

ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА ОСТРОВОВ ПАТОГЕННОСТИ
НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *Vibrio cholerae* O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР© 2020 г. Н. И. Смирнова¹, *, А. А. Крицкий¹, Ж. В. Альхова¹, Е. Ю. Агафонова¹,
Е. Ю. Щелканова¹, Д. В. Баданин¹, В. В. Кутырев¹¹Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”, Саратов, 410005 Россия

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила в редакцию 23.09.2019 г.

После доработки 31.10.2019 г.

Принята к публикации 13.11.2019 г.

Представлены результаты сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей островов патогенности (ОП) VP1-1 и VP1-2 43 штаммов нетоксигенных холерных вибрионов. Установлено, что они, отличаясь друг от друга по составу и структуре генома этих ОП, образуют три генетически разные группы ($ctxA^-tcpA^+VP1-2^+$, $ctxA^-tcpA^+VP1-2del^+$ и $ctxA^-tcpA^-VP1-2del^+$), различающиеся по адаптивному потенциалу. Обнаружено, что уровень варибельности генома ОП, обусловленной точечными мутациями и делециями разной протяженности, был неодинаков. Нуклеотидная последовательность структурных и регуляторных генов патогенности VP1-1, присутствующего в хромосоме нетоксигенных вибрионов $ctxA^-tcpA^+$, была в основном идентична таковой референсного токсигенного штамма. Было выявлено лишь небольшое число полиморфных сайтов (5) с единичными нуклеотидными заменами в генах *acfB*, *acfC*, *tcpA*, *tcpF*, *tcpH*. В то же время нестабильность генома VP1-2, проявляющаяся в образовании делеций разной длины (31131–49986 тпн) и возникновении множественных однонуклеотидных замен во всех сохранившихся генах, была весьма выраженной. Впервые установили, что потеря ДНК VP1-2 коррелировала с появлением множественных замен в его генах утилизации аминокислот и сиаловых кислот, локализованных в области *nan-nag* (57–274 замен), включая ген *nanH*. Обнаружено 12 ранее не описанных аллельных вариантов гена *nanH*. Большое генетическое разнообразие этих генов, значимых для выживания вибрионов в разных экологических нишах, является, видимо, одной из возможных причин высокого адаптивного потенциала *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^-VP1-2del^+$, широко распространенных в водной среде. На основе анализа нуклеотидных последовательностей гена *nanH* из VP1-2, а также шести генов “домашнего хозяйства” проведен кластерный анализ, определивший филогенетические связи разных групп нетоксигенных штаммов между собой и с токсигенными. Обнаружена генетическая близость нетоксигенных вибрионов $ctxA^-tcpA^+VP1-2^+$ и $ctxA^-tcpA^+VP1-2del^+$ с возбудителем холеры. Полученные ранее неизвестные сведения о структуре ОП нетоксигенных вибрионов не только способствуют более глубокому пониманию молекулярных механизмов возникновения генетически разнообразных штаммов с разным адаптивным потенциалом. Нетоксигенные штаммы с установленной структурой генома, не требующие удаления при его редактировании ключевых генов вирулентности, могут быть востребованы при создании нового поколения живых холерных вакцин.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, нетоксигенные штаммы, острова патогенности, варибельность генома, нуклеотидные замены, делеция, филогенетические связи.

DOI: 10.31857/S0016675820080147

Холерные вибрионы относятся к виду *Vibrio cholerae*, который состоит из более 200 O-серологических групп. Среди них только *V. cholerae* O1-серогруппы классического и Эль Тор биоваров стали причиной семи пандемий холеры, унесших миллионы человеческих жизней [1]. Вместе с тем биовар Эль Тор генетически неоднороден и включает холерные вибрионы с разным патогенным потенциалом — как токсигенные эпидемически опасные штаммы, вызвавшие текущую, седьмую, пандемию холеры (с 1961 г. по настоящее время),

так и нетоксигенные изоляты, которые могут вызывать единичные случаи, а также локальные вспышки острых кишечных инфекций (ОКИ) [2–5]. Разные патогенные свойства токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор обусловлены содержанием в их геноме различных наборов генов вирулентности. В связи с широким распространением гетерогенных популяций нетоксигенных штаммов в водных экосистемах России, несущих в геноме разные гены патогенности, существует немалый риск возникновения диа-

рейных заболеваний различной сложности, что требует постоянного мониторинга за этим возбудителем и оценки его патогенного потенциала.

Секвенирование полного генома *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор показало присутствие в клетках двух кольцевых хромосом (большой и малой), в состав которых, помимо генов “домашнего хозяйства” (housekeeping genes), входят различные мобильные генетические элементы (МГЭ) [6]. Патогенность возбудителя холеры является полидетерминантным свойством, в реализации которого принимают участие многие гены. В геноме токсигенных штаммов ключевые гены вирулентности, эпидемичности (пандемичности) и персистенции размещены на различных МГЭ. Среди них наиболее значимыми для возбудителя холеры являются профаг СТХφ, острова патогенности (ОП) VPI-1 и VPI-2 (от *Vibrio pathogenicity island*), острова пандемичности VSP-I и VSP-II (от *Vibrio seventh pandemic island*), остров персистенции в окружающей среде EPI (от environmental persistence island) [7–10]. К генам, абсолютно необходимым для развития инфекционного процесса при холере, относятся кластер генов *tcpA–tcpF*, входящий в состав ОП VPI-1 и определяющий биосинтез токсин-корегулируемых пилей (или TSP от toxin-coregulated pilus), а также гены *ctxAB*, размещенные в геноме профага СТХφ и кодирующие холерный токсин (или СТ от cholera toxin) [11–14]. Продукты этих генов обеспечивают реализацию двух основных этапов инфекционного процесса – колонизацию патогеном тонкого кишечника в организме хозяина и развитие острой профузной диареи.

Принципиальное отличие нетоксигенных вибрионов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих в России, от токсигенных – отсутствие в их геноме профага СТХφ с генами СТ и островов пандемичности VSP-I и VSP-II [15]. Что касается островов патогенности, то геномы разных популяций нетоксигенных штаммов различались между собой по их содержанию. Нетоксигенные вибрионы с ОП VPI-1 выделяются довольно редко, тогда как большинство вибрионов лишены этого участка ДНК [3, 4, 15, 16]. Второй ОП – VPI-2, впервые обнаруженный лишь у токсигенных штаммов, впоследствии был выявлен и у нетоксигенных вибрионов [15–19].

Роль ОП в патогенезе холеры, вызываемой токсигенными холерными вибрионами, хорошо изучена. Установлено, что функциональная значимость VPI-1 (41.3 тпн) состоит не только в том, что входящие в его состав гены *tcpA–F* кодируют TSP, необходимые для колонизации вибрионами тонкого кишечника. Эти пили служат также в качестве рецептора для фага вирулентности СТХφ, что определяет возможность формирования токсигенных клонов из нетоксигенных за счет фаго-

вой конверсии [3, 20]. Кроме того, геном VPI-1 содержит гены, кодирующие дополнительные факторы патогенности, а также регуляторные гены, контролирующие экспрессию различных генов вирулентности на уровне транскрипции (рис. 1,а) [12, 21–23]. Геном VPI-2 (57.3 тпн) включает в себя три основные области ДНК, содержащие гены, связанные с системой рестрикции–модификации первого типа (VC1764–VC1769), с метаболизмом сialовых кислот (VC1773–VC1784), а также гены, гомологичные генам фага Mu (VC1791–VC1799) (рис. 1,б). Среди них наиболее значимыми для выживания вибрионов в разных экологических нишах (в водной среде и организме человека) являются гены утилизации аминокислот и сialовых кислот, используемых в качестве альтернативного источника углерода и азота [17, 18, 24]. Нейраминидаза, кодируемая геном *nanH* (VC1784), наиболее важна для проявления вирулентных свойств. В кишечнике человека этот фермент, расщепляя полисialоганглиозиды до моносialоганглиозидов GM1, являющегося рецептором для холерного токсина, усиливает его действие [18]. В то же время до сих пор отсутствует полное представление о структуре и функции островов патогенности нетоксигенных штаммов, различающихся между собой по наличию ОП VPI-1 и относящихся к разным генотипам (*ctxA⁺tcpA⁺* и *ctxA⁺tcpA⁻*). Вместе с тем в нуклеотидной последовательности их ОП могут возникать разные мутации, вызванные действием стрессовых факторов водной среды, которые могут влиять на патогенные и адаптивные свойства различных популяций. В этой связи представлял интерес сравнительный анализ структуры ОП нетоксигенных штаммов для оценки их вариабельности и поиск факторов, определяющих разный адаптивный потенциал вибрионов с различным генотипом. Ранее мы секвенировали полные геномы ряда нетоксигенных штаммов и выявили наличие делеций в VPI-2 [25]. Однако расширенный анализ этих мутаций и их распространенность среди разных популяций нетоксигенных вибрионов, циркулирующих в водоемах России, до сих пор не проведен. Кроме того, нет единого мнения о происхождении нетоксигенных вибрионов с разным составом ОП.

Настоящая работа посвящена изучению вариабельности нуклеотидной последовательности ОП VPI-1 и VPI-2 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор разных генотипов и выяснению их филогенетических связей между собой.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы V. cholerae, условия культивирования. В работе использовали 53 токсигенных и нетоксигенных штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из воды открытых водоемов (табл. 1). Штаммы получали из Государствен-

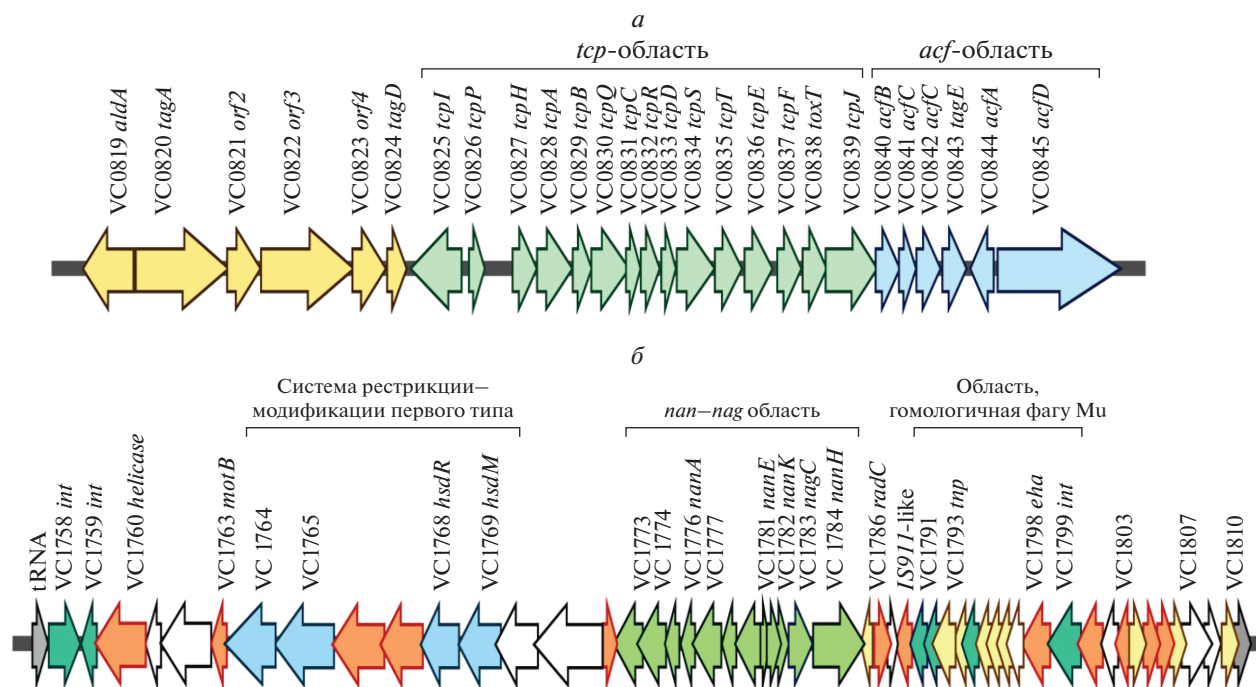


Рис. 1. Схематическое изображение структуры генома острова патогенности VPI-1 (а) и VPI-2 (б) *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор по [18, 22] с модификацией.

ной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ “Микроб”. Бактерии выращивали в бульоне и на агаре Luria–Bertani (LB) при 37°C в течение 18–20 ч. Для анализа генома ОП использовали нуклеотидные последовательности полных геномов исследуемых штаммов, определенных нами (51 штамм) или взятых из базы данных NCBI GenBank (табл. 1).

Выделение и очистку геномной ДНК проводили из бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора QIAamp DNA mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с протоколом производителя и методическими указаниями [26]. Клетки предварительно были обработаны мертиолятом натрия до конечной концентрации 1 : 10000 (0.01%) и прогеты при 56°C в течение 30 мин.

Полногеномное секвенирование, сборка и аннотация. Полногеномное секвенирование проводили на приборе “Ion PGM” (Thermo Fisher Scientific, США) по технологии ионного полупроводникового секвенирования. Первичную обработку данных выполняли с помощью пакета программ Ion Torrent Suite Software версии 5.10.1 (Thermo Fisher Scientific). Сборку полногеномных последовательностей *de novo* осуществляли при помощи программы Newbler gs Assembler версии 2.6 (454 Life Sciences, США).

Идентификацию геномных островов проводили путем картирования полученных полногеномных последовательностей на референсную последовательность штамма N16961 (номер доступа в базе

данных GenBank AE003852/AE003853) с помощью пакета программ DNASTAR Lasergene версии 11.2 (DNASTAR Inc., США).

Определение полиморфизма исследуемых генов, включая количество аллелей, индекс полиморфизма локусов, среднее число синонимичных/несинонимичных замен на синонимичный/несинонимичный сайт, проводили при помощи программ MEGA версии 6.0 (Megasoftware, США) и DNASEquence Polymorphism версии 5.10.01 (Университет Барселоны, Испания).

Мультилокусное секвенс-типирование проводили на основе анализа нуклеотидных последовательностей шести генов “домашнего хозяйства” (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*), взятых из секвенированных последовательностей полных геномов исследуемых штаммов. Размеры генов, выбранных для анализа, составили: *cat* – 2175 пн (позиция в геноме 1671041–1673215), *chi* – 2550 пн (позиция в геноме 33035–35584), *dnaE* – 3495 пн (позиция в геноме 2397732–2401226), *gyrB* – 2418 пн (позиция в геноме 11103–13520), *pgm* – 1647 пн (позиция в геноме 2256154–2257800), *recA* – 1065 пн (позиция в геноме 574696–575760). Определение аллелей данных генов осуществляли при помощи онлайн сервиса PubMLST (<https://pubmlst.org/>).

Филогенетический анализ токсигенных и нетоксигенных штаммов осуществляли последовательно, предварительно выравнивая нуклеотидные последовательности генов в соответствии с алго-

Таблица 1. Штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, полногеномные последовательности которых использованы в работе

Штамм	Место и год выделения	Генотип	№ доступа в GenBank
M988	Туркмения, 1965	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	LQBX00000000*
114	Украина, 1999	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NDXP00000000*
M1332	Россия, Челябинск, 2000	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	PYCE00000000*
M1337	Россия, Астрахань, 2000	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NEEB00000000*
P18748	Россия, Сочи, 2004	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NIFH00000000*
102	Украина, 2006	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NDXO00000000*
M1457	Россия, Калмыкия, 2009	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLH00000000*
M1467	Россия, Калмыкия, 2010	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLI00000000*
5U	Украина, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NDXM00000000*
M1506	Россия, Калмыкия, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTZX00000000*
M1516	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTZY00000000*
M1517	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTZZ00000000*
M1526	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VUAA00000000*
29	Россия, Калмыкия, 2013	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VUAB00000000*
132	Россия, Калмыкия, 2013	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VUAC00000000*
M1522	Россия, Татарстан, 2014	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	LQCA00000000*
8	Россия, Калмыкия, 2014	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	PYCF00000000*
433	Россия, Сочи, 2015	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	NEDW00000000*
2843	Россия, Калмыкия, 2016	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	PYCG00000000*
3178	Россия, Калмыкия, 2017	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	PYCH00000000*
120	Россия, Калмыкия, 2018	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLJ00000000*
136	Россия, Калмыкия, 2018	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLK00000000*
2439	Россия, Калмыкия, 2018	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLL00000000*
3017	Россия, Калмыкия, 2018	<i>ctxA⁻ tcpA⁻</i>	VTLM00000000*
M139	Туркмения, 1965	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LRMU00000000*
M299	Туркмения, 1965	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LQYZ00000000*
M1395	Россия, Астрахань, 1981	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LQBY00000000*
M1399	Россия, Астрахань, 1982	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LQBZ00000000*
85U	Украина, 1995	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	NEDU00000000*
P18778	Россия, Ростов-на-Дону, 2005	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	NIFI00000000*
M1501	Россия, Калмыкия, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LRAE00000000*
M1504	Россия, Калмыкия, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VTLN00000000*
M1505	Россия, Калмыкия, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VTLO00000000*
M1507	Россия, Калмыкия, 2011	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VTLP00000000*
M1518	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LQZR00000000*
111	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VTLQ00000000*
M1519	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VUAD00000000*
M1527	Россия, Калмыкия, 2012	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	VUAE00000000*
M1524	Россия, Калмыкия, 2013	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	LQZS00000000*

Таблица 1. Окончание

Штамм	Место и год выделения	Генотип	№ доступа в GenBank
2613	Россия, Калмыкия, 2015	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	PYCA00000000*
2687	Россия, Калмыкия, 2015	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	PYCB00000000*
2688	Россия, Калмыкия, 2015	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	PYCC00000000*
124	Россия, Калмыкия, 2017	<i>ctxA⁻ tcpA⁺</i>	PYCD00000000*
N16961	Бангладеш, 1975	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	AE003852/AE003853**
M1293	Россия, Дагестан, 1994	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	JFFW00000000*
P17644	Россия, Ачинск, 1997	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	JRTW00000000*
CIRS 101	Бангладеш, 2002	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	CWPG00000000**
M1429	Россия, Башкортостан, 2004	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	LAEM00000000*
P18899	Россия, Мурманск, 2006	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	LAKM00000000*
L3226	Россия, Москва, 2010	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	JDVX00000000*
KM76	Украина, 2011	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	MPVL00000000*
M1509	Россия, Москва, 2012	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	NEDZ00000000*
3265-80	Россия, Москва, 2015	<i>ctxA⁺ tcpA⁺</i>	JRQL00000000*

* Нуклеотидные последовательности геномов, секвенированные авторами. ** Нуклеотидные последовательности геномов, взятые из NCBI GenBank.

ритмом MAFFT, с дальнейшим построением филогенетических деревьев по методу Байеса в программе Ugene версии 1.32 (UniPro, Россия), используя модель нуклеотидных замен GTR с гамма-коррекцией.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Сравнение генома острова патогенности VPI-1 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор

Согласно результатам сравнительного биоинформационного анализа все исследованные нетоксигенные штаммы *ctxA⁻ tcpA⁺* (19 изолятов) содержали в геноме весь блок генов, входящих в состав VPI-1 (VC0819–VC0845), который имел тот же самый сайт внедрения в хромосому, что и в референсном токсигенном штамме N16961. В то же время нуклеотидная последовательность отдельных генов VPI-1 нетоксигенных изолятов отличалась от таковой этих же генов референсного штамма. Так, при сопоставлении последовательностей генов, наиболее важных для проявления патогенных свойств, выявили следующее. В нуклеотидной последовательности генов *acfB* и *acfC*, входящих в кластер генов *acf*, кодирующих компоненты дополнительного фактора колонизации ACF (от accessory colonization factor) (рис. 1, а), присутствовали полиморфные позиции (730 и 378), в которых находились транзиции С→Т и G→А соответственно (табл. 2). Вместе с тем краевой ген *acfD* из этого же кластера не содержал никаких

полиморфных сайтов и его последовательность была идентична таковой референсного штамма. Такая же картина была характерна и для другого краевого гена *aldA*, кодирующего фермент альдегиддегидрогеназу (рис. 1). Что касается центрального фрагмента VPI-1, включающего кластер генов *tcp*, состоящий из ключевых структурных и регуляторных генов вирулентности, то среди изученных нуклеотидных последовательностей генов *tcpI*, *tcpF*, *tcpP*, *tcpH*, *toxT* мы выявили единичные полиморфные сайты, содержащие точечные замены, лишь в генах *tcpF* и *tcpH* (табл. 2). Следует особо отметить присутствие одной и той же замены С→G в позиции 146 в регуляторном гене *tcpH* у 13 штаммов из 20 изученных, выделенных в основном в одном и том же регионе – Республике Калмыкия. Полиморфные локусы в этом же гене у других штаммов, изолированных на территории Туркмении, Астрахани, Ростова-на-Дону, отсутствовали (табл. 1, 2). Это означает, что нетоксигенные штаммы из различных популяций, циркулирующих в разных регионах, могут отличаться друг от друга полиморфизмом нуклеотидных последовательностей одних и тех же генов. Отдельный интерес вызывал сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *tcpA*, кодирующего основную субъединицу TSP – ключевого фактора колонизации, поскольку ранее среди нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор *ctxA⁻ tcpA⁺*, выделенных в Китае из различных объектов окружающей среды, впервые были выявлены изоляты с разными аллелями этого гена – аллелем *tcpA^{ET}*, идентичным ре-

ференсному токсигенному штамму N16961, и аллелем *tcpA*^{ETvar}, отличающимся от первого наличием 26 синонимичных и несинонимичных однонуклеотидных замен [16]. Однако практически все изученные штаммы имели тот же аллель гена *tcpA*, что и возбудитель холеры, а именно *tcpA*^{ET}. Только у одного изолята (M1501) в *tcpA* обнаружили единичную точечную мутацию (транспозицию А→Т) в положении 626. Поиски аллеля *tcpA*^{ETvar} среди сравниваемых штаммов были безуспешными (табл. 2). Замены оснований в генах *tcpA*, *tcpF*, *tcpH* и *acfB* сопровождалась заменой соответствующей аминокислоты, однако эти замены, видимо, не влияли на функциональные свойства белков. Таким образом, уровень варибельности генома ОП VPI-1 нетоксигенных штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺ оказался невысоким. Среди десяти генов, расположенных в разных фрагментах его генома и наиболее значимых для проявления патогенных свойств, мы обнаружили лишь пять полиморфных сайтов в генах кластеров *acf* и *tcp*, содержащих единичные однонуклеотидные замены транспозиции и транзиции. При этом у всех исследуемых штаммов, независимо от года и географического региона выделения, точечные мутации в измененных генах *tcpF*, *acfB* и *acfC* были локализованы в одних и тех же позициях. Основные структурные и регуляторные гены вирулентности *tcpA*, *tcpP* и *toxT* были в целом идентичны таковым референсного штамма.

Нестабильность острова патогенности VPI-2 нетоксигенных штаммов

Проведенный нами анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 43 нетоксигенных и 10 токсигенных, включая референсный штамм (табл. 1), показал, что VPI-2, кодирующий 52 ORFs, у всех сравниваемых штаммов включен в один и тот же хромосомный сайт — в ген *tRNA*^{ser}. Однако нетоксигенные штаммы оказались гетерогенными по структуре генома этого мобильного элемента. Среди 19 штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺, имеющих в хромосоме VPI-1, у 14 (или 73.7%) нуклеотидная последовательность этого ОП была идентична таковой токсигенных штаммов. В то же время у пяти штаммов (или 26.3%) были полностью утрачены два его фрагмента — содержащий гены системы рестрикции и модификации типа I (VC1759–VC1772) и гены, гомологичные генам фага Mu (VC1792–VC1803). Общая протяженность делеции составила 33965–38426 пн. Сохранились лишь краевые гены (VC1757–VC1758 и VC1805–VC1810) и гены центрального фрагмента (VC1773–VC1790), включающего ген *nanH*, кодирующий нейраминидазу, и прилегающую к нему область *nan*–*nag* (рис. 2). Этот ОП с редуцированным геномом обозначили как VPI-2del. Иную картину наблюдали

при анализе нуклеотидной последовательности VPI-2 у нетоксигенных штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁻, лишенных VPI-1 (изучено 24 изолята). В отличие от штаммов с VPI-1 частота утраты фрагментов VPI-2 в этой группе составляла 100%. Это означает, что все изученные штаммы имели VPI-2del. При этом у разных штаммов размеры утраченного участка ДНК были неодинаковы. Наиболее протяженные делеции VPI-2 (47120–49986 тпн), захватывающие все три основных района VPI-2, включая центральный участок ДНК с генами *nan*–*nag*, были обнаружены у трех штаммов (M1332, 132 и 433), выделенных в разные годы (2000–2015 гг.). Сохранились лишь единичные краевые гены. Однако даже при такой масштабной перестройке генома ОП у двух штаммов не был утрачен ген *nanH* (2423 пн). Только у штамма 433 в гене *nanH* была протяженная делеция размером 2311 пн, что составляло 95.4% от размера нативного гена *nanH* (рис. 2). Делетируемые участки VPI-2 других штаммов отличались друг от друга по длине, которая варьировала от 31131 до 38730 тпн вследствие полной или частичной утраты двух больших фрагментов ДНК, содержащих гены рестрикции и модификации, а также гены фагового происхождения. Вместе с тем в геноме этих штаммов делеции не затронули практически все гены, входящие в состав центральной области *nan*–*nag*, включая ген нейраминидазы (рис. 2).

Поскольку сохранение 11 генов из области *nan*–*nag* почти во всех нетоксигенных штаммах с делетированным VPI-2, возможно, было связано с их функциональной значимостью для клетки, мы сравнили их нуклеотидную последовательность с таковой 10 токсигенных штаммов (табл. 1). Оказалось, что эти гены вибрионов с интактным геномом VPI-2 были идентичны таковым токсигенных. В отличие от них у всех нетоксигенных штаммов с делетированным геномом VPI-2 во всех генах этой области, включая *nanH*, были обнаружены множественные нуклеотидные замены (от 57 до 274). Детальный анализ нуклеотидной последовательности гена *nanH* выявил в нем 57–114 полиморфных сайтов, содержащих 47–83 синонимичных и 11–31 несинонимичных однонуклеотидных замен (табл. 3). Из них 66 полиморфных сайтов были идентифицированы среди штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁺, тогда как у штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁻ их число варьировало в пределах 57–114. Это означает, что появление точечных мутаций в гене *nanH* коррелировало с возникновением крупных делеционных перестроек в геноме VPI-2. Таким образом, при биоинформационном анализе полногеномных последовательностей ДНК 43 нетоксигенных штаммов впервые выявлена выраженная нестабильность генома VPI-2, проявляющаяся в образовании делеций разной длины, что сопровождалось возникновением множественных однонуклеотидных замен во всех генах области *nan*–*nag*,

Таблица 2. Позиции однонуклеотидных замен в генах VP1-1 нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор *ctxA*⁻*tcpA*⁺

Штамм	Гены VP1-1 и полиморфные позиции										
	<i>aldA</i> 1512 пн	<i>tcpA</i> * 675 пн	<i>tcpF</i> * 1017 пн	<i>tcpI</i> 1863 пн	<i>tcpP</i> 666 пн	<i>tcpH</i> * 411 пн	<i>toxT</i> 1512 пн	<i>acfB</i> * 1881 пн	<i>acfC</i> ** 762 пн	<i>acfD</i> 4563 пн	
M139	0	0	842*G→A	0	0	0	0	730 C→T	378 G→A	0	
M299	0	0	842G→A	0	0	0	0	730C→T	378G→A	0	
M1395	0	0	842G→A	0	0	0	0	730C→T	378G→A	0	
M1399	0	0	842G→A	0	0	0	0	730C→T	378G→A	0	
85U	0	0	842G→A	0	0	146 C→G	0	730C→T	378G→A	0	
P18778	0	0	842G→A	0	0	0	0	730C→T	378G→A	0	
M1501	0	626A→T	842G→A	0	0	0	0	730C→T	378G→A	0	
M1504	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1505	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1507	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1518	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
111	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1519	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1527	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
M1524	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
2613	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
2687	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
2688	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	
124	0	0	842G→A	0	0	146C→G	0	730C→T	378G→A	0	

* Отмечены несинонимичные замены в генах в указанных позициях.

** Показаны синонимичные замены в гене *acfC* в указанной позиции.

включая ген *nanH*. Сравнение последовательностей VPI-2 нетоксигенных штаммов с генотипами *ctxA⁻tcpA⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻* показало, что одним из их отличий является наиболее частая утрата последним участков ДНК этого ОП.

Аллельное разнообразие гена *nanH* нетоксигенных штаммов

Детальный анализ нуклеотидных последовательностей гена *nanH* нетоксигенных штаммов указывал на присутствие у них аллельных вариантов этого гена, сходство которых с аллелем токсигенных штаммов (*nanH1*) составляло 96.3–97.9%. При сравнении последовательности *nanH* среди 42 штаммов обнаружили 13 его аллелей, из которых 12 были выявлены впервые. Частота их встречаемости была разной. Наиболее распространенным оказался аллель *nanH1*. Этот аллель, присущий токсигенным штаммам, был идентифицирован у всех нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* (14 изолятов) с интактным VPI-2. Сравнительно высокую частоту распространения имели также аллели *nanH3*, *nanH6* и *nanH8*, среди которых первый был обнаружен у всех штаммов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺*. Другие аллели (*nanH4*, *nanH5*, *nanH7*, *nanH9–nanH14*) были выявлены в одном или двух случаях (табл. 3). Ранее идентифицированный у нетоксигенных штаммов аллель *nanH2* [27] не был найден среди изученных изолятов. Таким образом, полученные данные показали достаточно высокую консервативность гена *nanH* нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* с интактным VPI-2 и его идентичность этому гену токсигенных штаммов. В отличие от них нуклеотидная последовательность гена *nanH* нетоксигенных штаммов с редуцированным геномом VPI-2 (*ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺*) была весьма вариабельна.

Филогенетический анализ VPI-2 нетоксигенных штаммов

Далее, для выяснения изменений структуры VPI-2 в процессе эволюции холерных вибрионов мы построили дендрограмму по результатам сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей его гена *nanH* у двух токсигенных и 42 нетоксигенных штаммов разных генотипов. В результате показали ее четкое разделение на два основных кластера (рис. 3). Первый из них содержал токсигенные штаммы *ctxA⁺tcpA⁺*, а также 14 нетоксигенных *ctxA⁻tcpA⁺*, имеющих VPI-1 и интактный VPI-2 с аллелем *nanH1* в его составе. Второй кластер был представлен 28 нетоксигенными штаммами разных генотипов (*ctxA⁻tcpA⁺*, *ctxA⁻tcpA⁻*), имеющими существенные отличия от штаммов первого кластера – наличие делеции разной длины в VPI-2 и множественных мутаций в гене *nanH*.

Этот кластер включал, по крайней мере, три подгруппы (а, б, в), штаммы которых имели 12 других аллелей *nanH*, отличающихся от аллеля *nanH1* присутствием 57–114 полиморфных сайтов. Интерес представлял тот факт, что подгруппа “а”, содержащая пять штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*, в геноме которых присутствовали VPI-1 и VPI-2del, филогенетически оказалась наиболее близкой к нетоксигенным штаммам с VPI-1 и интактным VPI-2 из кластера I. Это может означать, что указанные штаммы, выделенные в разное время (1965–2005 гг.) и имеющие аллель *nanH3*, были производными нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* с интактным VPI-2, сформированными в результате утраты ими больших участков ДНК этого ОП. Отличия штаммов из других подгрупп кластера II от большинства изолятов подгруппы “а” определялись отсутствием VPI-1 и увеличением числа полиморфных сайтов в гене *nanH* (рис. 3). Несмотря на большую вариабельность гена *nanH*, являющегося частью VPI-2, представленные данные позволяют говорить о следующих этапах преобразования этого ОП в процессе эволюции. Выявленная филогенетическая близость нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* с токсигенными может указывать на существование общей предковой формы, содержащей в геноме VPI-1 и VPI-2. Дивергенция токсигенных штаммов от нетоксигенных *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* была связана с приобретением первыми профага СТХφ и островов пандемичности VSP-I и VSP-II в результате горизонтального переноса генов. Дальнейший этап – дивергенция нетоксигенных вибрионов с другими генотипами (*ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺*) от нетоксигенных *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* коррелирует с несколькими событиями – как с сохранением VPI-1, но редукцией VPI-2, так и с последующей утратой VPI-1 и накоплением мутаций в сохранившихся генах VPI-2del.

Филогенетический анализ токсигенных и нетоксигенных штаммов методом MLST

Для подтверждения представленных выше филогенетических связей различных групп нетоксигенных штаммов между собой и с токсигенными провели мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) на основе анализа нуклеотидной последовательности шести генов (*dnaE*, *gyrB*, *recA*, *pgm*, *cat*, *chi*), локализованных в коровой части генома и кодирующих наиболее важные для обеспечения жизнедеятельности клетки белки (табл. 4). В результате анализа их аллельного профиля среди 52 изученных штаммов выявили 22 сиквенс-типа (ST) (табл. 4). Далее на основе байесовского анализа их нуклеотидных последовательностей провели реконструкцию филогенетического дерева токсигенных и нетоксигенных штаммов. Анализ дендрограммы филогенетического родства (рис. 4)

Таблица 3. Полиморфные сайты гена *nanH* токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор

Генотип штамма	Число штаммов	Число полиморфных сайтов	Нуклеотидные замены в полиморфных сайтах		K_n^*	K_s^{**}	K_n/K_s	Алель гена <i>nanH</i>
			несинонимичные (n)	синонимичные (s)				
<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	10	0	0	0	0	0	0	1
<i>ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺</i>	14	0	0	0	0	0	0	1
<i>ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	5	66	19	47	0.010	0.092	0.109	3
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	66	19	47	0.010	0.092	0.109	3
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	67	19	48	0.010	0.094	0.106	4
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	65	18	47	0.010	0.092	0.109	5
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	5	69	20	49	0.011	0.096	0.114	6
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	70	21	49	0.012	0.096	0.125	7
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	5	79	24	55	0.013	0.109	0.119	8
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	82	26	56	0.015	0.111	0.135	9
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	2	82	25	57	0.014	0.113	0.124	10
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	95	20	75	0.011	0.154	0.071	11
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	2	114	31	83	0.017	0.172	0.099	12
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	2	78	26	52	0.014	0.103	0.136	13
<i>ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺</i>	1	57	11	46	0.006	0.090	0.067	14

* K_n – среднее число несинонимичных нуклеотидных замен на несинонимичный сайт, ** K_s – среднее число синонимичных замен на синонимичный сайт.

Штамм	Размер делеции, пн	Число замен неспин./общее	Генотип	Алель гена <i>nanH</i>
N16961	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
3265--80	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M299	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
85U	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1504	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1505	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1507	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
111	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1519	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1527	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1524	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
2613	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
2657	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
2658	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
124	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M1518	0	0/0	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺</i>	1
M988	34875	67	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	4
M1332	49986	65	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	5
3178	35024	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
M139	34352	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
M1395	33513	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
M1399	34278	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
P18778	34348	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
M1501	33965	66	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	3
114	34255	69	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	6
P18748	34401	69	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	6
102	28931	69	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	6
M1457	27525	69	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	6
M1517	31131	70	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	7
2843	34288	69	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	6
M1337	36971	114	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	12
29	37932	114	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	12
M1467	38511	79	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	8
M1506	38565	79	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	8
132	46887	79	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	8
8	38081	79	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	8
120	38254	79	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	8
136	35009	82	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	9
M1516	34392	78	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	13
M1526	34532	78	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	13
2439	37888	82	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	10
3017	38277	82	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	10
5U	35392	57	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	14
M1522	36008	95	<i>ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺</i>	11

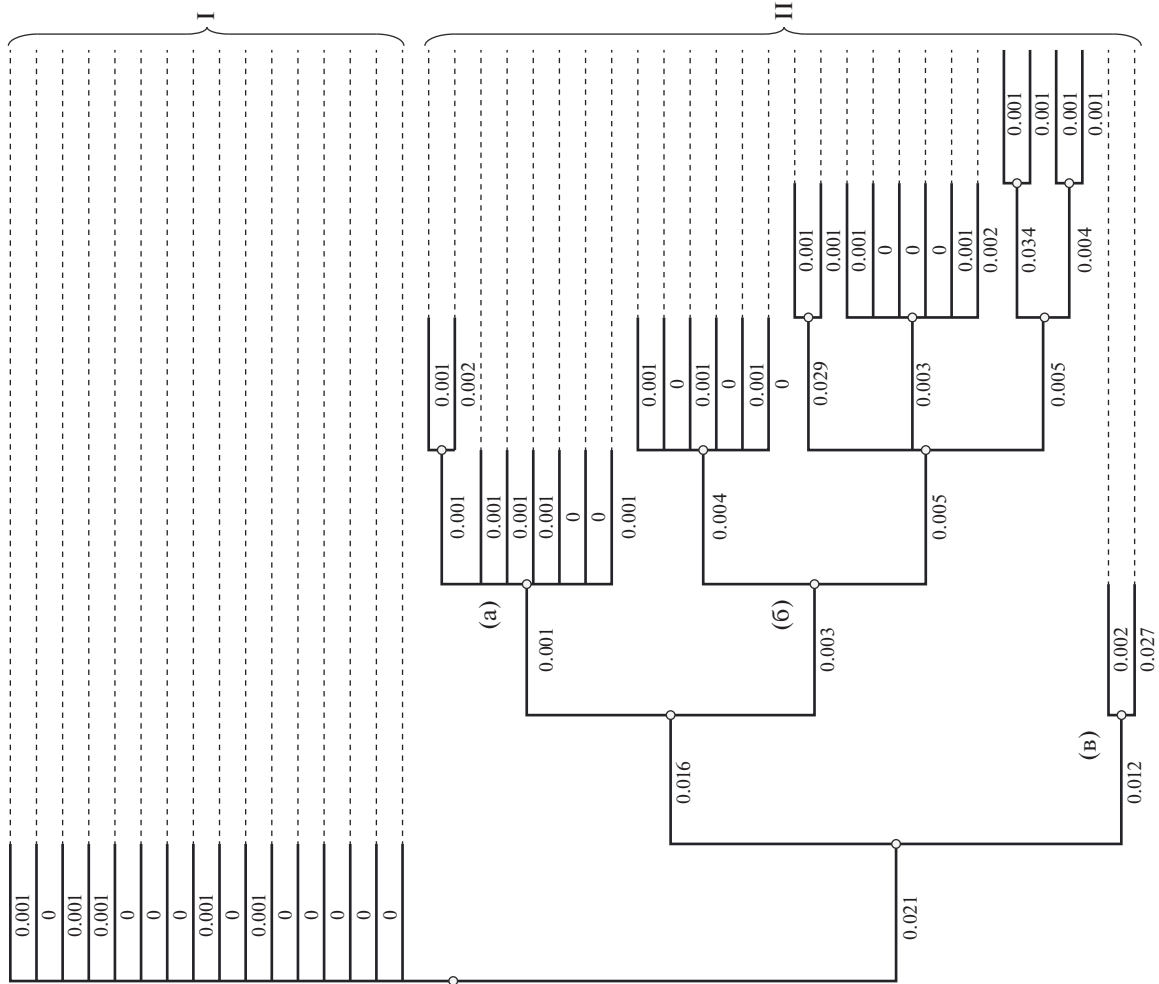


Рис. 3. Филогенетическое дерево *Vibrio cholerae* O1 бивара Эль Тор по данным байесовского анализа нуклеотидных последовательностей гена *nanH* из VPI-2 двух токсигенных *ctxA⁺tcpA⁺VPI-2⁺* и 42 нетоксигенных штаммов с разным генотипом: *ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺* и *ctxA⁺tcpA⁺VPI-2del⁺*. В основании ветвей указаны генетические расстояния, рассчитанные при помощи параметрической модели нуклеотидных замен GTR (General Time Reversible).

показал, что исследуемые штаммы образовали три основных кластера, коррелирующих с их генотипом. Первый кластер включал все токсигенные штаммы (*ctxA⁺tcpA⁺*), имеющие в 80.0% случаев идентичный сиквенс-тип (ST2) и содержащие в геноме оба ОП – VPI-1 и VPI-2. Филогенетически наиболее близкими к ним были нетоксигенные штаммы *ctxA⁻tcpA⁺*, сохранившие VPI-1 и вошедшие в состав кластера II. Однако эти штаммы оказались генетически неоднородными и, различаясь между собой по структуре VPI-2, образовали две подгруппы – “в” и “г”. В состав подгруппы “в” вошли все штаммы *ctxA⁻tcpA⁺* с интактным VPI-2, у 85.7% которых был один и тот же ST (4), в подгруппу “г” – штаммы *ctxA⁻tcpA⁺* с VPI-2del (ST7). Отражением дальнейших преобразований нетоксигенных вибрионов стали штаммы *ctxA⁻tcpA⁻*, распределившиеся в кластер III, особенностью которых было отсутствие в их геноме VPI-1, но наличие у всех VPI-2del. В этот кластер входили, по крайней мере, две подгруппы (“а” и “б”), отличительным признаком которых были другие ST-типы – ST8–ST22 (рис. 4). Таким образом, согласно полученным данным популяционная структура нетоксигенных вибрионов включает три основные группы, относящиеся к разным филогенетическим линиям: *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺*, *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺*. Различия в структуре их генома отражают, видимо, разные этапы их эволюции. Первый – дивергенция от общей предковой формы токсигенных и нетоксигенных вибрионов. Наиболее близкими к токсигенным оказались нетоксигенные вибрионы *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* и *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺*. Следующий этап эволюции нетоксигенных вибрионов, возможно, связан с утратой ими ОП VPI-1 и дальнейшей реорганизацией генома VPI-2.

ОБСУЖДЕНИЕ

При сравнении последовательностей геномов ОП VPI-1 и VPI-2 43 нетоксигенных вибрионов выявлена их вариабельность, обусловленная точечными мутациями и делециями разной протяженности. Однако уровень вариабельности этих ОП был неодинаков. Нуклеотидная последовательность VPI-1 вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺* отличалась от таковой референсного штамма в основном наличием единичных нуклеотидных замен, но их количество было невелико. Консервативность VPI-1 могла быть связана с его важной функциональной значимостью – обеспечением колонизации вибрионами кишечника человека с возможным последующим развитием ОКИ. В то же время вариабельность генома VPI-2 была существенной. Выраженная нестабильность генома VPI-2 проявлялась в образовании делеций разной длины. При этом было установлено, что одним из отличий не-

токсигенных штаммов с разными генотипами оказалась различная частота утраты этих участков ДНК – в 100.0% случаев у штаммов *ctxA⁻tcpA⁻* и только в 26.3% случаев у штаммов *ctxA⁻tcpA⁺*. Появление делеций в VPI-2, возможно, обусловлено незаконной рекомбинацией. Мы впервые обнаружили, что потеря участков ДНК VPI-2 коррелировала с возникновением множественных однонуклеотидных замен во всех сохранившихся генах области *nan–nag*, включая ген *nanH*. Такая ситуация, возможно, связана с утратой такими вибрионами редактирующих компонентов репаративных систем при реорганизации их генома, что характерно и для других бактерий [28, 29]. Но эти вопросы нуждаются в дальнейшем изучении. В результате анализа последовательностей гена *nanH* впервые выявили 12 его аллельных вариантов среди 42 изученных нетоксигенных штаммов. Обнаруженные нуклеотидные замены в аллельных вариантах гена *nanH* локализируются в основном в синонимичных сайтах и не приводят, видимо, к изменению функции кодируемого белка. Обнаруженные нами новые генетические различия нетоксигенных вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺* позволили выявить ранее неизвестные молекулярные механизмы формирования популяций с разным уровнем генетического разнообразия, что в значительной мере отражает их неодинаковый адаптивный потенциал. Так, одной из возможных причин высокого уровня адаптации к действию различных стрессовых факторов у вибрионов *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺* является большое генетическое разнообразие функционально значимых генов утилизации аминокислот и сиаловых кислот, локализованных в области *nan–nag* VPI-2del и обеспечивающих устойчивость к неблагоприятным факторам водной среды. В то же время у вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* эти гены в основном консервативны. Основным аргументом в пользу данного предположения является факт широкого распространения в водной среде холерных вибрионов *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺*, но довольно редкая встречаемость вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* [3, 4]. Таким образом, сравнительный анализ состава и структуры генома ОП показал, что изученные нетоксигенные штаммы представлены тремя генетически разными группами *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺*, *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2del⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺* с разным адаптивным потенциалом.

Филогенетический анализ, основанный на сравнении нуклеотидных последовательностей гена *nanH*, а также шести генов “домашнего хозяйства”, позволил выявить новые кластеры нетоксигенных штаммов с разной структурой VPI-2 и показать возможное происхождение нетоксигенных изолятов *ctxA⁻tcpA⁺VPI-2⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻VPI-2del⁺* от токсигенных, что согласуется с данными ряда исследователей.

Таблица 4. Аллельный полиморфизм генов “домашнего хозяйства” токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и их си-квенс-типы

Штаммы	Присутствие мобильных генетических элементов вирулентности			Аллельные профили генов “домашнего хозяйства”**							Число штаммов с указанным аллельным профилем	ST-тип
	СТХФ	VPI-1	VPI-2	<i>cat</i>	<i>chi</i>	<i>dnaE</i>	<i>gyrB</i>	<i>pgm</i>	<i>recA</i>			
Токсигенные	+	+	+	1;	1;	1;	1;	1;	1;	1;	1	1
	+	+	+	1;	1;	1;	1;	1;	2;	2;	8	2
	+	+	+	1;	1;	1;	1;	24;	2;	2;	1	3
Нетоксигенные	-	+	+	1;	4;	1;	5;	1;	6;	6;	12	4
	-	+	+	1;	4;	1;	5;	5;	6;	6;	1	5
	-	+	+	1;	4;	80;	5;	1;	6;	6;	1	6
Нетоксигенные	-	+	VPI-2del	1;	4;	1;	5;	1;	64;	64;	5	7
Нетоксигенные	-	-	VPI-2del	6;	5;	5;	6;	6;	7;	7;	4	8
	-	-	VPI-2del	6;	5;	5;	7;	6;	8;	8;	1	9
	-	-	VPI-2del	79;	5;	77;	6;	6;	51;	51;	1	10
	-	-	VPI-2del	89;	5;	4;	6;	61;	65;	65;	1	11
	-	-	VPI-2del	145;	131;	143;	64;	59;	62;	62;	1	12
	-	-	VPI-2del	65;	131;	143;	64;	59;	62;	62;	1	13
	-	-	VPI-2del	94;	26;	3;	54;	105;	142;	142;	2	14
	-	-	VPI-2del	143;	10;	10;	12;	11;	13;	13;	1	15
	-	-	VPI-2del	3;	2;	3;	2;	3;	4;	4;	1	16
	-	-	VPI-2del	64;	2;	108;	65;	96;	63;	63;	1	17
	-	-	VPI-2del	66;	59;	149;	65;	25;	63;	63;	1	18
	-	-	VPI-2del	94;	175;	62;	131;	92;	122;	122;	1	19
-	-	VPI-2del	144;	86;	19;	131;	129;	122;	122;	4	20	
-	-	VPI-2del	66;	56;	65;	65;	60;	63;	63;	1	21	
-	-	VPI-2del	64;	55;	65;	65;	60;	137;	137;	2	22	

* Гены кодируют: *cat* (2175 пн) – каталазу; *chi* (2550 пн) – хитиназу; *dnaE* (3495 пн) – α -субъединицу ДНК-полимеразы III; *gyrB* (2418 пн) – ДНК-гиразу; *pgm* (1647 пн) – фос-фоглюкомутазу; *recA* (1065 пн) – рекомбиназу A.

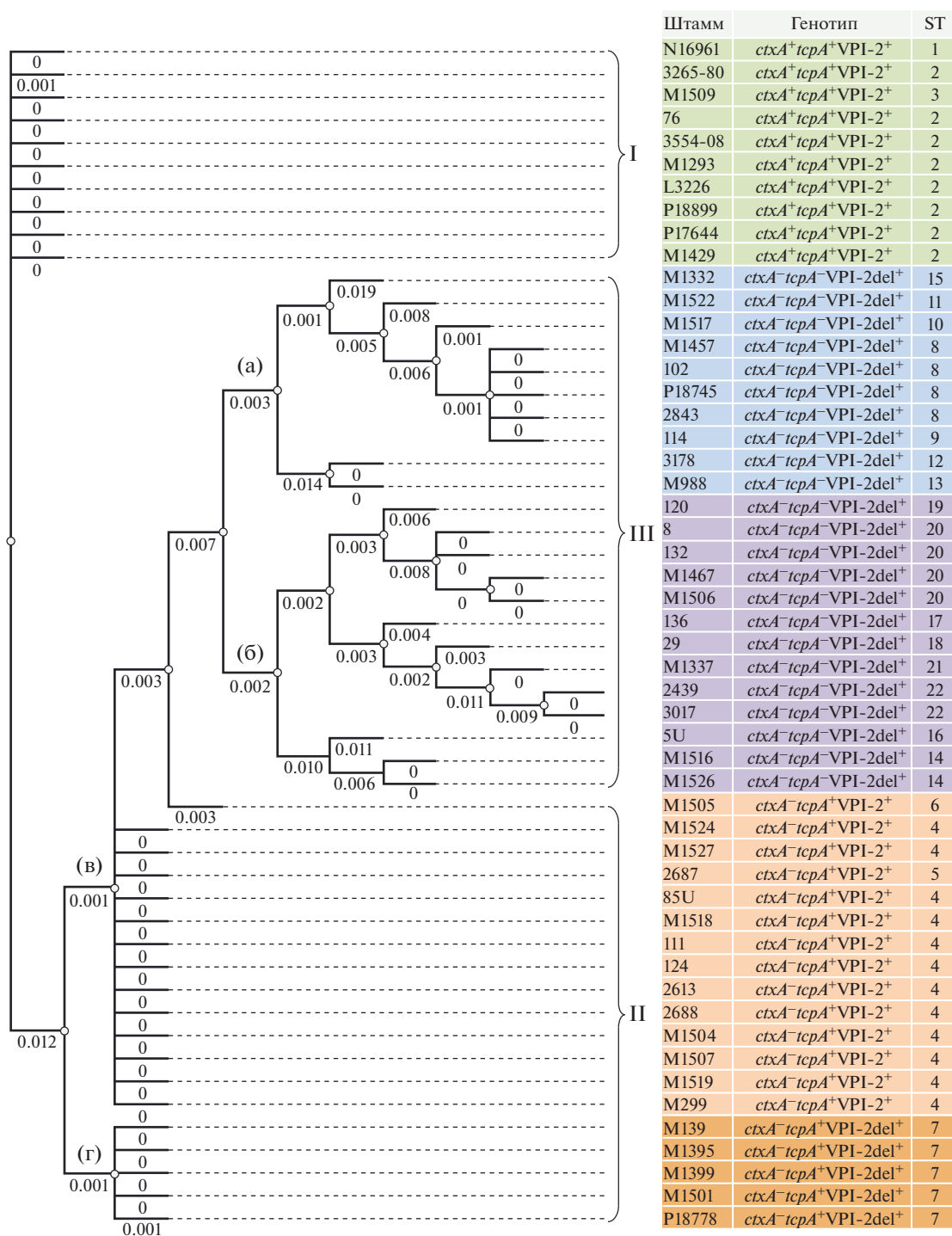


Рис. 4. Филогенетическое дерево *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор по данным байесовского анализа нуклеотидных последовательностей шести генов “домашнего хозяйства” (*cat*, *chi*, *dnaE*, *gyrB*, *pgm*, *recA*) 10 токсигенных штаммов *ctxA*⁺*tcpA*⁺VPI-2⁺ и 42 нетоксигенных штаммов с генотипами *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺, *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2del и *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2del. В основании ветвей указаны генетические расстояния, рассчитанные при помощи параметрической модели нуклеотидных замен GTR (General Time Reversible).

Полученные сведения о структуре ОП нетоксигенных вибрионов не только способствуют более глубокому пониманию молекулярных механизмов возникновения генетически разнообразных штам-

мов с разным адаптивным потенциалом. Выявленная корреляция между появлением в VPI-2 делеций и образованием точечных мутаций в гене *nanH* позволяет использовать нуклеотидную послед-

довательность этого гена в качестве нового генетического маркера для дифференциации нетоксигенных штаммов с различным адаптивным потенциалом. Кроме того, нетоксигенные штаммы с установленной структурой генома, не требующие удаления при его редактировании ключевых генов вирулентности, могут быть востребованы при создании нового поколения живых холерных вакцин.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaper J., Morris J., Jr., Levine M. Cholera // Clin. Microbiol. Rev. 1995. V. 8. № 1. P. 48–86.
2. Научная рабочая группа ВОЗ. Холера и другие диареи, вызываемые вибрионами // Бюл. ВОЗ. 1980. Т. 58. № 3. С. 277–296.
3. Faruque S.M., Asadulghani, Saha M.N. et al. Analysis of clinical and environmental strains of nontoxigenic *Vibrio cholerae* for susceptibility to CTXPhi: molecular basis for origination of new strains with epidemic potential // Infect. Immun. 1998. V. 66. № 12. P. 5819–5825.
4. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. Анализ результатов мониторинга холерных вибрионов в объектах окружающей среды на административных территориях России с помощью ГИС “Холера 1989–2014” // Пробл. особо опасных инфекций. 2017. № 4. С. 99–102.
5. Takemura T., Murase K., Maruyama F. et al. Genetic diversity of environmental *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Northern Vietnam // Infect. Genet. Evol. 2017. V. 54. P. 146–151. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.06.017>
6. Heidelberg J.F., Elsen J.A., Nelson W.C. et al. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* // Nature. 2000. V. 406. P. 477–483. <https://doi.org/10.1038/35020000>
7. Marsh J.W., Taylor R.K. Genetic and transcriptional analyses of the *Vibrio cholerae* mannose-sensitive hemagglutinin type 4 pilus gene locus // J. Bacteriol. 1999. V. 181. № 4. P. 1110–1117.
8. Dziejman M., Balon E., Boyd D. et al. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 3. P. 1556–1561. <https://doi.org/10.1073/pnas.042667999>
9. Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А. и др. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1036–1047.
10. Hu D., Liu B., Feng L. et al. Origins of the current seventh cholerae pandemic // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 48. P. 7730–7739. <https://doi.org/10.1073/pnas.1608732113>
11. Waldor M.R., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin // Science. 1996. V. 272. № 5270. P. 1910–1914. <https://doi.org/10.1126/science.272.5270.1910>
12. Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C. et al. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1998. V. 95. № 6. P. 3134–3139. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3134>
13. Faruque Sh.M., Mekalanos J.J. Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution // Trends Microbiol. 2003. V. 11. № 11. P. 505–510. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.09.003>
14. Ильина Т.С. Нитчатые бактериофаги и их роль в вирулентности и эволюции патогенных бактерий // Мол. генетика, микробиология и вирусология. 2015. Т. 30. № 1. С. 3–10.
15. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю. и др. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью // Генетика. 2016. Т. 52. № 9. С. 1029–1041.
16. Pang B., Yan M., Cui Z. et al. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization // J. Bacteriol. 2007. V. 189. P. 4837–4849. <https://doi.org/10.1128/JB.01959-06>
17. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates // Microbiology. 2002. V. 148. P. 3681–3693. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3681>
18. Jermyn W.S., Boyd E.F. Molecular evolution of *Vibrio* pathogenicity island-2 (VPI-2): mosaic structure among *Vibrio cholerae* and *Vibrio mimicus* natural isolates // Microbiology. 2005. V. 151. P. 311–322. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27621-0>
19. Siriphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S. et al. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand // PLoS One. 2017. V. 19. № 12(1):0169324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169324>
20. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr. et al. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria // Nature. 1999. V. 399. № 6734. P. 375–379. <https://doi.org/10.1038/20715>
21. Karaolis D.K.R., Lan R., Kaper J.B., Reeves P.R. Comparison of *Vibrio cholerae* pathogenicity islands in sixth and seventh pandemic strains // Infect. Immun. 2001. V. 69. № 3. P. 1947–1952. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1947-1952.2001>
22. Choi S.Y., Rashed S.M., Hasan N.A. et al. Phylogenetic diversity of *Vibrio cholerae* associated with endemic cholera in Mexico from 1991 to 2008 // mBio. 2016. V. 7. № 2.e02160–15. <https://doi.org/10.1128/mBio.02160-15>
23. Matson J.S., Withey J.H., DiRita V.J. Regulatory networks controlling *Vibrio cholerae* virulence gene expres-

- sion // *Infect. Immun.* 2007. V. 75. № 12. P. 5542–5549.
<https://doi.org/10.1128/IAI.01094-07>
24. *Almagro-Moreno S., Boyd E.F.* Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine // *Infect. Immun.* 2009. V. 77. № 9. P. 3807–3816.
<https://doi.org/10.1128/IAI.00279-09>
25. *Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Шелканова Е.Ю. и др.* Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран // *Мол. генетика, микробиология и вирусология.* 2018. № 2. С. 76–86.
26. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности: Методические указания 1.3.2569–09. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. 31 с.
27. *de Abreu Figueiredo S.C., Nevers-Borges A.C., Coelho A.* The neuraminidase gene is present in the non-toxigenic *Vibrio cholerae* Amazonia strain: a different allele in comparison to the pandemic strains // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 2005. V. 100. № 6. P. 563–569.
<https://doi.org/10.1590/s0074-02762005000600010>
28. *Moran N.A.* Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 7. P. 2873–2878.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.7.2873>
29. *Itoh T., Martin W., Nei M.* Acceleration of genomic evolution caused by enhanced mutation rate in endocellular symbionts // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 20. P. 12944–12948.
<https://doi.org/10.1073/pnas.192449699>

Variability of Pathogenicity Islands Genome of Non-Toxigenic Strains of *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor

N. I. Smirnova^{a,*}, A. A. Kritsky^a, J. V. Alkhova^a, E. Yu. Agafonova^a,
 E. Yu. Shchelkanova^a, D. V. Badanin^a, and V. V. Kutryev^a

^aRussian Research Anti-Plague Institute "Microbe," Saratov, 410005 Russia

*e-mail: rusrapi@microbe.ru

The results of comparative analysis of the nucleotide sequences of pathogenicity islands (PI) VPI-1 and VPI-2 of 43 strains of non-toxigenic cholera vibrios are presented. It was established that, differing from each other in the composition and structure of the genome of these IPs, they form three genetically different groups ($ctxA^-tcpA^+VPI-2^+$, $ctxA^-tcpA^+VPI-2del^+$ and $ctxA^-tcpA^-VPI-2del^+$), differing by adaptive potential. It was found that the level of variability of the IP genome due to point mutations and deletions of different lengths was not the same. The nucleotide sequence of the structural and regulatory pathogenicity genes of the VPI-1, which is present on the chromosome of non-toxigenic $ctxA^-tcpA^+$ vibrios, was basically identical to that of the reference toxigenic strain. Only a small number of polymorphic sites were revealed (5) with single nucleotide substitutions in the genes *acfB*, *acfC*, *tcpA*, *tcpF*, *tcpH*. At the same time, the instability of the VPI-2 genome, manifested in the formation of deletions of different lengths (31131–49986 kb) and the occurrence of multiple single nucleotide substitutions in all preserved genes, was very pronounced. For the first time, it was found that VPI-2 DNA loss correlated with the appearance of multiple substitutions in its genes encoding utilization of amino sugars and sialic acids located in the *nan-nag* region (57–274 substitutions), including the *nanH* gene. 12 previously undescribed allelic variants of the *nanH* gene were detected. Pronounced genetic diversity of these genes, which are significant for the survival of vibrios in different ecological niches, is probably one of the possible reasons for the high adaptive potential of *V. cholerae* O1 El Tor biovar $ctxA^-tcpA^-VPI-2del^+$, which are widespread in the aquatic environment. Based on the analysis of the nucleotide sequences of the *nanH* gene from VPI-2, as well as six "housekeeping" genes, a cluster analysis was carried out that determined the phylogenetic relationships of different groups of non-toxigenic strains with each other and with toxigenic ones. The genetic proximity of non-toxigenic vibrios $ctxA^-tcpA^+VPI-2^+$ and $ctxA^-tcpA^+VPI-2del^+$ with cholera agent was found. The received previously unknown data on the structure of the IP of non-toxigenic vibrios not only contribute to a deeper understanding of the molecular mechanisms of emergence of genetically diverse strains with different adaptive potentials. Non-toxigenic strains with the established genome structure that do not require the removal of key virulence genes in the course of their genome editing may be in demand when creating a new generation of live cholera vaccines.

Keywords: *Vibrio cholerae*, non-toxigenic strains, pathogenicity islands, genome variability, nucleotide substitutions, deletion, phylogenetic relationships.