

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-137-147

УДК 616.932:615.33

Д.А. Рыбальченко, Е.Ю. Щелканова, Ю.В. Лозовский, А.В. Федоров, Н.И. Смирнова

## РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ РАЗНЫХ ТИПОВ ИНТЕГРАТИВНОГО КОНЪЮГАТИВНОГО ЭЛЕМЕНТА SXT/R391, КОДИРУЮЩЕГО МНОЖЕСТВЕННУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К АНТИБИОТИКАМ, СРЕДИ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – изучить распространенность разных типов SXT-элемента с различным составом генов резистентности к антибиотикам среди клинических штаммов возбудителя холеры Эль Тор, изолированных в России, Украине и эндемичных по холере странах Азии и Африки. **Материалы и методы.** Объектами исследования служили 27 штаммов и нуклеотидные последовательности 77 штаммов *Vibrio cholerae* Эль Тор, представленные в NCBI GenBank. Определение структуры SXT-элемента и его типа проводили с помощью программ Mauve и BLAST v.2.9.0. Выявление филогенетических связей штаммов с разным типом SXT осуществляли с помощью программ Snippy v.4.6.0 и MrBayes v.3.2.7. Определение чувствительности к антибиотикам штаммов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09. **Результаты и обсуждение.** Среди изученных штаммов из России и Украины выявлено два типа SXT-элемента (ICEVchInd5 и ICEVchBan9), имеющих различный состав генов резистентности к антибиотикам: *floR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* и *floR*, *tetAR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* соответственно. В то же время исследованные штаммы из стран Азии и Африки содержали пять типов SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan9, ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5ΔVRIII, – различающихся между собой по размеру и/или составу генов резистентности. Из них три последних не обнаружены в России и Украине. В связи с высоким уровнем геномного разнообразия SXT в популяции холерных вибрионов в эндемичных регионах появляется риск завоза в Россию штаммов возбудителя холеры с измененной устойчивостью к антибиотикам. На основе SNP-анализа дана оценка филогенетических связей 76 штаммов с разным типом SXT и различными аллелями гена *ctxB*, кодирующего В-субъединицу холерного токсина. Показана тесная филогенетическая связь между штаммами с одинаковым типом SXT, изолированными в России и странах Азии, что подтверждает завоз возбудителя холеры с множественной резистентностью к антибиотикам из этого региона и необходимость постоянного мониторинга чувствительности холерных вибрионов к антимикробным препаратам.

**Ключевые слова:** возбудитель холеры, SXT-элемент, гены резистентность к антибиотикам, SNP-анализ, филогенетические связи.

Корреспондирующий автор: Смирнова Нина Ивановна, e-mail: nusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Рыбальченко Д.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Смирнова Н.И. Распространенность разных типов интегративного конъюгативного элемента SXT/R391, кодирующего множественную резистентность к антибиотикам, среди клинических штаммов возбудителя холеры. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 1:137–147. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-137-147

Поступила 04.08.2021. Отправлена на доработку 24.11.2021. Принята к публ. 13.12.2021.

D.A. Rybal'chenko, E.Yu. Shchelkanova, Yu.V. Lozovsky, A.V. Fedorov, N.I. Smirnova

## Prevalence of Different Types of Integrative Conjugative Element SXT/R391 Encoding Multiple Antibiotic Resistance Among Clinical Strains of Cholera Agent

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

**Abstract.** The aim of the work was to study the prevalence of different types of SXT element with different composition of antibiotic resistance genes among clinical strains of the El Tor cholera pathogen isolated in Russia, Ukraine and cholera-endemic countries in Asia and Africa. **Materials and methods.** The subject of the study was 27 strains and nucleotide sequences of 77 strains of *Vibrio cholerae* El Tor available from the NCBI GenBank. The structure of the SXT element and its type were determined using the Mauve and BLAST v.2.9.0 programs. Phylogenetic relations of strains with different types of SXT were identified using Snippy v.4.6.0 and MrBayes v.3.2.7 software. Assessment of strain sensitivity to antibiotics was carried out in accordance with Methodological Regulations 4.2.2495-09. **Results and discussion.** Two types of SXT element (ICEVchInd5 and ICEVchBan9) have been identified among the studied strains from Russia and Ukraine, which have different composition of antibiotic resistance genes: *floR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* and *floR*, *tetAR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1*, respectively. At the same time, the studied strains from Asia and Africa contain five types of SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan9, ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5ΔVRIII, which differ in size and/or composition of resistance genes. Of these, the last three have not been found in Russia and Ukraine. Due to the high level of genomic diversity of SXT in the population of *V. cholerae* in endemic regions, there is a risk of importation of cholera pathogen strains with altered resistance to antibiotics into Russia. Phylogenetic relations of 76 strains with different SXT types and different alleles of the *ctxB* gene encoding the B subunit of cholera toxin have been assessed based on SNP analysis. A close phylogenetic relation between strains with the same type of SXT isolated in Russia and Asian countries has been demonstrated, which confirms the importation of the causative agent of cholera with multiple resistance to antibiotics from this region and the need for constant monitoring of the sensitivity of *V. cholerae* to antimicrobial drugs.

**Key words:** cholera pathogen, SXT element, antibiotic resistance genes, SNP analysis, phylogenetic relations.

**Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Nina I. Smirnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Rybal'chenko D.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Fedorov A.V., Smirnova N.I. Prevalence of Different Types of Integrative Conjugative Element SXT/R391 Encoding Multiple Antibiotic Resistance Among Clinical Strains of Cholera Agent. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 1:137–147. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-137-147

Received 04.08.2021. Revised 24.11.2021. Accepted 13.12.2021.

Rybal'chenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>  
Shchelkanova E.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0672-8820>  
Lozovsky Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>

Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>  
Smirnova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Возникновение и изменение устойчивости патогенных бактерий к лекарственным препаратам является одной из фундаментальных угроз здоровью человека в современный период. Особую тревогу вызывает быстрое распространение в мире возбудителей особо опасных инфекций с множественной резистентностью к антибиотикам. Одним из таких возбудителей является *Vibrio cholerae* серогруппы O1 биовара Эль Тор, вызвавший последнюю, седьмую, пандемию холеры, начавшуюся в 1961 г. и продолжающуюся до сих пор [1, 2]. Глобальное распространение холеры из Бенгальского залива в другие страны мира происходило тремя независимыми, но перекрывающимися волнами [3]. При лечении холеры, вызывающей тяжелую острую диарею, помимо регидратационных растворов, применяют различные антибиотики (тетрациклины, хлорамфеникол, триметоприм, фторхинолоны и др.), использование которых сокращает длительность периода диареи, а также время выделения возбудителя больным [4]. В первые годы внедрения антибактериальных препаратов в практику устойчивость к ним возбудителя холеры была редким явлением. Ключевой причиной развития резистентности стало чрезмерно широкое и неправильное использование антибиотиков при лечении и профилактике этой инфекции. Следствием такой устойчивости является более продолжительная госпитализация, рост медицинских расходов и смертности.

Изучение механизмов возникновения и распространения бактериальных генов резистентности у холерных вибрионов показало исключительно важную роль в этом процессе интегративного конъюгативного элемента (или ICE, integrative conjugating element) SXT, относящегося к семейству SXT/R391. Впервые этот мобильный элемент обнаружили в штамме *V. cholerae* MO10 серогруппы O139, выделенном в Индии в 1992 г. [5]. Однако впоследствии SXT был приобретен многими штаммами *V. cholerae* серогруппы O1 биовара Эль Тор через горизонтальный перенос. Установлено, что SXT (99,5 т.п.н.), внедренный в 5'-конец хромосомного гена *pfvC* [6] и расположенный между геномными островами VPI-2 (островом патогенности 2) и VSP-I (островом пандемичности I) [7, 8], имеет мозаичную структуру. В его состав входят консервативные последовательности (52 гена), кодирующие его внедрение в хромосому, вырезание и конъюгативный перенос, а также четыре переменных региона (VRI–IV, variable regions I–IV), включенные в межгенное пространство в пять сайтов, названных горячими точками интеграции (HSs, hot spots) [9, 10]. Среди последних безусловный

интерес представляет VRIII, содержащий отдельный блок генов *floR*, *strAB*, *sul2* и *dfvA1*, кодирующих устойчивость к хлорамфениколу, стрептомицину, сульфаметоксазолу и триметоприму соответственно. Большинство встроенных в SXT генов резистентности (*floR*, *strAB* и *sul2*) находятся в участке размером 23 т.п.н., включенном в ген *rumB*. Этот участок, окруженный генами транспозаз, представляет собой сложную транспозоноподобную структуру, что означает возможность ее участия в появлении разных вариантов SXT в результате индуцированных геномных перестроек [9]. В то же время ген *dfvA1* отделен от данной области последовательностью ДНК размером около 70 т.п.н. (рис. 1, а).

Сравнительно недавно стало известно, что SXT-элемент нестабилен и его структура быстро меняется в ходе эволюции возбудителя. В настоящее время известно более 30 его типов [11], среди которых наиболее распространены ICEVchInd5/ICEVchBan5, ICEVchMoz10, ICEVchBan9, ICEVchBan11 и ICEVchInd9 [10], обозначенные согласно универсальной номенклатуре [12]. Основное различие между типами SXT выразилось в разном наборе генов резистентности к антибиотикам. Последствие большой пластичности генома SXT – изменение резистентности возбудителя холеры к лекарственным препаратам, что могло приводить к снижению качества лечения и росту смертности. В связи с очевидной значимостью для медицины устойчивости к различным лекарственным препаратам возбудителя холеры решением этой проблемы занимались многие зарубежные и отечественные исследователи [13–16]. Однако ряд вопросов о частоте распространения на территории России штаммов с разным типом SXT и различным набором генов резистентности, о циркуляции в эндемичных очагах холеры вибрионов с измененным спектром устойчивости к лекарственным препаратам и возможности их завоза в Россию нуждаются в дополнительных исследованиях. **Цель** работы – изучить распространенность разных типов SXT-элемента с различным составом генов резистентности к антибиотикам среди клинических штаммов возбудителя холеры Эль Тор, изолированных в России, Украине и эндемичных по холере странах Азии и Африки.

## Материалы и методы

Объектами исследования являлись 27 штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории России и Украины, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий

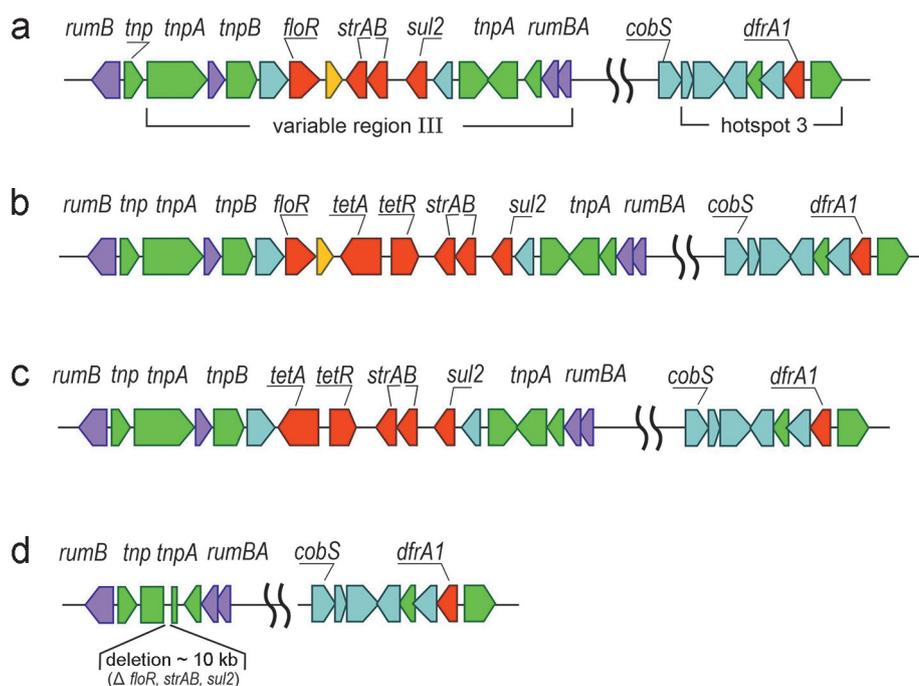


Рис. 1. Схема структурной организации интегративного конъюгативного SXT-элемента исследуемых штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор:

a – ICEVchInd5; b – ICEVchBan9; c – SXT<sup>TET</sup>; d – ICEVchInd5ΔVIII

Fig. 1. Scheme of the structural organization of the integrative conjugative SXT element in the studied strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor:

a – ICEVchInd5; b – ICEVchBan9; c – SXT<sup>TET</sup>; d – ICEVchInd5ΔVIII

РосНИПЧИ «Микроб» (табл. 1). Бактерии культивировали в среде LB при 37 °C (pH 7,2). Оценку их чувствительности к антибиотикам осуществляли методом реплик 18 часовых агаровых культур на плотную среду с хлорамфениколом (30 мкг), тетрациклином (10 мкг), стрептомицином (25 мкг), триметопримом (25 мкг) и сульфаметоксазолом (200 мкг). Посевная доза взвесей агаровых культур составляла 10<sup>8</sup> м.к. по отраслевому стандарту мутности ОСО-42-25-59-86П. Интерпретацию результатов проводили в соответствии с МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сеп, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам».

Для биоинформационного анализа использованы секвенированные нуклеотидные последовательности полных геномов 77 штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории России и Украины (табл. 1), а также в эндемичных по холере странах Азии и Африки (табл. 2). Из них нуклеотидные последовательности 27 штаммов из России и Украины секвенированы нами ранее, другие – взяты из баз данных NCBI GenBank и European Nucleotide Archive. Наличие SXT и его тип определяли путем сопоставления полногеномных последовательностей исследуемых штаммов с таковыми штаммов 7452 (ICEVchInd5), 1811/98 (ICEVchBan5), MJ-1236 (ICEVchBan9), B33 (ICEVchMoz10), 4585 (ICEVchInd6) и 4672 (ICE ICEVchBan11), взятых в качестве референсных [10]. Для выравнивания последовательностей использовали программы Mauve и BLAST v.2.9.0 с алгоритмом blastn.

Для проведения филогенетического анализа геномов 76 штаммов (сборка в виде контигов) они были картированы на референсную последовательность генома штамма N16961, после чего построе-

на матрица коровых SNP с помощью программы Snippy v.4.6.0. Байесовский MCMC-анализ с построением филогенетического дерева проводился с помощью программы MrBayes v.3.2.7 с использованием модели General Time Reversible (GTR). Для визуализации дендрограммы использовали программу FigTree v1.4.4.

## Результаты и обсуждение

Для выявления интегративного конъюгативного элемента SXT и анализа его структуры на первом этапе работы проведен биоинформационный анализ секвенированного полного генома 29 штаммов, изолированных на территории России и Украины в разные периоды текущей пандемии (1961–2014 гг.). Оказалось, что пять штаммов (M818, M888, M1062, M893 и M1011), занесенных в Россию из эндемичных очагов в 1970–1972 гг. во время первой волны пандемии, были лишены SXT и, следовательно, не имели генов резистентности к антибиотикам, входящих в его состав (табл. 1).

Однако начиная с 1993 г. в составе хромосомы всех изученных штаммов обнаружено присутствие SXT-элемента. Для определения типа этого мобильного элемента во взятых штаммах сравнили нуклеотидную последовательность их SXT с таковой разных типов SXT, присутствующих в штаммах 7452 (ICEVchInd5), 1811/98 (ICEVchBan5), MJ-1236 (ICEVchBan9), B33 (ICEVchMoz10), 4585 (ICEVchInd6) и 4672 (ICE ICEVchBan11), взятых в качестве референсных [10]. В результате показали, что по размеру и структуре SXT исследованные штаммы следует разделить на две группы. Первую образовали девять штаммов, выделенных во время эпидемических вспышек холеры или при регистрации отдельных случаев инфекции в Дагестане

Таблица 1 / Table 1

Резистентность к антибиотикам штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с SXT/R391 элементом, выделенных в России и Украине  
Antibiotic resistance of *V. cholerae* O1 El Tor strains with SXT/R391 element, isolated in Russia and Ukraine

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Site and year of isolation	Аллель гена <i>ctxB</i> <i>ctxB</i> gene allele	Тип SXT SXT type	Размер SXT (п.н.) Size of SXT (bp)	Профиль генов резистентности Drug resistance gene profile	Резистентность Resistance
1	M818	РФ, Саратов, 1970 RF, Saratov, 1970	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–	Cm <sup>S</sup> Tet <sup>S</sup> Sm <sup>S</sup> , Tr <sup>S</sup> /Su <sup>S</sup>
2–4	M888, M1062, M893	РФ, Астрахань, 1970 RF, Astrakhan, 1970	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–	Cm <sup>S</sup> , Tet <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Tr <sup>S</sup> /Su <sup>S</sup>
5	M1011	Башкортостан, Уфа, 1972 Bashkortostan, Ufa, 1972	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–	Cm <sup>S</sup> , Tet <sup>S</sup> , Sm <sup>S</sup> , Tr <sup>S</sup> /Su <sup>S</sup>
6	M1275	РФ, Дагестан, 1993 RF, Dagestan, 1993	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
7	M1270	РФ, Набережные Челны, 1993 RF, Naberezhnye Chelny, 1993	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strBA</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> Sm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
8	M1293	РФ, Дагестан, 1994 RF, Dagestan, 1994	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
9	I-1181*	РФ, Барнаул, 1994 RF, Barnaul, 1994	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
10	28	Украина, Кривой Рог, 1994 Ukraine, Krivoy Rog, 1994	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
11	155	Украина, Мариуполь, 1994 Ukraine, Mariupol, 1994	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
12	20-a/11	Украина, Николаевская обл., 1995 Ukraine, Nikolaev Region, 1995	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
13	I-1263*	РФ, Иркутск, 1997 RF, Irkutsk, 1997	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
14	P17644	РФ, Ачинск, 1997 RF, Achinsk, 1997	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
15	M1327	РФ, Дагестан, 1998 RF, Dagestan, 1998	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
16	M1344	РФ, Казань, 2001 RF, Kazan, 2001	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
17	M1429	РФ, Башкирия, 2004 RF, Bashkortostan, 2004	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
18	M1430	РФ, Тверь, 2005 RF, Tver, 2005	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
19	P18899	РФ, Мурманск, 2006 RF, Murmansk, 2006	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
20–21	L-4150, L3226	РФ, Москва, 2010 RF, Moscow, 2010	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
22	89	Украина, Ялта, 2010 Ukraine, Yalta, 2010	<i>ctxB1</i>	ICEVchBan9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
23–26	76, 153, 39, 186	Украина, Мариуполь, 2011 Ukraine, Mariupol, 2011	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
27	M1509	РФ, Москва, 2012 RF, Moscow, 2012	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Su/Tr <sup>R</sup>
28	P19613 (81)	РФ, Ростов-на-Дону, 2014 RF, Rostov-on-Don, 2014	<i>ctxB1</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>
29	3265/80	РФ, Москва, 2014 RF, Moscow, 2014	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>	Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Tr <sup>R</sup> /Su <sup>R</sup>

Примечание: \* – нуклеотидные последовательности взяты из NCBI GenBank; резистентность к антибиотикам указана согласно данным [16]; *floR*, *tetAR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* – гены, кодирующие резистентность к хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, сульфаметоксазолу, триметоприму соответственно; Cm<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>, Tr<sup>R</sup>/Su<sup>R</sup> – резистентность к хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, триметоприму, сульфаметоксазолу соответственно; ■, ■, ■ – цветом обозначены штаммы, не имеющие SXT и содержащие ICEVchBan9 и ICEVchInd5 соответственно.

Note: \* – Nucleotide sequences are taken from NCBI GenBank; resistance to antibiotics is indicated according to [16]; *floR*, *tetAR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1* – genes encoding resistance to chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim, respectively; Cm<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>, Sm<sup>R</sup>, Tr<sup>R</sup>/Su<sup>R</sup> – resistance to chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, trimethoprim, sulfamethoxazole, respectively; ■, ■, ■ – color indicates the strains without SXT and containing ICEVchBan9 and ICEVchInd5, respectively.

(1993–1994 гг.), Татарстане (1993 г.), Украине (1993–1994 гг.), Алтайском и Красноярском крае (1994, 1997 гг.), а также при мониторинге внешней среды (Украина, 2010 г.). Указанные штаммы были занесены на эти территории из разных стран Азии в период второй волны пандемии [17–19]. В их хромосоме присутствовал SXT размером 106124 п.н., относящийся к одному и тому же типу – ICEVchBan9 [10]. Характерная его особенность – наличие в VRIII не только генов *floR*, *strAB*, *sul2*, но и генов *tetAR*, кодирующих резистентность к тетрациклину, а также *dfrA1* (табл. 1; рис. 1, *b*). Большинство же штаммов (15 изолятов) вошли во вторую группу. В их хромосоме обнаружен другой тип SXT – ICEVchInd5, несущий в своем составе четыре гена устойчивости к антибиотикам (*floR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*) и отличающийся от ICEVchBan9 как меньшим размером (97847 п.н.), так и отсутствием генов *tetAR* (табл. 1; рис. 1, *a*). При этом значительное их число (13 из 15 изолятов, или 86,7 %) изолировали во время третьей волны пандемии (табл. 1; рис. 2, *a*). Таким образом, среди 24 исследуемых штаммов *V. cholerae* Эль Тор, имеющих SXT-элемент и вызывавших эпидемические осложнения по холере в России и Украине на протяжении 21 года (с 1993 по 2014 год), выявлено два разных его типа – ICEVchBan9 и ICEVchInd5. Следствие этого события – различный профиль устойчивости штаммов к антибиотикам. Полученные данные полностью согласуются с результатами A.S. Gladkikh *et al.* [16], изучивших штаммы из Сибири и Дальнего Востока.

Определена чувствительность 27 штаммов холерного вибриона Эль Тор к пяти антибиотикам: хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, сульфаметоксазолу и триметоприму. При ее оценке выявили три различные группы. В первую вошли штаммы (пять изолятов), выделенные в 1970–1972 гг., которые, как и ожидалось, были чувствительны к ним вследствие отсутствия у них SXT (табл. 1). Вторая группа представлена девятью штаммами, изолированными в более поздний период (1993–1998 гг. и 2010 г.), в хромосоме которых появился SXT типа ICEVchBan9. Эти штаммы были устойчивы к хлорамфениколу (Cm<sup>R</sup>), тетрациклину (Tc<sup>R</sup>), стрепто-

мицину (Sm<sup>R</sup>) и триметоприм/сульфаметоксазолу (Su/Tr<sup>r</sup>) (табл. 1). Штаммы из третьей группы, состоящей из 15 изолятов (2001–2014 гг.) с ICEVchInd5, в отличие от второй, были резистентны лишь к четырем антибиотикам: хлорамфениколу (Cm<sup>R</sup>), стрептомицину (Sm<sup>R</sup>) и триметоприм/сульфаметоксазолу (Su/Tr<sup>r</sup>) (табл. 1). Таким образом, изученные штаммы холерного вибриона, изолированные с 1993 по 2014 год, имели разный профиль множественной резистентности к антибиотикам.

Поскольку эпидемические проявления холеры продолжают в эндемичных странах Азии и Африки с сохранением риска завоза инфекции на территорию России [2], представляло интерес изучение распространенности SXT-элемента среди 48 клинических штаммов *V. cholerae* Эль Тор, выделенных в этих регионах в последние два десятилетия. В результате установили, что независимо от места выделения все проверенные штаммы, выделенные от больных в начальный период пандемии (1961–1986 гг.), были лишены SXT-элемента (табл. 2). Этот мобильный элемент появился в хромосоме штаммов, изолированных лишь во время 2-й и 3-й волн пандемии, что полностью согласуется с результатами других исследователей.

Далее для выяснения типа SXT и состава его генов резистентности провели сравнительный биоинформационный анализ нуклеотидной последовательности этого мобильного элемента 45 изолятов, выделенных во время 2-й (MJ-1236, Бангладеш, 1994 г.) и 3-й (44 штамма, 1994–2018 гг.) волн пандемии. В результате установили, что эти штаммы, в отличие от изолятов из России и Украины, несли пять разных типов SXT: ICEVchBan9, ICEVchInd5, ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5ΔVRIII, – различающихся между собой набором генов резистентности к антибиотикам и/или размером. Штамм MJ-1236 (1994 г.) содержал ICEVchBan9 размером 106124 п.н. с генами *floR*, *tetAR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*, как и штаммы из России и Украины, изолированные в тот же период пандемии (1993–1998 гг.) (табл. 2; рис. 1, *b*). Одним из наиболее распространенных оказался ICEVchInd5 (97847 п.н.), обнаруженный у 12 штаммов (или 26,7 % от числа изученных) из Индии и Бангладеш, который также имели большинство проверенных штаммов, изолированных в России и Украине. Состав генов резистентности был также одинаков: *floR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA* (табл. 2; рис. 1, *a*; 2, *b*). Отсутствие различий между типами SXT у сравниваемых изолятов из эндемичных и неэндемичных по холере регионов может служить указанием на занос возбудителя холеры на территорию России и Украины в основном из стран Юго-Восточной Азии, что подтверждено результатами эпидемиологических исследований [18, 19].

Что касается трех других типов SXT-элемента (ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5ΔVRIII), то они были найдены только среди штаммов из Азии и Африки. При этом ICEVchBan5, имеющий тот же набор генов резистентности, что и ICEVchInd5, но

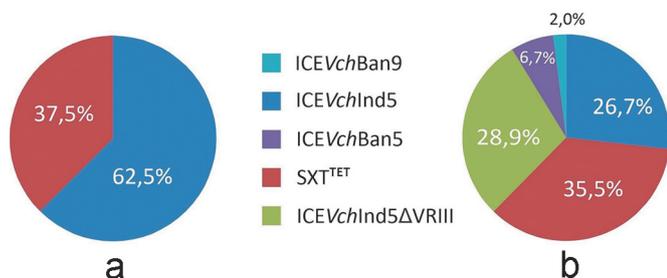


Рис. 2. Распространенность изучаемых штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разными типами интегративного конъюгативного SXT-элемента в России и Украине (*a*) и на эндемичных по холере территориях Азии и Африки (*b*)

Fig. 2. Prevalence of the studied *V. cholerae* O1 El Tor strains with different types of integrative conjugative SXT-element in Russia and Ukraine (*a*) and in cholera-endemic territories of Asia and Africa (*b*)

Таблица 2 / Table 2

Резистентность к антибиотикам штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разными типами SXT/R391 элемента, изолированных в эндемичных по холере странах

Antibiotic resistance in strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor with different types of SXT/R391 element, isolated in cholera endemic countries

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Site and year of isolation	Аллель гена <i>ctxB</i> <i>ctxB</i> gene allele	Тип SXT SXT type	Размер SXT (п.н.) Size of SXT (bp)	Профиль генов резистентности Drug resistance gene profile
1	2	3	4	5	6	7
1	CRC711	Индия, 1962 India, 1962	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–
2	6/67	Индия, 1967 India, 1967	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–
3	N16961	Бангладеш, 1975 Bangladesh, 1975	<i>ctxB3</i>	Отсутствует Absent	–	–
4	MJ-1236	Бангладеш, 1994 Bangladesh, 1994	<i>ctxB1</i>	ICE/ <i>ch</i> Ban9	106124	<i>floR</i> , <i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
5	IDH-0574	Индия, 2008 India, 2008	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
6	IND031	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
7–8	IDH-1986 IDH-2501	Индия, 2009 India, 2009	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
9	BGD101	Бангладеш, 2009 Bangladesh, 2009	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
10	IDH-2222	Индия, 2010 India, 2010	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
11	BGD043	Бангладеш, 2010 Bangladesh, 2010	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
12–13	BGD117 NHCM-053	Бангладеш, 2011 Bangladesh, 2011	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
14	BGD060	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
15	BGD120	Бангладеш, 2012 Bangladesh, 2012	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
16	IND071	Индия, 2013 India, 2013	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
17	BGD070	Бангладеш, 2013 Bangladesh, 2013	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	97847	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
18–19	IND082, IND085	Индия, 2014 India, 2014	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
20–21	BGD089, BGD095	Бангладеш, 2014 Bangladesh, 2014	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
22	IND203	Индия, 2015 India, 2015	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
23	BGD128	Бангладеш, 2015 Bangladesh, 2015	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
24	Tanz 14	Танзания, 2015 Tanzania, 2015	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1</i> Δ <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>
25	UG026	Уганда, 2015 Uganda, 2015	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1</i> Δ <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>
26–28	4621STDY6714750, 4621STDY6714758, 4621STDY6714749	Кения, 2015 Kenya, 2015	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1</i> Δ <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>
29–30	IND234, IND231	Индия, 2016 India, 2016	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
31	BGD140	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
32	BGD137	Бангладеш, 2016 Bangladesh, 2016	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5	97847	<i>floR</i> , <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>dfrA1</i>
33–34	UG020, UG010	Уганда, 2016 Uganda, 2016	<i>ctxB7</i>	ICE/ <i>ch</i> Ind5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1</i> Δ <i>strAB</i> , <i>sul2</i> , <i>floR</i>

Окончание табл. 2 / Ending of table 2

1	2	3	4	5	6	7
35	4621STDY6714780	Кения, 2016 Kenya, 2016	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1AstrAB, sul2, floR</i>
36–37	CNRVC170168, CNRVC170175	Йемен, 2016 Yemen, 2016	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1AstrAB, sul2, floR</i>
38–40	NALMLE36, NALMLE34, NALMLE37,	Бангладеш, 2017 Bangladesh, 2017	<i>ctxB1</i>	SXT <sup>TET</sup>	92592	<i>tetAR, strAB, sul2, dfrA1</i>
41–42	THSTI_56695, THSTI_56712	Индия, 2017 India, 2017	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5	97847	<i>floR, strAB, sul2, dfrA1</i>
43–45	CNRVC170179, CNRVC170208, CNRVC170197	Йемен, 2017 Yemen, 2017	<i>ctxB7</i>	ICEVchInd5ΔVRIII	88264	<i>dfrA1AstrAB, sul2, floR</i>
46–48	NALMLE03, NALMLE31, NALMLE07	Бангладеш, 2018 Bangladesh, 2018	<i>ctxB7</i>	ICEVchBan5	102131	<i>floR, strAB, sul2, dfrA1</i>

Примечание: *floR, tetAR, strAB, sul2, dfrA1* – гены, кодирующие резистентность к хлорамфениколу, тетрациклину, стрептомицину, сульфаметоксазолу, триметоприму соответственно; ■, ■, ■, ■, ■, ■ – цветом обозначены штаммы, не имеющие SXT и содержащие ICEVchBan9, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5, ICEVchInd5ΔVRIII и ICEVchBan5 соответственно.

Note: *floR, tetAR, strAB, sul2, dfrA1* are the genes encoding resistance to chloramphenicol, tetracycline, streptomycin, sulfamethoxazole, trimethoprim, respectively; ■, ■, ■, ■, ■, ■ – strains that do not have SXT and contain ICEVchBan9, SXT<sup>TET</sup>, ICEVchInd5, ICEVchInd5ΔVRIII, and ICEVchBan5, are colored respectively.

отличающийся от последнего большим размером (102131 п.н. по сравнению с 97847 п.н.), из изученных изолятов был в хромосоме лишь штаммов из Бангладеш, выделенных в 2018 г. (табл. 2). Особый интерес, на наш взгляд, представляет SXT<sup>TET</sup>, геном которого был изучен ранее [13, 19]. О появлении в ряде стран Азии единичных штаммов, утративших устойчивость к хлорамфениколу, но получивших резистентность к тетрациклину, стало известно с 1998–2000 гг. Однако с 2007 г. в Индии такие изоляты составляли более 76 % от числа изученных штаммов [19]. Резкое увеличение штаммов с SXT<sup>TET</sup> наблюдали и в ряде стран Африки, что было связано с интенсивным использованием тетрациклина (доксциклина) для лечения и профилактики холеры [20]. Среди изученных изолятов SXT<sup>TET</sup> присутствовал в хромосоме 16 штаммов, выделенных от больных в Индии (2008–2010 гг.) и Бангладеш (2009–2017 гг.) (табл. 2). В составе SXT<sup>TET</sup> размером 92592 п.н. были гены *tetAR, strAB, sul2* и *dfrA1* (табл. 2; рис. 1, c; 2, b). Однако, в отличие от других широко распространенных типов SXT (ICEVchInd5, ICEVchBan5, ICEVchBan9), в его геноме отсутствовал ген *floR* [10, 19]. Следует также отметить тот факт, что появление изолятов с SXT<sup>TET</sup> в эндемичных по холере регионах сопровождалось вытеснением ими штаммов с геном *floR* [19, 20].

Вариабельность генома SXT проявилась также в возникновении делеции в его VRIII, затронувшей гены резистентности. Среди изученных обнаружили 13 штаммов с SXT, несущих делецию около 10 т.п.н. в VRIII. Эта делеция в штаммах, выявленных в 2009–2018 гг., привела к утрате четырех генов, кодирующих резистентность к хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strA* и *strB*) и сульфаниламиду (*sul2*) в случае ICEVchInd5, или пяти генов, определяющих устойчивость к тетрациклину (*tetA*

*tetR*), стрептомицину (*strA* и *strB*) и сульфаниламиду (*sul2*) при SXT<sup>TET</sup>. Ген *dfrA1*, кодирующий резистентность к триметоприму, сохранялся во всех случаях (табл. 2; рис. 1, d; 2, b). Такие штаммы с измененным геномом SXT циркулировали на территории Кении (2015–2016 гг.), Танзании (2015 г.), Уганды (2015–2016 гг.), а также Йемена (2016–2017 гг.). Тем не менее на основании первых обнаружений таких штаммов в Индии считают, что появление в Африке изолятов с SXT, утратившим многие гены резистентности, связано с их заносом на этот континент из эндемичных очагов холеры в Азии [21–23].

Таким образом, приведенные результаты говорят о том, что геномное разнообразие SXT, находящихся в хромосоме клинических штаммов возбудителя холеры из эндемичных по холере территорий в Азии и Африке, более значимо по сравнению с таковым в России и Украине. Среди изученных штаммов выявлено пять типов SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan5, ICEVchBan9, SXT<sup>TET</sup> и ICEVchInd5ΔVRIII. Следствием этого является довольно широкий спектр изменчивости множественной резистентности к антибиотикам циркулирующих в этих регионах штаммов. Появились штаммы с ранее неизвестной структурой SXT-элемента, у которого, при сохранении генов резистентности к стрептомицину, сульфаметоксазолу и триметоприму, ген *floR* заменен на гены, кодирующие устойчивость к тетрациклину. Более того, в этот же период выявлены штаммы, утратившие устойчивость к трем антибиотикам (стрептомицину, сульфаметоксазолу, хлорамфениколу) за счет возникновения делеции в VRIII.

Ранее было показано, что в геноме возбудителя холеры на протяжении трех волн текущей пандемии происходило изменение не только резистентности к антибиотикам, но и генов патогенности. Одно из таких изменений – появление новых аллелей струк-

турного гена *ctxB*, который определяет биосинтез В-субъединицы холерного токсина и входит в состав профага СТХφ, содержащего оперон *ctxAB*, кодирующий этот ключевой фактор патогенности. Типичные штаммы возбудителя, появившиеся в 1961 г. и циркулировавшие в период 1-й волны пандемии, несли *ctxB3*, тогда как возникшие в процессе эволюции, генетически измененные штаммы из 2-й и 3-й волн имели аллели *ctxB1* и *ctxB7* [3]. Учитывая вышесказанное, мы попытались найти связь между типом SXT и аллелем гена *ctxB*, изучив его распространенность среди всех исследуемых штаммов. Оказалось, что аллель *ctxB3* действительно имели лишь штаммы, выделенные в период 1-й волны и лишенные SXT-элемента. Присутствие аллеля *ctxB1* установили в штаммах из 2-й и 3-й волн, содержащих разные типы SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan9, SXT<sup>TET</sup>. Что касается аллеля *ctxB7*, то он был выявлен только у новых вариантов возбудителя холеры из 3-й волны пандемии, имеющих в хромосоме один из следующих типов SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan5, ICEVchInd5ΔVRIII. Таким образом, не обнаружено прямой связи между аллелем гена *ctxB* и типом SXT-элемента. Однако подтверждена строгая корреляция аллеля *ctxB7* с новыми вариантами атипичных штаммов возбудителя холеры, появившимися в последние два десятилетия.

Глобальное распространение клинических штаммов возбудителя холеры в эндемичных по холере регионах с разными типами SXT-элемента ставит вопрос об их связи между собой и происхождении таких изолятов в России. В связи с этим провели филогенетический анализ на основе SNP-типирования 76 штаммов, представленных 29 изолятами из России и Украины и 47 штаммами, выделенными в Азии (39 изолятов) и Африке (8 изолятов) во время трех волн пандемии (рис. 3). При сравнении полных геномов изучаемых штаммов с референсной последовательностью штамма N16961 выявили 1488 одиночных нуклеотидных замен, или SNPs, в коровых генах, локализованных на обеих хромосомах. На основе анализа единичных полиморфных нуклеотидов построили филогенетическое дерево, которое четко разделилось на три кластера (рис. 3). Штаммы из 1-й волны с аллелем *ctxB3*, лишенные SXT-элемента (7 изолятов), независимо от места и года выделения (1962–1975 гг.) входили в состав кластера I, отличаясь от референсного лишь на 42–198 SNPs (рис. 3). Кластер II сформировали 13 штаммов, выделенных в период 2-й волны, получивших в процессе эволюции измененный профаг СТХφ с ранее неизвестным аллелем *ctxB1* и SXT-элемент и отличающихся от референсного на 86–206 SNPs. В пределах этого кластера штаммы образовали две подгруппы A и B, различающиеся типом SXT. В хромосоме всех штаммов из подгруппы A присутствовал ICEVchBan9, тогда как у штаммов из подгруппы B – ICEVchInd5 (рис. 3). В самый большой кластер III вошли штаммы из 3-й волны (56 изолятов), имеющие высокий уровень гетерогенности по

типам SXT. Их хромосома содержала один из четырех типов этого мобильного элемента: ICEVchInd5, ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup> или ICEVchInd5ΔVRIII (рис. 3). Различия в SNPs между ними и референсным штаммом достигали 116–216 SNPs. Следствием высокого генетического разнообразия стало формирование ими трех основных подгрупп: C, D и E. В состав достаточно четко обособленной подгруппы C входили 14 штаммов с аллелем *ctxB1*, выделенных в эндемичных по холере регионах Азии (Индия, Бангладеш), отличающихся от N16961 в среднем по 147 SNPs и имеющих SXT<sup>TET</sup>. Другая подгруппа, D, объединила 27 изолятов холерных вибрионов с аллелями *ctxB1* и *ctxB7*, циркулирующих как в России и Украине, так и в эндемичных очагах холеры (Индия и Бангладеш) и различающихся от N16961 в среднем по 141 SNPs. Эти штаммы содержали другие типы SXT: ICEVchInd5 и ICEVchBan5. При этом различия между входящими в эту подгруппу штаммами из России и Индии с ICEVchInd5 были незначительны – в среднем по 27 SNPs. Тесная филогенетическая связь этих штаммов может служить указанием на завоз возбудителя холеры в Россию из названных регионов. Отличие последней подгруппы E от двух первых состояло в присутствии в штаммах, входящих в ее состав, только аллеля *ctxB7* и иного типа SXT, а именно ICEVchInd5ΔVRIII (рис. 3). Различия по SNPs с N16961 были более значительны по сравнению со штаммами из подгрупп C и D и составляли в среднем 152 SNPs.

Таким образом, на основе SNP-анализа 76 штаммов *V. cholerae* Эль Тор показано, что они разделились на три обособленные филогенетические группы, различающиеся между собой по типу SXT-элемента и аллелю гена *ctxB*. Каждая из них также соответствовала трем волнам текущей пандемии холеры. Несмотря на принадлежность в целом всех штаммов из трех волн пандемии к одной филогенетической линии L2 [3], мы показали, что SNP-анализ токсигенных штаммов *V. cholerae* Эль Тор позволяет дифференцировать их на подгруппы, различающиеся между собой типом SXT-элемента с разным составом генов устойчивости к антибиотикам.

В заключение следует отметить, что у изученных штаммов выявили пять следующих типов SXT: ICEVchInd5, ICEVchBan9, ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup> и ICEVchInd5ΔVRIII, – среди которых первые два, различающиеся набором генов множественной резистентности к антибиотикам, имели штаммы из России и Украины. В то же время анализ нуклеотидной последовательности SXT позволил выявить его большое геномное разнообразие в штаммах из эндемичных очагов холеры. Наряду с ICEVchInd5 и ICEVchBan9 в их хромосоме обнаружили присутствие еще трех типов SXT: ICEVchBan5, SXT<sup>TET</sup> и ICEVchInd5ΔVRIII. Это означает, что в странах Азии и Африки циркулируют штаммы, имеющие более разнообразный набор генов устойчивости к лекарственным препаратам, чем в России. Заслуживает

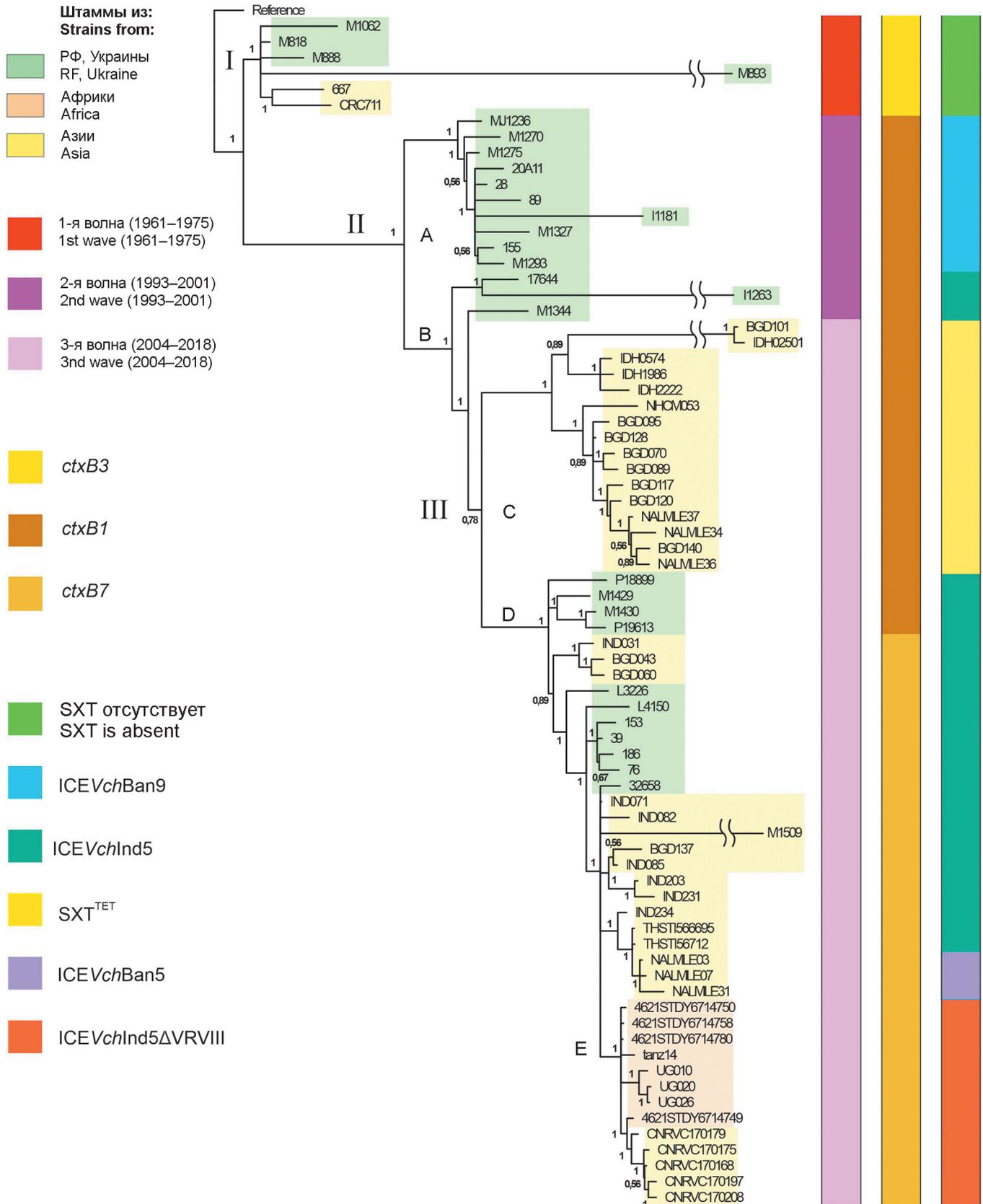


Рис. 3. Филогенетическое дерево клинических штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разными типами интегративного конъюгативного SXT-элемента, построенное на основе полногеномного SNP-анализа с использованием программного пакета Snippy v.4.6.0. Байесовский анализ выполнен с помощью программы MrBayes v.3.2.7, визуализация дендрограммы – программа FigTree v1.4.4

Fig. 3. Phylogenetic tree of clinical *V. cholerae* O1 El Tor strains with different types of integrative conjugative SXT element, built on the basis of genome-wide SNP analysis using the Snippy v.4.6.0 software package. Bayesian analysis was performed using the MrBayes v.3.2.7 program, visualization of the dendrogram – FigTree v1.4.4 software

внимания появление в Индии и Китае штаммов с SXT<sup>ТЕТ</sup>, в VRIII которого произошла замена гена резистентности к хлорамфениколу (*floR*), традиционно присутствующего в геноме других типов SXT, на гены устойчивости к тетрациклину (*tetAR*). Кроме того, стоит отметить выделение в последнее десятилетие штаммов, несущих в VRIII *CEVchInd5* делецию четырех генов резистентности: *floR*, *strA*, *strB* и *sul2*.

На основе SNP-анализа выявлена тесная филогенетическая связь между штаммами с одинаковым типом SXT-элемента, изолированными в России и странах Азии, что служит подтверждением завоза возбудителя холеры в нашу страну из азиатских эндемичных очагов. Показанное присутствие в различных регионах Азии и Африки штаммов с новым типом SXT, не встречающимся в России и несущим ранее неизвестный состав генов резистентности, позволяет прогнозировать их появление на территории нашей страны в результате интенсивной мобильности населения. Эти данные свидетельствуют о необходимости постоянного мониторинга устойчивости штаммов к антибиотикам для выбора наиболее эффективных лекарственных средств при лечении холеры.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

#### Список литературы

- Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–86. DOI: 10.1128/CMR.8.1.48.
- Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Левченко Д.А., Янович Е.Г., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И., Подойницына О.А. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2021; 1:43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature.* 2011; 477:462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
- Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(Pt. 4):397–407. DOI: 10.1099/jmm.0.023051-0.
- Waldor M.K., Tschäpe H., Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 1996; 178(14):4157–65. DOI: 10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996.
- Hochhut B., Waldor M.K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC*. *Mol. Microbiol.* 1999; 32(1):99–110. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01330.x.
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры. *Генетика.* 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
- Pant A., Bag S., Saha B., Verma J., Kumar P., Banerjee S., Kumar B., Kumar Y., Desigamani A., Maiti S., Maiti T.K., Banerjee S.K., Bhadra R.K., Koley H., Dutta S., Nair G.B., Ramamurthy T., Das B. Molecular insights into the genome dynamics and interactions between core and acquired genomes of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(38):23762–73. DOI: 10.1073/pnas.2006283117.
- Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2002; 184(15):4259–69. DOI: 10.1128/JB.184.15.4259-4269.2002.
- Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., Fondi M., Taviani E., Fani R., Colombo M.M., Colwell R.R., Balloux F. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014; 5(4):e01356-14. DOI: 10.1128/mBio.01356-14.
- Wozniak R.A.F., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G., Déry C., Burrus V., Waldor M.K. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5(12):e1000786. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000786.
- Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J., Waldor M.K. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4):3054–7. DOI: 10.1128/AEM.72.4.3054-3057.2006.
- Wang R., Yu D., Yue J., Kan B. Variations in SXT elements in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in China. *Sci. Rep.* 2016; 6:22733. DOI: 10.1038/srep22733.
- Подшивалова М.В., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT-типа. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 19(3):34–9.
- Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Титова С.В. Распространенность ICE элементов различных типов у *V. cholerae*. *Здоровье населения и среда обитания.* 2018; 1:33–5.
- Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Bochalgin N.O., Mironova L.V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 78:104096. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104096.
- Онищенко Г.Г., Беляев Е.Н., Москвитина Э.А., Резайкин В.И., Ломов Ю.М., Мединский Г.М. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее. Ростов н/Д: Полиграф; 1995. 120 с.
- Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю., Gladkikh A.S., Балахонов С.В. Генетическое разнообразие *Vibrio cholerae* O1 El Tor при эпидемических осложнениях в Сибирском и Дальневосточном регионах. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.17116/molgen201937041165.
- Москвитина Э.А., Мазрухо А.Б., Адаменко О.Л., Кругликов В.Д. Холера в начале XXI века. Прогноз на глобальном уровне. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; 1:11–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(11)-11-16.
- Sarkar A., Morita D., Ghosh A., Chowdhury G., Mukhopadhyay A.K., Okamoto K., Ramamurthy T. Altered integrative and conjugative elements (ICEs) in recent *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera cases, Kolkata, India. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2072. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02072.
- Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdullah A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of Cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.
- Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., Rakesh A., Assiri A.M., Sharma N.C., Kariuki S., Pourshafie M.R., Rauzier J., Abubakar A., Carter J.Y., Wamala J.F., Seguin C., Bouchier C., Malliavin T., Bakshi B., Abulmaali H.H.N., Kumar D., Njoroge S.M., Malik M.R., Kiiru J., Luquero F.J., Azman A.S., Ramamurthy T., Thomson N.R., Quilici M.L. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565:230–233. DOI: 10.1038/s41586-018-0818-3.
- Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop-Lafourcade B.M., Sapriel G., Page A.L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.L., Fournier J.M., Dougan G., Grimont P.A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici M.L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science.* 2017; 358:785–89. DOI: 10.1126/science.aad5901.

#### References

- Kaper J.B., Morris J.G., Levine M.M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–86. DOI: 10.1128/CMR.8.1.48.
- Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Levchenko D.A., Yanovich E.G., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I., Podoinitsyna O.A. [Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2021; (1):43–51. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51.
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens

- J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477:462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
4. Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(Pt. 4):397–407. DOI: 10.1099/jmm.0.023051-0.
5. Waldor M.K., Tschäpe H., Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 1996; 178(14):4157–65. DOI: 10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996.
6. Hochhut B., Waldor M.K. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into prfC. *Mol. Microbiol.* 1999; 32(1):99–110. DOI: 10.1046/j.1365-2958.1999.01330.x.
7. Smirnova N.I., Zadnova S.P., Agafonov D.A., Shashkova A.V., Cheldyshova N.B., Cherkasov A.V. [Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in natural strains of cholera agent]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2013; 49(9):1036–47. DOI: 10.7868/S0016675813090087.
8. Pant A., Bag S., Saha B., Verma J., Kumar P., Banerjee S., Kumar B., Kumar Y., Desigamani A., Maiti S., Maiti T.K., Banerjee S.K., Bhadra R.K., Koley H., Dutta S., Nair G.B., Ramamurthy T., Das B. Molecular insights into the genome dynamics and interactions between core and acquired genomes of *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(38):23762–73. DOI: 10.1073/pnas.2006283117.
9. Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2002; 184(15):4259–69. DOI: 10.1128/JB.184.15.4259-4269.2002.
10. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., Fondi M., Taviani E., Fani R., Colombo M.M., Colwell R.R., Balloux F. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio*. 2014; 5(4):e01356-14. DOI: 10.1128/mBio.01356-14.
11. Wozniak R.A.F., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G., Déry C., Burrus V., Waldor M.K. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5(12):e1000786. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000786.
12. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J., Waldor M.K. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4):3054–7. DOI: 10.1128/AEM.72.4.3054-3057.2006.
13. Wang R., Yu D., Yue J., Kan B. Variations in SXT elements in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in China. *Sci. Rep.* 2016; 6:22733. DOI: 10.1038/srep22733.
14. Podshivalova M.V., Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Lopasteyskaya Ya.A., Viktorov D.V. [Characteristics of antibiotic resistant strains of *Vibrio cholerae* carrying SXT type integrative conjugative elements]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2014; 19(3):34–9.
15. Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Oleynikov I.P., Titova S.V. [Prevalence of ICE elements of different types in *V. cholerae*]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2018; (1):33–5.
16. Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Bochalgin N.O., Mironova L.V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 78:104096. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104096.
17. Onishchenko G.G., Belyaev E.N., Moskvitina E.A., Rezaikin V.I., Lomov Yu.M., Medinsky G.M. Cholera in Dagestan: Past and Present. Rostov-on-Don: “Polygraph”; 1995. 120 p.
18. Mironova L.V., Ponomareva A.S., Khunkheeva Zh.Yu. [Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 El Tor during epidemic complications in Siberian and the Far Eastern regions]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics Microbiology and Virology]*. 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.17116/molgen201937041165.
19. Moskvitina E.A., Mazrukho A.B., Adamenko O.L., Kruglikov V.D. [Cholera in the early XXI century: global prognosis]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2012; (1):11–6. DOI: 10.21055/0370-1069-2012-1(111)-11-16.
20. Sarkar A., Morita D., Ghosh A., Chowdhury G., Mukhopadhyay A.K., Okamoto K., Ramamurthy T. Altered integrative and conjugative elements (ICEs) in recent *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera cases, Kolkata, India. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2072. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02072.
21. Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdullah A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of Cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.
22. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., Rakesh A., Assiri A.M., Sharma N.C., Kariuki S., Pourshafie M.R., Rauzier J., Abubakar A., Carter J.Y., Wamala J.F., Seguin C., Bouchier C., Malliavin T., Bakhshi B., Abulmaali H.H.N., Kumar D., Njoroge S.M., Malik M.R., Kiiru J., Luquero F.J., Azman A.S., Ramamurthy T., Thomson N.R., Quilici M.L. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019; 565:230–233. DOI: 10.1038/s41586-018-0818-3.
23. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop-Lafourcade B.M., Sapriel G., Page A.L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.L., Fournier J.M., Dougan G., Grimont P.A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici M.L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017; 358:785–89. DOI: 10.1126/science.aad5901.

**Authors:**

Rybal'chenko D.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Fedorov A.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

**Об авторах:**

Рыбалыченко Д.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.