

DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123

УДК 616.932:579.25

Л.В. Миронова, Н.О. Бочалгин, А.С. Гладких, С.И. Феранчук, А.С. Пономарева, С.В. Балахонов

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ПОЛОЖЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ СТРУКТУРЫ ГЕНОМОВ *ctxAB-tcpA*⁺ *VIBRIO CHOLERAЕ* ИЗ ПОВЕРХНОСТНЫХ ВОДОЕМОВ НА НЕЭНДЕМИЧНОЙ ПО ХОЛЕРЕ ТЕРРИТОРИИ*ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация*

Цель – анализ происхождения *ctxAB-tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* O1 El Tor из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории, а также их филогенетического родства с различными по эпидемической значимости группами штаммов на основе исследования структуры генов жизнеобеспечения и полных геномов. **Материалы и методы.** В исследование включено 25 штаммов *V. cholerae*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке, в том числе два *ctxAB-tcpA*⁺ штамма из поверхностных водоемов (Алтайский край, 2011 г.; Хабаровский край, 2013 г.). Для филогенетического анализа использованы геномы 36 штаммов *V. cholerae* из GenBank. MLST проводилось по генам *dnaE*, *cat*, *lap*, *pgm*, *recA*, *gyrB*, *chi*, MLST *in silico* – по генам *adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM*, *pyrC*. Реконструкция филогении осуществлялась на основании анализа SNP в геномах *V. cholerae* с использованием программы PhyML 3.0. **Результаты и обсуждение.** При MLST *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* O1 El Tor из поверхностных водоемов формируют самостоятельный генотип в группе токсигенных штаммов и спонтанных мутантов токсигенных штаммов. В *in silico* MLST *ctxAB-tcpA*⁺ изоляты демонстрируют принадлежность к ST75, характерному для US Gulf филогенетической линии. При SNP-типировании штаммы *ctxAB-tcpA*⁺ из поверхностных водоемов вошли в группу, основание которой представлено US Gulf *V. cholerae*, а изолят из Хабаровска (2013 г.) демонстрирует высокий уровень гомологии генома с US Gulf-подобным штаммом, выделенным в Китае (2009 г.). Установлена идентичность организации острова патогенности VPI-1 у штаммов из Хабаровска и Китая, а также наличие у них острова пандемичности VSP-I. Результаты свидетельствуют о принадлежности *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока к US Gulf филогенетической линии и, в совокупности с данными эпидемиологического анализа, позволяют судить об их завозном происхождении.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, мультилокусное секвенс-типирование, полногеномное секвенирование, филогенетический анализ.

Корреспондирующий автор: Миронова Лилия Валерьевна, e-mail: mironova-lv@yandex.ru.

Для цитирования: Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Феранчук С.И., Пономарева А.С., Балахонов С.В. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов *ctxAB-tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:115–123. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123

L.V. Mironova, N.O. Bochalgin, A.S. Gladkikh, S.I. Feranchuk, A.S. Ponomareva, S.V. Balakhonov

Phylogenetic Affinity and Genome Structure Features of *ctxAB-tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* from the Surface Waterbodies in the Territory that is Non-Endemic as Regards Cholera*Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation*

Abstract. Objective is analyzing the origin of the *ctxAB-tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated from the surface water bodies in the territory that is non-endemic of cholera; as well as investigating their phylogenetic relations to varying by epidemic significance groups of strains, based on the structure of housekeeping genes and whole genome structure. **Materials and methods:** we examined 25 *V. cholerae* strains, isolated in Siberia and Far East, including two *ctxAB-tcpA*⁺ strains from surface water sources (Altai Territory, 2011; Khabarovsk Territory, 2013). Phylogenetic analysis included genomes of 36 *V. cholerae* strains from GenBank. Multilocus sequence typing (MLST) was carried out based on *dnaE*, *cat*, *lap*, *pgm*, *recA*, *gyrB*, and *chi* genes; *in silico* MLST – *adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM* and *pyrC* genes. Reconstruction of phylogeny was performed based on the comparative analysis of core genome SNPs in PhyML 3.0. **Results and discussion.** MLST of *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* O1 El Tor strains from the surface water bodies revealed that such strains form an individual genotype in the cluster of toxigenic strains and spontaneous mutants of toxigenic strains. According to results of *in silico* MLST, *ctxAB-tcpA*⁺ isolates belong to ST75, common to US Gulf phylogenetic line. Based on SNP-typing, *ctxAB-tcpA*⁺ strains from the surface water sources were assigned to the group, originating from US Gulf *V. cholerae*, moreover isolate from Khabarovsk (2013) demonstrated high degree of genome homology with US Gulf-like strain from China (2009). For strains from Khabarovsk and China, we also showed the compositional identity of the pathogenicity island VPI-I and the presence of pandemicity island, VSP-1. The results testify to the fact that *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* strains, isolated in Siberia and Far East, originate from the US Gulf phylogenetic line. Furthermore, taking into account the results of epidemiological analysis, we can deduce that these strains are imported ones.

Keywords: *Vibrio cholerae*, multilocus sequence typing, whole genome sequencing, phylogenetic analysis.

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

Corresponding author: Lilia V. Mironova, e-mail: mironova-lv@yandex.ru.

Citation: Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Balakhonov S.V. Phylogenetic Affinity and Genome Structure Features of *ctxAB-tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* from the Surface Waterbodies in the Territory that is Non-Endemic as Regards Cholera. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; 1:115–123. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123

Received 18.12.19. Revised 25.12.19. Accepted 22.02.20.

Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>
Bochalgin N.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3053-6514>
Gladkikh A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>
Feranchuk S.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2774-4179>
Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>
Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

Внутривидовое разнообразие живых организмов, с одной стороны, рассматривается как потенциал эволюционных преобразований и, с другой – как основа сохранения вида в меняющихся условиях среды [1, 2]. Известно, что вид *Vibrio cholerae* характеризуется существенной гетерогенностью фенотипических и молекулярно-генетических свойств. В популяциях этиологического агента текущей пандемии холеры (токсигенного вибриона Эль Тор) установлена вариабельность структурной организации мобильных генетических элементов, детерминирующих биосинтез основных факторов патогенности возбудителя, обеспечивающих пандемический потенциал, резистентность микроорганизма к антибактериальным препаратам [3–6].

Наряду с указанными тенденциями, гетерогенность вибриона Эль Тор определяется существованием эпидемически неопасных вариантов, лишенных генов основных факторов патогенности – холерного токсина (*ctxAB*) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (*tcpA*). Такие варианты *V. cholerae* El Tor достаточно широко распространены и обнаруживаются в водных объектах на неэндемичных территориях в благополучный по холере период. Вместе с тем зарегистрированы случаи выделения штаммов, содержащих ген *tcpA* при отсутствии генетических детерминант холерного токсина (генотип *ctxAB-tcpA*⁺). *V. cholerae* с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ в 2005 г. послужили этиологическим агентом вспышки в г. Каменске Ростовской области (2 больных и 30 вибрионосителей) [7]. В поверхностных водоемах нетоксигенные вибрионы Эль Тор с геном *tcpA* обнаруживались в период указанной вспышки, а также в отдельных случаях при отсутствии больных холерой в ряде регионов Российской Федерации, в том числе в Алтайском и Хабаровском краях. Учитывая присутствие в геноме одного из ключевых генов патогенности возбудителя *ctxAB-tcpA*⁺, варианты холерного вибриона отнесены к потенциально эпидемически опасным [8, 9]. Г.Г. Онищенко и соавт. [8] установлено отсутствие у этой группы штаммов полноценных островов пандемичности, что, по заключению авторов, характерно для предпандемичных клонов возбудителя холеры Эль Тор. Позднее показано, что штаммы *ctxAB-tcpA*⁺ из поверхностных водоемов на фоне эпидблагополучия не содержат островов пандемичности, дистанцированы как от токсигенных, так и от отнесенных к производным токсигенных штаммов *ctxAB-tcpA*⁺ вибрионов и, соответственно, не представляют эпидемической опасности [10].

Вместе с тем, несмотря на комплексные исследова-

ния данной группы *V. cholerae* O1 El Tor, остается открытым вопрос об их происхождении и филогенетическом положении, а также значимости в инфекционной патологии. D. Hu *et al.* [11] при анализе эволюции возбудителя холеры Эль Тор показали, что этиологический агент текущей пандемии произошел от непатогенных предшественников с поэтапной диверсификацией и приобретением ассоциированных с патогенностью и пандемичностью мобильных элементов генома. Не исключено, что *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* могут быть производными клонов, сформировавшихся на отдельных этапах становления патогенного варианта возбудителя холеры Эль Тор.

С учетом этого цель настоящего исследования – анализ происхождения *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* O1 El Tor из поверхностных водоемов на неэндемичной по холере территории и их филогенетического родства с различными по эпидемической значимости группами штаммов на основе исследования структуры генов жизнеобеспечения и полных геномов.

Материалы и методы

Штаммы. В работе использовано 25 штаммов *V. cholerae* из коллекции музея живых культур ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт». Все штаммы хранились в лиофилизированном состоянии.

Выборка включала два штамма *V. cholerae* O1 El Tor с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ из поверхностных водоемов (обозначены как *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ): один – *V. cholerae* O1 El Tor И-1471 (Алтайский край, 2011 г.), второй – *V. cholerae* O1 El Tor И-1501 (Хабаровский край, 2013 г.). Для сравнительного анализа по структуре генов «домашнего хозяйства» в исследование включено три группы *V. cholerae*: спонтанные мутанты токсигенных штаммов (n=2), утратившие при хранении на питательных средах гены холерного токсина (генотип *ctxAB-tcpA*⁺, обозначены как *ctxAB-tcpA*⁺/СМ); токсигенные штаммы (n=11), изолированные от больных и из объектов окружающей среды в период эпидемических осложнений на Дальнем Востоке в 1999 г.; эпидемически неопасные вибрионы Эль Тор O1 серогруппы из поверхностных водоемов в благополучный по холере период (n=9) (табл. 1). Кроме того, определялась структура генов «домашнего хозяйства» штамма *V. cholerae* Classical 569B.

В реконструкцию филогении на основании анализа однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) в геномах, наряду с исследуемыми *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* O1 El Tor, включены представленные в GenBank

Таблица 1 / Table 1

Перечень и характеристика исследованных штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока

List and characteristics of the studied *V. cholerae* strains isolated in Siberia and Far East

Генотип штамма Strain genotype	Год выделения Year of isolation	Место выделения Area of isolation	Эпидемиологическая ситуация Epidemiological situation	Объект выделения Object of isolation	Количество Quantity
<i>ctxAB tcpA⁺/ЛПВ[*]</i> <i>ctxAB tcpA⁺/SW[*]</i>	2011	Барнаул Barnaul	Эпидемиологическая стабильность Epidemiological stability	ООС*** Environmental objects (EO)***	1
	2013	Хабаровский край Khabarovsk Territory		ООС EO	1
<i>ctxAB tcpA⁺/СМ**</i> <i>ctxAB tcpA⁺/SM</i>	1994	Омск Omsk	Завозной очаг Imported	Человек Patient	1
	1999	Южно-Сахалинск Yuzhno-Sakhalinsk	Вспышка Outbreak	ООС EO	1
<i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>	1972–1973	Омск, Новосибирск, Барнаул Omsk, Novosibirsk, Barnaul	Вспышка Outbreak	Человек Patient	2
				ООС EO	1
	1994	Новосибирск Novosibirsk	Завозной очаг Imported	Человек Patient	1
	1997	Иркутск Irkutsk	Завозной очаг Imported	Человек Patient	1
	1999	Владивосток Vladivostok	Завозной очаг Imported	Человек Patient	1
Владивосток, Южно-Сахалинск Vladivostok, Yuzhno-Sakhalinsk		Вспышка Outbreak	Человек Patient	3	
			ООС EO	2	
<i>ctxAB tcpA⁻</i>	2000–2010	Приморский край, Иркутск Primorsky Krai, Irkutsk	Эпидемиологическая стабильность Epidemiological stability	ООС EO	9

*ЛПВ – поверхностные водоёмы, **СМ – спонтанные мутанты токсигенных штаммов, ***ООС – объекты окружающей среды.

*SW – surface water bodies, **SM – spontaneous mutants of toxigenic strains, ***EO – environmental objects.

геномы 36 штаммов *V. cholerae* O1, секвенированные ранее [11–14], в том числе референсного штамма *V. cholerae* O1 N16961.

Экстракция ДНК осуществлялась с использованием набора «DneasyBlood&TissueKit» (Qiagen). Качество ДНК контролировалось в 0,9 % агарозном геле, концентрация – спектрофотометрически.

Мультилокусное секвенирование (MLST) *V. cholerae* выполнялось по схеме P. Garg *et al.* [15] с модификацией (исключение из анализа генов *rstA*, *gmd*). Определение нуклеотидной последовательности генов проводилось на ДНК-анализаторе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Сопоставление секвенированных фрагментов генов выполнялось с применением программы VectorNTI v. 10.0. Кластерный анализ результатов секвенирования – по алгоритму Neighbor Joining в программе BioNumerics 6.6.

Полногеномное секвенирование. Подготовка библиотек и геномное секвенирование на платформах GS Junior (Roche) и MinION (Oxford Nanopore) проводились в соответствии со стандартными протоколами. Удаление адапторов у чтений, полученных с платформы GS Junior («Roche»), проводилось в программе Newbler v. 2.8.; оценка качества чтений – с помощью программы FASTQC v. 0.11.5. С применением программы Trimmomatic v. 0.38 из выборки удалялись последовательности протяженностью

менее 50 нуклеотидов, а также 3' концы последовательностей при падении показателя качества чтения ниже 20. Гибридные сборки данных секвенирования на двух платформах выполнялись с помощью программы SPAdes v.3.11.1.

Мультилокусное секвенирование *in silico* проводилось посредством биоинформационного поиска в геномах исследуемых штаммов *V. cholerae* аллельных вариантов группы генов «домашнего хозяйства» из схемы, предложенной S. Octavia *et al.* [16]: *adk*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM*, *purC*. Идентификация аллелей генов и определение секвенс-типа изолятов проводились на основании информации, представленной на сетевом ресурсе PubMLST.org.

SNP-типирование. Для картирования однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) риды в формате fastq выравнивались на референсный геном *V. cholerae* O1 N16961 с использованием программы Bowtie2. Поиск полиморфизмов осуществлялся с помощью набора авторских скриптов, в качестве параметров при формировании матрицы полиморфизмов принимались расстояние между любыми двумя полиморфными позициями больше 500 нуклеотидов и покрытие полиморфизма, превышающее порог покрытия у всех штаммов выборки. SNP в установленных позициях для штаммов, представленных в международной базе данных GenBank как последо-

вательности геномов (MAK757, M66_2), добавлены на основе выравнивания геномов с помощью пакета mummer. Филогенетическая реконструкция выполнялась в программе PhyML 3.0 с использованием модели TPM1, определенной в качестве оптимальной на основании значений критерия Шварца для данной выборки. Оценка достоверности филогенетической реконструкции проводилась при помощи бутстрэп анализа. Целевые значения в основных узлах ветвления составили >90 %. Визуализация дендрограммы выполнялась в программе FigTree 1.4.2.

Поиск компонентов мобильных генетических элементов проводился с помощью алгоритма blastn в сравнении с последовательностями генома референсного штамма *V. cholerae* O1 N16961. Профиль генов устойчивости к антибиотикам определялся с помощью поиска blastn против базы данных ResFinder [17].

Результаты и обсуждение

С середины 70-х годов прошлого столетия из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока на фоне эпидблагополучия выделяются варианты холерного вибриона O1 серогруппы биовара Эль Тор, не содержащие в геноме детерминант основных факторов патогенности. Лишь в единичных случаях в водных объектах обнаруживаются нетоксигенные *V. cholerae* O1 El Tor, несущие ген токсин-корегулируемых пилей адгезии *tcpA*. В частности, *ctxAB-tcpA*⁺ штамм выделен в зоне рекреационного водопользования из проб воды р. Барнаулка в Алтайском крае в 2011 г., а также в Хабаровском крае из проб воды р. Черная у поселка Черная речка в месте сброса сточных вод и непосредственно из сточных вод канализационно-насосной станции (2013 и 2016 гг.). Несомненно, представляет фундаментальный и практический интерес определение филогенетического положения данной группы штаммов на

глобальном эволюционном древе возбудителя холеры и выяснение возможных причин их обнаружения на территории.

Один из классических подходов к изучению филогенетической истории микроорганизмов – мультилокусное сиквенс-типирование. С учетом этого на первом этапе исследования нами проведен анализ семи генов «домашнего хозяйства» [15] 25 штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока.

В результате установлено, что структура большинства исследованных генов у *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ *V. cholerae* O1 El Tor И-1471 и И-1501 идентична таковой у эпидемически опасных штаммов. Так, 100 % гомология установлена по генам *dnaE*, *cat*, *lap*, *pgm*. Вместе с тем нуклеотидная последовательность гена рекомбиназы (*recA*) у штаммов И-1471 и И-1501 характеризуется большим сходством с *ctxAB-tcpA*⁻ вибрионами Эль Тор из поверхностных водоемов. В установленных ранее дифференцирующих по эпидемической значимости полиморфных сайтах гена [18] у этих штаммов идентифицированы специфические для нетоксигенных изолятов нуклеотиды (табл. 2).

Кроме того, для *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ *V. cholerae* установлен уникальный нуклеотидный контекст в позициях 477 (Т) и 597 (Т) гена *recA*, не встречающийся у исследованных токсигенных и нетоксигенных штаммов. В нуклеотидной последовательности гена *gyrB* у этих штаммов из пяти установленных дифференцирующих полиморфизмов идентичность с токсигенными штаммами определена по четырем, с нетоксигенными – по одному (табл. 2). По структуре гена хитиназы штаммы И-1471 и И-1501 демонстрируют 100 % гомологию с группой, в которую вошли нетоксигенные изоляты и *V. cholerae* Classical 569В. Что касается структуры генов «домашнего хозяйства» у *ctxAB-tcpA*⁺/СМ штаммов, то установлена их идентичность с токсигенными эпидемически опасными *V. cholerae* O1 El Tor (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

Дифференцирующие по эпидемической значимости однонуклеотидные полиморфизмы в штаммах *V. cholerae* разных генотипов
Differentiating by epidemic significance single nucleotide polymorphisms in *V. cholerae* strains of various genotypes

Ген Gene	Номер позиции гена референсного штамма* Position number of the gene of the reference strain*	Идентифицированный нуклеотид Identified nucleotide			
		<i>ctxAB-tcpA</i> ⁺	<i>ctxAB-tcpA</i> ⁻	<i>ctxAB-tcpA</i> ⁺ /ООС <i>ctxAB-tcpA</i> ⁺ /ЕО	<i>ctxAB-tcpA</i> ⁺ /СМ <i>ctxAB-tcpA</i> ⁺ /SM
<i>dnaE</i>	1194	T	C	T	T
<i>gyrB</i>	705	A	G	G	A
	813	T	C	T	T
	966	A	T	A	A
	972	T	A	T	T
	1170	G	T	G	G
<i>pgm</i>	849	T	C	T	T
<i>recA</i>	420	A	G	G	A
	582	T	G	G	T
	585	C	A	A	C

* – в качестве референсного для анализа использовались нуклеотидные последовательности генов штамма *V. cholerae* O1 N16961 (NC002505).

* – as the reference for this study, nucleotide sequences of the genes of *V. cholerae* O1 N16961 (NC002505) strain were used.

На дендрограмме, сгенерированной на основании кластерного анализа генов «домашнего хозяйства», штаммы выборки распределились на две группы (рис. 1). Одна из групп образована *ctxAB⁻tcpA⁻* *V. cholerae* из поверхностных водоемов на фоне эпидблагополучия, которые дифференцируются на три сиквенс-типа с одним доминирующим. Вторая группа включает все токсигенные *V. cholerae* O1 El Tor, а также спонтанные мутанты токсигенных штаммов, объединенные в один доминирующий сиквенс-тип. Наряду с ними в эту группу входят и *V. cholerae* O1 El Tor И-1471 и И-1501, а также штамм классического биовара. Особенности кластеризации группы *ctxAB⁻tcpA⁺*/ПВ штаммов дают основание судить о большем сходстве их корового генома с токсигенными вариантами холерного вибриона (гомология на уровне 99,3–99,6%), нежели с нетоксигенными (98,9%). Вместе с тем выделение их в отдельный сиквенс-тип в составе второй группы позволяет полагать, что эти варианты вибриона могут быть само-

стоятельной генетической линией.

Для дополнительного анализа корового генома *ctxAB⁻tcpA⁺*/ПВ штаммов проведено *in silico* MLST по схеме S. Octavia *et al.* [16]. В результате аллельный профиль генов *adh*, *gyrB*, *metE*, *mdh*, *pntA*, *purM*, *pyrC* штаммов И-1471 и И-1501 определен как 7_2_4_37_12_1_38 и, соответственно, установлена принадлежность к сиквенс-типу ST75. Известно, что к ST75 относятся варианты *V. cholerae* O1 с побережья Мексиканского залива США (US Gulf) [16], которые считаются эндемичными для этой территории и вызывают там групповые или спорадические случаи заболевания. Вместе с тем штамм, демонстрирующий филогенетическое родство с US Gulf клоном, идентифицирован в Таиланде [19]. На востоке Китая в провинции Чжэцзян также охарактеризованы не относящиеся к клону седьмой пандемии клинические варианты *V. cholerae* O1 с сиквенс-типом ST75 [14]. По данным Y. Luo *et al.* [14], указанные варианты *V. cholerae*, обозначенные как US Gulf-

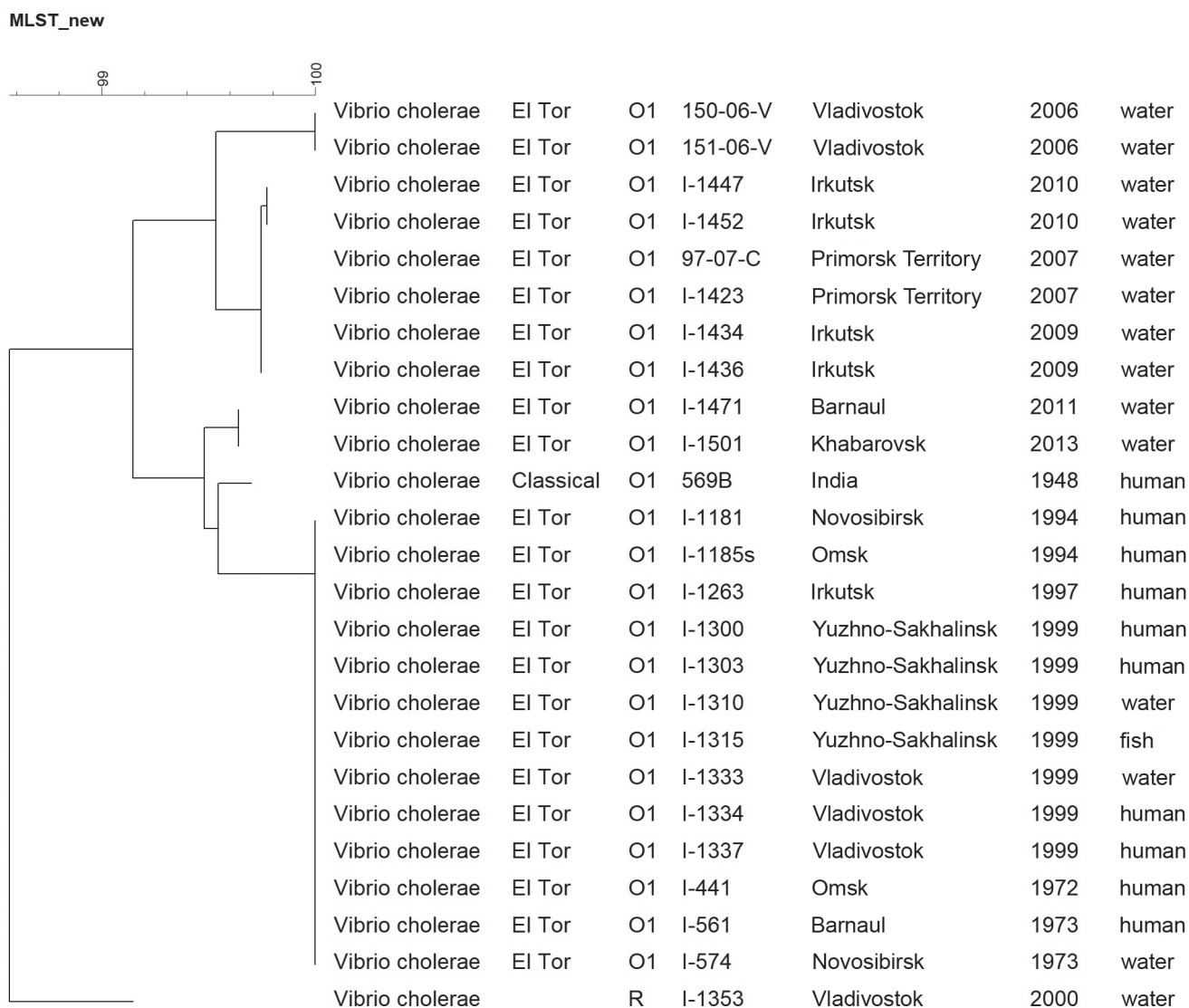


Рис. 1. Дендрограмма, построенная по алгоритму neighbor-joining на основании анализа структуры генов «домашнего хозяйства» штаммов *V. cholerae*

Fig. 1. Tree diagram of the concatenated “house-keeping” genes of *V. cholerae* strains constructed using neighbor-joining algorithm

подобные, на протяжении ряда лет выделяются от пациентов с диареей наряду с типичными штаммами пандемического клона, а обнаружение их в объектах окружающей среды позволило сделать заключение о существовании локальной популяции холерного вибриона ST75 в Китае.

Далее в работе проведено сравнение геномов исследуемых *ctxAB*⁻*tcpA*⁺/ПВ вариантов холерного вибриона (И-1471, И-1501) и выборки штаммов, представляющих разные этапы формирования и пандемического распространения патогенного клона вибриона Эль Тор. Кроме того, в реконструкцию филогении включены геномы US Gulf штаммов *V. cholerae* и выделенного в Китае лишнего СТХ профага US Gulf-подобного варианта, демонстрирующие, как и *ctxAB*⁻*tcpA*⁺ штаммы из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока, принадлежность к клону ST75. В результате скрининга SNP в геномах *V. cholerae* размер матрицы полиморфизмов составил 1490 нуклеотидов. На филогенетическом древе все штаммы выборки кластеризовались в соответствии с закономерностями формирования и распространения возбудителя холеры Эль Тор (рис. 2). Так, самостоятельные филогенетические группы сформировали *V. cholerae* O1 El Tor, отнесенные к

установленным ранее [13] трем волнам седьмой пандемии холеры. В основании дендрограммы лежат штаммы, выделенные на Ближнем Востоке и отнесенные D. Hu *et al.* [11] ко второму этапу формирования патогенного клона вибриона Эль Тор (Ирак, 1938 г.; Египет, 1954 г.), во время которого произошла диверсификация исходных непатогенных вариантов *V. cholerae*, заключающаяся в приобретении ими Эль Тор-специфического гена *tcpA*. Штаммы *ctxAB*⁻*tcpA*⁺ из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока (И-1471 и И-1501) в результате филогенетической реконструкции вошли в группу, основание которой представлено US Gulf вариантами *V. cholerae*. По данным D. Hu *et al.*, ответвление этой линии на филогенетическом древе произошло на третьем этапе эволюции возбудителя холеры Эль Тор одновременно с приобретением СТХ профага классического типа общим предшественником патогенного клона. Для US Gulf линии также характерно присутствие классического СТХ, однако данный признак у этой группы оказался нестабильным [11]. Штаммы И-1471 и И-1501 внутри US Gulf линии образуют кластер, в состав которого входит и включенный в выборку изолят из Китая (*V. cholerae* zj0917). При этом выделенный в Хабаровском крае штамм

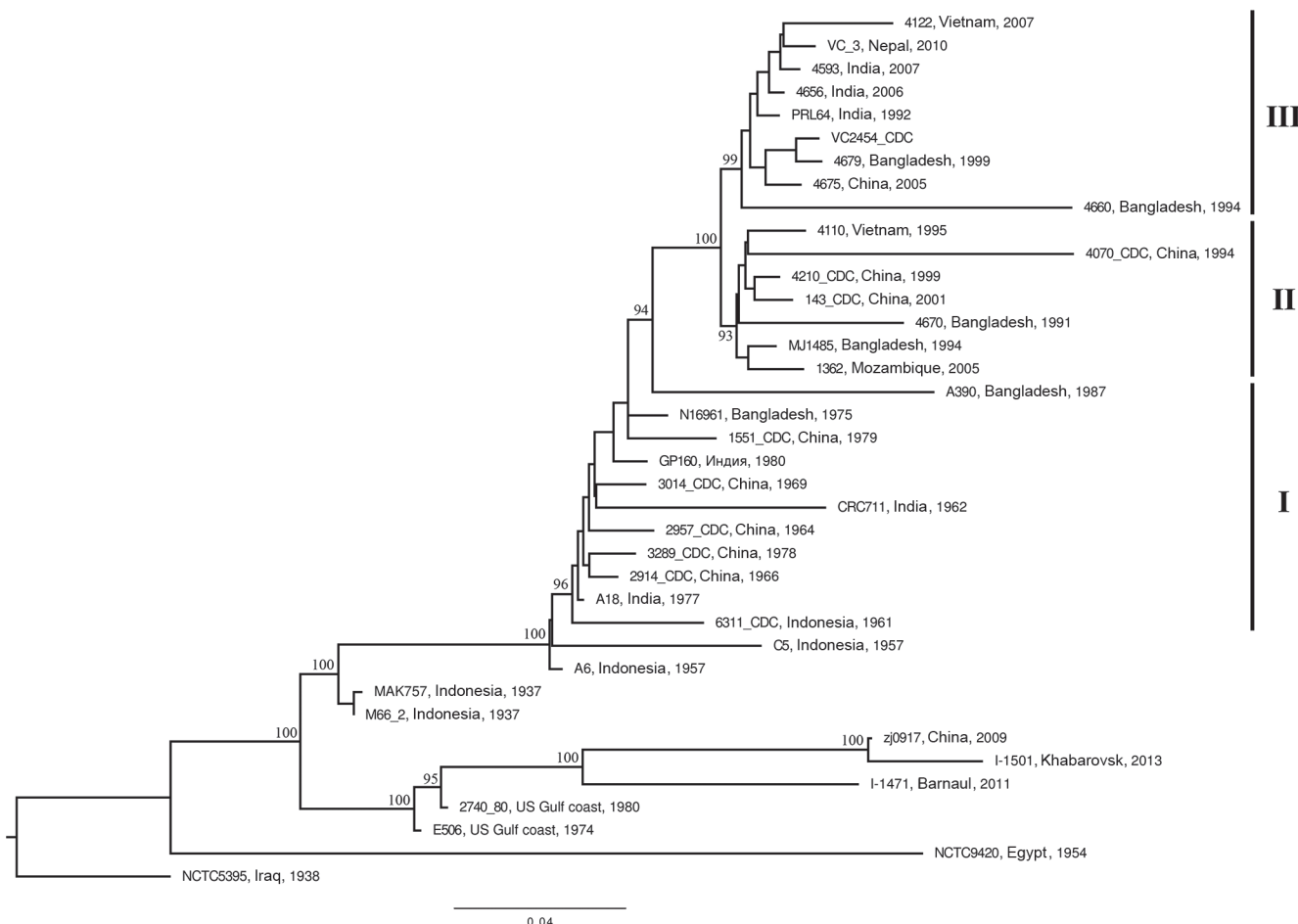


Рис. 2. Филогенетическое древо, построенное на основании анализа SNP в геномах штаммов *V. cholerae*. Цифрами I, II, III обозначены волны распространения седьмой пандемии в соответствии с A. Mutreja *et al.* [13]

Fig. 2. Phylogenetic tree reconstruction of *V. cholerae* core-genome SNPs. I, II, III marks the seventh pandemic distribution waves according to A. Mutreja *et al.* [13]

V. cholerae И-1501 со 100 % бутстрэп- поддержкой узла ветвления кластеризуется с изолятом из Китая, дистанция между ними составляет 40 SNP (рис. 2).

Известно, что для третьего этапа формирования патогенного клона, к которому отнесена группа US Gulf и US Gulf-подобных вариантов, наряду с присутствием СТХ классического типа, характерно наличие в геноме острова патогенности VPI-1, тогда как мобильные генетические элементы пандемичности – острова пандемичности VSP-I и VSP-II – приобретены возбудителем на более поздних этапах [11].

Картирование ридов, полученных при полногеномном секвенировании штаммов И-1501 и И-1471, на референсный геном *V. cholerae* O1 N16961 показало отсутствие у них последовательностей СТХ- и RS1-профагов. Следует сказать, что для US Gulf-подобного клона ST75, обнаруженного на востоке Китая, установлена гетерогенность по наличию СТХ профага: только один из 13 штаммов содержал интактный профаг в геноме, часть из штаммов (n=5) несла профаг СТХ без генов холерного токсина и у части штаммов (n=7) СТХ-профаг в геномах не обнаруживался [14]. Однако авторы полагают, что профаг СТХ в данных штаммах нестабилен, поскольку при изоляции все они были охарактеризованы как токсигенные. В пользу нестабильности СТХ-профага US Gulf-подобных вариантов вибриона свидетельствуют полученные авторами экспериментальные данные по его элиминации при пассаже на питательных средах, а также отсутствие профага у штамма *V. cholerae* 27040-80, относящегося к линии US Gulf [14].

Остров патогенности VPI-1 присутствует в геномах обоих *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ штаммов *V. cholerae*. При этом структура и нуклеотидная последовательность VPI-1 штамма *V. cholerae* O1 И-1501 (Хабаровск, 2013 г.) оказалась идентичной данной области у изолята из Китая (*V. cholerae* zj0917): у обоих штаммов идентифицировано по одной нуклеотидной замене в генах *tcpB*, *tcpF*, *acfB*, *acfC*, *acfA*, в двух межгенных участках и две замены в гене *tcpT* (табл. 3). У вто-

рого *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ штамма *V. cholerae* O1 И-1471 нуклеотидный контекст острова патогенности VPI-1 отличается от такового у штаммов И-1501 и zj0917 по генам *tcpT*, *acfD* и *int* (табл. 3).

Что касается островов пандемичности, то у *ctxAB-tcpA*⁺ штаммов из поверхностных водоемов Сибири и Дальнего Востока также установлены различия по данному признаку: в составе генома *V. cholerae* O1 El Tor И-1501 обнаружены все локусы VSP-I, тогда как у штамма И-1471 данный мобильный генетический элемент отсутствует. При анализе структуры VSP-I у *V. cholerae* O1 El Tor И-1501 показана его 100 % гомология по всем локусам с референсным штаммом, кроме VC0183 (идентифицирован 1 SNP). Следует отметить, что в геномах большинства US Gulf-подобных штаммов из провинции Чжэцзян Китая также определено присутствие VSP-I, а вариабельность нуклеотидной последовательности его заключалась в наличии SNP преимущественно в области VC0183 [14]. Интактной последовательности VSP-II у анализируемых штаммов не обнаружено, в их геномах выявлено присутствие только двух локусов, сходных с участками данного острова пандемичности: VC0499 (сходство с референсным штаммом 75,9 %) и VC0501 (сходство с референсным штаммом 85,2 %).

При сканировании через базу последовательностей устойчивости к антимикробным препаратам Resfinder в геноме штамма И-1501 обнаружена кассета, содержащая ген устойчивости к фторхинолонам *qnrVC*. Кассета фланкирована рекомбинантными сайтами *attC* и локализуется на второй хромосоме в составе суперинтегрона. Следует отметить, что указанный штамм фенотипически при выделении охарактеризован как чувствительный к ципрофлоксацину с зоной подавления роста на нижней границе, установленной для данной группы (25 мм), однако в динамике при хранении на питательных средах выявлено снижение его чувствительности к препарату (диаметр зоны подавления роста 21 мм – промежуточная устойчивость).

Таблица 3 / Table 3

Особенности структуры острова патогенности VPI-1 в геномах исследуемых штаммов *V. cholerae*
Peculiarities of the structure of pathogenicity island, VPI-1, in the genomes of the investigated *V. cholerae* strains

Номер локуса Locus number	МГИ* IGI	VC 0829	VC 0835		VC 0837	МГИ IGI	VC 0840	VC 0841	VC 0844	VC 0845	МГИ IGI	VC 0847
Ген Gene	МГИ IGI	<i>tcpB</i>	<i>tcpT</i>		<i>tcpF</i>	МГИ IGI	<i>acfB</i>	<i>acfC</i>	<i>acfA</i>	<i>acfD</i>	МГИ IGI	<i>int</i>
Позиция в VPI-1** Position in VPI-1**	3892	19299	23545	54330	26497	26693	29206	30740	32997	35485	39665	40005
Позиция в гене Position in the gene	-	1114	409	1193	842	-	732	379	456	2125	-	168
<i>V. cholerae</i> N16961	T	C	G	C	G	T	C	G	C	C	C	G
<i>V. cholerae</i> И-1471	T	T	T	C	A	C	T	A	T	T	T	A
<i>V. cholerae</i> И-1501	C	T	T	T	A	C	T	A	T	C	T	G
<i>V. cholerae</i> zj0917	C	T	T	T	A	C	T	A	T	C	T	G

* – межгенный интервал, ** – в качестве референсной последовательности острова VPI-1 использовали область NC 002505.1[873018..914291], фланкированную участками VPI attL и VPI attR.

* – intergenic interval, ** – as the reference sequence of VPI-I island, NC 002505.1[873018..914291] region, flanked by VPI attL and VPI attR, was used.

В целом, по данным изучения филогенетического родства и структурных особенностей геномов исследуемых штаммов холерного вибриона можно заключить, что *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ варианты *V. cholerae* El Tor относятся к самостоятельной филогенетической линии, включающей US Gulf и US Gulf-подобные варианты и дивергировавшей на одном из этапов становления патогенного клона этиологического агента седьмой пандемии холеры. Установленное на основании мультилокусного сиквенс-типирования большее сходство корового генома *ctxAB-tcpA*⁺/ООС вариантов с геномом токсигенного клона *V. cholerae* O1 El Tor подтверждает эту гипотезу и позволяет предполагать существование у этих групп вибрионов общего предка. Филогенетическая линия, в которую входят *ctxAB-tcpA*⁺/ПВ варианты, по всей видимости, не склонна к характерному для возбудителя холеры Эль Тор пандемическому распространению, однако очевидно, что ее представители обладают некоторыми селективными преимуществами, поскольку обнаруживаются на отдельных территориях на протяжении ряда лет и вызывают там спорадические и групповые случаи заболевания. При этом идентификация в геномах вибрионов данной группы одного из островов пандемичности (VSP-I) может свидетельствовать о продолжающейся самостоятельной микроэволюции линии US Gulf, направленной на повышение агрессивных свойств патогена. Другая особенность этой филогенетической линии – нестабильность СТХ профага, объясняет достаточно широкую представленность в ней *V. cholerae* с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺, формирование которых может происходить под воздействием факторов окружающей среды. Не исключено, что *ctxAB-tcpA*⁺ вибрионы, подобно предковым нетоксигенным вариантам с нетипичной для вибриона Эль Тор структурой гена *tcpA* [20], обладают способностью к формированию более длительного вибрионосительства в сравнении с патогенными клонами. Этот факт, а также возможные особенности клинического течения инфекции, вызванной вибрионами с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ (вероятность развития легких и стертых форм), определяют риск беспрепятственного распространения возбудителя из эндемичных регионов и завоза его на благополучные территории. Подтверждением этому служат полученные в настоящей работе данные филогенетической реконструкции, демонстрирующие высокий уровень гомологии геномов и общность организации мобильных генетических элементов штаммов *V. cholerae* O1 El Tor И-1501 и zj0917, и, соответственно, дающие основание судить об импортации *ctxAB-tcpA*⁺ варианта холерного вибриона на территорию Хабаровского края из Китая. В пользу завозного происхождения *V. cholerae* O1 El Tor И-1501 можно отнести и результаты эпидемиологического расследования по факту его выделения – штамм обнаружен однократно в месте сброса сточных вод и при расширении точек отбора проб и увеличении кратности исследования, а также в эпидсезон следующего года вибрионы с данным геноти-

пом обнаружить не удалось. В Алтайском крае *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* изолирован в месте рекреационного водопользования также однократно. Можно полагать, что климатические и эколого-гидрологические условия сибирского и дальневосточного регионов препятствуют закреплению указанных вариантов в поверхностных водоемах.

Таким образом, *V. cholerae* O1 El Tor *ctxAB-tcpA*⁺, спорадически обнаруживаемые в поверхностных водоемах на неэндемичных по холере территориях Сибири и Дальнего Востока, входят в состав самостоятельной US Gulf филогенетической линии и имеют завозное происхождение. Доминирующая роль в завозе таких вариантов вибриона Эль Тор, по всей вероятности, может принадлежать вибрионосителям или лицам со стертой формой инфекции. Однако, учитывая нестабильность СТХ профага в геномах вибрионов этой линии, нельзя исключить завоз *ctxAB-tcpA*⁺ вариантов и последующую утрату ими профага при попадании в водную окружающую среду. Соответственно, комплекс мероприятий по факту выделения *V. cholerae* O1 El Tor с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ должен определяться с учетом оценки их клональной принадлежности по данным молекулярно-генетического анализа. В перспективе целесообразна разработка ПЦР тест-систем, направленных на оперативную идентификацию *V. cholerae* US Gulf филогенетической линии.

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

Список литературы

1. Бельский В.А., Калуцкий П.В., Киселева В.В., Шаталова Е.В., Закарян Л.М. Гетерогенность микробных популяций. М: ООО «Медицинское информационное агентство»; 2008. 160 с.
2. Северцов А.С. Внутривидовое разнообразие как причина эволюционной стабильности. *Русский орнитологический журнал*. 2014; 23(1072):3659–73.
3. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front Public Health*. 2019; 23(7):203. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00203.
4. Kim E.J., Lee C.H., Nair G.B., Kim D.W. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2015; 23(8):479–89. DOI: 10.1016/j.tim.2015.03.010.
5. Sjölund-Karlsson M., Reimer A., Folster J.P., Walker M., Dahourou G.A., Batra D.G., Martin I., Joyce K., Parsons M.B., Boney J., Whichard J.M., Gilmour M.W. Drug-resistance mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 outbreak strain, Haiti, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2151–4. DOI: 10.3201/eid1711.110720.
6. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308(2):130–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x.
7. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманич Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *V. cholerae* O1 *ctxAB-tcpA*⁺. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2007; 1:23–9.
8. Онищенко Г.Г., Попова А.Ю., Кутырев В.В., Смиронова Н.И., Щербакова С.А., Москвитина Э.А., Титова С.В. Актуальные проблемы эпидемиологического надзора, лабораторной диагностики и профилактики холеры в Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.
9. Гриднева Л.Г., Мусатов Ю.С., Громова Т.В., Пуховская Н.М., Белозерова Н.Б., Уткина О.М., Иванов Л.И., Ковальский А.Г., Миронова Л.В., Куликалова Е.С., Хунхеева Ж.Ю.,

Балахонов С.В. Результаты мониторинга и биологические свойства холерных вибрионов, изолированных из объектов окружающей среды на территории Хабаровского края. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2014; 1:121–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-1-121-124.

10. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.

11. Hu D., Liu B., Feng L., Ding P., Guo X., Wang M., Cao B., Reeves P.R., Wang L. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2016; 113(48): E7730–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.

12. Didelot X., Pang B., Zhou Z., McCann A., Ni P., Li D., Achtman M., Kan B. The role of China in the global spread of the current cholera pandemic. *PLoS Genet*. 2015; 11(3):e1005072. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005072.

13. 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(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

14. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.

15. Garg P., Aydanian A., Smith D., J Glenn M.Jr., Nair G.B., Stine O.C. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):810–4. DOI: 10.3201/eid0907.030038.

16. Octavia S., Salim A., Kurniawan J., Lam C., Leung Q., Ahsan S., Reeves P.R., Nair G.B., Lan R. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PLoS One*. 2013; 8(6):e65342. DOI: 10.1371/journal.pone.0065342.

17. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11):2640–4. DOI: 10.1093/jac/dks261.

18. Миронова Л.В., Афанасьев М.В., Гольдапель Э.Г., Балахонов С.В. Мультилокусное сиквенс-типирование штаммов *Vibrio cholerae* разной эпидемиологической значимости. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(2):26–32.

19. Siriraphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew C., Aarestrup F.M., Sutteinkul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.

20. Tay C.Y., Reeves P.R., Lan R. Importation of the major pilin TcpA gene and frequent recombination drive the divergence of the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 289(2):210–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01385.x.

References

1. Bel'sky V.A., Kalutsky P.V., Kiseleva V.V., Shatalova E.V., Zakaryan L.M. [Heterogeneity of microbial populations]. M.: «Medical Information Agency» LLC; 2008. 160 p.

2. Severtsov A.S. [Intraspecific diversity as a cause of evolutionary stability]. *Russian Ornithological Journal [Rossiyskiy Ornitologicheskyy Zhurnal]*. 2014; 23(1072):3659–73.

3. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front Public Health*. 2019; 23(7):203. DOI: 10.3389/fpubh.2019.00203.

4. Kim E.J., Lee C.H., Nair G.B., Kim D.W. Whole-genome sequence comparisons reveal the evolution of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2015; 23(8):479–89. DOI: 10.1016/j.tim.2015.03.010.

5. Sjölund-Karlsson M., Reimer A., Folster J.P., Walker M., Dahourou G.A., Batra D.G., Martin I., Joyce K., Parsons M.B., Boney J., Whichard J.M., Gilmour M.W. Drug-resistance mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 outbreak strain, Haiti, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2151–4. DOI: 10.3201/eid1711.110720.

6. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308(2):130–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x.

7. Onishchenko G.G., Lomov Yu.M., Moskvitina E.A., Podosinnikova L.S., Vodyanitskaya S.Yu., Prometnoy V.I., Monakhova E.V., Vodopyanov S.O., Telesmanich N.R., Dudina N.A. [Cholera caused by *Vibrio cholerae* O1 ctxAB tcpA+]. *Journal*

of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology [Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii]. 2007; 1:23–9.

8. Onishchenko G.G., Popova A.Yu., Kutyrev V.V., Smirnova N.I., Shcherbakova S.A., Moskvitina E.A., Titova S.V. [Actual problems of epidemiologic control, laboratory diagnostics and prophylaxis of cholera in Russian Federation]. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology [Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii]*. 2016; 1:89–101. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-1-89-101.

9. Gridneva L.G., Musatov Y.S., Gromova T.V., Pukhovskaya N.M., Belozeroва N.B., Utkina O.M., Ivanov L.I., Koval'sky A.G., Mironova L.V., Kulikalova E.S., Khunkheeva Z.Y., Balakhonov S.V. [Results of Monitoring over and Biological Properties of *Vibrio cholerae* Isolated from Ambient Environment Objects in the Khabarovsk Territory]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2014; 1:121–4. DOI: 10.21055/0370-1069-2014-1-121-124.

10. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Y., Krasnov Y.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance]. *Genetika [Genetics]*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.

11. Hu D., Liu B., Feng L., Ding P., Guo X., Wang M., Cao B., Reeves P.R., Wang L. Origins of the current seventh cholera pandemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 2016; 113(48): E7730–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.

12. Didelot X., Pang B., Zhou Z., McCann A., Ni P., Li D., Achtman M., Kan B. The role of China in the global spread of the current cholera pandemic. *PLoS Genet*. 2015; 11(3):e1005072. DOI: 10.1371/journal.pgen.1005072.

13. 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(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.

14. Luo Y., Octavia S., Jin D., Ye J., Miao Z., Jiang T., Xia S., Lan R. US Gulf-like toxigenic O1 *Vibrio cholerae* causing sporadic cholera outbreaks in China. *J. Infect.* 2016; 72(5):564–72. DOI: 10.1016/j.jinf.2016.02.005.

15. Garg P., Aydanian A., Smith D., J Glenn M.Jr., Nair G.B., Stine O.C. Molecular epidemiology of O139 *Vibrio cholerae*: mutation, lateral gene transfer, and founder flush. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(7):810–4. DOI: 10.3201/eid0907.030038.

16. Octavia S., Salim A., Kurniawan J., Lam C., Leung Q., Ahsan S., Reeves P.R., Nair G.B., Lan R. Population structure and evolution of non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* by multilocus sequence typing. *PLoS One*. 2013; 8(6):e65342. DOI: 10.1371/journal.pone.0065342.

17. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11):2640–4. DOI: 10.1093/jac/dks261.

18. Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Goldapel E.G., Balakhonov S.V. [Multilocus sequence typing of *Vibrio cholerae* strains with differing pandemic importance]. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2015; 33(2):26–32.

19. Siriraphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew C., Aarestrup F.M., Sutteinkul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.

20. Tay C.Y., Reeves P.R., Lan R. Importation of the major pilin TcpA gene and frequent recombination drive the divergence of the *Vibrio* pathogenicity island in *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2008; 289(2):210–8. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01385.x.

Authors:

Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Феранчук С.И., Пономарева А.С., Балахонов С.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Поступила 18.12.19.

Отправлена на доработку 25.12.19.

Принята к публ. 22.02.20.