

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-99-107

УДК 616.932(470.61)

Е.В. Монахова¹, А.К. Носков¹, В.Д. Кругликов¹, А.С. Водопьянов¹, Н.А. Селянская¹, Е.А. Меньшикова¹,
М.И. Ежова¹, Н.Б. Непомнящая¹, И.Г. Швиденко², О.А. Подойницына¹, Р.В. Писанов¹

Генотипическая характеристика клональных комплексов CTX-VPI⁺ *Vibrio cholerae* O1, обнаруживаемых в водоемах Ростовской области

¹ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация;

²ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – выявление генотипических особенностей клональных комплексов, образуемых CTX-VPI⁺ штаммами холерных вибрионов, выделенными в разные годы из водоемов Ростовской области, на основе биоинформационного анализа их полногеномных секвенсов (WGSs). **Материалы и методы.** Полногеномное секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina), идентификацию в WGSs генетических детерминант и биоинформационный анализ – с использованием программ BioEdit, BLASTN, BLASTP, CARD, Vector NTI. **Результаты и обсуждение.** В каждой группе изолятов 2002, 2005, 2007, 2020, 2021, 2022 гг. штаммы были практически идентичными и обнаруживались в разных точках отбора проб воды в течение более или менее длительных периодов (от 3 недель до 2 месяцев). Биоинформационный анализ WGSs представителей этих групп показал их разделение на 4 кластера, которые можно рассматривать как отдельные клональные комплексы, отличающиеся рядом характерных генетических маркеров: 1) изоляты 2002 г., содержащие один SNP в регуляторном гене *rpoS*; 2) штаммы 2007 г., несущие тандемно дублированный профаг preCTX; 3) штаммы, выделенные в 2020 г. в Ростове-на-Дону и в 2005 г. во время эпидосложнений в Каменском районе Ростовской области, которые имели «гибридный» остров патогенности, включающий кластер системы секреции 3-го типа и *nan-nag*-область острова VPI-2, а в гене *rpoS* присутствовало 9 SNP; 4) штаммы 2021 и 2022 гг. и единичный изолят 2018 г., содержащие делецию 9 п.н. в гене коллагеназы *vchC*. Несмотря на выявленные различия, представители всех клональных комплексов обладали достаточными наборами интактных детерминант факторов патогенности/персистенции для реализации вирулентных свойств и для обеспечения способности к выживанию в водоемах. Обнаружение в поверхностных водоемах клональных комплексов потенциально патогенных штаммов свидетельствует о периодическом создании благоприятных условий для их продолжительной циркуляции, что подчеркивает значимость постоянного мониторинга за холерными вибрионами на территории России.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, клональные комплексы, полногеномное секвенирование, биоинформационный анализ, факторы патогенности/персистенции.

Корреспондирующий автор: Монахова Елена Владимировна, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Для цитирования: Монахова Е.В., Носков А.К., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Селянская Н.А., Меньшикова Е.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б., Швиденко И.Г., Подойницына О.А., Писанов Р.В. Генотипическая характеристика клональных комплексов CTX-VPI⁺ *Vibrio cholerae* O1, обнаруживаемых в водоемах Ростовской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 3:99–107. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-99-107

Поступила 14.10.2022. Отправлена на доработку 25.01.2023. Принята к публ. 30.05.2023.

E.V. Monakhova¹, A.K. Noskov¹, V.D. Kruglikov¹, A.S. Vodop'yanov¹, N.A. Selyanskaya¹,
E.A. Men'shikova¹, M.I. Ezhova¹, N.B. Nepomnyashchaya¹, I.G. Shvidenko², O.A. Podoinitsyna¹,
R.V. Pisanov¹

Genotypic Characteristics of CTX-VPI⁺ Clonal Complexes of *Vibrio cholerae* O1 Found in Water Bodies of the Rostov Region

¹Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation;

²Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to identify genotypic features of clonal complexes formed by CTX-VPI⁺ strains of *Vibrio cholerae* isolated from water bodies of the Rostov Region in different years, based on bioinformatics analysis of their whole genome sequences (WGSs). **Materials and methods.** Whole genome sequencing was performed on the MiSeq (Illumina) platform; identification of genetic determinants in WGSs and bioinformatics analysis – by means of BioEdit, BLASTN, BLASTP, CARD, Vector NTI software packages. **Results and discussion.** The strains were almost identical in each group of 2002-, 2005-, 2007-, 2020-, 2021-, and 2022-isolates and were found at different points of water sampling over a longer or shorter periods of time (from 3 weeks to 2 months). Bioinformatics analysis of WGSs of representative strains divided them into 4 clusters, which can be considered as separate clonal complexes sharing a number of characteristic genetic markers: 1) 2002-isolates containing one SNP in regulatory *rpoS* gene; 2) 2007-strains carrying tandemly duplicated preCTX prophage; 3) strains isolated in 2020 in Rostov-on-Don and in 2005, during epidemiological complications in the Kamensk district of the Rostov Region, which had a “hybrid” pathogenicity island including the cluster of type 3 secretion system and the *nan-nag* region of the VPI-2 island, and 9 SNPs in *rpoS* gene; 4) 2021- and 2022-strains and a single 2018-isolate containing a 9 bp deletion in *vchC* collagenase gene. Despite the revealed differences, representatives of all clonal complexes possessed sufficient sets of intact determinants of pathogenicity/persistence factors to realize virulent properties and ability to survive in water bodies. Detection of clonal complexes of potentially pathogenic strains in surface water bodies indicates occasional emergence of favorable conditions

for their long-term circulation, which emphasizes the importance of constant monitoring of *V. cholerae* in the territory of Russia.

Key words: *Vibrio cholerae*, clonal complexes, whole genome sequencing, bioinformatics analysis, pathogenicity/persistence factors.

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

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Elena V. Monakhova, e-mail: monakhova_ev@antiplague.ru.

Citation: Monakhova E.V., Noskov A.K., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A., Men'shikova E.A., Ezhova M.I., Nepomnyashchaya N.B., Shvidenko I.G., Podoinitsyna O.A., Pisanov R.V. Genotypic Characteristics of CTX-VPI⁺ Clonal Complexes of *Vibrio cholerae* O1 Found in Water Bodies of the Rostov Region. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:99–107. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-99-107

Received 14.10.2022. **Revised** 25.01.2023. **Accepted** 30.05.2023.

Monakhova E.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Selyanskaya N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0008-4705>

Men'shikova E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6003-4283>
Ezhova M.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4254-3313>
Nepomnyashchaya N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0868-6791>
Podoinitsyna O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>

В процессе мониторинга за холерой из водных объектов окружающей среды (ООС) на территориях Российской Федерации ежегодно выделяются нетоксигенные (CTX⁻) штаммы *Vibrio cholerae* серогруппы O1. Несмотря на отсутствие эпидемической опасности, многие из них могут быть причастны к возникновению спорадических случаев и локальных вспышек острых кишечных инфекций (ОКИ) за счет экспрессии содержащихся в их геномах детерминант целого ряда факторов патогенности. В большинстве своем эти факторы одновременно способствуют обеспечению выживаемости холерных вибрионов в ООС [1], т.е. являются, по сути, факторами патогенности/персистенции. Иногда регистрируются случаи выделения практически идентичных штаммов из одних и тех же источников в диапазоне от трех недель до двух месяцев, и за это время может произойти заражение людей при условии наличия у вибрионов патогенетического потенциала. Ретроспективный анализ генотипов показал, что чаще всего клональные комплексы образуют штаммы, содержащие остров патогенности VPI с генами токсин-корегулируемых пилей TSP, тогда как CTX-VPI⁺ отличаются более выраженной гетерогенностью, хотя некоторые тоже обладают клональностью [2–5]. Так, в 2021 г. в Ростове-на-Дону был выявлен клональный комплекс, включающий 10 CTX-VPI⁺ изолятов, которые обнаруживались в воде р. Дон в трех разных точках отбора в течение трех недель. К этому же клональному комплексу был отнесен и единичный CTX-VPI⁺ штамм 2018 г., что указывало на возможность его длительной персистенции. Данный комплекс существенно отличался от такового 2020 г., образованного 8 CTX-VPI⁺ штаммами, выделенными из двух точек р. Мертвый Донец в течение более трех недель [5]. Полученные данные позволили предположить, что в регионе периодически складываются благоприятные условия для сохранения и распространения одинаковых штаммов в водоемах. Для адекватной оценки степени опасности клональных штаммов необходима их детальная генотипическая характеристика, включающая дальнейшее изучение геномов новых изолятов,

а также ретроспективный анализ генотипов штаммов предшествующих лет выделения и их сравнение со свежесделенными.

Целью работы явилось выявление генотипических особенностей клональных комплексов, образуемых CTX-VPI⁺ штаммами холерных вибрионов, выделенными в разные годы из водоемов Ростовской области, на основе биоинформационного анализа их полногеномных сиквенсов.

Материалы и методы

Объектами исследования служили CTX-VPI⁺ штаммы *V. cholerae* O1, выделенные из ООС на территориях Ростова-на-Дону и Ростовской области. В табл. 1 показано общее число изолятов из разных точек, а число отобранных для секвенирования и биоинформационного анализа приведено в разделе «Результаты и обсуждение». Штаммы получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ростовского-на-Дону противочумного института, где хранились в лиофилизированном состоянии. Фенотипическую чувствительность/устойчивость штаммов к антибактериальным препаратам определяли методом двукратных серийных разведений в плотной питательной среде согласно МУК 4.2.2495-09.

ПЦР-детекцию генов факторов патогенности/персистенции с электрофоретическим учетом результатов проводили с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология», Москва) и специфических праймеров, синтез которых осуществлен ЗАО «Евроген» (Москва). Набор генетических детерминант включал, помимо генов *ctxAB*, маркеры профагов preCTX (*rstRAB*, *cep*, *orfU*, *ace*, *zot*) и RS1 (*rstC*), островов патогенности VPI (*tcpA*, *toxT*, *tagA*, *aldA*, *mop*, *acfB*) и VPI-2 (*int*, *nanH*, *vce*), кластеров RTX (*rtxA*, *rtxC*), *msh* (*mshA*, *mshC*), систем секреции T3SS (*vcsN2*, *vcsC2*, *vcsV2*, *vspD*, *vopF*) и T6SS (*vasA*, *vasF*, *vasK*, *vgrG*, *hcp*), гены *chxA*, *cef*, *hapA*, *prtV*, *vesC*, *sto*, *toxR*, *hapR*, *ompW*, *ompU*.

Полногеномное секвенирование на платформе MiSeq (Illumina) и сборку геномов выполняли, как описано ранее [3], кластерный анализ полученных

Таблица 1 / Table 1

Общее число CTX-VPI⁺ штаммов, выделенных из разных стационарных точек
Total number of CTX-VPI⁺ strains isolated from different stationary sites

Годы Years	Даты Dates	Число штаммов Number of strains	Число стационарных точек Number of stationary sites	Источники выделения Sources of isolation	ПЦР-генотип PCR-genotype
2002	15.07–26.09	5	4	Таганровский залив, реки Дон, Темерник, Узьяк Taganrog Bay, the rivers Don, Temernik, Uzyak	preCTX ⁻ , T3SS ⁻ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁺
2005	28.07–02.09	12+32 клин. clinical	1	оз. Ветровский карьер, больные, носители the lake Vetrovsky Quarry, patients, carriers	preCTX ⁻ , T3SS ⁺ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁻
2007	23.07–27.08	4	4	сточные воды, реки Дон, Темерник sewage waters, the rivers Don, Temernik	preCTX ⁺ , T3SS ⁻ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁺
2018	25.06	1	1	река Темерник river Temernik	preCTX ⁻ , T3SS ⁻ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁺
2020	10.08–02.09	8	2	река Мертвый Донец river Mertvy Donets	preCTX ⁻ , T3SS ⁺ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁻
2021	21.06–12.07	10	3	река Дон river Don	preCTX ⁻ , T3SS ⁻ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁺
2022	06.06–23.09	15	3	реки Дон, Темерник the rivers Don, Temernik	preCTX ⁻ , T3SS ⁻ , int ⁺ , nanH ⁺ , vce ⁺

сиквенсов (WGSs, whole genome sequences) проводили согласно предложенной ранее схеме [6], обновленная база включала 55 тыс. SNP.

Генетические детерминанты идентифицировали в WGSs с помощью программ BioEdit 7.2.5 (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit>) и BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Прототипами служили геномы штаммов *V. cholerae* N16961 (AE003852, AE003853) и AM-19226 (AATY0200000000). Для поиска генетических детерминант лекарственной устойчивости использовали базу CARD (<https://card.mcmaster.ca>) и последовательности других найденных в NCBI генов, встречающихся у холерных вибрионов. Трансляцию генов, анализ их нуклеотидных последовательностей и аминокислотных (aa) последовательностей их продуктов осуществляли с использованием пакета программ Vector NTI Advance 11 (Invitrogen). Для определения наличия и локализации активных доменов в белках выполняли BLASTP-анализ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Результаты и обсуждение

В процессе ПЦР-типирования установлено, что CTX-VPI⁺ штаммы, выделенные в течение каждого года, обладали идентичными друг другу генотипами, некоторые из которых полностью совпадали с таковыми штаммов других лет выделения (табл. 1). Для ответа на вопрос о клональном статусе данных групп мы выборочно провели секвенирование ДНК представителей изолятов всех лет, перечисленных в табл. 1, с последующим SNP-анализом полученных

WGSs. На рис. 1 показана дендрограмма, построенная по результатам этого анализа.

Как видно из рис. 1, WGSs изученных штаммов разделились на четыре кластера, каждый из которых можно рассматривать как отдельный клональный комплекс.

Штаммы 2002 г. образовали наиболее однородный по SNP-профилям кластер, что весьма неожиданно, поскольку они были выделены в течение более двух месяцев из разных точек, из которых две находились за пределами Ростова-на-Дону. Однако в

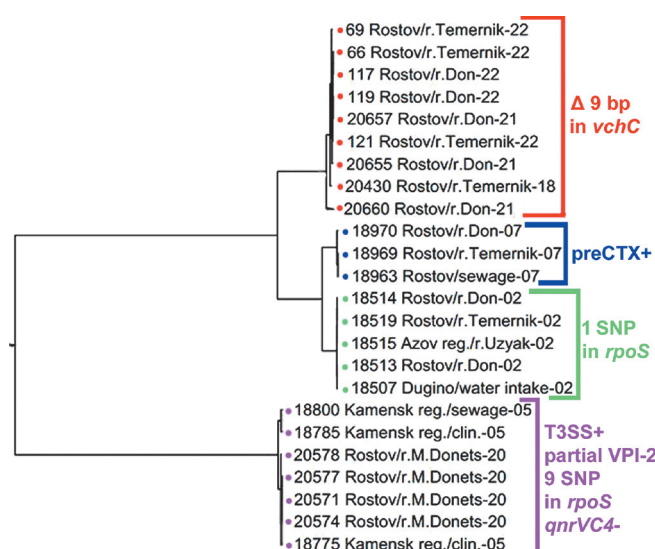


Рис. 1. Дендрограмма, построенная на основе анализа WGSs по 55 тыс. коровых SNP

Fig. 1. Dendrogram based on analysis of WGSs by 55 000 core SNPs

последующие годы такие штаммы в регионе не обнаруживались. Ближе всех к ним на дендрограмме располагались штаммы 2007 г., выделенные также из разных точек, но в пределах города. Они образовали отдельную ветвь и отнесены к другому клональному комплексу по причине обнаружения у них всех генов профага preCTX – RS2-элемента (*rstRAB*), *cep* (core encoded pilin), *orfU* (PIICTX), *ace* (accessory cholerae enterotoxin) и *zot* (zonula occludens toxin).

Изоляты 2022 г. вошли в один кластер с такими 2021 г. и идентичным им штаммом 2018 г. Очевидно, первые сохранились в ООС с прошлого года, а штаммы 2021 г., возможно, являются потомками последнего [5].

Наиболее отдаленный от других кластер объединил изоляты 2020 г., а также практически идентичные им штаммы 2005 г., выделенные в Каменском районе Ростовской области во время локальной вспышки ОКИ [2].

Дальнейший анализ был направлен на идентификацию в WGSs отдельных генов, их кластеров, геномных островов, мобильных элементов. У всех без исключения штаммов полностью отсутствовали, помимо CTX, профаг RS1, гены cholix-токсина *chxA*, термостабильного токсина *stn/sto*, острова пандемичности VSP-1 и VSP-2, но присутствовали

полные кластеры генов системы секреции 6-го типа (T6SS), биопленкообразования *vps1-rbm-vps2*, *msh*, жгутикообразования *fla1*, *fla2*, синтеза цитотоксина-актиномодулятора MARTX (*rtxACBDE*), интактные гены гемолизина *hlyA*, протеаз *hapA*, *prtV*, *vesA*, *vesB*, *vesC*, цитотонического токсина *cef*, регуляторов *toxR*, *hapR*, *hns*, *luxO*. Оказалось, что по большинству аллелей детерминант факторов патогенности/персистенции все штаммы почти не различались. Тем не менее нам удалось выявить и маркеры, характерные для каждого клонального комплекса (табл. 2, рис. 1).

Так, изоляты 2002 г. содержали полный остров патогенности VPI-2, значительно измененные по сравнению с прототипом кластеры *fla1* и *fla2*: в 7 из 8 генов обнаружено от 7 до 27 SNP с одной и той же локализацией у всех штаммов. Данные замены не привели к сдвигам рамок считывания (*orf*) либо образованию преждевременных стоп-кодонов, и гены остались интактными. Кроме того, 39 SNP присутствовали в гене *gyrA*, имеющем отношение к устойчивости к фторхинолонам. Другой ген такой резистентности, *qnrVC4*, выявлен у них программой CARD. В регуляторном гене *cytR* присутствовали 11 идентичных SNP.

Интересно, что такими же особенностями обладали и штаммы 2018, 2021 и 2022 гг. (один клональ-

Таблица 2 / Table 2

Основные различия между штаммами холерных вибрионов – представителями клональных комплексов по данным биоинформационного анализа WGSs

Main differences between *V. cholerae* strains - representatives of clonal complexes according to bioinformatics analysis of WGSs

Гены Genes	Годы Years	2002	2007	2005	2020	2021	2018	2022
	n/N	5/5	2/4	3/32	4/8	3/10	1/1	5/12
preCTX	профаг prophage	–	+ тандем + tandem	–	–	–	–	–
VPI2	остров island	полный complete	полный complete	фрагмент fragment	фрагмент fragment	полный complete	полный complete	полный complete
T3SS	кластер cluster	–	–	+	+	–	–	–
<i>vchC</i>	ген gene	pt	pt	pt	pt	Δ 9bp	Δ 9bp	Δ 9bp
<i>fla-1</i> (<i>flaA</i> , <i>C</i> , <i>fglL</i> , <i>M</i>)	кластер cluster	10, 27, 14, 15 SNP	10, 27, 14, 15 SNP	pt	pt	10, 27, 14, 15 SNP	10, 27, 14, 15 SNP	10, 27, 14, 15 SNP
<i>fla-2</i> (<i>flaE</i> , <i>D</i> , <i>B</i>)	кластер cluster	16, 7, 10 SNP	16, 7, 10 SNP	pt	pt	16, 7, 10 SNP	16, 7, 10 SNP	16, 7, 10 SNP
<i>gyrA</i>	ген gene	38 SNP	38 SNP	pt	pt	38 SNP	38 SNP	38 SNP
<i>qnrVC4</i>	ген gene	+	+	–	–	+	+	+
<i>cytR</i>	ген gene	11 SNP	11 SNP	pt	pt	11 SNP	11 SNP	11 SNP
<i>rpoS</i>	ген gene	1 SNP	pt	9 SNP	9 SNP	pt	pt	pt/ins6bp

Примечания: n/N – число секвенированных штаммов / общее число изолятов; pt – прототипные гены. Количество SNP определено по отношению к генам прототипа *V. cholerae* N16961.

Notes: n/N – number of sequenced strains / total number of isolates; pt – prototype genes. Number of SNPs is determined against *V. cholerae* N16961 prototype genes.

ный комплекс), причем все SNP полностью совпадали. Вместе с тем у них имелась делеция 9 п.н. в гене коллагеназы *vchC*, не сопровождающаяся сдвигом *orf*, но приведшая к укорочению продукта его трансляции на 3 аа, активные домены в нем сохранились.

У трех из пяти проанализированных изолятов 2022 г. внутри гена *proS* появилась вставка 6 п.н. без сдвига рамки, а в продукте трансляции – соответственно два «лишних» аа, что могло быть результатом мутационной изменчивости в процессе длительной персистенции в ООС.

Штаммы 2007 г., как отмечено выше, отличались от остальных присутствием в геноме тандемно дублированного профага *preCTX* с геном *rstR* типа Эль Тор. При этом в конце каждого из профагов располагался сайт специфической интеграции *attRS1*. Нуклеотидные последовательности двух профагов полностью совпадали, не считая 2 SNP в генах *zot*, но наличие тандема не вызывает сомнений, поскольку при сборке WGS штамма 18969 они попали в один контиг, где последовательность между *attRS1-1* и *rstR-2* (477 п.н.) совершенно не совпадала по длине и нуклеотидному составу с таковой между *attRS1-2* и последующим геном *rtxA* (333 п.н.). В геномах других штаммов найдено только по одной копии *preCTX*, однако в содержащих их контигах кроме дистального сайта *attRS1-2* в начале присутствовала часть *attRS1-1* (12–18 п.н.). Тандемная дубликация указывает на потенциальную способность к продукции вирионов *preCTXφ* [7]. Штаммы, содержащие *preCTX*, встречаются в водоемах России довольно редко и имеют заносное происхождение. Они обладают повышенным патогенным потенциалом, поскольку в состав профага входят гены дополнительных факторов патогенности *Ser*, *Ace* и *Zot*, которые могут утяжелять симптоматику ОКИ. По всей видимости, в 2007 г. имели место занос и последующее распространение нового клона, поскольку среди выделенных ранее *preCTX⁺* вибрионов ни один не содержал аллель *rstR* типа Эль Тор, имелись различия и по структуре других генов профага.

Штаммы 2020 и 2005 гг. обладали наибольшим числом отличительных маркеров. В первую очередь это присутствие в геномах полного интактного кластера T3SS, что указывает на потенциальную возможность системы экспрессироваться и в случае заражения людей вносить существенный вклад в развитие заболеваний. Известно, что эффекторы данной системы способствуют колонизации кишечника лабораторных животных и могут вызывать тяжелую диарею с летальным исходом [8–11]. Кроме того, заслуживает внимания предположение о ее возможном вкладе в выживаемость вибрионов в водных ООС в ассоциации с их обитателями [12]. Косвенным свидетельством в пользу такой вероятности может служить способность T3SS⁺ штаммов вызывать серьезное заболевание креветок в аквакультуре, хотя причастны к этому могут быть и другие факторы патогенности [13]. Другим отличительным

признаком клонального комплекса является неполный остров патогенности VPI-2, в котором отсутствовала протяженная проксимальная часть – кластер генов рестрикции-модификации, сохранилась интактная *nan-nag*-область, экспрессия которой обеспечивает катаболизм и транспорт сиаловых кислот. Последние служат источниками углерода для питания бактерий в разных экологических нишах [14, 15]. Дистальная часть VPI-2 практически отсутствовала, кластер фагоподобных генов был делетирован, сохранились только следующие за *nan-nag*-областью гены ДНК-связывающего белка (VC1785), ДНК-репаратора *radC* и завершающие этот кластер гены гипотетического белка VC1805 и фаговой репликазы VC1806. Ген гипотетического белка VC1804 утратил 12 первых аа включая старт-кодон. В литературе описана аналогичная структура, выявленная в геномах штаммов не только неO1/неO139, но и отдельных представителей серогруппы O1; авторы обозначили этот «гибридный» кластер как остров патогенности VPI-3 [16, 17]. Между кластером T3SS и участком VPI-2 находятся две неизвестные *orf*, отсутствующие у T3SS⁺ штаммов, содержащих полный VPI-2. Продукт трансляции одной из них программа BLASTP идентифицировала как гипотетический белок, а другой – как белок, содержащий Ig-подобный домен (Ig-like domain-containing protein). Функции этого белка, состоящего из 681 аа, остаются неизвестными. Вероятно, данные *orf* относятся к T3SS-кластеру, хотя на представленных в публикациях схемах в него не включены.

Ген интегразы находился в начале кластера T3SS и отличался от таковых других T3SS⁺ штаммов (WGSs которых получены нами ранее либо найдены в NCBI), но гену интегразы VPI-2 такой же длины (1236 п.н.) он идентичен на 98 %.

По всей видимости, исследуемые штаммы содержат «гибридный» остров патогенности VPI-3 (рис. 2), который мог образоваться в результате обмена проксимального участка VPI-2 на кластер T3SS и дополнительной делеции в дистальной части VPI-2. Как и у других T3SS⁺ холерных вибрионов, кластер интегрирован в хромосому рядом с геном *tPHK*, как и полный VPI-2 T3SS⁺ штаммов. Более того, перед геном *tPHK* в обоих случаях находится один и тот же ген транспортного белка семейства AcrB/D/F (VC1767), т.е. позиция «гибридного» острова не изменилась. Для ответа на вопросы, является ли такая структура специфичной для всех T3SS⁺ холерных вибрионов и в чем состоит смысл ее формирования, требуется дальнейший анализ с включением большего числа штаммов по сравнению с ограниченной выборкой, изученной на сегодняшний день.

Наконец, штаммы 2020 и 2005 гг. отличались наличием 9 SNP в гене сигма-фактора *proS*, не нарушивших его интактность. Повреждение этого гена могло бы привести к значительному снижению вирулентности и способности к колонизации кишечника [18].

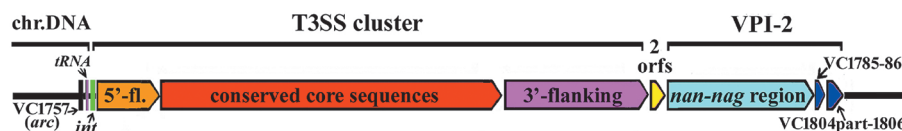


Рис. 2. Схематическое изображение структуры «гибридного» острова, включающего кластер T3SS и часть VPI-2, в геноме штаммов 2005 и 2020 гг.

Fig. 2. Schematic representation of the “hybrid” island structure, including T3SS cluster and a fragment of VPI-2, in the genome of 2005- and 2020-isolates

Обнаружение совпадения генотипов штаммов 2020 г. с таковыми 2005 г., вызвавшими эпидосложнения в Ростовской области более 15 лет назад, оказалось неожиданным. Во время упомянутой клональной вспышки идентичные друг другу штаммы выделялись не только от людей, но и из воды озера, используемого в рекреационных целях [2]. В связи с этим возникает вопрос, могли ли эти штаммы так долго сохраняться в ООС, ни разу себя не обнаружив в течение всего периода, например, перейдя в некультивируемое состояние [19]. Такая возможность полностью не исключена, хотя более вероятным представляется новый занос клона, сформировавшегося и циркулирующего в азиатских регионах. Вспышку 2005 г. связывали с трудовыми мигрантами из Таджикистана, работавшими в то время на стройке. Значительный поток трудовых мигрантов в Россию, в т.ч. в Ростовскую область, не прекращается, какая-то их часть может оставаться на ПМЖ, однако сомнения вызывает возможность столь длительного носительства. К сожалению, обследование людей на данной территории в отсутствие эпидпоказаний невозможно, как и получение штаммов из Таджикистана и других стран Азии.

Несмотря на выявленные различия, представители всех клональных комплексов обладали достаточными наборами интактных детерминант факторов патогенности/персистенции для реализации вирулентных свойств и для обеспечения способности к выживанию в ООС.

В частности, *tcp*-кластер в составе VPI обеспечивает продукцию TCP, которые не только являются ключевым фактором колонизации кишечника, но и способствуют биопленкообразованию на хитиновых поверхностях водных членистоногих [19, 20], что повышает персистентный потенциал холерных вибрионов. Другие факторы, обеспечивающие формирование биопленок, кодируются кластерами *msh* и *vpsI-rbm-vpsII* [3], имеющимися у всех изученных штаммов.

Присутствие основного и трех дополнительных (*Aux*-1, -2, -3) кластеров T6SS указывает на высокую вероятность ее экспрессии, несмотря на отсутствие *Aux*-4 (наличие *Aux*-5 не определяли в связи с недоступностью его сиквенса) [21, 22]. Эта система секреции является мощным фактором патогенности/персистенции, убивающим макрофаги и способствующим в организме человека колонизации кишечника, а в ООС – хитина ракообразных [18, 19, 21, 22]. Она защищает вибрионов от поедания одно-

клеточными хищниками и лизирует конкурентные бактерии, продукты лизиса которых используются как источники питания.

Все штаммы за счет присутствия интактных детерминант обладали потенциальной способностью к продукции MARTX, HlyA (VCC), Cef, протеаз HA/P, PrtV, VchC, VesA, VesB, VesC, IvaP, RssP [23, 24]. Многие структурные и регуляторные гены были идентичны либо близки прототипам, другие содержали довольно большое число нуклеотидных замен. Продукты трансляции таких измененных генов также отличались по первичной структуре, что, вероятно, сказывается на их активности в сторону усиления или ослабления. Однако мы полагаем, что при наличии широких спектров детерминант экспрессия хотя бы некоторых из них может обеспечивать реализацию патогенного и персистентного потенциала.

Во всех WGSs программами BioEdit и CARD не обнаружено большинства детерминант резистентности к антибиотикам, в частности к тетрациклинам (*tetA*, *R*), хлорамфениколу (*floR*, *catB9*), ампициллину и другим бета-лактамам (*blaP1*, *carb7*, 9, *blaNDM-1*), цефалоспорином (*blaCTX-M*), стрептомицину (*strA*, *B*, *aadA1*), канамицину (*aphA1*), гентамицину (*aadA2*), рифампицину (*arr2*, 3), триметоприму (*dfrA-18*, -1, -5, -12, -23), сульфаметоксазолу (*sul1*, 2). Что касается генов устойчивости к фторхинолонам, то ни в одном геноме не выявлено гена *qnrVC1*, но в то же время у всех штаммов, за исключением изолятов 2005 и 2020 гг., присутствовал ген *qnrVC4*. Представители всех клональных комплексов обладали геном β-лактамазы *varG*, ответственной за устойчивость к пенициллинам, а также гомологом гена *nfsA*, хотя причастность его продукта к резистентности к фуразолидону для холерных вибрионов не доказана. У всех штаммов также выявлены детерминанты эффлюкс-помп RND (CPR) и MATE (гены *VC1634*, *vcmABDHMN*); не выявлены SXT-элементы, интегроны 1-го класса и плазмиды.

В большинстве случаев отсутствие генов антибиотикорезистентности совпадало с фенотипической чувствительностью, в частности, к гентамицину, канамицину, хлорамфениколу, тетрациклину, доксициклину, налидиксовой кислоте, ципрофлоксацину, рифампицину. Вместе с тем иногда наблюдались и исключения. Так, штаммы 2005 г. были устойчивы к стрептомицину и триметоприму/сульфометаксазолу, хотя перечисленные выше гены резистентности не были обнаружены, тогда как штаммы 2020 г. из того же клонального комплекса оставались чувствитель-

ными. Причины этого факта неясны, возможно, резистентность была связана с другими, еще не описанными либо отсутствующими в использованной базе генами, которые по каким-то причинам не работали у остальных штаммов. К триметоприму/сульфаметаксазолу также были чувствительны все изученные представители клона 2018, 2021, 2022 гг. Культуры с устойчивостью либо промежуточной устойчивостью к ампициллину встречались во всех клональных комплексах, кроме 2007 г. (preCTX⁺), хотя они так же содержали ген *varG*. Штаммы 2005 г. проявляли промежуточную устойчивость к цефотаксиму, не имея гена *blaCTX-M*. И наоборот, присутствие гена *qnrVC4* у представителей трех клональных комплексов не обеспечило им устойчивости к фторхинолонам. Аналогичные штаммы (с геном *qnrVC1*) ранее описаны в литературе [25]. Резистентность к фуразолидону отсутствовала у клона 2002 г., остальные были устойчивы, что совпадает с литературными данными о том, что реальная устойчивость к нитрофуранам выявлялась не у всех штаммов холерных вибрионов, выделенных до 2008–2010 гг., тогда как в последующие годы их число возрастало, и в настоящее время подавляющее большинство обладает резистентностью [26].

Следует отметить, что внутри каждого комплекса имелись межштаммовые различия в фенотипическом проявлении устойчивости к антимикробным агентам (ампициллину, триметоприму, сульфаметоксазолу) от нулевой до промежуточной и выраженной. Это может быть связано с мутационной изменчивостью в процессе пребывания в ООС, однако для полного понимания данного явления требуются дальнейшие углубленные исследования, возможно с использованием дополнительных компьютерных программ и баз данных.

Полученные данные еще раз подтверждают возможность достаточно длительного сохранения в водоемах CTX-VPI⁺ штаммов холерных вибрионов, представляющих потенциальную опасность возникновения спорадических заболеваний либо локальных вспышек ОКИ. Также следует иметь в виду, что клональные комплексы могут формироваться и CTX-VPI⁺ штаммами. Например, такие комплексы ранее выявлены в водоемах в Сочи [3], Республике Калмыкия [4], Сибири и на Дальнем Востоке [5], а также в Китае [27], Франции [28], США [29]. В Бразилии и Аргентине два клона (Amazonia и Tucumán) в конце прошлого столетия вызвали локальные вспышки холероподобных заболеваний [30], а в Чили в 2018 г. зарегистрирована вспышка острого гастроэнтерита, обусловленная T3SS+ клоном *V. cholerae* nonO1/nonO139 [16]. Наконец, нельзя полностью исключить и возможность сохранения и распространения в ООС завозных токсигенных штаммов. Один такой случай имел место в Ростове-на-Дону в 2001 г., когда на фоне эпидемического благополучия в течение двух недель три генетически измененных штамма были выделены из трех раз-

ных точек. Происхождение их не установлено, хотя они могли быть занесены из Казани, где в это время возникла вспышка эпидемической холеры, вызванная такими же штаммами. Все это подчеркивает значимость постоянного мониторинга за холерными вибрионами на территории РФ, а случаи выявления в ООС клональных комплексов требуют повышенного внимания.

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

Финансирование. Авторы заявляют об отсутствии дополнительного финансирования при проведении данного исследования.

Список литературы

1. Sakib S.N., Reddi G., Almagro-Moreno S. Environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00795-17. DOI: 10.1128/JB.00795-17.
2. Онищенко Г.Г., Ломов Ю.М., Москвитина Э.А., Подосинникова Л.С., Водяницкая С.Ю., Прометной В.И., Монахова Е.В., Водопьянов С.О., Телесманин Н.Р., Дудина Н.А. Холера, обусловленная *Vibrio cholerae* O1 ctxAB-tcpA⁺. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007; 1:23–9.
3. Титова С.В., Монахова Е.В., Алексеева Л.П., Писанов Р.В. Молекулярно-генетические основы биопленкообразования как составляющей персистенции *Vibrio cholerae* в водоемах Российской Федерации. *Экологическая генетика.* 2018; 16(4):23–32. DOI: 10.17816/ecogen16423-32.
4. Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Обороткина 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.
5. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Монахова Е.В., Миронова Л.В., Крицкий А.А., Лопатын А.А., Чеминова О.С., Соболева Е.Г., Иванова С.М., Водопьянов А.С., Стенина С.И., Писанов Р.В., Левченко Д.А., Подойницына О.А., Непомнящая Н.Б., Ежова М.И. Холера: тенденции развития эпидемического процесса в 2021 г., прогноз на 2022 г. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2022; 1:24–34. DOI: 10.21055/0370-069-2022-1-24-34.
6. Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Кругликов В.Д., Титова С.В. Молекулярная эпидемиология *Vibrio cholerae* – разработка алгоритма анализа данных полногеномного секвенирования. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.18821/1560-9529-2016-21-3-146-152.
7. Fan F., Kan B. Survival and proliferation of the lysogenic bacteriophage CTXφ in *Vibrio cholerae*. *Virol. Sin.* 2015; 30(1):19–25. DOI: 10.1007/s12250-014-3550-7.
8. Tam V.C., Serruto D., Dziejman M., Briehner W., Mekalanos J.J. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe.* 2007; 1(2):95–107. DOI: 10.1016/j.chom.2007.03.005.
9. Tam V.C., Suzuki M., Coughlin M., Saslowsky D., Biswas K., Lencer W.I., Faruque S.M., Mekalanos J.J. Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2010; 1(5):e00289-10. DOI: 10.1128/mBio.00289-10.
10. Alam A., Miller K.A., Chaand M., Butler J.S., Dziejman M. Identification of *Vibrio cholerae* type III secretion system effector proteins. *Infect. Immun.* 2011; 79(4):1728–40. DOI: 10.1128/IAI.01194-10.
11. Shin O.S., Tam V.C., Suzuki M., Ritchie J.M., Bronson R.T., Waldor M.K., Mekalanos J.J. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio.* 2011; 2:e00106-11. DOI: 10.1128/mBio.00106-11.
12. Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., Rahman M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kuchlerapati R., Mekalanos J.J. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2005; 102(9):3465–70. DOI: 10.1073/pnas.0409918102.
13. Zhou Y., Gu S., Li J., Ji P., Zhang Y., Wu C., Jiang Q., Gao X., Zhang X. Complete genome analysis of highly pathogenic non-O1/O139 *Vibrio cholerae* isolated from *Macrobrachium rosenbergii*

reveals pathogenicity and antibiotic resistance-related genes. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:882885. DOI: 10.3389/fvets.2022.882885.

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

15. Almagro-Moreno S., Boyd E.F. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 2009; 77(9):3807–16. DOI: 10.1128/IAI.00279-09.

16. Arteaga M., Velasco J., Rodriguez S., Vidal M., Arellano C., Silva F., Carreño L.J., Vidal R., Montero D.A. Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018. *Microb. Genom.* 2020; 6(3):e000340. DOI: 10.1099/mgen.0.000340.

17. Carpenter M.R., Kalburge S.S., Borowski J.D., Peters M.C., Colwell R.R., Boyd E.F. CRISPR-Cas and contact-dependent secretion systems present on excisable pathogenicity islands with conserved recombination modules. *J. Bacteriol.* 2017; 199(10):e00842-16. DOI: 10.1128/JB.00842-16.

18. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330.

19. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.

20. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 2005; 187(10):3551–5. DOI: 10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005.

21. Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., Watve S.S., Yunker P., Jordan I.K., Hammer B.K. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1):163. DOI: 10.1186/s13059-019-1765-5.

22. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Кульшань Т.А., Швиденко И.Г., Крицкий А.А. Система секреции шестого типа *Vibrio cholerae*. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 2:27–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-27-35.

23. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.

24. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S.N. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 2008; 275(12):3167–77. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x.

25. Селянская Н.А., Егизарян Л.А., Ежова М.И., Пасюкова Н.И., Водопьянов С.О. Анализ устойчивости к антибактериальным препаратам холерных вибрионов, выделенных из объектов окружающей среды в России в 2019 г. *Антибиотики и химиотерапия*. 2021; 66(3-4):4–11. DOI: 10.24411/0235-2990-2021-66-3-4-4-11.

26. Parvin I., Shahunja K.M., Khan S.H., Alam T., Shahrin L., Ackhter M.M., Sarmin M., Dash S., Rahman M.W., Shahid A.S.M.S.B., Golam Faruque A.S., Ahmed T., Chisti M.J. Changing susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O1 isolates to commonly used antibiotics in the largest diarrheal disease hospital in Bangladesh during 2000–2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103(2):652–8. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0058.

27. Zhou H., Zhao X., Wu R., Cui Z., Diao B., Li J., Wang D., Kan B., Liang W. Population structural analysis of O1 El Tor *Vibrio cholerae* isolated in China among the seventh cholera pandemic on the basis of multilocus sequence typing and virulence gene profiles. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 22:72–80. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.12.016.

28. Kirchberger P.C., Orata F.D., Barlow E.J., Kauffman K.M., Case R.J., Polz M.F., Boucher Y. A small number of phylogenetically distinct clonal complexes dominate a coastal *Vibrio cholerae* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(18):5576–86. DOI: 10.1128/AEM.01177-16.

29. Esteves K., Mosser T., Aujoulat F., Hervio-Heath D., Monfort P., Jumas-Bilak E. Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. *Front. Microbiol.* 2015; 6:708. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00708.

30. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martín F., Ibarra C., Binsztain N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41(1):124–34. DOI: 10.1128/JCM.41.1.124-134.2003.

References

1. Sakib S.N., Reddi G., Almagro-Moreno S. Environmental role of pathogenic traits in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2018; 200(15):e00795-17. DOI: 10.1128/JB.00795-17.

2. 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⁺]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2007; (1):23–9.

3. Titova S.V., Monakhova E.V., Alekseeva L.P., Pisanov R.V. [Molecular-genetic basis of biofilm formation as a component of *Vibrio cholerae* persistence in water reservoirs of Russian Federation]. *Ekologicheskaya Genetika* [Ecological Genetics]. 2018; 16(4):23–32. DOI: 10.17816/ecogen16423-32.

4. Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutryev V.V. [Comparative analysis of molecular-genetic properties of non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor isolated in Russia and in cholera endemic territories]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; (3):72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

5. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Monakhova E.V., Mironova L.V., Kritsky A.A., Lopatin A.A., Chemisova O.S., Soboleva E.G., Ivanova S.M., Vodopyanov A.S., Stenina S.I., Pisanov R.V., Levchenko O.A., Podomnitsyna O.A., Nepomnyashchaya N.B., Ezhova M.I. [Cholera: trends in the development of the epidemic process in 2021, forecast for 2022]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2022; (1):24–34. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-1-24-34.

6. Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Vodopyanov S.O., Mishankin B.N., Oleynikov I.P., Kruglikov V.D., Titova S.V. [Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* – development of the algorithm for data analysis of whole genome sequencing]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni* [Epidemiology and Infectious Diseases]. 2016; 21(3):146–52. DOI: 10.17816/EID40917.

7. Fan F., Kan B. Survival and proliferation of the lysogenic bacteriophage CTXφ in *Vibrio cholerae*. *Virol. Sin.* 2015; 30(1):19–25. DOI: 10.1007/s12250-014-3550-7.

8. Tam V.C., Serruto D., Dziejman M., Briehier W., Mekalanos J.J. A type III secretion system in *Vibrio cholerae* translocates a formin/spire hybrid-like actin nucleator to promote intestinal colonization. *Cell Host Microbe*. 2007; 1(2):95–107. DOI: 10.1016/j.chom.2007.03.005.

9. Tam V.C., Suzuki M., Coughlin M., Saslowsky D., Biswas K., Lencer W.I., Faruque S.M., Mekalanos J.J. Functional analysis of VopF activity required for colonization in *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2010; 1(5):e00289-10. DOI: 10.1128/mBio.00289-10.

10. Alam A., Miller K.A., Chaand M., Butler J.S., Dziejman M. Identification of *Vibrio cholerae* type III secretion system effector proteins. *Infect. Immun.* 2011; 79(4):1728–40. DOI: 10.1128/IAI.01194-10.

11. Shin O.S., Tam V.C., Suzuki M., Ritchie J.M., Bronson R.T., Waldor M.K., Mekalanos J.J. Type III secretion is essential for the rapidly fatal diarrheal disease caused by non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae*. *mBio*. 2011; 2:e00106-11. DOI: 10.1128/mBio.00106-11.

12. Dziejman M., Serruto D., Tam V.C., Sturtevant D., Diraphat P., Faruque S.M., Rahman M.H., Heidelberg J.F., Decker J., Li L., Montgomery K.T., Grills G., Kuchelapati R., Mekalanos J.J. Genomic characterization of non-O1, non-O139 *Vibrio cholerae* reveals genes for a type III secretion system. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2005; 102(9):3465–70. DOI: 10.1073/pnas.0409918102.

13. Zhou Y., Gu S., Li J., Ji P., Zhang Y., Wu C., Jiang Q., Gao X., Zhang X. Complete genome analysis of highly pathogenic non-O1/O139 *Vibrio cholerae* isolated from *Macrobrachium rosenbergii* reveals pathogenicity and antibiotic resistance-related genes. *Front. Vet. Sci.* 2022; 9:882885. DOI: 10.3389/fvets.2022.882885.

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

15. Almagro-Moreno S., Boyd E.F. Sialic acid catabolism confers a competitive advantage to pathogenic *Vibrio cholerae* in the mouse intestine. *Infect. Immun.* 2009; 77(9):3807–16. DOI: 10.1128/IAI.00279-09.

16. Arteaga M., Velasco J., Rodriguez S., Vidal M., Arellano C., Silva F., Carreño L.J., Vidal R., Montero D.A. Genomic characterization of the non-O1/non-O139 *Vibrio cholerae* strain that caused a gastroenteritis outbreak in Santiago, Chile, 2018. *Microb. Genom.* 2020; 6(3):e000340. DOI: 10.1099/mgen.0.000340.

17. Carpenter M.R., Kalburge S.S., Borowski J.D., Peters M.C., Colwell R.R., Boyd E.F. CRISPR-Cas and contact-dependent secretion systems present on excisable pathogenicity islands with conserved recombination modules. *J. Bacteriol.* 2017; 199(10):e00842-16. DOI: 10.1128/JB.00842-16.

18. Silva A.J., Benitez J.A. *Vibrio cholerae* biofilms and cholera pathogenesis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016; 10(2):e0004330. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004330.

19. Lutz C., Erken M., Noorian P., Sun S., McDougald D. Environmental reservoirs and mechanisms of persistence of *Vibrio cholerae*. *Front. Microbiol.* 2013; 4:375. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00375.

20. Reguera G., Kolter R. Virulence and the environment: a novel role for *Vibrio cholerae* toxin-coregulated pili in biofilm formation on chitin. *J. Bacteriol.* 2005; 187(10):3551–5. DOI: 10.1128/JB.187.10.3551-3555.2005.
21. Crisan C.V., Chande A.T., Williams K., Raghuram V., Rishishwar L., Steinbach G., Watve S.S., Yunker P., Jordan I.K., Hammer B.K. Analysis of *Vibrio cholerae* genomes identifies new type VI secretion system gene clusters. *Gen. Biol.* 2019; 20(1):163. DOI: 10.1186/s13059-019-1765-5.
22. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Kul'shan' T.A., Shvidenko I.G., Kritsky A.A. [*Vibrio cholerae* secretion system of the type VI]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (2):27–35. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-2-27-35.
23. Mondal A., Tapader R., Chatterjee N.S., Ghosh A., Sinha R., Koley H., Saha D.R., Chakrabarti M.K., Wai S.N., Pal A. Cytotoxic and inflammatory responses induced by outer membrane vesicle-associated biologically active proteases from *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2016; 84(5):1478–90. DOI: 10.1128/IAI.01365-15.
24. Vaitkevicius K., Rompikuntal P.K., Lindmark B., Vaitkevicius R., Song T., Wai S.N. The metalloprotease PrtV from *Vibrio cholerae*. *FEBS J.* 2008; 275(12):3167–77. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2008.06470.x.
25. Selyanskaya N.A., Egiazyryan L.A., Ezhova M.I., Pasyukova N.I., Vodopyanov S.O. [Analysis of antibiotic resistance of *Vibrio cholerae* isolated from environmental objects in Russia in 2019]. *Antibiotiki i Khimioterapiya [Antibiotics and Chemotherapy]*. 2021; 66(3-4):4–11. DOI: 10.24411/0235-2990-2021-66-3-4-4-11.
26. Parvin I., Shahunja K.M., Khan S.H., Alam T., Shahrin L., Ackhter M.M., Sarmin M., Dash S., Rahman M.W., Shahid A.S.M.S.B., Golam Faruque A.S., Ahmed T., Chisti M.J. Changing susceptibility pattern of *Vibrio cholerae* O1 isolates to commonly used antibiotics in the largest diarrheal disease hospital in Bangladesh during 2000–2018. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2020; 103(2):652–8. DOI: 10.4269/ajtmh.20-0058.
27. Zhou H., Zhao X., Wu R., Cui Z., Diao B., Li J., Wang D., Kan B., Liang W. Population structural analysis of O1 El Tor *Vibrio cholerae* isolated in China among the seventh cholera pandemic on the basis of multilocus sequence typing and virulence gene profiles. *Infect. Genet. Evol.* 2014; 22:72–80. DOI: 10.1016/j.meegid.2013.12.016.
28. Kirchberger P.C., Orata F.D., Barlow E.J., Kauffman K.M., Case R.J., Polz M.F., Boucher Y. A small number of phylogenetically distinct clonal complexes dominate a coastal *Vibrio cholerae* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 2016; 82(18):5576–86. DOI: 10.1128/AEM.01177-16.
29. Esteves K., Mosser T., Aujoulat F., Hervio-Heath D., Monfort P., Jumas-Bilak E. Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. *Front. Microbiol.* 2015; 6:708. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00708.
30. Pichel M., Rivas M., Chinen I., Martín F., Ibarra C., Binsztajn N. Genetic diversity of *Vibrio cholerae* O1 in Argentina and emergence of a new variant. *J. Clin. Microbiol.* 2003. 41(1):124–34. DOI: 10.1128/JCM.41.1.124-134.2003.

Authors:

Monakhova E.V., Noskov A.K., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A., Men'shikova E.A., Ezhova M.I., Nepomnyashchaya N.B., Podoinitsyna O.A., Pisanov R.V. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Shvidenko I.G. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Монахова Е.В., Носков А.К., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Селянская Н.А., Меньшикова Е.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б., Подойницына О.А., Писанов Р.В. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.

Швиденко И.Г. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.