

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-122-131

УДК 616.932:579.25(571.6+571.1)/5

Л.В. Миронова¹, И.С. Федотова¹, Ю.П. Галачьянц^{1,2}, А.С. Пономарева¹, С.В. Эрдынеев¹,
Ж.Ю. Хунхеева¹, Е.А. Басов¹, А.В. Фортунатова¹, С.В. Балахонов¹

Геномный анализ штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке в период седьмой пандемии холеры: идентификация принадлежности к глобальным филогенетическим линиям

¹ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Иркутск, Российская Федерация; ²ФГБУН «Лимнологический институт» Сибирского отделения Российской академии наук, Иркутск, Российская Федерация

Цель исследования – определение филогенетического положения и особенностей организации геномов отдельных групп штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке при разных эпидемиологических ситуациях в период седьмой пандемии холеры. **Материалы и методы.** В исследование включено 275 штаммов *V. cholerae*, изолированных при эпидемических осложнениях или в благополучный по холере период в Сибири и на Дальнем Востоке, с разными профилями по основным геномным локусам патогенности. Для филогенетического анализа использованы геномы 969 изолятов *V. cholerae* из GenBank. Реконструкция филогении осуществлена методом расчета дистанций между штаммами на основе встречаемости *k*-меров. Поиск, анализ и визуализация структуры локусов мобильных генетических элементов в геномах *V. cholerae* осуществлены программами blastn и Prokka, а также авторскими скриптами R и Python. **Результаты и обсуждение.** Выделенные на территории Сибири и Дальнего Востока штаммы холерного вибриона вошли в состав трех глобальных филогенетических линий – L2, L3, L4. Распределение штаммов на филогенетические линии согласуется с эпидемиологической ситуацией, при которой они были изолированы. Прослеживается распределение штаммов на группы с дифференциацией на глобальные волны распространения этиологического агента седьмой пандемии холеры и предварительным определением потенциальных направлений завоза возбудителя на территорию. Выявлено, что, наряду с токсигенными вибрионами Эль Тор, к филогенетической линии L2 относятся и спонтанные мутанты, утратившие гены холерного токсина при хранении и пассаже на питательных средах. Структурный анализ подтверждает различия их геномной организации со штаммами, не имеющими профага CTX при первичном ПЦР-скрининге. Целесообразен двухэтапный алгоритм филогенетического анализа в рамках геномного мониторинга возбудителя холеры: первый этап – упрощенный подход на основе встречаемости *k*-меров для оперативного эпидемиологического анализа; второй этап – углубленный анализ геномов с применением комплекса филогенетических методов для реконструкции звеньев эпидемической цепи в пределах отдельных эпидосложнений, установления закономерностей происхождения и времени дивергенции клонов возбудителя.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, полногеномное секвенирование, филогенетические линии, структурный анализ.

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

Для цитирования: Миронова Л.В., Федотова И.С., Галачьянц Ю.П., Пономарева А.С., Эрдынеев С.В., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., Фортунатова А.В., Балахонов С.В. Геномный анализ штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке в период седьмой пандемии холеры: идентификация принадлежности к глобальным филогенетическим линиям. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 2:122–131. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-122-131

Поступила 27.12.2023. Отправлена на доработку 23.01.2024. Принята к публ. 05.02.2024.

L.V. Mironova¹, I.S. Fedotova¹, Yu.P. Galach'yants^{1,2}, A.S. Ponomareva¹, S.V. Erdyneev¹,
Zh.Yu. Khunkheeva¹, E.A. Basov¹, A.V. Fortunatova¹, S.V. Balakhonov¹

Genomic Analysis of *Vibrio cholerae* Strains Isolated in Siberia and the Far East during the Seventh Cholera Pandemic: Determining the Appurtenance to Global Phylogenetic Lines

¹Irkutsk Research Anti-Plague Institute, Irkutsk, Russian Federation;

²Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim was to determine the phylogenetic position and features of the genome organization of individual groups of *Vibrio cholerae* strains isolated in Siberia and the Far East under different epidemiological situations during the seventh cholera pandemic. **Materials and methods.** We examined 275 *V. cholerae* strains, isolated during epidemic complications and during the cholera-free period in Siberia and the Far East, with different profiles of the main genomic loci of pathogenicity. The genomes of 969 *V. cholerae* strains from GenBank were used for phylogenetic analysis. The phylogeny reconstruction was carried out through calculating the distances between strains based on the occurrence of *k*-mers. The search, analysis and visualization of the loci structure in mobile genetic elements in *V. cholerae* genomes were performed using the blastn and Prokka programs and the author's R and Python scripts. **Results and discussion.** Strains of *V. cholerae* isolated in Siberia and the Far East have been included in three global phylogenetic lines – L2, L3, L4. The distribution of strains from Siberia and the Far East along phylogenetic lines corresponds to the epidemiological situation in which they were isolated. We have identified the differentiation of strains by groups consistent with the global waves of spread of the etiological agent of the seventh cholera pandemic. We also traced potential paths for the import of the cholera pathogen into the territory of the Russian Federation. It has been revealed that spontaneous mutants

that lost cholera toxin genes during storage and cultivation on nutrient media belong to the L2 phylogenetic lineage as well as toxigenic El Tor vibrios. The structural analysis confirms the differences in their genome organization and strains that do not have a CTX prophage during primary PCR screening. We recommend a two-stage algorithm of phylogenetic analysis within the framework of genomic monitoring of cholera agent: the first stage is a simplified assessment based on the occurrence of *k*-mers for express epidemiological analysis; the second stage is an in-depth analysis of genomes using a complex of phylogenetic methods for the reconstruction of links in individual epidemic complications, to establish patterns of origin and time of divergence of the pathogen clones.

Key words: *Vibrio cholerae*, whole genome sequencing, phylogenetic lines, structural analysis.

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

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

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

Citation: Mironova L.V., Fedotova I.S., Galach'yants Yu.P., Ponomareva A.S., Erdyneev S.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Fortunatova A.V., Balakhonov S.V. Genomic Analysis of *Vibrio cholerae* Strains Isolated in Siberia and the Far East during the Seventh Cholera Pandemic: Determining the Appurtenance to Global Phylogenetic Lines. *Problemny Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 2:122–131. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-122-131

Received 27.12.2023. Revised 23.01.2024. Accepted 05.02.2024.

Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>
 Fedotova I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-0960>
 Galach'yants Yu.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4764-6330>
 Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>
 Erdyneev S.V., ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7937-1382>

Khunkheeva Zh.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5388-4300>
 Basov E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8358-2880>
 Fortunatova A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1167-7864>
 Balakhonov S.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4201-5828>

В Сибирском и Дальневосточном регионах Российской Федерации холера в период седьмой пандемии была зарегистрирована в виде отдельных случаев завоза инфекции или обусловленных завозом острых вспышек с преимущественно водным путем передачи возбудителя. Так, случаи завоза инфекции имели место в 1970-х гг. (Якутск – 1970 г., Красноярск, Томск – 1973 г., Новокузнецк – 1975 г.) и в 1990-х гг. (Новосибирск, Омск, Барнаул – 1994 г., Иркутск, Ачинск – 1997 г., Владивосток, Уссурийск, Южно-Сахалинск – 1999 г.). Эпидемические осложнения в виде ассоциированных с завозом острых вспышек также пришлось на 1970-е и 1990-е гг.: Омск – 1972 г., Новосибирск и Барнаул – 1973 г., Южно-Сахалинск и Владивосток – 1999 г. [1–3].

Наряду с этим, в благополучный по холере период в поверхностных водоемах Сибири и Дальнего Востока начиная с 1970-х гг. обнаруживаются нетоксигенные *Vibrio cholerae* O1-серогруппы. В отдельных субъектах наблюдается практически ежегодное (Забайкальский край) или длительное (Приморский край, Иркутская область) выделение таких вариантов холерного вибриона. В 1970–1980-х гг. на территории были зарегистрированы спорадические случаи транзитного носительства нетоксигенных штаммов *V. cholerae* у лиц без клинических проявлений инфекции. В современный период (2011, 2013, 2016, 2019 гг.) имели место единичные случаи обнаружения в объектах окружающей среды (поверхностные водоемы в зоне рекреационного водопользования и в месте сброса сточных вод, сточные воды) нетоксигенных вибрионов O1-серогруппы, содержащих ген токсин-корегулируемых пилей адгезии (генотип *ctxAB-tcpA*⁺).

Следует сказать, что по основным таксономическим характеристикам: принадлежность к виду, биовару, серогруппе – холерный вибрион, являющийся этиологическим агентом холеры, и нетоксигенные вибрионы, обнаруживаемые в объектах окружающей

среды (ООС) на эндемичных по холере территориях в благополучный период или при обусловленной *V. cholerae* острой кишечной инфекции и транзитном вибрионосительстве, характеризуются сходством или идентичностью. Принципиальные отличия заключаются в наличии/отсутствии в геноме мобильных генетических элементов, несущих основные детерминанты патогенности. В 1990-х гг., когда впервые была установлена мобильная природа основных детерминирующих патогенность холерного вибриона локусов генома (профаг CTX с генами холерного токсина, остров патогенности VPI-I с генами токсин-корегулируемых пилей адгезии), при отсутствии исчерпывающих данных о структуре геномов разных групп *V. cholerae* исследователями активно обсуждался вопрос о возможности трансформации непатогенных вариантов вибриона в патогенные эпидемически значимые посредством горизонтальной передачи мобильных генетических элементов (МГЭ) [4–6].

Вместе с тем изучение возбудителя холеры на геномном уровне обеспечило новые возможности по определению происхождения разных групп штаммов, оценке их филогенетических связей, закономерностей формирования и распространения патогенного клона возбудителя. Так, в 2011 г. A. Mutreja *et al.* [7] на основании анализа полных геномов холерного вибриона идентифицировали восемь филогенетических линий (L1 – L8): изоляты классического биовара сформировали значительно дистанцированную от других линию L1; варианты этиологического агента текущей пандемии холеры – *V. cholerae* El Tor объединились в линию L2 с тремя крупными группами в структуре линии, соответствующими глобальным волнам распространения инфекции; линии L3, L5, L6, L8 обнаружили сходство корового генома с L2 с присущими для каждой из них особенностями структурной организации и набора мобильных генетических элементов, определяющими патогенный

и эпидемический потенциал входящих в линии изолятов; L4 и L7 – самостоятельные линии на филогенетическом древе с характерной уникальностью геномной организации входящих в них штаммов. Позднее Н. Wang *et al.* [8] в результате изучения распространения нетоксигенных холерных вибрионов в Китае и мире в целом идентифицировали дополнительную филогенетическую линию L9, образованную изолятами *ctxAB-tcpA*⁺.

При анализе закономерностей распространения холерного вибриона в мире исследователями определены направления и время импорта штаммов линии L2 (клона седьмой пандемии) в Африку в период седьмой пандемии, а также пути продвижения возбудителя внутри континента с формированием сублиний [9, 10]. Показано, что эпидосложнения в Йемене обусловлены сублинией пандемического клона вибриона Эль Тор из Южной Азии с предварительным распространением этой сублинии в Восточной Африке [11]. В Китае, наряду с относящимися к L2 штаммами, выявлено распространение холерного вибриона филогенетических линий L3 и L9, представители которых обнаружены как при клинически выраженной форме инфекции и вибриононосительстве, так и в ООС [8, 12, 13].

Разнообразие генетических линий холерного вибриона, дифференцирующихся по значимым генотипическим характеристикам, определяет важность установления филогенетического положения изолятов в рамках геномного надзора за патогенами с эпидемическим и пандемическим потенциалом, к числу которых относится возбудитель холеры.

Цель исследования – определение филогенетического положения и особенностей организации геномов отдельных групп штаммов *V. cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке при разных эпидемиологических ситуациях в период седьмой пандемии холеры.

Материалы и методы

Исследуемые штаммы. В исследование включено 275 охарактеризованных ранее по комплексу фенотипических свойств и эпидзначимости штаммов холерного вибриона из коллекции патогенных бактерий ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Исследуемая группа включает 61 токсигенный штамм *V. cholerae* O1-серогруппы, выделенные от инфицированных лиц (больные и вибриононосители) и из объектов ООС при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке в 1970-х и 1990-х гг., 3 спонтанных мутанта (СМ) токсигенных штаммов *V. cholerae* O1-серогруппы (*V. cholerae* И-719, И-1488, И-1362), утратившие гены биосинтеза холерного токсина при хранении и пассаже на питательных средах (*ctxAB-tcpA*⁺/СМ). Из группы штаммов благополучного по холере периода в исследование включено 209, в том чис-

ле 205 – не содержащих гены холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии, и 4 – с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ из ООС (*ctxAB-tcpA*⁺/ООС). Кроме того, исследовано 2 штамма *V. cholerae* классического биовара.

Референсные нуклеотидные последовательности геномов из международной базы данных GenBank. Для проведения филогенетического анализа и позиционирования штаммов из исследуемой группы (Сибирь, Дальний Восток) на глобальном филогенетическом древе в качестве референсного набора использованы геномы 969 изолятов холерного вибриона, принадлежащих к различным филогенетическим линиям L1 – L9, которые представлены в работе Н. Wang *et al.* [8].

Выделение суммарной ДНК. Для выделения тотальной ДНК использовались 18-часовые культуры исследуемых штаммов *V. cholerae*, выращенные на щелочном агаре для культивирования холерного вибриона. Экстракция осуществлялась на спин-колонках наборами реагентов DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) и HiPure Universal DNA Kit (Magen). Качество выделенной ДНК оценивалось методами сканирующей спектрофотометрии и флуориметрии.

Секвенирование геномов. Полногеномное секвенирование штаммов *V. cholerae*, изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке, проводилось на высокопроизводительных секвенаторах 2-го и 3-го поколений: MiSeq (Illumina, США), DNBSEQ-G50RS (MGI, Китай) и MinION (Oxford Nanopore Technologies, Великобритания). Подготовка ДНК-библиотек и их секвенирование проводились в соответствии с актуальными версиями протоколов производителей с использованием наборов Illumina DNA Prep и MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle); MGIEasy FS DNA Library Prep Set и DNBSEQ-G50 High-throughput Sequencing Set (FCL, PE100); Ligation Sequencing Kit 1D (LSK-109), Native Barcoding Kit 1D 1-12/13-24 и SpotON Flow Cell (R.9.4).

Сборка геномов. Предобработка полученных данных секвенирования выполнялась путем выявления прочтений низкого качества и их фильтрации, выбор используемого программного обеспечения осуществлялся в зависимости от модели секвенатора: платформы MiSeq, DNBSEQ-G50RS – программы FastQC и Trimmomatic; платформа MinION – программы MinionQC.R и Guppy. Геномные сборки *de novo* получены инструментом SPAdes с выставлением строгих параметров, для исключения ошибок ассемблера применялась программа полировки контингов Pilon. Геномы штаммов *V. cholerae* 121-19, 200-16, И-719, И-1362, И-1471, И-1488, И-1501 для проведения структурного анализа ассоциированных с патогенностью локусов собирались до уровня хромосом с помощью инструмента Ragout (reference-assisted genome ordering utility) [14, 15]. Сборка хромосом осуществлялась по референсному геному *V. cholerae* N16961 (NCBI assembly GCF_000006745.1).

Анализ результатов секвенирования и реконструкция филогении. Для позиционирования анализируемых штаммов среди разнообразия филогенетических линий *V. cholerae* использовали метод, основанный на расчете дистанций между штаммами на основе встречаемости *k*-меров в геномных последовательностях с помощью программы PopPUNK [16]. Референсную базу данных *k*-меров индексировали с шагом длины *k*-меров, равным двум, и размером словаря 100000 (параметры --k-step 2 и --sketch-size 100000). При классификации штаммов минимальная встречаемость *k*-меров составляла 20 (параметр --min-kmer-count 20).

Для филогеномного анализа полногеномное выравнивание референсной геномной последовательности и набора NGS-данных анализируемых штаммов проводили с помощью программы snippy [17]. Идентификацию фрагментов полногеномного выравнивания, имеющих повышенную плотность нуклеотидных замен в какой-либо из филогенетических линий, производили с помощью программы gubbins [18]. Поскольку области генома, картированные gubbins, нельзя рассматривать как ортологичные геномные локусы, их исключали из дальнейшего анализа. Молекулярно-филогенетический анализ полученного SNP-выравнивания проводили с помощью программы iqtree [19] с использованием модели замен K3P+ASC – трехпараметрической модели Кимура-81 [20] с коррекцией ошибок, вызванных смещением частот нуклеотидов при анализе SNP-выравнивания [21].

Поиск и анализ структуры локусов МГЭ в геномах *V. cholerae* осуществляли в сравнении с геномом референсного штамма *V. cholerae* N16961 (NC_002505.1) с помощью программы blastn [22]. Результаты обрабатывались авторским скриптом на языке программирования R для получения консенсусных последовательностей локусов RS1, CTXφ, TLC, VSP-I и VSP-II. Для дальнейшей визуализации консенсусные последовательности сравниваемых штаммов холерного вибриона аннотировали с помощью программы Prokka с параметрами по умолчанию [23]. Визуализация анализируемых локусов осуществлялась скриптом на языке Python с применением библиотеки pyGenomeViz [24].

Результаты и обсуждение

Учитывая тот факт, что все зарегистрированные на территории Сибири и Дальнего Востока случаи холеры имеют завозное происхождение (завозные очаги, ассоциированные с завозом острые вспышки), а для периода эпидблагополучия характерно обнаружение в водоемах нетоксигенных вариантов *V. cholerae*, крайне важно при выделении штамма от больного/вибриононосителя установить вероятные пути его завоза и распространения или определить типичность/нетипичность для данной территории генотипов штаммов, изолированных из поверхност-

ных водоемов. В данном аспекте решающее значение приобретает системный геномный надзор за возбудителем с ретроспективным и оперативным анализом распространения отдельных генотипов *V. cholerae* и формированием баз данных геномов в территориальном и глобальном масштабах.

Для установления принадлежности изолированных в Сибири и на Дальнем Востоке в период седьмой пандемии штаммов холерного вибриона к глобальной филогенетической линии на первом этапе работы проводился скрининговый анализ геномов с использованием подхода, основанного на анализе встречаемости *k*-меров в исследуемых геномах, обозначенный как «скрининговая филогения». В филогенетическую реконструкцию включены геномы 275 штаммов, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока, и 969 геномов штаммов, изолированных на разных территориях в мире и отражающих разнообразие генетических вариантов холерного вибриона.

В результате на дендрограмме, рассчитанной с помощью встречаемости *k*-меров в полногеномных данных, все штаммы выборки распределились на глобальные филогенетические линии L1 – L9. Сибирские и дальневосточные изоляты вошли в состав трех линий – L2, L3, L4 (рис. 1). Необходимо отметить, что распределение на филогенетические линии штаммов из Сибири и Дальнего Востока согласуется с эпидемиологической ситуацией, при которой они были изолированы.

Так, в состав линии L2 вошли токсигенные эпидемически опасные штаммы холерного вибриона (геномный профиль по основным генам патогенности *ctxAB⁺tcpA⁺*), выделенные при эпидемических осложнениях по холере, зарегистрированных в 1970-х и 1990-х гг. в Сибирском и Дальневосточном регионах (n=61). При этом на дендрограмме прослеживается распределение на группы с дифференциацией на глобальные волны распространения этиологического агента седьмой пандемии холеры и предварительным определением потенциальных направлений завоза возбудителя на территорию. Вместе с тем более детальный анализ закономерностей кластеризации штаммов в структуре данной линии при отдельных эпидемических осложнениях обеспечивается проведением дополнительного изучения взаимосвязей штаммов с применением методов углубленного филогенетического анализа (метод максимального правдоподобия, датированная филогения и др.) целевых групп штаммов.

Наряду с токсигенными вибрионами Эль Тор, к филогенетической линии L2 отнесены и спонтанные мутанты выделенных при эпидемических осложнениях токсигенных штаммов, утратившие гены холерного токсина при хранении и пассаже на питательных средах (генотип *ctxAB tcpA⁺*) (рис. 2).

Нетоксигенные штаммы холерного вибриона из поверхностных водоемов при отсутствии зарегистрированных случаев холеры на территории

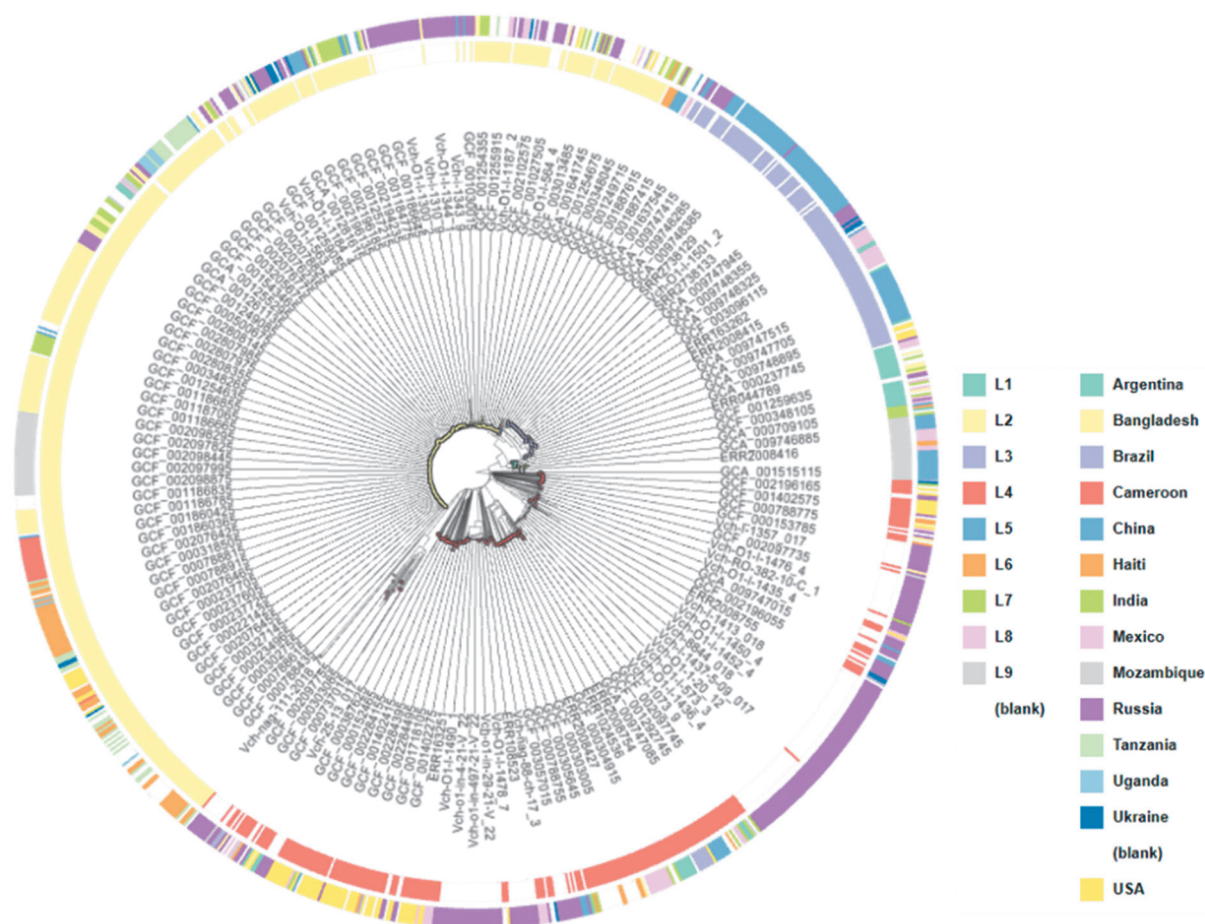


Рис. 1. Дендрограмма, реконструированная на основе встречаемости *k*-меров в геномных последовательностях *V. cholerae*

Fig. 1. Tree diagram reconstructed on the basis of occurrence of *k*-mers in *V. cholerae* genomic sequences

демонстрируют принадлежность к двум филогенетическим линиям – L3 и L4. В состав линии L3 вошли четыре штамма холерного вибриона с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺, выделенные в Хабаровском крае в 2013, 2016, 2019 гг. из проб воды р. Черной в месте сброса сточных вод и непосредственно из проб сточных вод, а также в 2011 г. в Алтайском крае из воды р. Барнаулки (в зоне неорганизованного рекреационного водопользования). Ранее нами была показана принадлежность этих штаммов к US Gulf-подобной филогенетической линии и установлено сходство генетической организации с изолятами подобного генотипа из Китая [25]. На полученной по результатам скрининговой филогении дендрограмме также прослеживается объединение китайских и российских изолятов в сублинию L3b в составе линии L3. Вместе с тем уточнение направлений распространения и времени дивергенции отдельных клонов требует проведения дальнейшего анализа с применением байесовского метода и датированной филогении.

Следует отметить, что возможность распределения вариантов *ctxAB-tcpA*⁺ *V. cholerae* (спонтанные мутанты токсигенных штаммов – *ctxAB-tcpA*⁺/CM и штаммы с исходным генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ из ООС – *ctxAB-tcpA*⁺/ООС) на различные филогенетические линии – крайне значимый результат скрининговой филогении, поскольку при первичной оценке

эпидемической значимости по результатам ПЦР данные штаммы будут отнесены к одной группе. При этом объем и тактика профилактических (противоэпидемических) мероприятий в случае обнаружения штаммов этих групп должны быть различными, учитывая различия в их происхождении и, вероятно, патогенном, эпидемическом и трансформационном потенциале.

Дальнейший структурный анализ геномов *ctxAB-tcpA*⁺/CM (линия L2) и *ctxAB-tcpA*⁺/ООС (линия L3) штаммов подтверждает различия их геномной организации. Установлено, что у обеих групп штаммов отсутствует блок генов, детерминирующих биосинтез холерного токсина (рис. 3).

Однако в случае с группой *ctxAB-tcpA*⁺/CM наблюдается вариативность структуры генома в отношении профага CTX – установлена утрата всех коровых генов профага при сохранении RS2-элемента (И-719, И-1362) или его полная элиминация (И-1488), тогда как у всех исследованных *ctxAB-tcpA*⁺/ООС профаг CTX отсутствует. Что касается других ассоциированных с патогенностью областей генома, то у двух взятых в исследование *ctxAB-tcpA*⁺/CM штаммов установлено присутствие области RS1 и токсин-связанного криптического элемента TLC. Один из спонтанных мутантов – И-1488 (производное штамма И-1185, выделенного от больного холерой в заносном

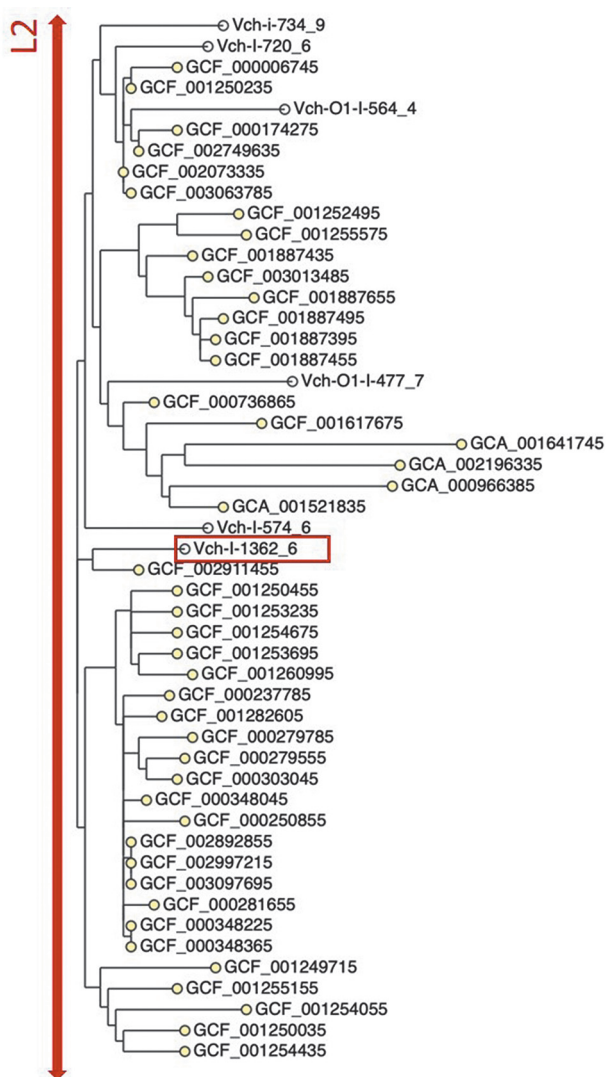


Рис. 2. Фрагмент реконструированной на основе встречаемости *k*-меров в геномных последовательностях *V. cholerae* дендрограммы, включающий штаммы линии L2 и спонтанный мутант токсигенного штамма холерного вибриона И-1362 (выделен рамкой)

Fig. 2. The fragment of a tree diagram reconstructed on the basis of the occurrence of *k*-mers in the genomic sequences of *V. cholerae*, including strains of the L2 line and a spontaneous mutant of the toxigenic *V. cholerae* strain I-1362 (highlighted by a frame)

очаге в Омске, 1994 г.), утративший полную последовательность профага CTX, оказался лишен и других ассоциированных с патогенностью мобильных генетических элементов – RS1, TLC при сохранении островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Тем не менее по результатам скрининговой филогении он отнесен к линии эпидемически опасных вариантов вибриона Эль Тор (линия L2), что подтверждает информативность данного подхода к анализу для оперативного определения происхождения штаммов *V. cholerae*, в том числе штаммов с особенностями организации основных геномных кластеров патогенности.

В геноме всех *ctxAB-tcpA*⁺/OOC обнаружен генетический элемент TLC (рис. 3), у части штаммов присутствует один из островов пандемичности – VSP-I. Роль указанных элементов в геномной организации и формировании функциональных особен-

стей данной группы штаммов – предмет дальнейших исследований по изучению геномных особенностей, закономерностей происхождения и распространения, а также эпидемической и клинической значимости *ctxAB-tcpA*⁺/OOC *V. cholerae*.

К линии L4 при скрининговой филогении отнесены *V. cholerae* серогрупп O1, O139 и неO1/O139, лишенные как генов холерного токсина, так и токсин-корегулируемых пилей (генотип *ctxAB-tcpA*⁻). Штаммы холерного вибриона с указанным генотипом выделены преимущественно из поверхностных водоемов в благополучный по холере период. Исключение составляет один нетоксигенный штамм от вибриононосителя (И-1299), прибывшего авиарейсом в Южно-Сахалинск из Китая в 1999 г. и обследованного в связи с предшествующим осложнением эпидобстановки по холере на Дальнем Востоке (зарегистрированные случаи завоза инфекции в Уссурийск и Владивосток из Китая). Указанный штамм на дендрограмме, реконструированной по результатам анализа *k*-меров, входит в один кластер с клиническими изолятами *V. cholerae* из Китая (2000, 2001, 2009 гг.) (рис. 4, а). При дополнительном филогенетическом анализе целевой группы штаммов, включающей данный изолят и наиболее близкие к нему кластеры, топология дендрограммы не изменилась, прослеживаются те же закономерности кластеризации (рис. 4, б).

В составе L4 идентифицированы отдельные клональные группы штаммов, объединенные территорией и временем выделения. В частности, в самостоятельную группу вошли выделенные в 2021 г. из воды р. Седанки в Приморском крае штаммы *V. cholerae* O1-серогруппы (рис. 5, а, б).

Несмотря на продолжительность обнаружения (в течение двух недель), практически все штаммы характеризовались идентичным MLVA-профилем (данные не представлены) и принадлежностью к одному не идентифицированному ранее на территории кластеру по данным анализа геномов, что дает основание предполагать заносное происхождение этого клона. Отдельные кластеры генотипов также образованы штаммами 2011 и 2017 гг. выделения из поверхностных водоемов Иркутска. Выявленные закономерности группировки штаммов при скрининговой филогении сохраняются и при анализе целевых групп с использованием алгоритма ML (рис. 5, б).

Наряду с клональными группами, образованными изолятами одного года выделения, идентифицированы кластеры, объединяющие изоляты с одной территории в динамике на протяжении ряда лет, подтверждая возможность закрепления клонов в определенных участках водоемов и формирование там локальных популяций холерного вибриона. Однако выявлены случаи формирования кластеров со сходной геномной организацией штаммами холерного вибриона, выделенными на различных территориях. Дальнейшее изучение филогеографических аспектов и динамики популяций нетоксигенных *V. cholerae*

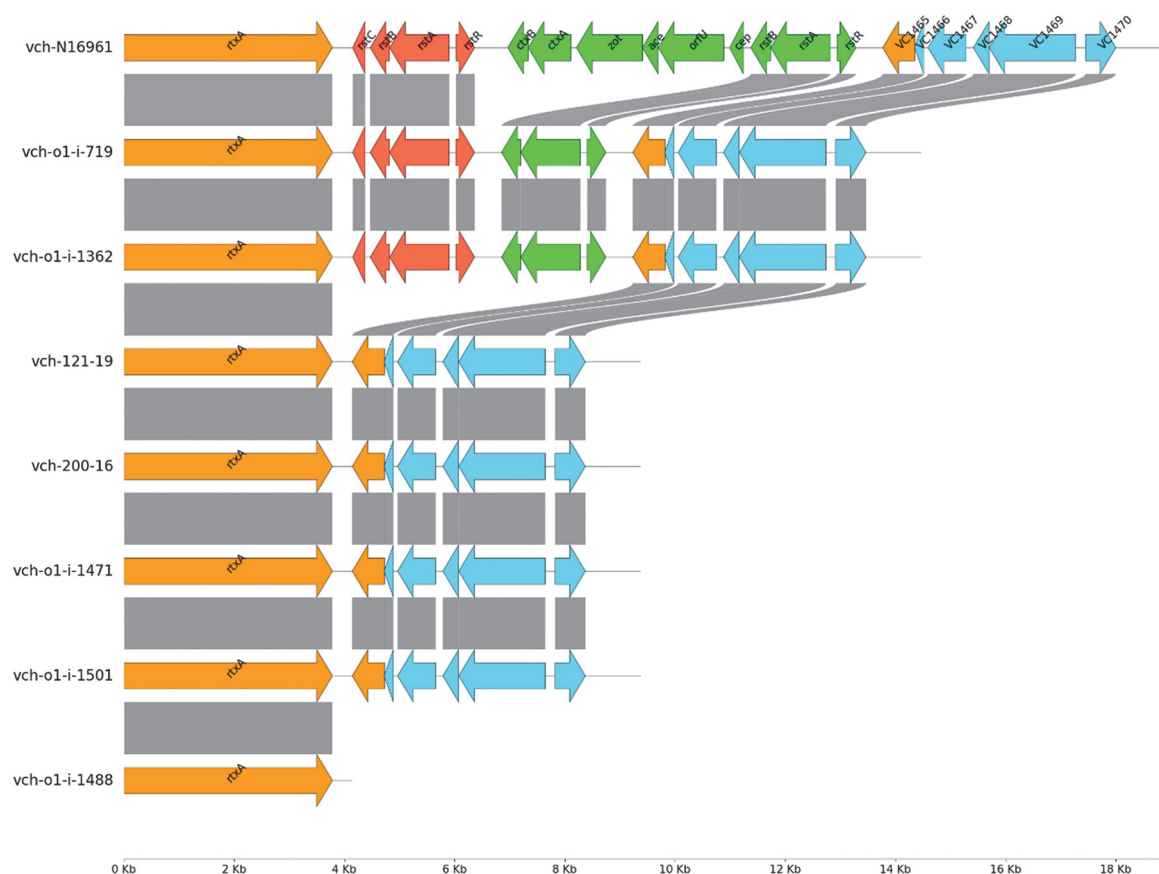


Рис. 3. Структура ассоциированных с патогенностью локусов генома исследованных штаммов *V. cholerae*: красный – RS1; зеленый – CTX; голубой – TLC

Fig. 3. The structure of the genomic loci associated with pathogenicity in the studied *V. cholerae* strains: red – RS1; green – CTX; blue – TLC

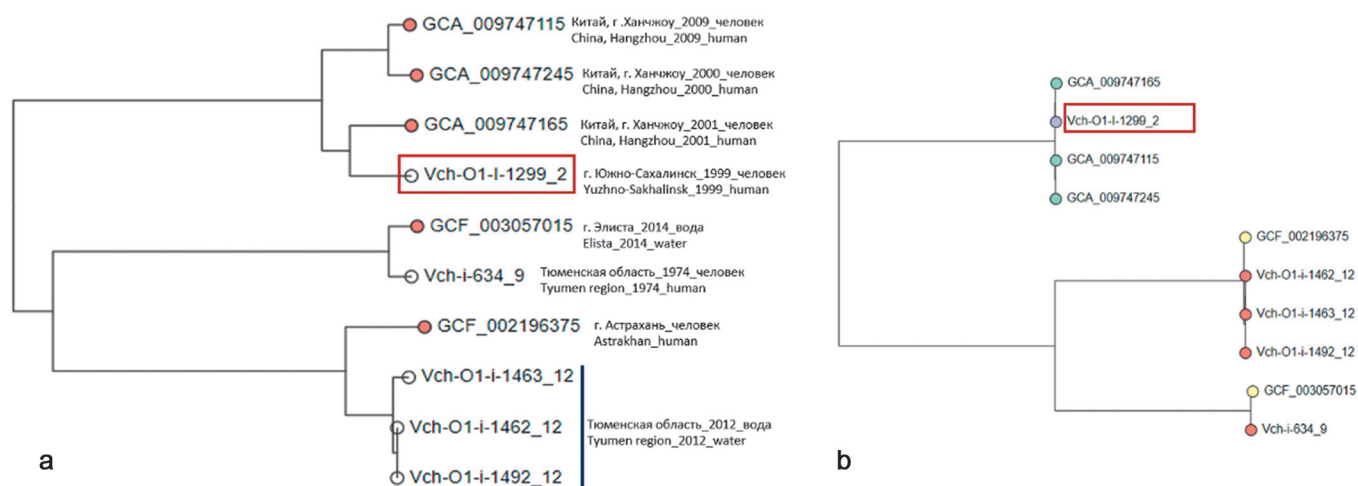


Рис. 4. Фрагменты дендрограмм, реконструированных на основе встречаемости k -меров в геномах (а) и с использованием филогеномного подхода (б), включающие штамм, выделенный от вибрионосителя в г. Южно-Сахалинске в 1999 г. (выделен рамкой)

Fig. 4. Fragments of dendrograms reconstructed on the basis of occurrence of k -mers in the genomes (*a*) and using a phylogenomic approach (*b*), including a strain isolated from a vibrio carrier in Yuzhno-Sakhalinsk in 1999 (highlighted by a frame)

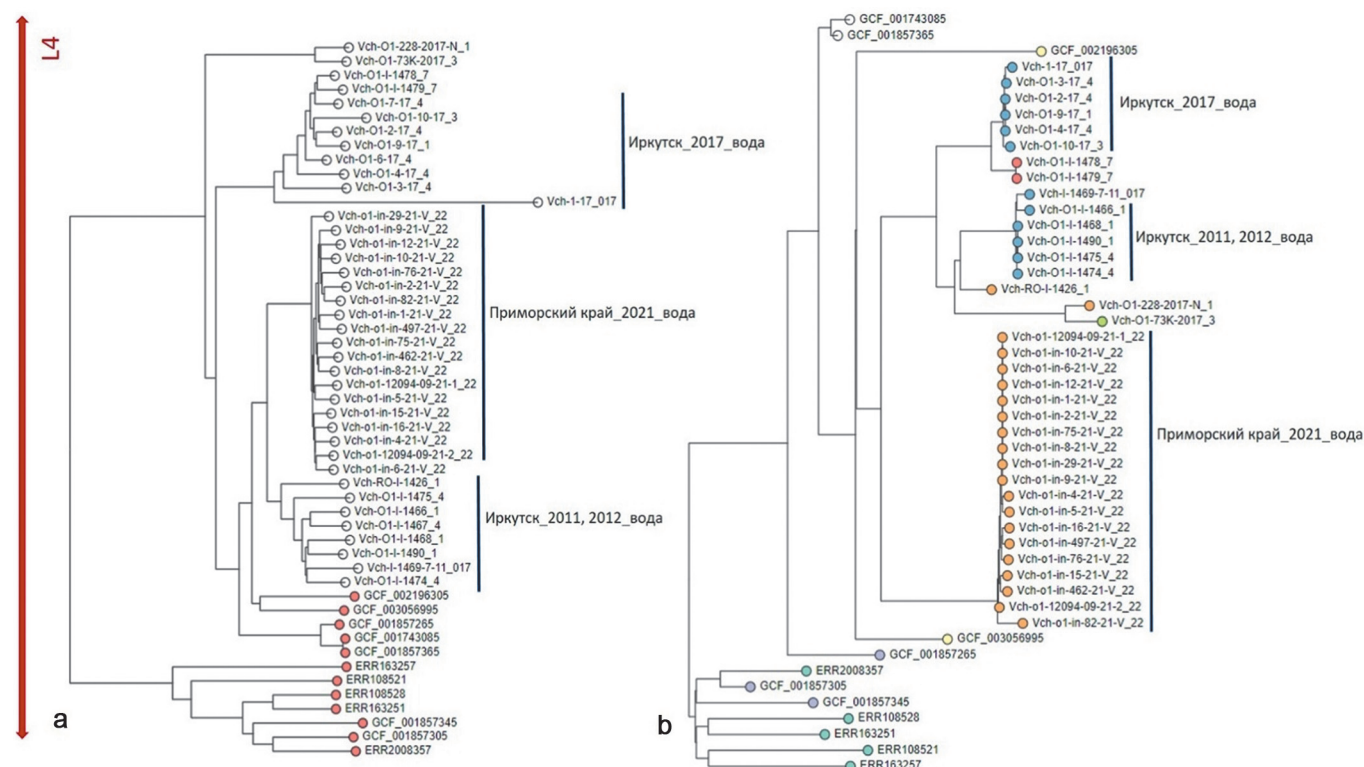


Рис. 5. Фрагменты дендрограмм, реконструированных на основе встречаемости k -меров в геномах (a) и с использованием филогеномного подхода (b), включающие клональные группы штаммов *V. cholerae*

Fig. 5. Fragments of dendrograms reconstructed on the basis of occurrence of k -mers in the genomes (a) and using a phylogenomic approach (b), including clonal groups of *V. cholerae* strains

в ООС позволит подойти к пониманию причин подобной кластеризации и выяснению молекулярных механизмов адаптации и геномной трансформации вибрионов в природных экологических нишах.

В целом в результате проведенного исследования определено филогенетическое положение разных групп штаммов холерного вибриона, выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке в период седьмой пандемии, в глобальной популяции возбудителя и сформирована база геномов разных филогенетических групп. Обращает на себя внимание подтвержденная характерная для холерного вибриона значительная внутривидовая геномная дивергенция. По данным A. Mutreja *et al.* [7], различия в коровом геноме между филогенетической линией L2 и линией L4, образованной непатогенными вариантами холерного вибриона серогрупп O1 и неO1/O139, составляет более 55 тыс. однонуклеотидных замен, что свидетельствует об их существенной дистанцированности. Учитывая значимую удаленность указанных линий на филогенетическом древе и различия в структуре их корового генома, трансформация *ctxAB-tcpA* *V. cholerae* линии L4 в варианты линии L2 представляется маловероятной. Однако нельзя исключить другие варианты внутривидовых трансформационных событий, которые могут привести к изменению патогенного потенциала микроорганизма при наличии внешних доноров генетических элементов в оптимальных для обмена генетической информацией экологических нишах.

В то же время нетоксигенные *V. cholerae* с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺ из ООС, отнесенные к линии L3, демонстрируют большее сходство геномной организации с L2. Исследователями было показано, что относящиеся к этой группе холерные вибрионы дивергировали в самостоятельную линию на одном из этапов эволюции патогенного клона седьмой пандемии [26]. Учитывая данные об обнаружении среди представителей данной линии, а также сходной с ней линии L9 изолятов с генами холерного токсина, не исключена их эпидемическая и клиническая значимость, соответственно, принадлежность к указанным линиям должна учитываться при определении тактики и объема мероприятий в случае выделения штамма в рамках микробиологического мониторинга холеры.

Что касается рекомендуемых подходов к филогенетическому исследованию геномов *V. cholerae*, то, учитывая проблемные вопросы анализа гетерогенных групп холерного вибриона, различия в нуклеотидной последовательности которых могут быть существенными, и необходимость одновременной обработки больших объемов данных для достоверного определения генотипа штамма, наиболее эффективным представляется двухэтапный алгоритм анализа в рамках геномного мониторинга возбудителя холеры. На первом этапе целесообразен скрининговый анализ с помощью определения встречаемости k -меров, позволяющий одновременно характеризовать большие объемы данных. Этот этап обеспечи-

вает возможность оперативного определения принадлежности выделенного штамма к той или иной филогенетической линии и установление общих закономерностей кластеризации внутри отдельных линий. Полученные на этом этапе данные могут применяться в рамках оперативного эпидемиологического анализа для установления направления завоза возбудителя на территорию, дифференциации сходных по профилю генов патогенности, но отличающихся по коровому геному и происхождению вариантов холерного вибриона. С их учетом может быть скорректирована тактика первичных противоэпидемических мероприятий при выделении *V. cholerae*. Филогеномный анализ на основе SNP-выравнивания (в том числе анализ дискретных признаков, датированная филогения) на втором этапе представляется более эффективным и информативным в отношении определенных целевых групп штаммов и может быть использован для реконструкции звеньев эпидемической цепи в пределах отдельных эпидемических очагов, установления закономерностей происхождения и времени дивергенции клонов возбудителя, а также характеристики мобилома, в том числе патогенома, и резистома возбудителя.

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. Онищенко Г.Г., Марамо́вич А.С., Голубинский Е.П., Маслов Д.В., Вершкова Т.И., Урбанович Л.Я., Алленов А.В., Мурначев Г.П., Гарковенко Л.Е., Воронок В.М. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщение 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Владивосток. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5:26–31.
2. Онищенко Г.Г., Марамо́вич А.С., Голубинский Е.П., Папиренко Е.В., Ганин В.С., Бурый В.Л., Морозова И.В., Мартынова Т.М. Холерана Дальнем Востоке России. Сообщение 2. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры эльтор в г. Южно-Сахалинск. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2000; 5:31–35.
3. Марамо́вич А.С., Пинигин А.Ф. Современные эпидемиологические аспекты холеры Эль Тор. *Журнал инфекционной патологии*. 1994; 1:6–11.
4. Faruque S.M., Asadulghani, Rahman M.M., Waldor M.K., Sack D.A. Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infect. Immun.* 2000; 68(8):4795–801. DOI: 10.1128/IAI.68.8.4795-4801.2000.
5. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012; 3(7):556–65. DOI: 10.4161/viru.22351.
6. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr, Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
7. Muteja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
8. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang 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 non-toxigenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
9. Breurec S., Franck T., Njamkepo E., Mbecko J.R., Rauzier J., Sanke-Waigana H., Kamwiziku G., Piarroux R., Quilici M.L., Weill F.X. Seventh pandemic *Vibrio cholerae* O1 sublineages, Central African Republic. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(1):262–6. DOI: 10.3201/eid2701.200375.
10. Smith A.M., Sekwadi P., Erasmus L.K., Lee C.C., Stroika S.G., Ndzabandzaba S., Alex V., Nel J., Njamkepo E., Thomas J., Weill F.-X. Imported cholera cases, South Africa, 2023. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(8):1687–90. DOI: 10.3201/eid2908.230750.
11. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., Rakesh A., Assiri A.M., Sharma N.C., Kariuki S., Pourshafie M.R., Rauzier J., Abubakar A., Carter J.Y., Wamala J.F., Seguin C., Bouchier C., Malliavin T., Bakhshi B., Abulmaali H.H.N., Kumar D., Njoroge S.M., Malik M.R., Kiiru J., Luquero F.J., Azman A.S., Ramamurthy T., Thomson N.R., Quilici M.-L. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019; 565(7738):230–3. DOI: 10.1038/s41586-018-0818-3.
12. Hao T., Zheng W., Wu Y., Yu H., Qian X., Yang C., Zheng Z., Zhang X., Guo Y., Cui M., Wang H., Pan J., Cui Y. Population genomics implies potential public health risk of two non-toxigenic *Vibrio cholerae* lineages. *Infect. Genet. Evol.* 2023; 112:105441. DOI: 10.1016/j.meegid.2023.105441.
13. Yan H., Pang B., Lu X., Gao Z., Lu P., Zhang X., Wang M., Shen L., Zhao W., Zhao J., Liang W., Jia L., Zhou H., Cui Z., Du X., Kan B., Wang Q. Cholera caused by a new clone of serogroup O1 *Vibrio cholerae* – Beijing Municipality, China, June 2021. *China CDC Wkly.* 2022; 4(2):31–2. DOI: 10.46234/ccdcw2021.279.
14. Kolmogorov M., Armstrong J., Raney B.J., Streeter I., Dunn M., Yang F., Odom D., Flicek P., Keane T.M., Thybert D., Paten B., Pham S. Chromosome assembly of large and complex genomes using multiple references. *Genome Res.* 2018; 28(11):1720–32. DOI: 10.1101/gr.236273.118.
15. Kolmogorov M., Raney B., Paten B., Pham S. Ragout – a reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. *Bioinformatics*. 2014; 30(12):1302–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu280.
16. Lees J.A., Harris S.R., Tonkin-Hill G., Gladstone R.A., Lo S.W., Weiser J.N., Corander J., Bentley S.D., Croucher N.J. Fast and flexible bacterial genomic epidemiology with PopPUNK. *Genome Res.* 2019; 29(2):304–16. DOI: 10.1101/gr.241455.118.
17. GitHub – tseemann/snippy: :scissors: Rapid haploid variant calling and core genome alignment. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения 15.08.2023).
18. Croucher N.J., Page A.J., Connor T.R., Delaney A.J., Keane J.A., Bentley S.D., Parkhill J., Harris S.R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gku1196.
19. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1):268–74. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
20. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1981; 78(1):454–8. DOI: 10.1073/pnas.78.1.454.
21. Lewis P.O. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Syst. Biol.* 2001; 50(6):913–25. DOI: 10.1080/106351501753462876.
22. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10:421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421.
23. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30(14):2068–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
24. pyGenomeViz: A genome visualization python package for comparative genomics. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/mosh14/pyGenomeViz> (дата обращения 07.08.2023).
25. 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.
26. 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.

References

1. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Maslov D.V., Vershikova T.I., Urbanovich L.Ya., Allenov A.V., Murmachev G.P., Garkovenko L.E., Voronok V.M. [Cholera in the Russian Far East. Communication 1. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Vladivostok]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2000; (5):26–31.
2. Onishchenko G.G., Maramovich A.S., Golubinsky E.P., Papirenko E.V., Ganin V.S., Bury V.L., Morozova I.V., Martynova T.M.

- [Cholera in the Russian Far East. Communication 2. Epidemiological characteristics of the El Tor cholera outbreak in Yuzhno-Sakhalinsk]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2000; (5):31–5.
3. Maramovich A.S., Pinigin A.F. [Modern epidemiological aspects of cholera El Tor]. *Zhurnal Infektsionnoy Patologii* [Journal of Infectious Pathology]. 1994; (1):6–11.
4. Faruque S.M., Asadulghani, Rahman M.M., Waldor M.K., Sack D.A. Sunlight-induced propagation of the lysogenic phage encoding cholera toxin. *Infect. Immun.* 2000; 68(8):4795–801. DOI: 10.1128/IAI.68.8.4795-4801.2000.
5. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012; 3(7):556–65. DOI: 10.4161/viru.22351.
6. Karaolis D.K., Somara S., Maneval D.R. Jr, Johnson J.A., Kaper J.B. A bacteriophage encoding a pathogenicity island, a type-IV pilus and a phage receptor in cholera bacteria. *Nature*. 1999; 399(6734):375–9. DOI: 10.1038/20715.
7. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., Connor T.R., Lee J.H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011; 477(7365):462–5. DOI: 10.1038/nature10392.
8. Wang H., Yang C., Sun Z., Zheng W., Zhang 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 non-toxigenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
9. Breurec S., Franck T., Njamkepo E., Mbecko J.R., Rauzier J., Sanke-Waigana H., Kamwiziku G., Piarroux R., Quilici M.L., Weill F.X. Seventh pandemic *Vibrio cholerae* O1 sublineages, Central African Republic. *Emerg. Infect. Dis.* 2021; 27(1):262–6. DOI: 10.3201/eid2701.200375.
10. Smith A.M., Sekwadi P., Erasmus L.K., Lee C.C., Stroika S.G., Ndzabandzaba S., Alex V., Nel J., Njamkepo E., Thomas J., Weill F.-X. Imported cholera cases, South Africa, 2023. *Emerg. Infect. Dis.* 2023; 29(8):1687–90. DOI: 10.3201/eid2908.230750.
11. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., Rakesh A., Assiri A.M., Sharma N.C., Kariuki S., Pourshafie M.R., Rauzier J., Abubakar A., Carter J.Y., Wamala J.F., Seguin C., Bouchier C., Malliavin T., Bakhshi B., Abulmaali H.H.N., Kumar D., Njoroge S.M., Malik M.R., Kiiru J., Luquero F.J., Azman A.S., Ramamurthy T., Thomson N.R., Quilici M.-L. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019; 565(7738):230–3. DOI: 10.1038/s41586-018-0818-3.
12. Hao T., Zheng W., Wu Y., Yu H., Qian X., Yang C., Zheng Z., Zhang X., Guo Y., Cui M., Wang H., Pan J., Cui Y. Population genomics implies potential public health risk of two non-toxigenic *Vibrio cholerae* lineages. *Infect. Genet. Evol.* 2023; 112:105441. DOI: 10.1016/j.meegid.2023.105441.
13. Yan H., Pang B., Lu X., Gao Z., Lu P., Zhang X., Wang M., Shen L., Zhao W., Zhao J., Liang W., Jia L., Zhou H., Cui Z., Du X., Kan B., Wang Q. Cholera caused by a new clone of serogroup O1 *Vibrio cholerae* – Beijing Municipality, China, June 2021. *China CDC Wkly.* 2022; 4(2):31–2. DOI: 10.46234/ccdcw2021.279.
14. Kolmogorov M., Armstrong J., Raney B.J., Streeter I., Dunn M., Yang F., Odom D., Flicek P., Keane T.M., Thybert D., Paten B., Pham S. Chromosome assembly of large and complex genomes using multiple references. *Genome Res.* 2018; 28(11):1720–32. DOI: 10.1101/gr.236273.118.
15. Kolmogorov M., Raney B., Paten B., Pham S. Ragout – a reference-assisted assembly tool for bacterial genomes. *Bioinformatics*. 2014; 30(12):i302–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu280.
16. Lees J.A., Harris S.R., Tonkin-Hill G., Gladstone R.A., Lo S.W., Weiser J.N., Corander J., Bentley S.D., Croucher N.J. Fast and flexible bacterial genomic epidemiology with PopPUNK. *Genome Res.* 2019; 29(2):304–16. DOI: 10.1101/gr.241455.118.
17. GitHub – tseemann/snippy: :scissors: Rapid haploid variant calling and core genome alignment. [Электронный ресурс]. URL: <https://github.com/tseemann/snippy> (дата обращения 15.08.2023).
18. Croucher N.J., Page A.J., Connor T.R., Delaney A.J., Keane J.A., Bentley S.D., Parkhill J., Harris S.R. Rapid phylogenetic analysis of large samples of recombinant bacterial whole genome sequences using Gubbins. *Nucleic Acids Res.* 2015; 43(3):e15. DOI: 10.1093/nar/gku1196.
19. Nguyen L.T., Schmidt H.A., von Haeseler A., Minh B.Q. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 2015; 32(1):268–74. DOI: 10.1093/molbev/msu300.
20. Kimura M. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1981; 78(1):454–8. DOI: 10.1073/pnas.78.1.454.
21. Lewis P.O. A likelihood approach to estimating phylogeny from discrete morphological character data. *Syst. Biol.* 2001; 50(6):913–25. DOI: 10.1080/106351501753462876.
22. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden T.L. BLAST+: Architecture and applications. *BMC Bioinformatics*. 2009; 10:421. DOI: 10.1186/1471-2105-10-421.
23. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics*. 2014; 30(14):2068–9. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu153.
24. pyGenomeViz: A genome visualization python package for comparative genomics. (Cited 07 Aug 2023). [Internet]. Available from: <https://github.com/moshi4/pyGenomeViz>.
25. Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladikh 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):115–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.
26. 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.

Authors:

Mironova L.V., Fedotova I.S., Ponomareva A.S., Erdyneev S.V., Khunkheeva Zh.Yu., Basov E.A., Fortunatova A.V., Balakhonov S.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute, 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Galach'yants Yu.P. Irkutsk Research Anti-Plague Institute; 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru. Limnological Institute, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; 3, Ulaanbaatar St., Irkutsk, 664033, Russian Federation.

Об авторах:

Миронова Л.В., Федотова И.С., Пономарева А.С., Эрдынеев С.В., Хункеева Ж.Ю., Басов Е.А., Фортунатова А.В., Балахонов С.В. ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Галачьянц Ю.П. ФКУЗ Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора; Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилиссера, 78; e-mail: adm@chumin.irkutsk.ru. Лимнологический институт Сибирского отделения РАН; Российская Федерация, 664033, Иркутск, ул. Улан-Баторская, 3.