

Н.И.Смирнова, Н.Б.Челдышова, А.А.Горяев, Ю.В.Лозовский, В.В.Кутырев

**ЭВОЛЮЦИЯ ГЕНОМА *VIBRIO CHOLERAЕ*:
ПУТИ ФОРМИРОВАНИЯ АТИПИЧНЫХ ШТАММОВ**

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Представлен обзор литературных и собственных данных о путях возникновения атипичных по вирулентным свойствам штаммов *Vibrio cholerae* *eltor*. Показано, что повышение вирулентности возбудителя холеры эльтор в современный период связано с приобретением им профага СТХф *Vibrio cholerae* *cholerae* в результате горизонтального переноса генов. Описан также другой возможный путь образования штаммов с более высоким уровнем вирулентности за счет изменения регуляции резидентных генов холерного токсина, обусловленной реорганизацией генома профага СТХф внедрившимся транспозоном. Рассмотрены также данные о путях происхождения штаммов *ctxA*⁻ *tcpA*⁺ и их повышенной жизнеспособности в водной среде по сравнению с изогенными токсигенными клонами. Представлены перспективы разработки нового ПЦР-теста для выявления возбудителя холеры эльтор с измененной вирулентностью при мониторинговых исследованиях.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, эволюция, геном, профаг СТХф, вирулентность, холерный токсин, пандемии.

Изучение эволюции генома возбудителя холеры остается одним из приоритетных направлений в проблеме «Холера». Исследование эволюционных преобразований генома *Vibrio cholerae* позволяет получить ответы на многие вопросы, важные для диагностики, профилактики и мониторинга этого патогена: каковы причины и параметры естественного генетического разнообразия возбудителя холеры; как происходит процесс образования патогенных штаммов с новыми ранее неизвестными свойствами, что необходимо для прогнозирования эпидемической ситуации; почему и как формируются лекарственно-устойчивые штаммы; какие механизмы лежат в основе адаптации патогена к меняющимся условиям внешней среды?

К настоящему времени геном возбудителя холеры полностью секвенирован. Установлено, что в отличие от многих других возбудителей, этот патоген имеет две хромосомы, отличающиеся по размеру и функциям [10, 24, 31]. Значительная часть генов вирулентности локализована на первой или большой хромосоме и входит в состав различных мобильных генетических элементов (МГЭ) – профагов (СТХф и RS1ф), «островов патогенности» (VPI-1, VPI-2) и «пандемичности» (VSP-1, VSP-2). Такая гетерогенная группа мобильных элементов была приобретена авирулентной предковой формой *V. cholerae* от неизвестных доноров в процессе горизонтального переноса генов [10, 24, 26, 33, 37, 42]. Присутствие в геноме возбудителя холеры чужеродных мобильных участков ДНК определяет его большую пластичность, которая выражается в изменении его размеров и функций за счет потери или приобретения МГЭ. Это обстоятельство может обусловить появление клонов с разным набором генов патогенности, резистентности к антибиотикам, а также диагностически значимых генов. Биологический смысл высокого

уровня изменчивости генома возбудителя – обеспечение его выживаемости в меняющихся условиях окружающей среды.

Как происходит эволюция бактериального генома *V. cholerae*? К настоящему времени накоплены многочисленные факты, свидетельствующие о том, что в основе этого процесса лежат различные генетические события – инактивация функционально активных генов, редукция генома, мутации (замены, делеции, инверсии). Однако наиболее значимый вклад в эволюционные преобразования генома холерного вибриона внес горизонтальный перенос генов [3, 10, 16, 18, 20, 26, 41]. Основное последствие этого процесса – появление в хромосоме ранее авирулентной предковой формы чужеродных геномных островов с генами патогенности.

К настоящему времени стало известно, что в результате эволюции в пределах вида образовалось три эпидемически опасных штамма, отличающихся друг от друга по фенотипическим и генетическим свойствам – *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара, *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор и *V. cholerae* O139 серогруппы [1, 8, 10, 14, 15, 26, 32, 36].

V. cholerae классического биовара был, видимо, возбудителем первых шести пандемий азиатской холеры (с 1817 по 1926 год), при которой в ряде стран «смертность превышала возможности хоронить мертвых» [1, 26, 32]. Однако к началу прошлого столетия эти вибрионы были вытеснены на эндемичной для них территории холерными вибрионами биовара эльтор. Именно *V. cholerae* *eltor* вызвали текущую, 7-ю, пандемию холеры, начавшуюся в 1961 г. и продолжающуюся до сих пор [1, 7, 10, 20, 24]. Что касается внезапно появившегося в 1992 г. в Индии и Бангладеш нового эпидемического штамма *V. chol-*

erae O139, то прогноз ряда исследователей о начале новой, 8-й, пандемии холеры, связанной с этим возбудителем, пока не оправдался [8, 14, 26, 36].

К настоящему времени установлено, что классические вибрионы более вирулентны по сравнению с вибрионами эльтор. Они эффективнее колонизируют тонкий кишечник человека и продуцируют больше холерного токсина (ХТ), который кодируется генами *ctxAB*, входящими в состав двух профагов СТХф, локализованных на разных хромосомах [1, 10, 15, 17, 49]. Видимо, за счет этих свойств классические вибрионы часто вызывают тяжелые формы диареи. Что касается вибрионов эльтор, то более 80,0 % людей, зараженных этим возбудителем, переносят мягкую, часто бессимптомную форму диареи. Одна из основных причин такого явления – более низкий уровень токсигенности этого возбудителя, несмотря на присутствие у более 30,0 % штаммов двух или более копий профага СТХф на первой хромосоме [1, 10, 23, 24, 27, 34].

Вместе с тем вопрос о том, почему более вирулентный возбудитель холеры был замещен менее вирулентным, пока открыт. Предполагается, что основная причина этого события – высокая устойчивость вибрионов эльтор к неблагоприятным условиям внешней среды. Следует отметить, что несмотря на смену биовара возбудителя, холерные классические вибрионы, видимо, никогда не были полностью замещены вибрионами эльтор. Так, в 2008 г. появилось сообщение о выделении из водной среды в Ираке наряду с эльтор вибрионами нескольких штаммов *V. cholerae* классического биовара [38, 39, 49]. К настоящему времени принято считать, что классические вибрионы образуют естественный резервуар генов вирулентности [10, 38, 39]. Основной же угрозой для мирового сообщества продолжает оставаться холера эльтор [5, 7].

Почему и как изменяется в современный период возбудитель холеры эльтор? Ухудшение среды обитания, изменение климата, неправильное применение антибиотиков при лечении человека, проникновение этого патогена на новые территории – все это является природными и социальными факторами, которые способствуют дальнейшей эволюции возбудителя для обеспечения его выживания в изменившихся условиях окружающей среды. В результате этих событий в природных популяциях сформировались атипичные по различным свойствам штаммы. Среди них наибольший интерес представляют следующие: штаммы с измененными диагностически значимыми признаками; варианты, устойчивые к лекарственным препаратам; атипичные нетоксигенные клоны, вызывающие клинические проявления холеры; штаммы, отличающиеся от типичных повышенной вирулентностью [10, 17, 18, 22, 39, 44, 45, 50].

Не вызывает никакого сомнения, что одним из актуальных направлений в исследованиях возбудителя холеры в настоящий момент является изучение механизмов формирования устойчивых к антибио-

тикам клонов, поскольку появление таких штаммов значительно осложняет проведение лечебных мероприятий [3, 19, 21, 50]. Но особую тревогу вызывает факт появления атипичных клонов *V. cholerae* эльтор с повышенной вирулентностью [25, 28, 38, 39, 48], что может привести к изменению «стандартного» механизма развития эпидемического процесса [4, 12].

Возникновение клонов с повышенной вирулентностью связано с изменением у типичного возбудителя холеры эльтор структуры профага СТХф. Этот мобильный элемент несет гены *ctxAB*, кодирующие ХТ, который является одним из ключевых факторов вирулентности и отвечает за развитие диареи [10, 26, 34]. Между классическими и эльтор вибрионами существуют выраженные различия в структуре профагов СТХф и их локализации на хромосомах. У токсигенных эльтор вибрионов присутствует от 1 до 8 копий профага СТХф, расположенных в tandemном порядке на большой хромосоме. Типичные гены этого профага имеют две области – коровую и RS-2 (от repeat sequence) [17, 23, 34]. Коровая область, помимо генов *ctxAB*, отвечающих за биосинтез ХТ второго типа, несет гены *zot*, *ace*, *orfU*, *cep* и *psh*, кодирующие биосинтез дополнительных токсинов Zot и Ace, а также белков, необходимых для морфогенеза фаговых частиц [23, 24, 29, 51]. Область RS-2 содержит 3 гена, из которых *rstA* требуется для репликации фага СТХф, *rstB* – для специфической интеграции фага в хромосому, а *rstR* кодирует репрессор, запрещающий транскрипцию гена *rstA* и, следовательно, отвечающий за лизогенное состояние холерных вибрионов (рис. 1, а). В то же время в геноме большинства штаммов классических вибрионов присутствует лишь две копии профага СТХф, локализованные на разных хромосомах. Более того, нуклеотидная последовательность гена *rstR*, входящая в состав RS-2 области, имеет значительные отличия от таковой *V. cholerae* эльтор. Следовательно, ген *rstR* является биоварспецифическим (рис. 1, б) [10, 17, 26]. И, наконец, классические вибрионы, в отличие от вибрионов эльтор, продуцируют ХТ первого типа. Различия между ХТ

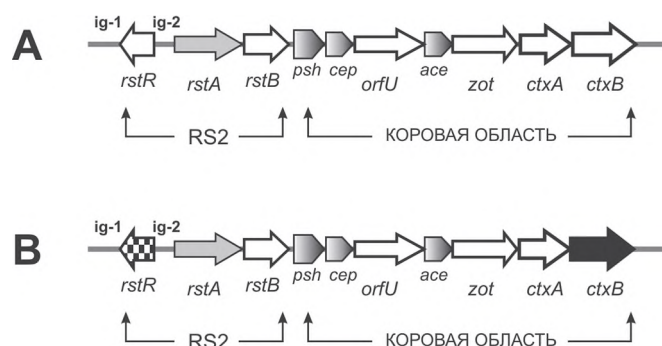


Рис. 1. Схематическое изображение структуры генома профагов СТХф *Vibrio cholerae* эльтор (А) и *Vibrio cholerae* холера (Б). Различные цвета генов *rstR* (RS2-область) и *ctxB* (коровая область), входящих в состав профагов СТХф сравнимых биоваров *V. cholerae*, отображают их разную нуклеотидную последовательность

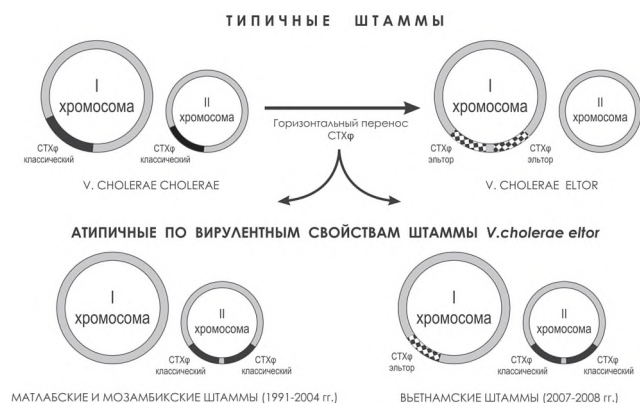


Рис. 2. Отличия в профагах СТХφ и их локализации на хромосомах между типичным возбудителем холеры эльтор и его вариантами, атипичными по вирулентным свойствам (Матлабский и Мозамбикский штаммы, а также Вьетнамский штамм)

классических и эльтор вибрионов обусловлены неодинаковой аминокислотной последовательностью их В-субъединиц, что, в свою очередь, связано с принадлежностью их генов *ctxB* к разным генотипам – 1-му и 3-му соответственно [30, 43].

К настоящему времени к штаммам *V. cholerae eltor* с повышенной вирулентностью прежде всего следует отнести Матлабский и Мозамбикский варианты (рис. 2). Матлабские штаммы впервые были выделены в 1991–1994 гг. от больных тяжелой формой холеры в Матлабе, расположенном на юге Бангладеш. Эти штаммы, имеющие разную комбинацию свойств классических и эльтор вибрионов, были распределены на 3 типа. Матлабские штаммы I типа содержали в геноме остров патогенности VPI-1 и профаг СТХφ, у которых последовательность ряда генов (*tcpA* и *rstR* соответственно) не отличалась от таковой классических вибрионов [39]. Последующие исследования показали, что для таких гибридных вариантов, которые стали доминировать на ряде территорий Юго-Восточной Азии, характерен ряд фенотипических и генетических особенностей. Во-первых, по основным диагностически значимым бактериологическим свойствам эти штаммы не отличались от типичных *V. cholerae eltor*. Они продуцируют термолабильный гемолизин, устойчивы к полимиксину, агглютинируют куриные эритроциты, чувствительны к диагностическому фагу Эльтор и резистентны к классическому фагу С. Во-вторых, продуцируют, как и *V. cholerae* классического биовара, ХТ первого типа, что установлено с помощью моноклонального анализа [40]. И, наконец, ключевой генетической особенностью этих штаммов является присутствие в их геноме классического профага СТХφ [38, 47, 48]. Считают, что Матлабские штаммы появились в результате горизонтального переноса генов вирулентности от классических вибрионов к вибрионам эльтор. Последствие такого события – повышение вирулентных свойств возбудителя 7-ой пандемии холеры, что выразилось в увеличении числа sporadических случаев холеры в Бангладеш (Дакка) с

15,9 % в 2001 г. до 30,8 % в 2005 г. [38, 40]. При этом было отмечено утяжеление клиники заболевания по сравнению с тем, что имело место при инфекции типичным возбудителем [38]. Более того, существенные биологические изменения, которые претерпел возбудитель холеры эльтор, определяют, видимо, повышение его эпидемического потенциала, которое выражается в вытеснении с 2001 г. Матлабскими штаммами типичных вирулентных штаммов на территории Бангладеш [40].

На пандемический потенциал холерных вибрионов эльтор с усиленной вирулентностью указывает их появление на другом континенте – в Юго-Восточной Африке. В 2004 г. в Мозамбике была зарегистрирована эпидемическая вспышка холеры эльтор, вызванная штаммами, имеющими значительное генетическое сходство с Матлабским вариантом (рис. 2). При этом среди более 20000 больных холерой значительное число переносило тяжелую форму заболевания [28, 35, 47, 48]. Геномный анализ Мозамбикского штамма, проведенный S.M.Farique *et al.* [28], показал присутствие на его малой хромосоме двух копий классического профага, расположенных в tandemном порядке. Однако фаговый геном был дефектен по репликации и не продуцировал фаговые частицы. Вместе с тем было обнаружено, что в хромосомах Мозамбикского штамма присутствует более 99,0 % генов, имеющих в типичных вирулентных штаммах *V. cholerae eltor*. И прежде всего это «острова пандемичности» VSP-1 и VSP-2, отсутствующие у классических штаммов. Из этого следует, что Мозамбикский штамм возник в результате эволюционных преобразований генома возбудителя 7-ой пандемии холеры [28].

Какие же молекулярно-генетические механизмы могли обеспечить появление штамма с измененной вирулентностью? Точный механизм его образования пока до конца не выяснен. Тем не менее на основании сравнительного анализа геномов типичного возбудителя холеры эльтор и Мозамбикского штамма высказано предположение, что последний произошел от вирулентного штамма *V. cholerae eltor* в результате многоступенчатых событий. Вначале на большой хромосоме какого-то вирулентного штамма был делетирован участок ДНК, содержащий эльтор СТХφ профаг и прилегающую к нему нуклеотидную последовательность с *att*-сайтами (от англ. attachment site), которая требуется для внедрения этого фага в бактериальный геном. Затем этот нетоксигенный штамм в результате горизонтального переноса генов приобрел от *V. cholerae cholerae* классический профаг СТХφ, который мог встроиться только в оставшийся на малой хромосоме *att*-сайт. Ввиду того, что до сих пор не выявлено образования свободных фаговых частиц классическими вибрионами, маловероятно, что классический профаг СТХφ был приобретен в результате фаговой конверсии. В данный момент обсуждается приобретение свободного фагового генома или хромосомного участка *V. cholerae* классического биовара, несущего СТХφ, в процессе трансформации.

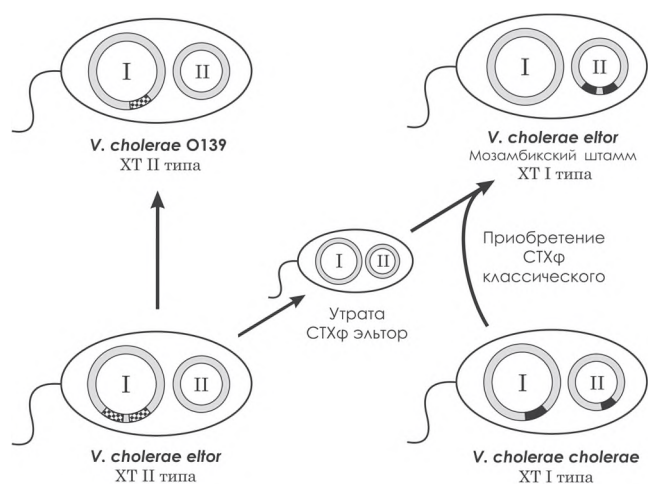


Рис. 3. Схема возможного происхождения Мозамбикского штамма, отличающегося от типичного возбудителя холеры повышенной вирулентностью (по Sh.M.Faruque *et al.*, 2007)

Высказано предположение, что вероятнее всего это событие могло произойти в окружающей среде при нахождении вибрионов на хитиновом субстрате в составе биопленки [18, 28, 46]. И, наконец, при попадании этого штамма в организм человека приобретенный классический профаг СТХф, включенный в малую хромосому, мог дублироваться, что привело к появлению его двух копий (рис. 3) [28]. Таким образом, реконструкция событий, которые привели к возникновению Мозамбикского штамма, указывает на существование ранее неизвестного пути эволюции патогенных штаммов *V. cholerae* с пандемическим потенциалом [28]. Появление у возбудителя холеры эльтор двух копий классического профага СТХф отразилось, видимо, на регуляции экспрессии генов ХТ. Последствие всех этих явлений – возникновение атипичного по вирулентным свойствам штамма *V. cholerae eltor*.

Другим не менее ярким примером изменения вирулентных свойств возбудителя холеры в современный период является штамм *V. cholerae eltor*, выделенный на территории Северного Вьетнама в 2008 г. [16, 25, 52]. Этот штамм в марте–апреле 2008 г. вызвал эпидемическую вспышку холеры в Ханое и 20 провинциях. Несмотря на отсутствие смертельных исходов, для этой вспышки были характерны тяжелые клинические формы заболевания, что свидетельствует о повышенной вирулентности возбудителя по сравнению с типичными штаммами [52]. При анализе генома выделенных штаммов были получены весьма интересные данные. Оказалось, что все изученные штаммы несли три копии профага СТХф. Из них две копии, локализованные на малой хромосоме, относились к классическому профагу. Третья копия СТХф была расположена на большой хромосоме и относилась к эльтор профагу [25]. Приведенные данные не оставляют сомнений в том, что Вьетнамский вариант возбудителя холеры эльтор возник в результате горизонтального переноса генов вирулентности от классических вибрионов к холерным вибрионам

эльтор. Пока нет никаких сведений о том, сможет ли этот вариант возбудителя холеры эльтор вытеснить типичного возбудителя на эндемичной по холере территории. Вместе с тем совершенно очевидно, что в природных условиях происходит формирование гибридных штаммов, обладающих более вирулентными свойствами.

Возникновение в ходе эволюционных событий в пределах биовара эльтор новых патогенных вариантов ставит вопрос о коррекции существующих методов молекулярно-эпидемиологического мониторинга внешней среды. Используемые бактериологические методы и лицензированные ПЦР-тест системы не могут обеспечить дифференцирование типичных и описанных атипичных вариантов возбудителя холеры эльтор. Однако четкие различия между классическими и эльтор вибрионами в нуклеотидной последовательности гена-репрессора *rstR* указывают на реальную возможность использования этого гена в качестве генетической метки атипичных по вирулентным свойствам штаммов *V. cholerae eltor*. Несомненно, что, несмотря на весьма интенсивные исследования механизма возникновения *V. cholerae eltor* с измененной вирулентностью, для решения этой проблемы требуется дальнейшая работа.

Как уже отмечалось, описанные выше атипичные штаммы возникли в результате горизонтального переноса генов от *V. cholerae cholerae* к *V. cholerae eltor*. Возникает вполне закономерный вопрос о том, существуют ли другие механизмы формирования штаммов с измененной вирулентностью? В этой связи нами были проведены модельные эксперименты по получению штаммов холерных вибрионов эльтор с повышенной вирулентностью за счет изменения экспрессии резидентных генов *ctxAB* [13]. В качестве исходного был взят штамм *V. cholerae eltor* MAK757, имеющий на большой хромосоме две копии профага СТХф, расположенные в тандемном порядке, которые определяют продукцию 0,02 мкг/мл ХТ второго типа (по данным GM₁ELISA). Для изменения активности генов *ctxAB* был использован транспозонный мутагенез. Выбор этого метода обусловлен полученными ранее сведениями об участии транспозонов в регуляции экспрессии генов вирулентности у различных патогенных бактерий. Для получения инсерционных мутантов транспозон Tn5-Mob (Km^R) вначале был введен в клетки холерного вибриона в составе векторной плазмиды pSUP5011. Последующее исключение Tn-элемента из плазмидной ДНК и включение его в бактериальную хромосому производили путем излечения клеток от плазмиды с одновременным созданием условий для селекции клонов, сохранивших Tn5-Mob (Km^R). У полученных Km^R–клонов с помощью ПЦР и ДНК-ДНК-гибридизации изучали структуру профага и определяли продукцию ХТ. В результате оказалось, что внедрение Tn5-Mob в хромосому MAK757 почти в 2,0 % случаев сопровождалось утратой одной копии профага и делецией генов *zot*, *ace*, *cep*, *orfU* второй его копии [13]. Уровень

биосинтеза ХТ у таких клонов, потерявших около 70,0 % генов профага, возрос более чем в 2000 раз по сравнению с исходным штаммом, составляя 42,0–45,0 мкг/мл [2, 13]. При этом диагностически значимые бактериологические свойства этого штамма (резистентность к полимиксину, чувствительность к фагу эльтор) не изменились.

Далее, встал вопрос о том, влияет ли изменение структуры профага на вирулентность полученного штамма? В этой связи был проведен сравнительный анализ инфекционного процесса на модельных животных (кролики-сосунки), инфицированных исходным штаммом и его инсерционным мутантом со сверхэкспрессией *ctxAB*. При практически одинаковой эффективной колонизации кишечника клетками сравниваемых штаммов у всех модельных животных развивался специфический холерогенный синдром. Вместе с тем штамм с повышенной продукцией ХТ вызывал гибель всех инфицированных животных уже через 24 ч, тогда как в случае исходного штамма почти 70,0 % зараженных животных, несмотря на развитие у них типичной экспериментальной холерной инфекции, не погибали и через 48 ч. Полученные данные позволили заключить, что гипертоксигенный штамм был более вирулентен. Его повышенная вирулентность выражалась в более быстрой гибели экспериментальных животных, у которых развивался весьма выраженный холерогенный синдром.

Пока нет сведений о селективных преимуществах этого штамма по сравнению с типичным возбудителем холеры эльтор. Тем не менее полученные данные указывают на существование еще одного возможного пути формирования штаммов с повышенной вирулентностью за счет изменения регуляции экспрессии собственных генов *ctxAB* в результате делеции ряда генов, входящих в состав профага СТХф. Такое событие вполне реально и в природных условиях, поскольку холерные вибрионы, находясь в составе бактериальной биопленки, могут приобретать различные транспозоны от других бактерий в результате конъюгационных или трансформационных процессов [18].

Другое важное направление в проблеме формирования атипичных по вирулентным свойствам вариантов возбудителя холеры эльтор – изучение путей образования нетоксигенных холерных вибрионов, сохранивших весь набор других ключевых генов патогенности. Такие штаммы способны вызывать тяжелые диарейные заболевания, а в ряде случаев быть этиологическим агентом локальных вспышек холеры [30, 50].

Одно из возможных предположений относительно возникновения таких вариантов *V. cholerae* заключалось в том, что *ctxA⁻tcpA⁺* штаммы могли появиться в результате утраты профага СТХф токсигенными штаммами при их попадании в водную среду. Основанием для такой гипотезы служили данные о присутствии в окружающей среде *tcpA⁺* штаммов *V. cholerae* эльтор как с дефектным профагом СТХф

(*ctxAB⁺, zot⁻, ace⁺* или *ctxAB⁻, zot⁺, ace⁺* или *ctxAB⁻, zot⁻, ace⁺*), так и лишенных этого мобильного элемента [11, 44, 45]. В этой связи были проведены модельные эксперименты, направленные на изучение фено- и генотипических особенностей, появившихся у токсигенных штаммов после их пребывания в водной среде. Двадцать клинических штаммов *V. cholerae* эльтор, выделенных во время эпидемии холеры в Астрахани (1970–1975 гг.) и содержащих в геноме весь набор основных генов вирулентности, включая и профаг СТХф, были помещены в речную воду. Через каждые 4 дня делали высевы из контаминированной воды на чашки с полноценным агаром и полученные изолированные колонии с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) тестировали на присутствие всех генов профага – *ctxA*, *ctxB*, *zot*, *ace*, *orfU*, *cep* (коровая область), а также *rstA*, *rstB*, *rstR* (RS2-область). В результате было обнаружено, что более 50,0 % штаммов действительно утратили профаг СТХф через 4–75 дней [9]. Одним из стрессовых факторов, индуцирующих такую перестройку генома возбудителя холеры эльтор, является, видимо, бедность водной среды питательными веществами. Следует особо отметить тот факт, что утрата профага сопровождалась изменением экспрессии других генов, связанных с вирулентностью. Нетоксигенные клоны были менее подвижны, но продуцировали больше гемолизина по сравнению с исходными. Эти данные указывают на то, что выявленные изменения структуры и функции генома вирулентных клонов холерных вибрионов при их попадании в водную среду, возможно, связаны с процессом их адаптации к данной экологической нише. При этом утрата профага, не являющегося жизненно важным для выживания клеток вне организма хозяина, может быть одним из условий длительного переживания *V. cholerae* в природных экосистемах. Действительно, при оценке конкурентной способности изогенных клонов СТХф⁺ и СТХф⁻ в условиях их совместного культивирования в речной воде уровень выживаемости нетоксигенных клонов был в 2–5 раз выше по сравнению с токсигенными [9]. Это может означать, что описанные изменения генома вирулентных штаммов в водной среде могут быть одним из механизмов сохранения бактериальной популяции в межэпидемический период.

Более того, *ctxA⁻tcpA⁺* штаммы являются потенциально эпидемически опасными, так как присутствие на бактериальной поверхности токсин-корегулируемых пилей, являющихся рецептором для фага СТХф, может обусловить их превращение в токсигенные в результате фаговой конверсии. Кроме того, такие штаммы сохраняют способность к колонизации тонкого кишечника и, следовательно, могут обусловить появление вибрионосителей [10, 26, 33]. И, наконец, *ctxA⁻tcpA⁺* штаммы могут быть ценным материалом для последующих эволюционных преобразований возбудителя холеры, на основе которых могут возникнуть вирулентные штаммы с новыми свойствами.

В заключение следует подчеркнуть, что в современный период в основе изменения вирулентных свойств возбудителя холеры лежит вариабельность генома профага СТХф, кодирующего биосинтез холерного энтеротоксина. Исходя из результатов литературных данных, можно заключить, что в последние годы происходит формирование новых вариантов возбудителя холеры эльтор, отличительной особенностью которых является заметное повышение их вирулентности. Изменение вирулентных свойств этих штаммов, выражающееся в тяжелых клинических формах заболевания и в повышении числа заболевших, по всей видимости, было следствием многоступенчатой реорганизации их генома. Конечный этап этого процесса состоял в приобретении возбудителем холеры эльтор профага СТХф от возбудителя азиатской холеры в результате горизонтального переноса генов. Безусловно, говорить о свершившейся эволюции *V. cholerae*, в результате которой сформировался новый для человека возбудитель холеры, нет никаких оснований. Вместе с тем приобретение возбудителем холеры эльтор повышенной вирулентности действительно свидетельствует о происходящих эволюционных преобразованиях его генома. Основной причиной этого явления, видимо, является регулирующее воздействие социальных и природных факторов на эпидемический процесс прежде всего на эндемичных по холере территориях.

Сохранение новым вариантом возбудителя пандемического потенциала требует повышенного внимания к его циркуляции на разных территориях. Вместе с тем, несмотря на существенные фенотипические (продукция ХТ первого типа) и генетические (присутствие на малой хромосоме 2 копий классического профага СТХф) отличия между новыми и типичными штаммами, существующие на данный момент лабораторные методы исследования не позволяют идентифицировать штаммы с повышенной вирулентностью. Следовательно, для преодоления возникших трудностей при проведении адекватного мониторинга возбудителя холеры, необходимо внедрение в практику новых методов идентификации. В частности, один из таких подходов может заключаться в тестировании у природных штаммов гена *rstR* с помощью ПЦР.

Следует также отметить возросший интерес к другой проблеме, связанной с изучением адаптивных изменений генома возбудителя холеры при его попадании в водную среду. Анализ собственных данных позволяет говорить о том, что этот процесс может быть обусловлен утратой токсигенными вибрионами профага СТХф. По всей видимости, такое событие обеспечивает длительное сохранение *ctxA*⁺ *tcpA*⁺ вибрионов в окружающей среде. Не исключено, что нетоксигенные вибрионы, возникшие из ранее токсигенных клонов и сохранившие весь набор других генов патогенности, и являются причиной локальных вспышек холеры, зарегистрированных как на территории Российской Федерации, так и ряда зару-

бежных стран. Однако этот важный вопрос требует дальнейшего исследования.

Работа поддержана грантом РФФИ (06-04-48310).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. М.: Медицина; 1971. 254 с.
2. Горяев А.А., Щелканова Н.Ю., Лозовский Ю.В., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Конструирование штамма *Vibrio cholerae* биовара эльтор гиперпродукента холерного токсина II типа и определение оптимальных условий для продукции этого белка. Пробл. особо опасных инф. 2008; 95:56–9.
3. Ильина Т.С. Механизмы горизонтального переноса генов: роль бактериофагов и интегровнов в эволюции патогенных бактерий. Молекул. генетика, микробиол. вирусол. 2003; 4:3–11.
4. Кутырев В.В., Смирнова Н.И., Черкасский Б.Л. Влияние биологических свойств возбудителя холеры на характер эпидемического процесса. Эпидемиол. и инф. бол. 2006; 4:43–7.
5. Ломов Ю.М. Холера и проблемы биотерроризма. Эпидемиол. и инф. бол. 2008; 2:4–6.
6. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И. и др. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 stxAB⁺ tcpA⁺. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 1:23–9.
7. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Федоров Ю.М., Подосинникова Л.С., Горбеев А.В. Холера в начале века. Прогноз. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2005; 3:44–8.
8. Смирнова Н.И. Возбудитель холеры новой O139-серогруппы: молекулярно-генетические особенности и происхождение. Молекул. генетика, микробиол. вирусол. 2002; 3:23–33.
9. Смирнова Н.И., Кулышань Т.А., Челдышова Н.Б., Осин А.В. Структурные и функциональные изменения генома возбудителя холеры в водной среде. Эпидемиол. и инф. бол. 2007; 5:22–7.
10. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
11. Смирнова Н.И., Осин А.В., Нефедов К.С., Кулышань Т.А., Заднова С.П., Ливанова Л.Ф. и др. Вариабельность генома профага СТХф и ее роль в изменении вирулентных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. 2007; 6:20–6.
12. Черкасский Б.Л. Системный подход в эпидемиологии. М.: Медицина; 1988. 288 с.
13. Щелканова Е.Ю., Горяев А.А., Смирнова Н.И. Изменение генома профага СТХф *Vibrio cholerae* биовара эльтор, вызываемое транспозоном Tn5-Mob. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2008; 23:23–33.
14. Alam M., Hasan N.A., Sadique A., Bhuiyan N.A., Ahmed K.U., Nusrin S. et al. Seasonal cholerae caused by *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 in the coastal aquatic environment of Bangladesh. Appl. Env. Microbiol. 2006; 72:4096–4104.
15. Ali M., Emch M., Donny J.P., Yunus J.P., Sack R.B. The spatial epidemiology of cholera in an endemic area of Bangladesh. Social science & medicine. 2002; 55:1015–24.
16. Bani S., Mastromarino P.N., Ceccarelli D., Van A.L., Salvia A.M., Viet Q.T.N. et al. Molecular characterization of ICE Vch Vie0 and its disappearance in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in 2003 in Vietnam. FEMS Microbiol. Lett. 2007; 266:42–8.
17. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., Bhadra R.K., Takeda Y., Nair B. et al. 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. Env. Microbiol. 2006; 8:526–34.
18. Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. PLoS Pathog. 3(6):e81.1371/journal.ppat.0030081.
19. Burrus V., Marrero J., Waldor M. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. Plasmid. 2006; 55:173–83.
20. Byun R., Elbourne L. D., Lan R., Reeves P. R. Evolutionary relationships of pathogenic clones of *Vibrio cholerae* by sequence analysis of four housekeeping genes. Infect. Immun. 1999; 67:1116–24.
21. Ceccarelli D., Salvia A.M., Sami J., Cappuccinelli P., Colombo M.M. New cluster of plasmid-located class 1 integrons in *Vibrio cholerae* O1 and a *dfrA15* cassette-containing integrons in *Vibrio parahaemolyticus* isolated in Angola. Antimicrobial agents chemotherapy. 2006; 50:2493–9.
22. Dalsgaard A., Forsslund A., Tam N.V., Vinh D.X., Cam P.D. Cholera in Vietnam: changes in genotypes and emergence of gene I integrons containing aminoglycoside resistance gene cassettes in *Vibrio cholerae* O1 strain isolated from 1979 to 1996. J. Clin. Microbiol. 1999; 37:734–41.

23. Davis B.M., Kimsey H.H., Kane A.V., Waldor M.K. A satellite phage-encoded antirepressor induces repressor aggregation and cholera toxin gene transfer. *The EMBO Journal*. 2002; 21:4240–9.
24. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002; 99:1556–61.
25. Ehara M. Cholerae, variant strains – Viet Nam: (North). Cholerae, diarrhea & dysentery update 2008 (09).
26. Faruque Sh.M., Albert M.J., Mekalanos J.J. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Microbiol. and Mol. Biol. Rev.* 1998; 62:1301–14.
27. Faruque Sh.M., Kamruzzaman M., Asadulghani, Sack D.A., Mekalanos J.J., Nair G.B. CTXphi-independent production of the RS1 satellite phage by *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003; 100:1280–5.
28. Faruque Sh.M., Tam V.C., Chowdhury N., Diraphat P., Dziejman M., Heidelberg J.F. et al. Genomic analysis of the Mozambique strain of *Vibrio cholerae* O1 reveals the origin of El Tor strains carrying classical CTX prophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007; 104:5151–6.
29. Fasano A., Baudry B., Pumphlin D.W., Wasserman S. S., Tall B. D., Ketley J. M. et al. *Vibrio cholerae* produces a second enterotoxin, which affects intestinal tight junctions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:5242–6.
30. Finkelstein R.A., Burks M.F., Zupan A., Dallas W.S., Jacob C.O., Ludwig D.S. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. *Rev. Infec. Dis.* 1987; 9:544–61.
31. Heidelberg J.F., Eisen J.A., Nelson W.C., Clayton R.A., Gwinn M.L., Dodson R.J. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae*. *Nature*. 2000; 406:477–83.
32. 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. cholerae* isolates. *J. Bacteriol.* 1994; 176:3191–8.
33. Karaolis D.K.R., Somara S., Maneval D.R., Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399:375–9.
34. Kimsey H.H., Waldor M.K. CTXphi immunity: application in the development of cholera vaccines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998; 95:7035–9.
35. Lee H.J., Han K.H., Choi S.Y., Lucas M.E.S., Mondlane C., Ansaruzzaman M. Multilocus sequencing typing (MLST) analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor isolates from Mozambique that harbour the classical CTX prophage. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:165–70.
36. Mooli F.R., Bik E.M. The evolution of epidemic *Vibrio cholerae* strains. *Trends Microbiol.* 1997; 5:161–5.
37. Murphy R.A., Boyd E.F. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates. *J. Bacteriol.* 2008; 190:636–47.
38. Nair G.B., Bhuiyan N.A., Nusrin S. et al. Molecular basis of the emergence of a new more severe form of cholera. In: Gevers D., Mazel D., Thompson F., editors. *Vibrio 2007 Abstract book*; 2007 28 Nov-1; Dec; Paris, France. Paris: Institut Pasteur, Centre d'Information Scientifique; 2007. 25 p.
39. Nair G.B., Faruque Sh.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. 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; 40:3296–99.
40. Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., Svennerholm A.M., Safa A., Bhuiyan N.A. et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44:4211–3.
41. Nair G.B., Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Murphy D., Nicol C. et al. Isolation of *Vibrio cholerae* strains similar to pre-seventh pandemic El Tor strains during an outbreak of gastrointestinal disease in an island resort in Fiji. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:1559–62.
42. O'Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the epidemic *V. cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42:4657–71.
43. Olsvik O., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Waschmuth I.K. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholerae toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31:22–5.
44. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y. et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189:4837–49.
45. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martin F., Ibarra C., Binsztain N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41:124–34.
46. Rawlings T.K., Ruiz G.M., Colwell R.R. Association of *V. cholerae* El Tor and O139 Bengal with the copepods *Acartia tonsa* and *Eurytemora affinis*. *Appl. Env. Microbiol.* 2007; 73:7926–33.
47. Safa A., Bhuiyan N.A., Alam M.A., Sack D.A., Nair G.B. 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.
48. Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T. et al. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:1563–9.
49. Salim A., Lan R., Reeves P.R. *Vibrio cholerae* pathogenic clones. 2005; 11:1758–60.
50. Shi L., Fujihara K., Sato T., Ito T., Garg P., Chakrabarty R. et al. Distribution and characterization of integrons in various serogroups of *Vibrio cholerae* strains isolated from diarrhoeal patients between 1992 and 2000 in Kolkata, India. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55:575–83.
51. Trucksis M., Galen J.E., Mishalski J., Fasano A., Kaper J.B. Accessory cholera enterotoxin (Ace), the third toxin of a *Vibrio cholerae* virulence cassette. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90:5267–71.
52. Weekly epidemiological record. Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2008; 18:157–68.

N.I.Smirnova, N.B.Cheldyshova, A.A.Goryaev, Yu.V.Lofovsky, V.V.Kutyrev

***Vibrio cholerae* Genome Evolution: Ways of Atypical Strains Formation**

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe"

Presented is the review of literary and authors' data on the ways of emergence of *Vibrio cholerae* eltor strains, atypical as regards their virulence properties. The enhancement of virulence of cholera eltor agent at present was shown to be associated with acquisition of *Vibrio cholerae* cholerae CTXφ prophage as a result of horizontal gene transfer. Another possible way of formation of strains with higher virulence is described – alteration of cholera toxin resident genes regulation due to rearrangement of CTXφ prophage genome by the introduced transposon. Also considered are evidences on origination of ctxA⁺ tcpA⁺ strains and their enhanced viability in aquatic environment as compared with isogenic toxigenic clones. Presented are the prospects of the development of new PCR test for detection of cholera eltor agent with altered virulence in monitoring investigations.

Key words: *Vibrio cholerae*, evolution, genome, CTXφ prophage, virulence, cholera toxin, pandemics.

Проступила 10.07.08.