

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82

УДК:616.932(470)

А.А. Крицкий¹, Н.И. Смирнова¹, Т.Б. Каляева², Н.Ф. Оброткина², И.В. Грачева¹, А.Д. Катышев¹,
В.В. Кутырев¹**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ
НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР,
ИЗОЛИРОВАННЫХ В РОССИИ И НА ЭНДЕМИЧНЫХ ПО ХОЛЕРЕ ТЕРРИТОРИЯХ**¹ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация;
²ФКУЗ «Элистинская противочумная станция», Элиста, Российская Федерация

Цель – сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в Республике Калмыкия и на эндемичных по холере территориях, и установление их филогенетических связей с токсигенными изолятами. **Материалы и методы.** Проведен биоинформационный анализ полногеномных последовательностей 60 штаммов холерных вибрионов из эндемичных по холере регионов и Калмыкии. Определено присутствие в их геномах островов патогенности и пандемичности. Показаны их ST-типы и проведен полногеномный SNP-анализ. **Результаты и обсуждение.** Показано, что нетоксигенные холерные вибрионы Эль Тор, изолированные в Калмыкии, относятся к двум основным генотипам: *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁻* и *ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻*, где VPI-2Δ⁺ означает наличие делеций разной протяженности в геноме этого острова патогенности. Среди них лишь последние обнаружены в регионах, эндемичных по холере. Кроме того, в эндемичных очагах холеры циркулируют популяции вибрионов *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁺*, не обнаруженные в Калмыкии. Среди всех изученных штаммов выявлено 17 сиквенс-типов (по семи локусам генов «домашнего хозяйства»). Филогенетический анализ, проведенный с помощью SNP-типирования, показал отсутствие тесной генетической связи вибрионов из Калмыкии *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁻* как с токсигенными, так и с нетоксигенными вибрионами с иным составом островов патогенности и пандемичности. В то же время выявлена генетическая близость холерных вибрионов *ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻* из эндемичных очагов холеры с таковыми, изолированными в Калмыкии, что может указывать на возможность их периодического завоза на территорию России. Нетоксигенные штаммы *V. cholerae*, циркулирующие на территории Калмыкии, отличаются высоким генетическим разнообразием. Циркулирование штаммов уникальных сиквенс-типов позволяет сделать предположение об их способности к длительной персистенции на данной территории. Вместе с тем филогенетическая близость и идентичность некоторых штаммов со штаммами эндемичных территорий могут свидетельствовать о периодическом заносе.

Ключевые слова: нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор, биоинформационный анализ, генотип, сиквенс-тип, SNP-типирование.

Корреспондирующий автор: Крицкий Андрей Александрович, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в России и на эндемичных по холере территориях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 3:72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

Поступила 16.07.2021. Отправлена на доработку 01.09.2021. Принята к публ. 06.09.2021.

А.А. Kritsky¹, N.I. Smirnova¹, T.B. Kalyaeva², N.F. Obrotkina², I.V. Gracheva¹, A.D. Katyshev¹,
V.V. Kutyrev¹**Comparative Analysis of Molecular-Genetic Properties in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1
Strains Biovar El Tor, Isolated in Russia and on Cholera Endemic Territories**¹Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation;²Elista Plague Control Station, Elista, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to perform a comparative analysis of molecular-genetic properties in non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains biovar El Tor, isolated in the Republic of Kalmykia and on cholera endemic territories and to reveal their phylogenetic relations to toxigenic isolates. **Materials and methods.** We have carried out bio-information analysis of whole genome sequences of 60 cholera vibrio strains from endemic as regards cholera regions and from Kalmykia. The presence of pathogenicity and endemicity islands in their genomes has been determined. Specified have been the sequence-types of the examined strains and whole genome SNP-analysis conducted. **Results and discussion.** Non-toxigenic El Tor vibrios circulating in Kalmykia are clustered into two major genotypes: *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁻* and *ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻*, where VPI-2 Δ⁺ signifies the presence of deletions of varying length in the genome of this pathogenicity island. Only the latter one is found in regions endemic for cholera. In addition, *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁺* populations circulate in cholera endemic foci, not found in Kalmykia. 17 sequence-types were identified among the studied strains (by seven housekeeping gene loci). Phylogenetic analysis performed using SNP-typing demonstrated the absence of close genetic relation between the *ctxA tcpA⁺VPI-2⁺VSP⁻* vibrios from Kalmykia and both toxigenic and non-toxigenic vibrios with different composition of pathogenicity and pandemicity islands in the genome. At the same time, genetic proximity of *ctxA tcpA⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻* cholera vibrios from endemic cholera foci with those isolated in Kalmykia was detected, which may indicate the possibility of their recurrent importation into the territory of Russia. Non-toxigenic *V. cholerae* strains found in the territory of Kalmykia are characterized by a high genetic diversity.

Circulation of the strains with unique sequence-types suggests their potential for long-term persistence on this territory. At the same time, phylogenetic closeness and identity of certain strains with strains from endemic territories can be an evidence of repeated importation.

Key words: non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains; bio-information analysis; genotype; sequence-type; SNP-typing.

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

Corresponding author: Andrey A. Kritsky, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. Comparative Analysis of Molecular-Genetic Properties in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Strains Biovar El Tor, Isolated in Russia and on Cholera Endemic Territories. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 3:72–82. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

Received 16.07.2021. Revised 01.09.2021. Accepted 06.09.2021.

Kritsky A.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>
Smirnova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>
Kalyaeva T.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-89455-920x>
Obrotkina N.F., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6841-4531>

Gracheva I.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6757-6977>
Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/00002-8260-4670>
Kutyrev V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

К холерным вибрионам серогруппы O1 биовара Эль Тор относятся штаммы разной эпидемической значимости. Эпидемически опасные штаммы *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор вызвали седьмую пандемию холеры – острой диарейной особо опасной инфекционной болезни, которая началась в 1961 г. и продолжается до сих пор, ее эндемичные очаги сформированы на территории многих стран Азии и Африки [1–3].

Патогенный потенциал возбудителя холеры обусловлен присутствием в его геноме мобильных элементов с генами токсин-корректируемых пилей, расположенных на острове патогенности VPI-1 (от *Vibrio Pathogenic Island*), и холерного токсина, входящего в состав профага CTXφ, продукты которых определяют развитие инфекционного процесса [4, 5]. Кроме того, в их геноме присутствует второй остров патогенности – VPI-2, содержащий гены, усиливающие действие холерного токсина и значимые для выживания вибрионов в разных экологических нишах [6]. Эпидемический потенциал возбудителя обеспечивают два острова патогенности – VSP-I (от *Vibrio Seventh Pandemic*) и VSP-II [7]. Появление эпидемически опасных штаммов на территории России, вызвавших локальные вспышки либо единичные случаи холеры, связано с их заносом из эндемичных по холере стран. Существование их в различных объектах окружающей среды, как правило, ограничено коротким периодом времени в период вспышек [3]. В отличие от этих вариантов, нетоксигенные вибрионы Эль Тор, способные вызывать острые кишечные инфекции, могут длительное время циркулировать в поверхностных водоемах России [2].

Нетоксигенные холерные вибрионы, изолированные в России и не имеющие островов патогенности, генетически разнообразны и четко дифференцируются на две группы в зависимости от присутствия в геноме острова патогенности VPI-1, содержащего кластер генов *tcpA-F*, кодирующих токсин-корректируемые пили, обеспечивающие прикрепление вибриона к слизистой оболочке кишечника человека [8]. Вибрионы, содержащие в геноме VPI-1, относятся к генотипу *ctxA tcpA⁺*, вибрионы, лишенные этого участка ДНК, имеют генотип *ctxA tcpA⁻*. Вместе с тем в водных экосистемах эн-

демичных по холере регионов регистрируется постоянное присутствие нетоксигенных вибрионов, имеющих как острова патогенности, так и острова патогенности [8–10].

Молекулярно-генетические свойства токсигенных и нетоксигенных холерных вибрионов являются предметом интенсивных исследований отечественных [11–15] и зарубежных [16–19] исследователей, которые для их филогенетического анализа использовали разные методы молекулярного типирования [9, 12, 15, 20–23]. В России, не имеющей эндемичных очагов холеры, нетоксигенные вибрионы наиболее часто обнаруживаются в открытых водоемах Южного федерального округа. Наибольшее число таких вибрионов выделено в Республике Калмыкия, на территории которой имеются благоприятные условия для их сохранения в поверхностных водоемах. Так, за период с 1989 по 2015 год на территории Калмыкии выделено 314 штаммов холерного вибриона O1 серогруппы, что составляет 33,5 % от общероссийского показателя за данный временной период [11]. Однако, несмотря на проведенные исследования генетических свойств отдельных штаммов нетоксигенных вибрионов из Калмыкии [11, 13, 14], вопрос об особенностях структуры их генома и происхождении до сих пор остается открытым. Один из путей решения этого вопроса – сопоставление структуры генома нетоксигенных вибрионов, выделенных в Калмыкии, с таковой у изолированных на эндемичных по холере территориях, а также установление филогенетического родства как между ними, так и с токсигенными изолятами.

Цель работы – сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в Республике Калмыкия и на эндемичных по холере территориях, а также установление их филогенетических связей с токсигенными изолятами.

Материалы и методы

В работе использовали полногеномные нуклеотидные последовательности 60 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы

биовара Эль Тор, изолированных в период с 1930 по 2018 год, включая депонированные нами ранее последовательности 29 нетоксигенных штаммов, выделенных на территории Калмыкии [24], и четырех токсигенных изолятов, занесенных в Россию. Присутствие в их геноме островов патогенности и пандемичности определяли при помощи программ Mauve версии 2.4.0 с валидацией в программе Blast2Go версии 5.2 относительно генома референсного Эль Тор штамма N16961.

Сиквенс-типы исследованных штаммов определяли с использованием онлайн-сервиса MLST 2.0 (Multilocus Sequence Typing) на платформе CGE (Center Genomic Epidemiology) путем анализа нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства»: *adhA*, *gyrB*, *mdhI*, *metE*, *pntA*, *purM*, *purC*.

SNP-типирование. Поиск коровых SNPs в геноме проводили при помощи программы Wombac 2.0, используя в качестве референсной полногеномную последовательность штамма N16961. Построение филогенетического дерева по рассчитанной матрице коровых SNPs осуществляли в программе Ugene V.1.32. методом Maximum Likelihood, используя параметрическую модель замен GTR (General Time Reversible). Оценка достоверности топологии построенного дерева осуществлялась при помощи bootstrap-теста с числом итераций 1000.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы понять происхождение нетоксигенных холерных вибрионов биовара Эль Тор, выявляемых на территории Республики Калмыкия, провели сравнение их секвенированных полных геномов с таковыми нетоксигенных вибрионов того же биовара, циркулирующими в эндемичных регионах различных стран Юго-Восточной Азии. Использовали полногеномные нуклеотидные последовательности 21 штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированного в 1973–2011 гг. от людей или из внешней среды в период текущей пандемии холеры в Индии, Бангладеш, Таиланде и Китае, а также двух нетоксигенных предпандемических штаммов, выделенных от людей в 1930 и 1937 гг. (таблица). Что касается территории Калмыкии, то в исследование включены секвенированные нами ранее геномы 29 нетоксигенных штаммов [24], изолированных в 2009–2011 гг. в основном из воды поверхностных водоемов, расположенных в черте Элисты, включая пруды Заячий, Колонский и реку Элистинку. Лишь один штамм выделен в Элисте от больного острым инфекционным гастроэнтеритом.

Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов 21 нетоксигенного штамма из эндемичных регионов, изолированного в период текущей пандемии холеры, позволил разделить их на две основные группы. В первую вошли 12 штаммов (или 57,1 % от числа изучен-

ных), в геноме которых присутствовали два острова патогенности: VPI-1 (41,3 т.п.н.) с геном *tcpA* и интактный VPI-2 (57,3 т.п.н.). Кроме того, геномы этих штаммов несли острова пандемичности VSP-I (16,0 т.п.н.) и VSP-II (26,6 т.п.н.), определяющие их эпидемический потенциал. Их генотип обозначен как *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ (группа «а»). Вторая группа, состоящая из шести штаммов (28,6 %), отличалась от первой по составу мобильных элементов. У этих штаммов отсутствовали VPI-1 и оба острова пандемичности, а в VPI-2 обнаружены делеции разной протяженности (37,9–54,9 т.п.н.), которые затронули 19–41 ген. Такой остров патогенности, геном которого лишен ряда генов, получил обозначение VPI-2Δ. Их генотип был *ctxA-tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻ (группа «б»). Кроме штаммов с указанными генотипами обнаружили три штамма (или 14,3 %), отличающиеся от указанных изолятов по составу мобильных элементов. Эти штаммы вошли в состав третьей гетерогенной группы («в»), включающей в себя три подгруппы («в1», «в2», «в3» соответственно) с разным генотипом: *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (V5), *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ (305AD1697) и *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (TC183) (таблица). Помимо штаммов, выделенных в период текущей пандемии холеры, для сравнения взяты два нетоксигенных предпандемических штамма (NCTC8457 и NCTC5395) с генотипом *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (таблица).

Таким образом, результаты проведенного анализа указали на большое генетическое разнообразие изученных нетоксигенных штаммов, различающихся между собой по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности и относящихся к пяти разным генотипам. При этом значительное число нетоксигенных штаммов (57,1 %), выделенных в эндемичных по холере регионах, имели большое сходство с токсигенными штаммами по содержанию генов патогенности и пандемичности.

В отличие от этих регионов, на территории Калмыкии в период с 2009 по 2018 год среди 29 исследуемых штаммов не выявлено нетоксигенных с интактными островами пандемичности, имеющих генотип *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺. Изученные штаммы входили в состав двух основных групп, различающихся друг от друга по набору мобильных элементов. Значительная часть штаммов – 16 из 29 (или 55,2 %) – лишена VPI-1 с геном *tcpA*, но имела делетированный VPI-2 и относилась к тому же генотипу *ctxA-tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻, что и штаммы группы «б» из эндемичных регионов. Другая группа представлена 12 изолятами (или 41,4 % от числа исследованных из этого региона) и, в отличие от штаммов группы «б», содержала в геноме интактные острова патогенности. Поскольку их генотип *ctxA-tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ не отличался от такового нетоксигенного изолята V5 из эндемичного по холере региона, входящего в состав подгруппы «в1», то эти изоляты также отнесены к той же подгруппе (таблица). Кроме того, среди штаммов *tcpA*⁺ обнаружен один изолят M1501

Штаммы *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, полногеномные нуклеотидные последовательности которых использованы в работе
Strains of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor, whole-genome sequences of which are used in this work

Штамм Strains	Место, источник и год выделения Site, source, and the year of isolation	Код доступа GenBank GenBank access No	Генотип/группа Genotype/group	ST
1	2	3	4	5
Нетоксигенные предпандемические штаммы Non-toxicogenic pre-pandemic strains				
NCTC8457	Египет, человек, 1930 Egypt, patient, 1930	AAWD00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	71
NCTC5395	Ирак, человек, 1937 Iraq, patient, 1937	CP013317/CP013318	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	71
Токсигенные штаммы, седьмая пандемия Toxicogenic strains, 7 th pandemic				
N16961	Бангладеш, человек, 1975 Bangladesh, patient, 1957	NC_002505.1, NC_002506.1	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
CRC1106	Индия, человек, 1962 India, patient, 1962	NZ_CP013305.1, NZ_CP013306.1	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
2044	Ирак, человек, 1966 Iraq, patient, 1966	PXZC01000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
6/67	Индия, человек, 1967 India, patient, 1967	LRFF00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
M888	СССР, человек, 1970 USSR, patient, 1970	LRBH00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
M1275	РФ, человек, 1993 RF, patient, 1993	LRAF00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
P18889	РФ, человек, 2006 RF, patient, 2006	LAKM00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
L3226	РФ, человек, 2010 RF, patient, 2010	JDVX00000000	<i>ctxA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺ VPI2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
Нетоксигенные штаммы из эндемичных по холере территорий Non-toxicogenic strains from cholera endemic territories				
GP60	Индия, человек, 1973 India, patient, 1973	CWQU00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
349_264	Таиланд, человек, 1983 Thailand, patient, 1983	ERS1228659	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
476_167	Таиланд, человек, 1983 Thailand, patient, 1983	ERS1228661	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
816ct634	Таиланд, человек, 1984 Thailand, patient, 1984	ERS1228662	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
184AD112	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228664	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
501_771	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228663	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
305AD1697	Таиланд, человек, 1985 Thailand, patient, 1985	ERS1228665	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /в2	69
V5	Индия, н/и, 1989 India, n.k., 1989	CWNT00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	69
857	Бангладеш, в/с, 1996 Bangladesh, a.e., 1996	MIKH00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	382
MBRN14	Индия, н/и, 2004 India, n.k., 2004	CWNR00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
TC22	Таиланд, в/с, 2006 Thailand, a.e., 2006	ERS1228673	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	183
TC183	Таиланд, в/с, 2006 Thailand, a.e., 2006	ERS1228734	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в3	184
4053024303	Таиланд, человек, 2010 Thailand, patient, 2010	ERS1228717	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
P47	Таиланд, человек, 2011 Thailand, patient, 2011	ERS1228692	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
NHCM_017	Бангладеш, человек, 2011 Bangladesh, patient, 2011	LGOK00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
471352	Бангладеш, в/с, 2011 Bangladesh, a.e., 2011	NOJT00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69
MK14	Таиланд, в/с, 2011 Thailand, a.e., 2011	ERS1228694	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	178
4T5	Таиланд, в/с, 2011 Thailand, a.e., 2011	ERS1228695	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	186
S023208	Бангладеш, в/с, 2014 Bangladesh, a.e., 2014	NTBY00000000	<i>ctxA tcpA</i> ⁺ VPI-2 ⁺ VSP ⁺ /а	69

Окончание таблицы / Ending of the Table

1	2	3	4	5
EL2313	Китай, человек, 1992 China, patient, 1992	VMPJ00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	164
EL2398	Китай, человек, 1996 China, patient, 1996	VMOM00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	744
Нетоксигенные штаммы из Республики Калмыкия Non-toxigenic strains from the Republic of Kalmykia				
M1457	РФ, Элиста, в/с, 2009 RF, Elista, a.e., 2009	VTLN00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	178
M1467	РФ, Элиста, в/с, 2010 RF, Elista, a.e., 2010	VTLI00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
M1506	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTZX00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
M1501	РФ, Элиста, человек, 2011 RF, Elista, patient, 2009	LRAE00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /г	75
M1504	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLN00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
M1505	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLO00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
M1507	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLP00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
111	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VTLQ00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
M1519	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VUAD00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
M1527	РФ, Элиста, в/с, 2011 RF, Elista, a.e., 2011	VUAE00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
M1517	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VTZZ00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	167
29	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VUAB00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	931
M1516	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VTZY00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	233
M1526	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	VUAA00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	233
M1518	РФ, Элиста, в/с, 2012 RF, Elista, a.e., 2012	LQZR00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	75
132	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	VUAC00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
85	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	VUAF00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
M1524	РФ, Элиста, в/с, 2013 RF, Elista, a.e., 2013	LQZS00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
8	РФ, Элиста, в/с, 2014 RF, Elista, a.e., 2014	PYCF00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
2613	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCA00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
2687	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCB00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
2688	РФ, Элиста, в/с, 2015 RF, Elista, a.e., 2015	PYCC00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
2843	РФ, Элиста, в/с, 2016 RF, Elista, a.e., 2016	PYCG00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	744
3178	РФ, Элиста, в/с, 2017 RF, Elista, a.e., 2017	PYCH00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	760
124	РФ, Элиста, в/с, 2017 RF, Elista, a.e., 2017	PYCD00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2 ⁺ VSP ⁻ /в1	75
120	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLI00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	776
136	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLK00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	406
2439	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLL00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	620
3017	РФ, Элиста, в/с, 2018 RF, Elista, a.e., 2018	VTLM00000000	<i>ctxA tcpA</i> VPI-2Δ ⁺ VSP ⁻ /б	620

Примечание: н/и – неизвестно; в/с – внешняя среда; ST – сиквенс-тип.

Note: n.k. – not known; a.e. – ambient environment; ST – sequence type.

(или 3,4 %) с иным генотипом (*ctxA tcpA*⁺VPI-2Δ⁺VSP⁻), что позволило отнести его к другой подгруппе – «г» (таблица). Таким образом, нетоксигенные вибрионы Эль Тор, выявленные на территории Калмыкии, генетически разнообразны, так же как и вибрионы, изолированные в эндемичных по холере регионах. Однако основные генотипы штаммов, изолированных на разных по эндемичности холеры территориях, различны.

Для установления филогенетических связей между штаммами из Калмыкии и эндемичных по холере регионов проведены их мультилокусное сиквенс-типирование (MLST) на основании анализа нуклеотидной последовательности семи генов «домашнего хозяйства» (*adhA*, *gyrB*, *mdhI*, *metE*, *pntA*, *purM*, *pyrC*), а также SNP-анализ коровой части геномов.

По результатам мультилокусного сиквенс-типирования среди 50 нетоксигенных штаммов, выделенных в период текущей пандемии холеры на указанных территориях, выявлено 17 сиквенс-типов, или ST (от sequence type). Холерные вибрионы, циркулирующие на эндемичных по холере территориях, относились к восьми сиквенс-типам: 69, 164, 178, 183, 184, 186, 382 и 744. Заслуживает внимания тот факт, что все 12 штаммов с генотипом *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺, входящие в группу «а», вне зависимости от года и места выделения, имели единый ST69, характерный для всех изученных токсигенных штаммов, включая референсный N16961 (таблица). К этому же ST относились и два штамма с генотипами *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ (V5, подгруппа «в1») и *ctxA tcpA*⁻VPI-2⁺VSP⁺ (305AD1697, подгруппа «в2»). В то же время шесть штаммов *ctxA tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ (группа «б») принадлежали к шести разным ST (164, 178, 183, 186, 382 и 744), что указывает на значительный полиморфизм их генов «домашнего хозяйства».

Что касается штаммов из Калмыкии, то среди 29 изолятов выявлено десять ST, из которых семь (167, 233, 406, 620, 760, 776, 931) обнаружили только среди холерных вибрионов, циркулирующих на этой территории. Важно отметить, что все 12 штаммов из Калмыкии, имеющие генотип *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ и входящие в состав подгруппы «в1», относились к одному ST75. В то же время значительная часть штаммов (16 изолятов, группа «б») с генотипом *ctxA tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ принадлежала к девяти разным ST: семи специфичным для этой территории (167, 233, 406, 620, 760, 776, 931) и двум (178 и 744), встречающимся у штаммов с эндемичных территорий в Китае и Таиланде (таблица).

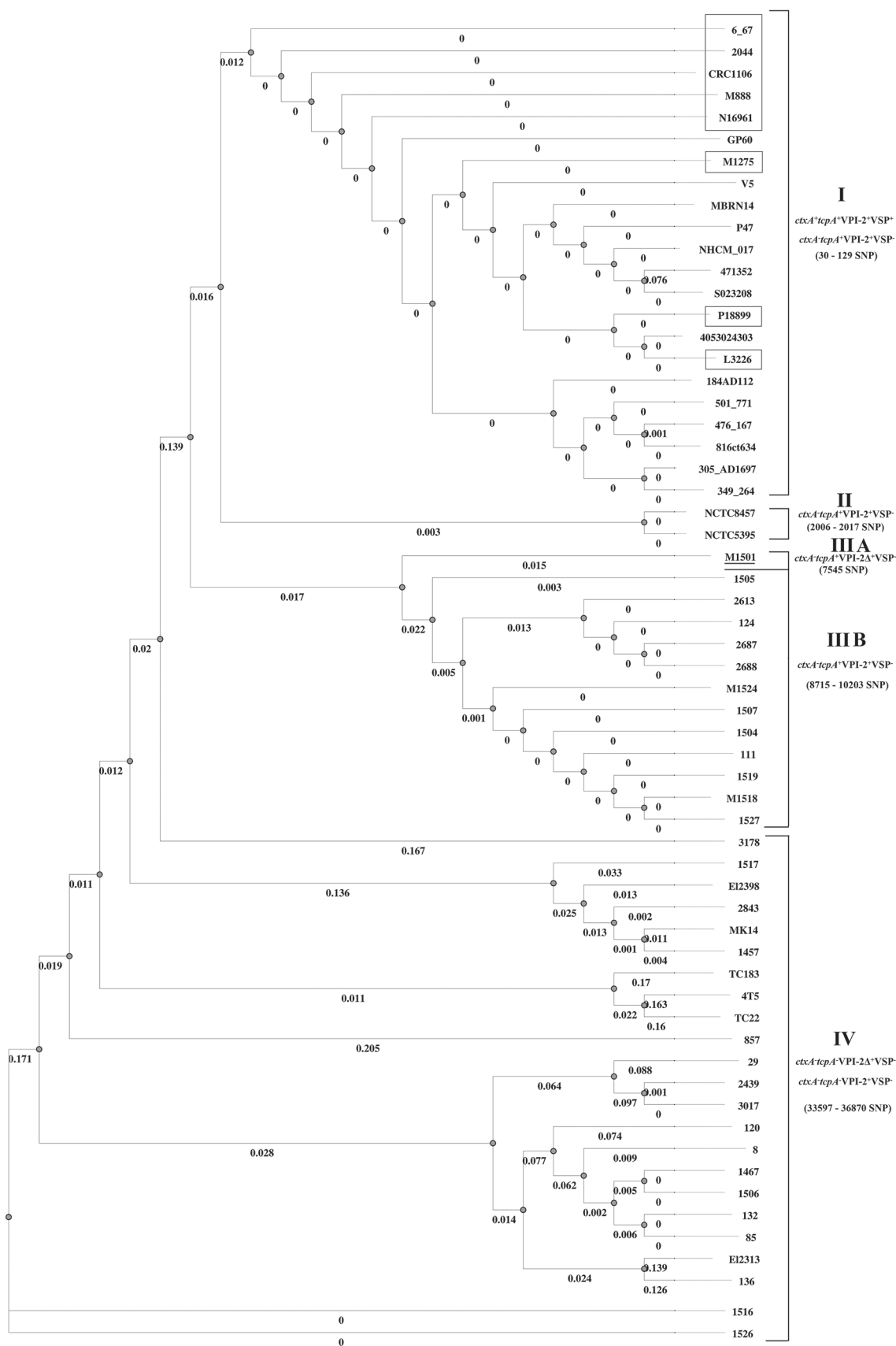
Далее проведен полногеномный SNP-анализ 60 штаммов. При сравнении нуклеотидных последовательностей их геномов с референсным N16961 в коровых генах обнаружили 87724 одиночных нуклеотидных замены (SNPs). На основе их анализа построено филогенетическое дерево, на котором видно деление на четыре основных кластера (рисунок). В кластер I вошли 14 нетоксигенных штаммов, изо-

лированных на эндемичных территориях в различные годы и относящихся к ST69. Из них 12 штаммов (или 85,7 %) имели генотип *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ и лишь 2 штамма отличались отсутствием либо острова патогенности VPI-1 с геном *tcpA* (305AD1697), либо интактных островов пандемичности VSP (V5) (таблица). Тем не менее все эти штаммы имели тесную филогенетическую связь с токсигенными *V. cholerae* биовара Эль Тор, о чем свидетельствует присутствие в данном кластере всех изученных токсигенных штаммов. Различия всех токсигенных и нетоксигенных штаммов этого кластера с референсным составили 30–129 SNPs. Лишь последовательность одного из них (471352) отличалась от референсной на 9317 SNPs. В целом отличия нуклеотидной последовательности нетоксигенных штаммов от токсигенных незначительны, что подтверждает их филогенетическую близость.

Кластер II состоял из двух предпандемических штаммов *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻, имеющих иной ST71. Их отличия от референсного более значимы – 2006–2017 SNPs (рисунок).

Нетоксигенные штаммы, лишённые интактных островов пандемичности VSP, вошли в состав двух других кластеров – III и IV. При этом III кластер (13 изолятов), состоящий из подкластеров IIIA и IIIB, сформирован штаммами, изолированными только на территории Калмыкии в разные годы (2011–2017 гг.) и несущими в геноме оба острова патогенности. Все эти штаммы имели единый генотип *ctxA tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ и относились к одному и тому же ST75 (рисунок). От токсигенного референсного эти изоляты отличались большим числом SNPs (7545–10203) по сравнению с токсигенными и нетоксигенными штаммами из кластера I (30–129). Такая удаленность нетоксигенных штаммов этого кластера от токсигенных и их производных может указывать на их независимое происхождение либо очень давнюю дивергенцию от токсигенных.

Все нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻, выявленные как в Калмыкии, так и на эндемичных по холере территориях, и относящиеся к разным ST, вошли в состав кластера IV. Данный кластер включал в себя 23 штамма, изолированных как в Калмыкии (16 штаммов), так и в эндемичных по холере регионах (7 штаммов из Таиланда, Китая, Бангладеш). Значительные различия между ними и всеми указанными выше штаммами состояли в отсутствии в их геноме VPI-2 с геном *tcpA* и наличии VPI-2Δ с делециями разной протяженности. Исключением был лишь один штамм TC183 из Таиланда, в геноме которого присутствовал интактный VPI-2. Более того, отличительная особенность штаммов этого кластера заключалась в большом разнообразии их сиквенс-типов. Несмотря на практически единый генотип (*ctxA tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻), выявлено девять ST (167, 178, 233, 406, 620, 744, 760, 776, 931) у штаммов из Калмыкии и семь (164, 178, 183, 184, 186, 382, 744) среди штаммов из эндемичных по



Филогенетические связи между нетоксигенными штаммами *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенными в Калмыкии, с различными нетоксигенными и токсигенными штаммами, изолированными на эндемичных по холере территориях, по данным MLST-анализа

Phylogenetic relations between non-toxicogenic *V. cholerae* O1 El Tor strains isolated in Kalmykia and with various non-toxicogenic and toxicogenic strains isolated in cholera endemic areas, according to MLST analysis

холере регионов (таблица, рисунок). Присутствие в кластере IV нетоксигенных штаммов из Калмыкии, имеющих один и тот же генотип (*ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-Δ⁺VSP⁻) и сиквенс-тип (776), но выделенных в разные годы (2010–2018 гг.), указывает на возможность их длительного сохранения в различных водоемах на этой территории. Вместе с тем локализация в данном кластере указанных нетоксигенных штаммов с эндемичных и неэндемичных по холере территорий позволяет говорить об их филогенетической связи. Отличия штаммов IV кластера как от референсного, так и от штаммов из других кластеров оказались наиболее значимыми и составили 33597–36870 SNPs (рисунок). Эти данные подтверждают их явную филогенетическую обособленность.

Таким образом, результаты молекулярного типирования методом SNP-анализа показали, что нетоксигенные штаммы, изолированные в период седьмой пандемии холеры, разделились на три филогенетически обособленных кластера (I, III, IV). В эндемичных очагах холеры циркулируют разные популяции холерных вибрионов. Одни из них имеют тесную генетическую связь с токсигенными, циркулирующими лишь в эндемичных по холере регионах (кластер I), другие филогенетически близки с нетоксигенными штаммами из Калмыкии (кластер IV). В то же время установлено, что для Калмыкии характерно присутствие нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻, отличающихся от токсигенных и других нетоксигенных изолятов по ST и числу SNPs (кластер III).

Ежегодное выделение нетоксигенных холерных вибрионов серогруппы O1 биовара Эль Тор из открытых водоемов Республики Калмыкия на протяжении более 45 лет (с 1974 г. по настоящее время) ставит вопрос об особенностях структуры их генома и происхождении. Ранее при ПЦР-тестировании 14 различных генов показано генетическое разнообразие нетоксигенных штаммов с этой территории [25]. Анализ их полных геномов показал, что по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности нетоксигенные штаммы из Калмыкии также разнообразны. Они входят в состав двух основных групп с генотипами *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻. В эндемичных очагах холеры популяции холерных вибрионов также генетически гетерогенны и, помимо токсигенных, включали в себя нетоксигенные изоляты двух генотипов: *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ и *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ (таблица). Эти данные совпадают с результатами анализа популяционной структуры холерных вибрионов в Китае, Таиланде, Индии, Бангладеш, полученными другими исследователями [9, 10, 17, 19].

Из сравнения генотипов нетоксигенных штаммов на двух типах территорий следует, что, в отличие от Калмыкии, в регионах, эндемичных по холере, циркулируют популяции вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺, которые различаются с токсигенными лишь отсутствием в их геноме генов холерного

токсина. Другое важное различие между сравниваемыми регионами – присутствие в Калмыкии водных популяций с генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻, не обнаруженных в странах Юго-Восточной Азии. Следует отметить, что такие вибрионы также выделены из поверхностных водоемов ряда других регионов России: в Алтайском и Хабаровском краях, Ростовской области [8, 11, 13, 24]. Этот факт может служить указанием на определенную приуроченность генотипа *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ к благополучной по холере территории. В то же время в Калмыкии и в эндемичных по холере странах присутствовали популяции холерных вибрионов с общим генотипом *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻. Таким образом, географическая разобщенность мест обитания холерных вибрионов в Юго-Восточной Азии и Калмыкии, а также различные экологические условия их существования обусловили их генетическое разнообразие.

Основной вопрос генетического разнообразия нетоксигенных вибрионов Эль Тор – их способность к реверсии в токсигенные эпидемически опасные клоны. Результаты проведенного исследования указали на принципиальные различия по этому свойству между нетоксигенными вибрионами из сравниваемых территорий. В эндемичных по холере регионах циркулируют популяции нетоксигенных вибрионов *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI2⁺VSP⁺, которые могут представлять потенциальную эпидемическую опасность. Присутствие генов *tcpA* в составе VPI-1 определяет реальную возможность приобретения ими генов холерного токсина в результате фаговой конверсии, а наличие интактных островов пандемичности может обеспечить им эпидемический потенциал. Напротив, циркулирующие в Калмыкии холерные вибрионы *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ и *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁻ являются эпидемически безопасными вследствие отсутствия островов пандемичности и неспособности вызывать развитие холерной инфекции, что показано нами ранее в экспериментах на модельных животных [25].

Другой не менее важный вопрос – происхождение нетоксигенных холерных вибрионов Эль Тор, выделяемых из водоемов Калмыкии. Для его понимания построено филогенетическое дерево на основе анализа полногеномных нуклеотидных последовательностей 52 нетоксигенных и 8 токсигенных штаммов, изолированных как в Калмыкии, так и на территориях, эндемичных по холере. Значительная часть их из эндемичных регионов (кластер I), имеющих генотип *ctxA*⁻*tcpA*⁺VPI-2⁺VSP⁺ и относящихся к единому ST69, являются, видимо, производными токсигенных. Такие изоляты не обнаружены в Калмыкии. Вместе с тем установлено, что на территориях обоих типов циркулируют нетоксигенные вибрионы *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻, которые входят в состав одного и того же кластера IV, хотя относятся к 14 разным ST. Сопоставление нуклеотидных последовательностей полных геномов 23 нетоксигенных штаммов *ctxA*⁻*tcpA*⁻VPI-2Δ⁺VSP⁻ (кластер

IV) также указало на их большое генетическое разнообразие и выраженную филогенетическую обособленность от токсигенных, различия с которыми составляли 33597–36870 SNPs. Этот вывод совпадает с результатами SNP-анализа холерных вибрионов с таким генотипом других исследователей [9, 10, 22]. Данная явно филогенетически обособленная группа нетоксигенных холерных вибрионов, видимо, может иметь независимое происхождение, сформировавшись на ранних этапах эволюции *V. cholerae* O1. Наибольший интерес представляет тот факт, что для Калмыкии характерны штаммы *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻, принадлежащие к ST75 и образующие отдельный кластер III, значительно отличающийся как от кластера I токсигенных вибрионов и их производных (на 7545–10203 SNPs), так и от нетоксигенных изолятов из кластера IV (на 26052–26677 SNPs). Выявленная филогенетическая обособленность таких изолятов из Калмыкии полностью совпадает с результатами MLST-типирования холерных вибрионов с тем же генотипом *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻, изредка выделяемых в других регионах России [26]. Следует отметить, что штаммы данного сиквенс-типа выделялись также в водоемах Сибири и Дальнего Востока и имели завозное происхождение [27].

Происхождение этих вибрионов остается неясным. Можно лишь предполагать, что они являются промежуточной филогенетической линией, образованной в процессе эволюционного формирования токсигенных клонов. Последующее приобретение ими через горизонтальный перенос новых мобильных элементов вирулентности и пандемичности, вероятно, могло привести к образованию эпидемически опасного клона.

Экологические особенности водоемов Республики Калмыкия могли способствовать длительному переживанию нетоксигенных вибрионов на этой территории. Вместе с тем, по всей видимости, происходит и периодический занос холерных вибрионов *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ в Калмыкию из регионов, эндемичных по холере. Основным аргументом в пользу такой возможности является наличие у ряда штаммов из Калмыкии не только общего генотипа с некоторыми изолятами из Юго-Восточной Азии, но и сиквенс-типа. Эти данные согласуются с результатами других исследователей, полученными при использовании ПЦР-анализа [24].

Таким образом, показано большое генетическое разнообразие изученных нетоксигенных штаммов по составу мобильных элементов с генами патогенности и пандемичности. Установлено, что нетоксигенные холерные вибрионы Эль Тор, циркулирующие на эндемичных по холере территориях, относятся к двум основным генотипам: *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁺ и *ctxA tcpA*⁻*VPI-2*^Δ*VSP*⁻. В отличие от них, на территории Калмыкии за исследуемый период не выделено ни одного нетоксигенного штамма с интактными островами пандемичности. Вместе с тем установлено присутствие в Калмыкии популяций холерных ви-

брионов как со специфическим генотипом *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻, так и с общим для эндемичных и неэндемичных по холере территорий генотипом *ctxA tcpA*⁻*VPI-2*^Δ*VSP*⁻. Результаты SNP-типирования показали, что холерные вибрионы, имеющие генотип *ctxA tcpA*⁻*VPI-2*^Δ*VSP*⁻ и циркулирующие на территориях обоих типов, филогенетически близки друг с другом, но обособлены от токсигенных штаммов. Установлено, что холерные вибрионы *ctxA tcpA*⁺*VPI-2*⁺*VSP*⁻ образуют отдельный кластер, удаленный как от токсигенных, так и от нетоксигенных изолятов *ctxA tcpA*⁻*VPI-2*^Δ*VSP*⁻. Тем не менее этот кластер филогенетически более близок с токсигенными по сравнению с указанными выше нетоксигенными изолятами. Анализ полученных данных свидетельствует о том, что нетоксигенные *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, способные, видимо, к длительному сохранению в водоемах Калмыкии, являются эпидемически безопасными.

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

Список литературы

- 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. USA*. 2016; 113(48):E7730–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.
- Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л., Кругликов В.Д., Титова С.В., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Мишанькин Б.М., Кривенко А.С., Анисимова Г.Б., Носков А.К. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 2:38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47.
- Миронова Л.В. Современные представления о закономерностях эпидемического процесса при холере: экологические и молекулярно-биологические аспекты. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9525-2018-23-5-242-250.
- Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B., Reeves P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(6):3134–9. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3134.
- Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996; 272(5270):1910–4. DOI: 10.1126/science.272.5270.1910.
- Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt 11):3681–93. DOI: 10.1099/002221287-148-11-3681.
- Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.0426679999.
- 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.
- Siriphap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew Ch., Aarestrup F.M., Suthieikul 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.
- Wang H., Yang Ch., Sun Z., Zheng W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic nontoxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
- Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Титова С.В., Архангельская И.В., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. ГИС: возможности анализа данных фено- и генотипирования холерных вибрионов O1 серогруппы Эль Тор, изолированных из

водных объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

12. Кулешов К.В., Маркелов М.Л., Дедков В.Г., Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Керманов А.В., Писанов Р.В., Кругликов В.Д., Мазрухо А.Б., Малеев В.В., Шипулин Г.А. Филогенетический анализ геномов штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Ростовской области. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2013; 6:13–20.

13. Зубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Водопьянов С.О. Генетические особенности штаммов холерных вибрионов O1 серогруппы *ctxA tcpA*⁺, выделенных из водных объектов Российской Федерации, охарактеризованные с помощью новой геоинформационной системы. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014; 9:32–5.

14. Титова С.В., Монахова Е.В. О потенциальной опасности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, содержащих гены токсин-корректируемых пилей адгезии. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; 5:65–72.

15. Миронова Л.В., Пономарева А.С., Хунхеева Ж.Ю., Гладких А.С., Балахонов С.В. Генетическое разнообразие *Vibrio cholerae* O1 El Tor при эпидемических осложнениях в Сибирском и Дальневосточном регионах. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.17116/molgen201937041165.

16. Mukhopadhyay A.K., Chakraborty S., Takeda Y., Nair G.B., Berg D.E. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(16):4737–46. DOI: 10.1128/JB.183.16.4737-4746.2001.

17. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Dziejman M., Rahman M.H., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(7):2123–8. DOI: 10.1073/pnas.0308485100.

18. O'Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4657–71. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004.

19. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y., Gao S., Zhang L., Kan B. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189(13):4837–49. DOI: 10.1128/JB.01959-06.

20. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин М.Б., Сучков И.Ю., Мишанькин Б.Н. Варибельные тандемные повторы, выявленные при компьютерном анализе генома *Vibrio cholerae*. *Биотехнология*. 2001; 6:85–8.

21. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(4):195–200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200.

22. Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdullah A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.

23. Mavian C., Paisie T.K., Alam M.T., Browne C., Beau De Rochars V.M., Nembrini S., Cash M.N., Nelson E.J., Azarian T., Ali A., Morris J.G. Jr, Salemi M. Toxigenic *Vibrio cholerae* evolution and establishment of reservoirs in aquatic ecosystems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(14):7897–904. DOI: 10.1073/pnas.1918763117.

24. Левченко Д.А., Архангельская И.В., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Ежова М.И., Ренгач М.В. Результаты мониторинга холерных вибрионов на территории Республики Калмыкия в 2013–2017 гг. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2019; 9(4):6–11. DOI: 10.18565/epidem.2019.94.6-11.

25. Смирнова Н.И., Агафонова Е.Ю., Шелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(2):76–86. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.

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

27. 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 эндемичной по холере территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; 1:115–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

References

1. 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. USA*. 2016; 113(48):E7730–E7739. DOI: 10.1073/pnas.1608732113.

2. Moskvitina E.A., Yanovich E.G., Kurilenko M.I., Kruglikov V.D., Titova S.V., Levchenko D.A., Vodop'yanov A.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Mishan'kin B.M., Krivenko A.S., Anisimova G.B., Noskov A.K. [Cholera: monitoring of epidemiological situation around the world and in Russia (2010–2019). Forecast for 2020]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (2):38–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47.

3. Mironova L.V. [Current views on objective laws of a cholera epidemic process: ecological and molecular-biological aspects]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2018; 23(5):242–50. DOI: 10.18821/1560-9525-2018-23-5-242-250.

4. Karaolis D.K., Johnson J.A., Bailey C.C., Boedeker E.C., Kaper J.B., Reeves P.R. A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1998; 95(6):3134–9. DOI: 10.1073/pnas.95.6.3134.

5. Waldor M.K., Mekalanos J.J. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science*. 1996; 272(5270):1910–4. DOI: 10.1126/science.272.5270.1910.

6. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.

7. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.

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

9. Siripap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew Ch., Aarestrup F.M., Sutheikul 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.

10. Wang H., Yang Ch., Sun Z., Zheng W., Yu H., Wu Y., Didelot X., Yang R., Pan J., Cui Y. Genomic epidemiology of *Vibrio cholerae* reveals the regional and global spread of two epidemic nontoxigenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.

11. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Titova S.V., Arkhangel'skaya I.V., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I. [GIS: capabilities of data analysis of pheno- and genotyping of El Tor O1 serogroup cholera vibrios isolated from surface water bodies in the Russia Federation]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2016; 6:19–25. DOI: 10.36233/0372-9311-2016-6-19-25.

12. Kulshov K.V., Markelov M.L., Dedkov V.G., Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Kermanov A.V., Pisanov R.V., Kruglikov V.D., Mazrukho A.B., Maleev V.V., Shipulin G.A. [Phylogenetic analysis of genomes of *Vibrio cholerae* strains isolated on the territory of Rostov region]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2013; 6:13–20.

13. Zубкова Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Vodop'yanov S.O. [Genetic features of strains of *Vibrio cholerae* O1 *ctxA tcpA*⁺, isolated from water bodies of the Russian Federation, described using a new geo-information systems]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya [Public Health and Life Environment]*. 2014; 9(258):32–5.

14. Titova S.V., Monakhova E.V. [Potential hazard of non-toxigenic *Vibrio cholerae* strains containing genes of toxin-coregulated pilus of adhesion]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktualnye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2016; 5:65–70.

15. Mironova L.V., Ponomareva A.S., Khunkheeva Zh.Yu., Gladkikh A.S., Balakhonov S.V. [Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 El Tor during epidemic complications in the Siberian and Far East regions]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2019; 37(4):165–72. DOI: 10.17116/molgen201937041165.

16. Mukhopadhyay A.K., Chakraborty S., Takeda Y., Nair G.B., Berg D.E. Characterization of VPI pathogenicity island and CTXphi prophage in environmental strains of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2001; 183(16):4737–46. DOI: 10.1128/JB.183.16.4737-4746.2001.

17. Faruque S.M., Chowdhury N., Kamruzzaman M., Dziejman M., Rahman M.H., Sack D.A., Nair G.B., Mekalanos J.J. Genetic diversity and virulence potential of environmental *Vibrio cholerae* population in a cholera-endemic area. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2004; 101(7):2123–8. DOI: 10.1073/pnas.0308485100.
18. O'Shea Y.A., Reen F.J., Quirke A.M., Boyd E.F. Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(10):4657–71. DOI: 10.1128/JCM.42.10.4657-4671.2004.
19. Pang B., Yan M., Cui Z., Ye X., Diao B., Ren Y., Gao S., Zhang L., Kan B. Genetic diversity of toxigenic and nontoxigenic *Vibrio cholerae* serogroups O1 and O139 revealed by array-based comparative genomic hybridization. *J. Bacteriol.* 2007; 189(13):4837–49. DOI: 10.1128/JB.01959-06.
20. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin M.B., Suchkov I.Yu., Mishan'kin B.N. [Variable tandem repeats, revealed in computer analysis of *Vibrio cholerae* genome]. *Biotekhnologiya [Biotechnology]*. 2001; 6:85–8.
21. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N. [INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2017; 22(4):195–200. DOI: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200.
22. Baddam R., Sarker N., Ahmed D., Mazumder R., Abdullah A., Morshed R., Hussain A., Begum S., Shahrin L., Khan A.I., Islam M.S., Ahmed T., Alam M., Clemens J.D., Ahmed N. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2020; 11(1):e03339-19. DOI: 10.1128/mBio.03339-19.
23. Mavian C., Paisie T.K., Alam M.T., Browne C., Beau De Rochars V.M., Nembrini S., Cash M.N., Nelson E.J., Azarian T., Ali A., Morris J.G. Jr, Salemi M. Toxigenic *Vibrio cholerae* evolution and establishment of reservoirs in aquatic ecosystems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2020; 117(14):7897–904. DOI: 10.1073/pnas.1918763117.
24. Levchenko D.A., Arkhangel'skaya I.V., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I., Rengach M.V. [Results of *Vibrio cholerae* monitoring in the Republic of Kalmykia in 2013–2017]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktualnye Voprosy [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]*. 2019; 9(4):6–11. DOI: 10.18565/epidem.2019.94.6-11.
25. Smirnova N.I., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Agafonov D.A., Krasnov Y.M., Livanova L.F., Kutyrev V.V. [Genomic diversity of non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains, isolated in the territory of Russia and neighboring states]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics Microbiology and Virology]*. 2018; 3:76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
26. Mironova L.V., Afanas'ev M.V., Gol'dapel E.G., Balakhonov S.V. [Multilocus sequence typing of *Vibrio cholerae* strains with different epidemic significance]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics Microbiology and Virology]*. 2015; 33(2):26–32.
27. 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. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

Authors:

Kritsky A.A., Smirnova N.I., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F. Elista Plague Control Station. Post Box 28, Elista, 358000, Russian Federation. E-mail: pestis-kalmykia@yandex.ru.

Об авторах:

Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Калыева Т.Б., Оброткина Н.Ф. Элистинская противочумная станция. Российская Федерация, 358000, Элиста, Главпочтамт, а/я 28. E-mail: pestis-kalmykia@yandex.ru.