *rstR^{El}* и *ctxB^{El}* – типичные холерные вибрионы эльтор, продуцирующие СТ 2-го типа); 31 штамм, изолированный в 1993–1998 гг., отнесен к генотипу II (с генами *rstR^{El}*, *rstR^{Clas}* и *ctxB^{Clas}*), 3 – к генотипу III (с генами *rstR^{Clas}*, *ctxB^{Clas}*, *rstC*), 7 – к генотипу I. Генотипы II и III (генетически измененные) – гибридные варианты биовара эльтор, продуцирующие СТ 1-го типа.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* eltor, эволюция, генотипы холерного вибриона эльтор.

V.N.Savel'ev, I.V.Savel'eva, O.V.Vasil'eva, B.V.Babenyshev, D.A.Kovalev, G.M.Grizhebovsky, A.D.Antonenko, Sh.Kh.Kurbanov, T.M.Butaev, A.N.Kulichenko

Evolution of *Vibrio cholerae* El Tor and Detection of Their Gene-Variants in the Caucasus

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Carried out is the molecular-genetic analysis of 73 *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated from patients at different time points in 1970–1988 in the territory of the Caucasus region. 32 strains isolated in 1970–1990 have been identified as genotype I (contains only *rstR^{El}* and *ctxB^{El}* genes – typical cholera vibrios El Tor producing CT of the II type); 31 strains isolated in 1993–1998 have been classified as genotype II (with *rstR^{El}*, *rstR^{Clas}* and *ctxB^{Clas}* genes), 3 strains, isolated within the same period, have fallen into the third genotype (with *rstR^{Clas}*, *ctxB^{Clas}*, *rstC* genes), and 7 strains – to the genotype I. Genotypes I and II (genetically altered ones) are the hybrid variants of the El Tor biovar producing CT of the first type.

Key words: *Vibrio cholerae* El Tor, evolution, genotypes of the cholera vibrio El Tor.

К настоящему времени в процессе эволюции сформировались 3 эпидемически опасных, отличающихся по фенотипическим и генотипическим свойствам, варианта возбудителя холеры: *Vibrio cholerae* O1 классического биовара, *Vibrio cholerae* O1 биовара эльтор и *Vibrio cholerae* O139 серогруппы [4]. Основным же возбудителем 7-й пандемии на протяжении более полувека продолжает оставаться *V. cholerae* O1 биовара эльтор [2].

Vibrio cholerae O1 классического биовара был возбудителем первых шести пандемий азиатской холеры (1817–1926 гг.), при которой в ряде стран «смертность превышала возможность хоронить мертвых» [1, 10]. Однако в 1961 г. более чем у 90 % всех заболевших холерой в мире обнаруживались *V. cholerae* O1 биовара эльтор, гемолизположительные в пробе Грейга, которые в августе 1962 г. были признаны ВОЗ возбудителями холеры эльтор [9]. Но эпидемический потенциал данных штаммов холерного вибриона эльтор оказался недостаточно высоким для дальнейшего эпидемического распространения. Эту функцию взял на себя новый вариант холерного вибриона эльтор – *V. cholerae* O1 eltor anhaemolyticus, обусловивший крупную вспышку холеры в Западном Ириане (Новая Гвинея) в октябре 1962 г. [7]. В середине шестидесятых годов прошлого столетия негемолитический, токсигенный (ctx+) холерный вибрион эльтор вытеснил классический биовар данных микроорганизмов на его эндемичной территории.

В 2002–2007 гг. появились сообщения [5, 12, 13]

о находках у выделенных в 1991–1994 гг. в Матлабе (Бангладеш) и в лечебном Центре Beira (Мозамбик, Африка) штаммов холерных вибрионов эльтор, несущих генотипические признаки вибрионов классического биотипа: их геном содержал ген *rstR* классического типа, а гены *ctxAB* кодировали синтез холерного токсина (СТ) также классического типа. Изоляты *V. cholerae* O1 с генотипическими признаками обоих биотипов получили название «гибридных» [11].

Характеристику генетически измененных штаммов холерных вибрионов O1 приводят в своей работе А. Сафа и соавт. [15]. Генотипическая характеристика измененных токсигенных штаммов холерного вибриона дана в сравнительном аспекте с типичными эльтор и классическими вибрионами. Так, геном СТХφ типичного токсигенного холерного вибриона эльтор состоит из коровой области и области RS2. В коровой области гены *ctxAB* кодируют продукцию холерного энтеротоксина; гены *ase* и *zot*, обеспечивающие морфогенез фаговых частиц, кодируют синтез токсинов, нарушающих проницаемость эпителиальных клеток кишечника человека, способствующих свободному доступу в них энтеротоксина. Функция остальных трех генов, входящих в кластер токсигенности, изучена недостаточно. В область RS2 входят гены *rstA*, *rstB*, кодирующие репликацию, интеграцию фаговых частиц, и ген *rstR*, регулирующий эти процессы. Геном СТХφ фланкируется с обеих сторон филаментозным фагом RS1, в геноме которого важную роль играет ген *rstC*, специфичный для типичного эльтор. Необходимо

отметить, что гены *ctxAB* кодируют продукцию токсина эльторовского типа (СТ2), т.е. энтеротоксина, аминокислотная последовательность субъединицы В которого в положении 39 содержит аминокислоту тирозин, а в позиции 68 – изолейцин.

Геном СТХф классического холерного вибриона состоит, как и у типичного эльтор, из коровой и RS2 областей с тем же набором генов. Гены *ctxAB* кодируют продукцию энтеротоксина классического типа (СТ1) – в положении 39 такой энтеротоксин субъединицы В содержит гистидин, а в положении 68 – треонин. Ген *rstR* по последовательностям нуклеотидов имеет четкие отличия от *rstR* холерного вибриона эльтор. Кроме того, геном СТХф классического холерного вибриона не фланкируется областью RS1.

В группу «атипичных» входят генетически разнородные холерные вибрионы O1 серологической группы. Так, матлабские варианты содержат в своем геноме профаг СТХф классического биовара с генами *rstR^{Clas}* и аллелем *ctxB1*, кодирующем продукцию СТ1, и не дифференцируются на биовары. Вместе с тем данные варианты содержат кластер генов *VSP1* и *VSP2*, что указывает на происхождение матлабских вариантов от типичного холерного вибриона эльтор. Анализ электрофореграмм пульс-электрофореза показал наличие генов классического и эльтор биоваров [14]. Мозамбикские варианты фенотипически характеризуются как холерные вибрионы биотипа эльтор, содержат в своем геноме СТХф^{Clas} с генами *rstR^{Clas}* и аллелем *ctxB1*, кодирующем продукцию СТ1. Группа генетически измененных вариантов холерных вибрионов эльтор содержит «гибридный СТХф» с комбинацией генов *rstR^{El}* и *ctxB1* (кодируют продукцию СТ1) или *rstR^{Clas}* и *ctxB3* (кодируют продукцию СТ2). И, наконец, «гибридные эльтор» [15] содержат в геноме *rstR^{Clas}* и *rstR^{El}*, что является отражением присутствия двух различных копий СТХф, расположенных как тандемно на одной хромосоме, так и локально на различных хромосомах. Гибридные варианты эльтор продуцируют СТ1.

На основании приведенных данных, для генотипирования генетически измененных холерных вибрионов эльтор методом ПЦР определен оптимальный набор праймеров, мишенью которых будут ДНК генов *rstR^{El}*, *rstR^{Clas}*, *ctxA*, *ctxB1*, *B3* и *rstC*.

Все эпидемические осложнения по холере в России и странах СНГ явились следствием завоза инфекции из стран Юго-Восточной Азии (Индия, Пакистан, Иран) или Ближнего Востока (Сирия), что предопределило цель настоящего исследования: ретроспективный поиск генетически измененных вариантов холерного вибриона эльтор среди изолированных в 90-е годы на Кавказе.

Материалы и методы

В работе изучены 73 штамма холерного вибриона эльтор, из которых 32 выделены от больных в 1970–1990 гг. в Грузии, Дагестане и Ставропольском крае,

41 – в 1993, 1994, 1998 гг. в Дагестане. Клинические изоляты идентифицированы как холерные токсигенные вибрионы O1 серологической группы биовара эльтор сероваров Огава или Инаба.

Определение генотипов, в том числе и генетически измененных, среди клинических изолятов холерного вибриона эльтор, выделенных на Кавказе в период 7-й пандемии, осуществляли методом ПЦР, детектируя фрагменты генов *rstR^{El}*, *rstR^{Clas}*, *ctxA*, *ctxB1(B^{Clas})*, *ctxB3(B^{El})*, *rstC*. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе, синтезированы в ЗАО «Синтол» (табл. 1).

Для определения размеров ампликонов использовали 100 bp DNA Ladder (100–3000 bp). Секвенирование ампликонов проводили на генетическом анализаторе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems) с набором реактивов BigDye Terminator v3.1 в соответствии с методическими рекомендациями производителя, исходные данные анализировали в программе Sequencing Analysis v5.4. При сопоставлении последовательностей были использованы программы FinchTV 1.4.0. и BLAST (NCBI).

Результаты и обсуждение

Результаты исследований (табл. 2) показывают, что 32 клинических изолята, выделенные от людей в 1970–1990 гг., и 7 штаммов, выделенные в 1993–1994 гг., отнесены нами к генотипу I, 31 штамм – к генотипу II, а 3 штамма – к генотипу III, которые по генетической структуре прилегающего к умеренному фагу СТХф участку RS1 с геном *rstC* отличались от классического биовара, фенотипически оставаясь эльтор вибрионом. «Гибридный», или смешанный, генотип II составили дагестанские штаммы, выделенные в 1993, 1994 и 1998 гг. Эти штаммы отличались также полиантибиотикорезистентностью (от 3 до 8 маркеров устойчивости), и большая их часть не лизировалась фагами С, эльтор II, ХДФ 3, 4, 5.

Полученные данные позволили выявить среди клинических изолятов три генотипа холерного вибриона эльтор, которые характеризовались наличием, наряду с *ctxA*, *rstC*, следующих генов: генотип I содержал только свои собственные, эльторовские,

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Тестируемый ген	Нуклеотидная последовательность праймера, 5–3'	Размер ампликона, п.н.	Источник
<i>rstR^{El}</i>	gcacatgatttaagatgctc tcgagttgtaattcatcaagagtg	501	[8]
<i>rstR^{Clas}</i>	cttctcatcagcaaacctccatc tcgagttgtaattcatcaagagtg	501	[8]
<i>ctxA</i>	cgggcagattctagacctg cgatgatcttgagcactattccac	564	[6]
<i>ctxB1(B^{Clas})</i>	actatcaacagcatatgcacatgg cctggttacttgaacg	186	[15]
<i>ctxB3(B^{El})</i>	actatcaacagcatatgcacatgg cctggttacttgaacg	186	[15]
<i>rstC</i>	atgagtttgaaccatacacttt ttacagtgatgatcagcaat	224	[12]

Генотипы холерного вибриона эльтор среди 73 клинических изолятов, выделенных на Кавказе в период 7-й пандемии

Фенотип, годы выделения, кол-во исследованных штаммов	Кол-во изолятов с детектируемыми генами						Генотип
	<i>rstR^{El}</i>	<i>rstR^{Clas}</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB^{Clas}</i>	<i>ctxB^{El}</i>	<i>rstC</i>	
<i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор, 1970–1990 гг., n=32	32	0	32	0	32	32	I
<i>V. cholerae</i> O1 биовара эльтор, 1993–1998 гг., n=41	7	0	7	0	7	7	I
	31	31	31	31	0	31	II
	0	3	3	3	0	3	III

гены – *rstR^{El}* и *ctxB^{El}*, генотип II – гены *rstR^{El}*, *rstR^{Clas}* и *ctxB^{Clas}*, генотип III – *rstR^{Clas}* и *ctxB^{Clas}* (табл. 2), т.е. генотипы II и III содержат ген *ctxB^{Clas}*, кодирующий энтеротоксин классического типа.

При секвенировании гена *ctxB* штаммов холерного вибриона эльтор, отнесенных нами к генотипу I, установлено, что в нуклеотидной последовательности данного гена в позициях 115 и 203 присутствует тимин, а кодируемая им аминокислотная последовательность субъединицы В холерного токсина в положении 39 содержит аминокислоту тирозин, в положении 68 – изолейцин.

В нуклеотидной последовательности гена *ctxB* штаммов холерного вибриона эльтор II и III генотипов в позициях 115 и 203 находится цитозин, а кодируемый им экзотоксин в положениях 39 и 68 содержит соответственно аминокислоты гистидин и треонин. Данные секвенирования свидетельствуют о том, что штаммы I генотипа продуцируют СТ 2-го типа, а II и III генотипов – СТ 1-го типа.

Таким образом, штаммы холерных вибрионов I генотипа являются типичными токсигенными холерными вибрионами биовара эльтор, вызвавшими эпидемиологические осложнения по холере на Кавказе в 1970–1990 гг., хотя единичные случаи этой инфекции наблюдались в 1993–1998 гг. Генотипы II и III следует определить как генетически измененные варианты биовара эльтор, обусловившие эпидемические вспышки и единичные случаи холеры в Дагестане в 1993–1998 гг. Такие геноварианты биовара эльтор продуцируют СТ 1-го типа, причем, как показали исследования Н.И.Смирновой и соавт. [4], в значительно большем количестве по сравнению с типичным токсигенным холерным вибрионом, являются полиантибиотикорезистентными и устойчивыми к холерным диагностическим бактериофагам. Учитывая полученные результаты и данные А.Сафа и соавт. [14], можно утверждать, что выявленные на Кавказе генотипы II и III холерного вибриона эльтор имеют клоновое происхождение от генетически измененных штаммов биовара эльтор, выделяемых в Азии и Африки.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
 2. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Федоров Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Горобец А.В. Холера в начале века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и микробиол. 2005; 3:44–8.
 3. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шайкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов *Vibrio*

cholerae биовара эльтор, изолированных на территории России в современный период. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2011; 3:11–7.

4. Смирнова Н.И., Кутырев В.В., Костромитина Е.А., Осин А.В. Вариабельность генома штаммов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Вестник РАМН. 2005; 7:19–26.
 5. Ansaruzzaman M. Cholera in Mozambique, variant of *Vibrio cholerae*. Emerg. Infect. Dis. 2004; 10:2057–9.
 6. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., Bhadra R.K., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular analysis of the *rstR* and *orfU* genes of the CTX prophages integrated in the small chromosomes of environmental *Vibrio cholerae* non-O1, non-O139 strains. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.
 7. De Moor C.E. A non-haemolytic El-Tor *Vibrio* as the cause of an outbreak of paracholera in West New Guinea. The El-Tor problem paracholera in the West Pacific. Trop. Geogr. Med. 1963; 15(2):97–107.
 8. Faruque S.M., Nair G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Immunol. 2002; 46:59–66.
 9. Hugh R. The taxonomy of El-Tor *Vibriosis*. Bact. Proc. 1962; 5:123–8.
 10. Karaolis D.K.R., Lan R., Reeves P.R. Molecular evolution of the seventh-pandemic clone of *Vibrio cholerae* and its relationship to other pandemic and epidemic *V. cholera* isolates. J. Bacteriol. 1994; 176:3191–8.
 11. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCA assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 1(52):314–7.
 12. Nair G.B. 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; 40:3296–9.
 13. Safa A. Genomic relatedness of the new Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 to the classical and El Tor biotypes as determined by pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 2005; 43:1401–4.
 14. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J., Kong R. *Vibrio cholerae* O1 eltor strains, Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 15(6):987–8.
 15. Safa A., Nair G.B., Alam M. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. Trends Microbiol. 2010; 18:46–54.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Baroyan O.V. [Cholera Biovar El Tor]. M.: Meditsina; 1971. 254 p.
 2. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Fedorov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Gorobets A.V. [Cholera in the beginning of the century. Prognosis]. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2005; 3:44–8.
 3. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. [Variability of the genome of *Vibrio cholerae* altered variants biovar El Tor, isolated in the territory of Russia in the modern period]. Mol. Genet. Mikrobiol. Virusol. 2011; 3:11–7.
 4. Smirnova N.I., Kutyrev V.V., Kostromitina E.A., Osin A.V. [Variability of the genome of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor]. RAMS Bulletin. 2005; 7:19–26.

Authors:

Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Babenyshev B.V., Kovalev D.A., Grizhebovsky G.M., Antonenko A.D., Kurbanov Sh.Kh., Butaev T.M., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Савельев В.Н., Савельева И.В., Васильева О.В., Бабенышев Б.В., Ковалев Д.А., Грижебовский Г.М., Антоненко А.Д., Курбанов Ш.Х., Бутаев Т.М., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 08.11.12.