

А.А.Горяев, С.П.Заднова, А.В.Шубина, Я.М.Краснов, Н.И.Смирнова

## ИЗМЕНЕННЫЕ ВАРИАНТЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ, ВЫДЕЛЕННЫЕ НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

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

Проведен ретроспективный генетический анализ штаммов холерного вибриона, вызвавших вспышки и спорадические случаи холеры на территории Российской Федерации с 1993 по 2006 год. Установлено, что уже с 1993 г. заболевание вызывали измененные штаммы *Vibrio cholerae* биовара эльтор, содержащие в геноме профага СТХф ген *ctxB* классического типа, кодирующий В-субъединицу холерного токсина. Кроме того, обнаружено два штамма, у которых в геноме профага присутствовал ген *rstR* классического типа.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae*, профаг СТХф, измененные варианты.

В настоящее время известно более 200 серогрупп холерных вибрионов, однако возбудителем холеры являются только токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. На основании фенотипических и генетических признаков холерные вибрионы O1 серогруппы разделяют на два биовара – классический и эльтор. Штаммы классического биовара были, по-видимому, возбудителями первых шести пандемий холеры (1817–1923 гг.), в то время как штаммы биовара эльтор вызвали седьмую пандемию, начавшуюся в 1961 г. и продолжающуюся по настоящее время [1, 4]. Фенотипические различия штаммов двух биоваров связаны со способностью эльтор вибрионов продуцировать термолabileмный гемолизин, агглютинировать куриные эритроциты, ферментировать глюкозу до образования ацетилметилкарбинола в реакции Фогес-Проскауэра, расти на средах, содержащих полимиксин В, и лизироваться диагностическим холерным бактериофагом эльтор. Несмотря на значительные фенотипические различия, сравнительный генетический анализ штаммов двух биоваров показал высокую степень сходства их геномов [3]. Выявленные различия связаны с неодинаковыми нуклеотидными последовательностями гена *tcpA*, основного белка токсин-корегулируемых пилей адгезии, необходимого холерным вибрионам для колонизации кишечника человека, гена *rstR*, репрессора профага СТХф, а также гена *hlyA*, ответственного за синтез термолabileмного гемолизина. Кроме того, разная нуклеотидная последовательность гена *ctxB* у холерных вибрионов классического и эльтор биоваров (две нуклеотидные замены в 115 и 203 положениях у вибрионов эльтор) определяет биосинтез холерного токсина (ХТ) разных типов – 1-го и 2-го. Также в геноме *V. cholerae* биовара эльтор присутствуют два острова пандемичности (VSP-I и VSP-II) и гены *rstC* и *rtxC*, входящие в состав профага RS1φ и RTX-оперона [1, 3].

Вместе с тем, по литературным данным, известно, что начиная с 1991 г. в странах Юго-Восточной Азии обнаружены атипичные штаммы *V. cholerae* биовара эльтор, отличительной особенностью которых явилось наличие аллелей классического типа в

генах *tcpA*, *rstR* и *ctxB*. При этом некоторые штаммы совмещали фенотипические признаки классического и эльтор биоваров. Такие измененные штаммы эльтор вибрионов, отличающиеся повышенной вирулентностью, стали доминирующими и вытеснили типичные эльтор вибрионы на территории стран Азии и Африки [9, 10].

Целью данной работы был ретроспективный генетический анализ штаммов *V. cholerae* биовара эльтор, выделенных с 1993 по 2006 год в период эпидемических вспышек и при единичных заносах холеры на территорию Российской Федерации.

### Материалы и методы

В работе были использованы 10 клинических штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий «Микроб». В качестве контрольных штаммов использовали *V. cholerae* M818 биовара эльтор и *V. cholerae* 569В классического биовара. Для культивирования бактерий применяли бульон и агар LB (pH 7,2), а также бульон АК1 (pH 8,4).

Определение чувствительности к холерным диагностическим фагам, продукции гемолизина, чувствительности к полимиксину В и реакцию Фогес-Проскауэра проводили согласно МУК 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры».

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в микропробирках объемом 600 мкл на амплификаторе «PTC-150» (MJ Research, США) и iCycler IQ5 (Bio-Rad, США). В реакционную смесь объемом 15 мкл (2,5 мкл буфера 3а – 0,67 М Трис-НСl pH 8,4, 0,166 М (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,1 % Twin 20, 200 мкг/мл BSA, 0,02 М MgCl<sub>2</sub>; 2,5 мкл смеси 2 мМ dNTP («Сибэнзим»); 0,25 мкл 5 ед/мкл Taq-полимеразы («Бионем»); по 0,5 мкл специфических праймеров; и 8,75 мкл деионизированной воды) добавляли 10 мкл анализируемой ДНК. Последовательности праймеров, использованные в работе, представлены в табл. 1.

Секвенирование генов *rstR* и *ctxB* проводили на приборе «CEQ8000» (Beckman Coulter, США). Для

Результаты и обсуждение

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидных праймеров, использованные в работе

| Название             | Последовательность (5'-3') | Ссылка             |
|----------------------|----------------------------|--------------------|
| <i>ctxA-F</i>        | CGGGCAGATTCTAGACCTCCTG     | [5]                |
| <i>ctxA-R</i>        | CGATGATCTTGGAGCATCCCCAC    |                    |
| <i>ctxB-F</i>        | ATGATTAATAAATAATTTGG       | Рассчитан авторами |
| <i>ctxB-R</i>        | TAAATTTGCCATACTAATTG       |                    |
| <i>Ig-1-F</i>        | GAGCCTGTGACACTCACCTTGTAT   | [2]                |
| <i>rstR-1F-clas</i>  | CTTCTCATCAGCAAAGCCTCCATC   |                    |
| <i>rstR-2F-eltor</i> | GCACCATGATTTAAGATGCTC      |                    |
| <i>rstA-3R</i>       | TCGAGTTGTAATTCATCAAGAGTG   |                    |
| <i>Fw-con</i>        | ACTATCTTCAGCATATGCACATGG   | [8]                |
| <i>Rv-clas</i>       | CCTGGTACTTCTACTTGAAACG     |                    |
| <i>Rv-eltor</i>      | CCTGGTACTTCTACTTGAAACA     |                    |
| <i>rtxC-F</i>        | CGACGAAGATCATTGACGAC       | [7]                |
| <i>rtxC-R</i>        | CATCGTCGTTATGTGGTTGC       |                    |
| <i>rstC-1</i>        | AACAGCTACTGGCTTATTC        | [12]               |
| <i>rstC-2</i>        | TGAGTTGCGGATTTAGGC         |                    |
| <i>tcpA-F</i>        | CACGATAAGAAAACCGGTCAAGAG   | [6]                |
| <i>tcpA-R-eltor</i>  | CGAAAGCACSTTCTTCACGTTG     |                    |
| <i>tcpA-R-clas</i>   | TTACCAAATGCAACGCCGAATG     |                    |

сравнения использовали нуклеотидные последовательности изучаемых генов штаммов *V. cholerae* N16961 биовара эльтор и *V. cholerae* O395 классического биовара, представленные в GenBank. Анализ последовательностей ДНК осуществляли с использованием программ «Genetic Analysis System Software Version 9.0» и «Mega4» [11].

Для проведения анализа нами были использованы штаммы, выделенные от больных во время эпидемических вспышек холеры в Дагестане (1993 г.), Приморье (1997 г.) и Казани (2001 г.), а также при единичных заносах холеры в Пермь (1993 г.), Белорецк (2004 г.), Тверь (2005 г.) и Мурманск (2006 г.).

При изучении фенотипических свойств установлено, что все анализируемые изоляты относятся к штаммам холерного вибриона биовара эльтор: чувствительны к эльтор и резистентны к классическому диагностическим холерным бактериофагам, растут на среде с полимиксином В, продуцируют гемолизин и образуют ацетилметилкарбинол из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра (табл. 2).

На следующем этапе был проведен ПЦР-анализ, который показал наличие у всех штаммов генов *ctxA*, *rstC* и *rtxC*. При использовании аллель-специфических праймеров было установлено присутствие у всех изучаемых штаммов генов *tcpA* и *rstR* эльтор типа или *tcpA<sup>El</sup>* и *rstR<sup>El</sup>* (табл. 2). Однако в хромосоме двух штаммов – *V. cholerae* M1266 и M1293, наряду с геном *rstR<sup>El</sup>*, также присутствовал *rstR* классического типа или *rstR<sup>Class</sup>* (табл. 2). Для выявления генотипа *ctxB* был проведен Mismatch Amplification Mutation Assay PCR (МАМА-PCR), позволяющий дифференцировать однонуклеотидные различия в положении 203 гена *ctxB*. По результатам МАМА-PCR-анализа все изучаемые штаммы содержали *ctxB* классического типа или *ctxB<sup>Class</sup>* (табл. 2).

Для подтверждения полученных результатов нами было проведено секвенирование генов *rstR* и *ctxB*. Анализ нуклеотидных последовательностей подтвердил данные ПЦР-анализа. Ген *rstR* штаммов

Таблица 2

Фенотипические и генетические особенности штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара эльтор, выделенные на территории Российской Федерации с 1993 по 2006 гг.

| Штамм  | Место выделения   | Год выделения | Биовар       | Фенотип* |            |     |              | Генотип**   |             |             |             |             |             |
|--------|-------------------|---------------|--------------|----------|------------|-----|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|        |                   |               |              | фаг С    | фаг эльтор | Ф-П | полимиксин В | <i>ctxA</i> | <i>ctxB</i> | <i>rstR</i> | <i>tcpA</i> | <i>rstC</i> | <i>rtxC</i> |
| M1266  | Пермь             | 1993          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El/Class    | El          | +           | +           |
| M1293  | Дагестан          | 1994          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El/Class    | El          | +           | +           |
| P17647 | Красноярский край | 1997          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| P17644 | Красноярский край | 1997          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M1344  | Казань            | 2001          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M1345  | Казань            | 2001          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M1349  | Казань            | 2001          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M1429  | Белорецк          | 2004          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M1430  | Тверь             | 2005          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| P18899 | Мурманск          | 2006          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | Class       | El          | El          | +           | +           |
| M818   | Саратов           | 1970          | эльтор       | R        | S          | +   | R            | +           | El          | El          | El          | +           | +           |
| 569В   | Индия             | 1948          | Классический | S        | R          | -   | S            | +           | Class       | Class       | Class       | -           | -           |

\* R или S – резистентность или чувствительность к полимиксину или к диагностическим холерным бактериофагам С (классическому) или эльтор; Ф-П – реакция Фогес-Проскауэра;

\*\* Class – аллель классического биовара, El – аллель биовара эльтор.

|        |            |            |             |            |              |            |             |             |            |             |             |            |            |     |
|--------|------------|------------|-------------|------------|--------------|------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------------|-----|
|        | 10         | 20         | 30          | 40         | 50           | 60         | 70          | 80          | 90         | 100         | 110         | 115        | 120        | 130 |
| N16961 | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M818   | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| O395   | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| 569B   | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1266  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1293  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| P17644 | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| P17647 | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1344  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1345  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1349  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1429  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| M1430  | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
| P18899 | ATGATTAAT  | TAAAATTTGG | TGTTTTTTTT  | ACAGTTTTAC | TATCTTCAGC   | ATATGCACAT | GGAACACCTC  | AAAATAATTAC | TGATTTGTGT | GCAGAATACC  | ACAAACACACA | AATATATACG | CTAAATGATA |     |
|        | 140        | 150        | 160         | 170        | 180          | 190        | 200         | 203         | 210        | 220         | 230         | 240        | 250        | 260 |
| N16961 | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M818   | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| O395   | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| 569B   | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1266  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1293  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| P17644 | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| P17647 | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1344  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1345  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1349  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1429  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| M1430  | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
| P18899 | AGATATTTTC | GTATACAGAA | TCTCTAGCTG  | GAAAAAGAGA | GATGGCTATC   | ATTACTTTTA | AGAAATGGTGC | AACTTTTCAA  | GTAGAAATAC | CAGGTAGTCA  | ACATATAGAT  | TCACAAAAAA | AAGCGATTGA |     |
|        | 270        | 280        | 290         | 300        | 310          | 320        | 330         | 340         | 350        | 360         | 370         |            |            |     |
| N16961 | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M818   | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| O395   | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| 569B   | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1266  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1293  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| P17644 | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| P17647 | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1344  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1345  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1349  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1429  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| M1430  | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |
| P18899 | AAGGATGAAG | GATACCCTGA | GGATTGCGATA | TCTTACTGAA | GCTAAAATGTCG | AAAAGTTATG | TG/TATGGAAT | AATAAAAACGC | CTCATGCGAT | TGCCCGCAATT | AGTATGGCAA  | ATTAA      |            |     |

Выровненные нуклеотидные последовательности генов *ctxB* изучаемых штаммов *V. cholerae*.

Последовательности генов *ctxB* штаммов N16961 биовара эльтор и O395 классического биовара взяты для сравнения из GenBank

*V. cholerae* P17647, P17644, M1344, M1345, M1349, M1429, M1430 и P18899 был полностью идентичен последовательности гена *rstR<sup>El</sup>* штамма *V. cholerae* N16961 эльтор биовара, представленной в GenBank, а также последовательности этого гена контрольного штамма *V. cholerae* M818. У штаммов *V. cholerae* M1266 и M1293, выделенных соответственно в Перми (1993 г.) и Дагестане (1994 г.), присутствовали два аллеля гена *rstR*, один из которых был идентичен гену *rstR<sup>El</sup>* штаммов N16961 и M818 биовара эльтор, а другой – гену *rstR<sup>Class</sup>* штаммов O395 и 569B классического биовара. При сравнении сиквенсов гена *ctxB* оказалось, что все исследуемые штаммы содержат в геноме профага СТХφ ген *ctxB<sup>Class</sup>*, так как в нуклеотидной последовательности этого гена в позициях 115 и 203 присутствует цитозин (рисунок).

Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают, что взятые для анализа клинические штаммы *V. cholerae*, выделенные на территории Российской Федерации во время эпидемических вспышек и при единичных заносах холеры в 1993–2006 гг. и относящиеся по фенотипическим признакам к эльтор биовару, являются измененными эльтор вариантами, так как содержат в геноме про-

фага СТХφ гены *rstR<sup>El</sup>* и *ctxB<sup>Class</sup>*, либо *rstR<sup>El</sup>/rstR<sup>Class</sup>* и *ctxB<sup>Class</sup>*. Наличие у двух штаммов *V. cholerae* M1266 и M1293 гена *rstR* двух биоварспецифических аллелей, возможно, связано с присутствием в их геноме двух различных профагов СТХφ (СТХ<sup>El</sup>φ и СТХ<sup>Class</sup>φ), которые могут располагаться тандемно на одной хромосоме, либо раздельно на разных хромосомах.

На основании представленных результатов можно предположить, что начиная с 1993 г. все эпидемические вспышки и единичные завозные случаи холеры были вызваны измененными штаммами *V. cholerae* биовара эльтор, содержащими ген *ctxB<sup>Class</sup>*. Для подтверждения данного предположения необходимо дальнейшее исследование большего количества штаммов. Тем не менее, полученные данные указывают на необходимость создания новых генодиагностических препаратов для своевременного выявления измененных вариантов возбудителя холеры.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Смирнова Н.И., Кутырев В.В. Эволюция генома возбудителя холеры. Мол. генет., микробиол. и вирусол. 2004; 4:3–13.
2. Bhattacharya T., Chatterjee S., Maiti D., 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. Environ. Microbiol. 2006; 8:526–34.
3. Chun J., Grim C.J., Hasan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J., et al. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009; 106(36):15442–7.
4. Faruque S.M., Nair G.B. Molecular ecology of toxigenic *Vibrio cholerae*. Microbiol. Immunol. 2002; 46:59–66.
5. Fields P.I., Popovic T., Wachsmuth K., Olsvik O. Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. J. Clin. Microbiol. 1992; 30(8):2118–21.
6. Keasler S.P., Hall R.H. Detecting and biotyping *Vibrio cholerae* O1 with multiplex polymerase chain reaction. Lancet. 1993; 341(8861):1661.
7. Kumar P., Jain M., Goel A.K., Bhadauria S., Sharma S.K., Kamboj D.V., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. J. Med. Microbiol. 2009; 58:234–8.
8. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M., et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. Microbiol. Immunol. 2008; 52:314–7.
9. Nair G.B., Faruque S.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; 40:3296–9.
10. Safa A., Sultana J., Cam P.D., et al. Classical cholera toxin producing *Vibrio cholerae* O1 hybrid El Tor strains in Asia and Africa. Emerg. Infect. Dis. 2008; 14:987–8.
11. Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 2007, 24(8):1596–9.
12. Waldor M.K., Rubin E.J., Gregory D.N. et al. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTX $\phi$  are encoded by regions RS2. Mol. Microbiol. 1997; 24:917–26.

A.A.Goryaev, S.P.Zadnova, A.V.Shubina, Ya.M.Krasnov, N.I.Smirnova

**Altered Variants of Cholera Agent Isolated in the Territory of the Russian Federation**

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

Carried out was the retrospective genetic analysis of cholera vibrio strains which caused the outbreaks and sporadic cases of cholera in the territory of the Russian Federation from 1993 to 2006. It was elucidated that beginning from 1993 the disease had been caused by the altered strains of *V. cholerae* El Tor containing *ctxB* gene of classical type, encoding B subunit of cholera toxin, in their CTX $\phi$  prophage genome. In addition, identified were two strains whose prophage genome contained classical type *rstR* gene.

*Key words:* *Vibrio cholerae*, CTX $\phi$  prophage, altered variants.

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

1. Smirnova N.I., Kutyrev V.V. [Evolution of the cholera agent genome]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2004; 4:3–13.

**Authors:**

Goryaev A.A., Zadnova S.P., Shubina A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru)

**Об авторах:**

Горяев А.А., Заднова С.П., Шубина А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: [microbe@san.ru](mailto:microbe@san.ru)

Поступила 26.09.10.