

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-144-153

УДК 616.932:579.25

О.А. Подойницына¹, Л.В. Миронова², В.Д. Кругликов¹, И.С. Федотова², Ю.П. Галачьянц²,
А.С. Водопьянов¹, Д.А. Левченко¹, С.Ю. Темякова¹, Е.А. Басов², А.С. Пономарева², А.К. Носков¹

Генетическое разнообразие и филогенетическое родство штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта

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

²ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Среди холерных вибрионов, выделяемых из поверхностных водоемов в процессе мониторинга, встречаются штаммы, отклоняющиеся от типичных по признаку агглютинабельности диагностическими холерными сыворотками, что затрудняет отнесение их к той или иной серогруппе. Поэтому актуальной задачей представляется выявление причин этих отклонений путем изучения структуры генетических детерминант, ответственных за синтез О-антигена (*wb** кластеров). **Цель работы** – идентификация *wb** кластеров в геномах *Vibrio cholerae* R-варианта, изучение их структуры и проведение филогенетического анализа данных штаммов. **Материалы и методы.** Проведено полногеномное секвенирование (платформы Illumina MiSeq и MinION). Сборка осуществлялась *de novo* программой-сборщиком SPAdes (v.3.11.1). Манипуляции с последовательностями кластеров и визуализация данных проводились с помощью программы BLAST из пакета ncbi-blast-suite версии 2.13.0, скриптов на языке Python и пакетов pyGenomeViz, Biopython. Филогенетическое дерево построено с использованием программы roary (v.3.13.0). Полногеномное выравнивание проводилось программами nucmer и promer из пакета MUMmer 4 версии 4.0. **Результаты и обсуждение.** У штаммов холерного вибриона R-варианта установлено наличие в геноме *wb** кластеров разных типов, среди которых наиболее часто встречались O23 и O59. Проведено сравнение транслированных аминокислотных последовательностей *wb** регионов штаммов R-варианта с аминокислотными последовательностями представленных в базе данных NCBI референсных штаммов. Часть рассмотренных кластеров полностью совпадала с референсными. Для других установлена высокая вариабельность. Филогенетически штаммы группировались преимущественно в соответствии с типом *wb** кластера, вне зависимости от S/R-фенотипа. Штаммы *V. cholerae* R-варианта сложно систематизировать по признаку агглютинабельности, и для определения их патогенного потенциала необходимо использовать молекулярные методы исследования, в частности полимеразную цепную реакцию.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, R-вариант, *wb** кластер, серогруппа, *wbe*.

Корреспондирующий автор: Подойницына Оксана Андреевна, e-mail: podoinitsyna_oa@antiplague.ru.

Для цитирования: Подойницына О.А., Миронова Л.В., Кругликов В.Д., Федотова И.С., Галачьянц Ю.П., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Темякова С.Ю., Басов Е.А., Пономарева А.С., Носков А.К. Генетическое разнообразие и филогенетическое родство штаммов *Vibrio cholerae* R-варианта. Проблемы особо опасных инфекций. 2024; 3:144–153. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-144-153

Поступила 26.01.2024. Отправлена на доработку 28.02.2024. Принята к публ. 27.03.2024.

О.А. Podoinitsyna¹, L.V. Mironova², V.D. Kruglikov¹, I.S. Fedotova², Yu.P. Galach'yants²,
A.S. Vodop'yanov¹, D.A. Levchenko¹, S.Yu. Temyakova¹, E.A. Basov², A.S. Ponomareva², A.K. Noskov¹

Genetic Diversity and Phylogenetic Relatedness of R-Variant *Vibrio cholerae* Strains

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

²Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. Cholera vibrios, isolated from surface water bodies during monitoring activities, can differ from typical ones in terms of agglutinability with diagnostic cholera sera, which makes it difficult to assign them to a specific serogroup. Therefore, the determination of the causes for these deviations through the study of the structure of genetic determinants responsible for the synthesis of O-antigen (*wb** clusters) is considered a relevant task. **The aim** of this work was to identify *wb** clusters in the genomes of R-variant *Vibrio cholerae*, study their structure, and conduct phylogenetic analysis of the strains. **Materials and methods.** Full genome sequencing was performed using Illumina MiSeq and MinION platforms. The assembly was conducted *de novo* using the SPAdes assembler software (v.3.11.1). Manipulation of cluster sequences and data visualization were carried out using the BLAST program from the ncbi-blast-suite package version 2.13.0, Python scripts and packages such as pyGenomeViz and Biopython. The phylogenetic tree was constructed using the roary program (v.3.13.0). Full genome alignment was carried out using the nucmer and promer programs from the MUMmer 4 package version 4.0. **Results and discussion.** R-variant *V. cholerae* contains different types of *wb** clusters in the genome, with most commonly occurring O23 and O59. A comparison has been made between translated amino acid sequences of *wb** regions in R-variant strains and amino acid sequences of reference strains present in the NCBI database. Some of the analyzed clusters completely match with reference strains, while others show high variability. Phylogenetically, the strains primarily group together according to the *wb** cluster type, regardless of the S/R phenotype. Classifying R-variant *V. cholerae* strains based on agglutinability is challenging. Molecular research methods, polymerase chain reaction, in particular, are necessary to determine the pathogenic potential of such strains.

Key words: *Vibrio cholerae*, R-variant, *wb** cluster, serogroup, *wbe*.

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

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

Acknowledgements: The authors express special gratitude to E.S. Gerasimov for his invaluable assistance in data processing.

Corresponding author: Oksana A. Podoinitsyna, e-mail: podoinitsyna_oa@antiplague.ru.

Citation: Podoinitsyna O.A., Mironova L.V., Kruglikov V.D., Fedotova I.S., Galach'yants Yu.P., Vodop'yanov A.S., Levchenko D.A., Temyakova S.Yu., Basov E.A., Ponomareva A.S., Noskov A.K. Genetic Diversity and Phylogenetic Relatedness of R-Variant *Vibrio cholerae* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2024; 3:144–153. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-3-144-153

Received 26.01.2024. Revised 28.02.2024. Accepted 27.03.2024.

Podoinitsyna O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>
Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Fedotova I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-0960>
Galach'yants Yu.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4764-6330>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>
Temyakova S.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4472-0264>
Basov E.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8358-2880>
Ponomareva A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0674-6159>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Холерные вибрионы – микроорганизмы, обладающие высокой изменчивостью и пластичностью генома. Их внутривидовое разнообразие выражается в том числе в большом количестве существующих серогрупп, которых в настоящее время известно более 200. Определение таксономической принадлежности штаммов, которые при первичной серологической идентификации агглютинируются только холерной диагностической сывороткой RO и относятся к так называемым R-вариантам, может вызвать затруднение в связи с тем, что при пересевах и хранении таких культур зачастую изменяется или утрачивается их агглютинабельность холерными диагностическими сыворотками [1]. Способность штаммов к агглютинации зависит от типа О-антигена [2, 3], разница в строении которого, в свою очередь, обусловлена генетическим разнообразием детерминант, кодирующих ферменты, участвующие в его биосинтезе [4]. Вне зависимости от серогрупповой принадлежности холерных вибрионов, участки их генома, кодирующего О-антиген, фланкированы генами *rjg* и *gmhD*, ориентируясь на которые можно определить наличие всего кластера в полногеномном секвенсе. По мнению J. Xu *et al.*, мутации на участке между вышеуказанными генами могут быть причиной утраты О1-антигена, в результате чего штаммы приобретают R-фенотип, т.е. способность агглютинироваться только холерной диагностической сывороткой RO [5]. Регионы генома, кодирующие биосинтез О1- и О139-антигенов, в литературе обозначаются как *wbe* и *wbf* соответственно, или *wb** кластеры, к которым наряду с двумя названными относятся и детерминанты О-антигенов представителей многочисленных серогрупп *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 [6].

Вибрионы, агглютинирующиеся холерными диагностическими сыворотками, характеризуются наличием на поверхности клетки как О-антигенов, так и R-антигенов [7], но в случае, если бактерия экспрессирует только R-антигены, она теряет свойство агглютинироваться холерными диагностическими сыворотками О1 и О139, но становится способна к агглютинации с диагностической сывороткой RO [8]. В липополисахаридах таких клеток отсутствуют длинные повторяющиеся звенья О-антигена, однако короткий липополисахарид сохраняется. При этом формируются колонии, морфологически не отличающиеся

от колоний в S-форме [7, 9], в противоположность ругозным (морщинистым), в которых образующие их клетки продуцируют во внешнюю среду экзополисахарид [10]. Известно, что R-антигены у холерных вибрионов серологически идентичны между собой вне зависимости от типа О-антигена [11].

В литературе есть данные о *V. cholerae* R-варианта, которые были получены от штаммов с *wb** кластерами, строение которых соответствует таковому штаммов как серогруппы О1, так и О139 [3, 7]. Токсигенные *V. cholerae* также могут быть R-вариантами, причем продукция холерного токсина у таких штаммов бывает как низкой (чаще всего), так и высокой [7].

В связи с этим представляется актуальным изучение *wb** кластеров штаммов *V. cholerae*, принадлежащих по фенотипу к R-вариантам, для обоснования подходов к разработке молекулярных методов для их дифференциации.

Цель работы – идентификация *wb** кластеров в геномах *V. cholerae* R-варианта, изучение их структуры и проведение филогенетического анализа данных штаммов.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. В работе проведено исследование 24 штаммов *V. cholerae* R-варианта, четырех SR-варианта и двух штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 из коллекций Ростовского-на-Дону и Иркутского противочумных институтов. При сравнении кластеров и для проведения филогенетического анализа использовали нуклеотидные последовательности, представленные в базе NCBI в проекте, объединяющем секвенсы штаммов, относящихся более чем к 200 серогруппам (номер проекта – PRJDB8600), нуклеотидные последовательности *V. cholerae* О1 N16961, а также три штамма *V. cholerae* О1 из коллекции Ростовского-на-Дону противочумного института (таблица).

Полногеномное секвенирование и биоинформационный анализ. Секвенирование проведено в ходе выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 г. «Санитарный щит страны – безопасность для здоровья (предупреждение, выяв-

Штаммы, используемые в работе
Strains used in the study

Номер штамма Strain No.	Год выделения Year of isolation	Агглютинабельность сыворотками				Генотип* Genotype*	Место и источник выделения Site and source of isolation
		O1 (1:1600)	Огава Ogawa (1:800)	Инаба Inaba (1:800)	RO (1:800)		
1	2	3	4	5	6	7	8
I-1103	1990	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Уссурийск, р. Комаровка Primorsky Territory, Ussuriysk, Komarovka river
I-1113	1990	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Находка, падь Ободная, оз. Лебяжье Primorsky Territory, Nakhodka, Obodnaya gorge, Lebyazhye lake
I-1147	1992	+++	–	–	++	wbe-	Приморский край, Уссурийск, р. Славянка Primorsky Territory, Ussuriysk, Slavyanka river
I-1158	1992	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Находка, старое устье р. Глиники Primorsky Territory, Nakhodka, old mouth of the river Glinka
I-1199	1994	+++	+++	#	+++ 1/4 т ** 1/4 t **	wbe-	Приморский край, Уссурийск, р. Репьевка, автодорожный мост Primorsky Territory, Ussuriysk, Rep'evka river, near the motor-road bridge
I-1329	1999	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Владивосток, р. Седанка Primorsky Territory, Vladivostok, Sedanka river
I-1353	2000	–	–	–	# 1/2 т *** 1/2 t ***	wbe-	Приморский край, Владивосток, р. Горностай, бухта Щитовая Primorsky Territory, Vladivostok, Gornostai river, Shchitovaya Bay
I-1357	2000	–	–	–	# 1/4 т 1/4 t	wbe-	Приморский край, Находка, бухта Отрада Primorsky Territory, Nakhodka, Otrada Bay
I-1376	2003	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Артем, р. Малая Дрена Primorsky Territory, Artem, Malaya Drena river
150-03-s	2003	–	–	–	+++	wbe-	Приморский край, Уссурийск Primorsky Territory, Ussuriysk
9-06	2006	–	–	++	+++	wbe-	Иркутская область, Иркутск Irkutsk Region, Irkutsk
4-06	2006	–	–	+++ 1/2 т 1/2 t	+++	wbe-	Иркутская область, Иркутск Irkutsk Region, Irkutsk
40-08-ch	2008	–	–	–	+++ 1/2 т 1/2 t	wbe-	Приморский край, Черниговский район Primorsky Territory, Chernigovsky district
I-1441	2009	–	–	–	#	wbe-	Алтайский край, Барнаул, р. Обь Altai Territory, Barnaul, Ob river
382-10-s	2010	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Хасанский район Primorsky Territory, Khasansky district
136-2016	2016	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Находка, оз. Соленое Primorsky Territory, Nakhodka, Solenoe lake
135-98	1998	–	–	–	+++	wbe-	Приморский край, Находка, оз. Соленое Primorsky Territory, Nakhodka, Solenoe lake
102-2016-n	2016	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Находка, оз. Соленое Primorsky Territory, Nakhodka, Solenoe lake
156-16-n	2016	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Находка, оз. Соленое Primorsky Territory, Nakhodka, Solenoe lake
1-18	2018	–	–	–	#	wbe-	Иркутская область, Иркутск, р. Ушаковка Irkutsk Region, Irkutsk, Ushakovka river
1-19	2019	–	–	–	#	wbe-	Иркутская область, Иркутск, р. Ушаковка Irkutsk Region, Irkutsk, Ushakovka river
3-20	2020	–	–	–	# 1/4 т 1/4 t	wbe-	Иркутская область, Иркутск, р. Ушаковка Irkutsk Region, Irkutsk, Ushakovka river
19336	2013	–	–	–	#	wbe-	Республика Калмыкия, Целинный р-н, с. Вознесеновка, пруд с. Вознесеновка Republic of Kalmykia, Tselinny district, Voznesenovka village, the pond in Voznesenovka village

Окончание таблицы / Ending of the table

1	2	3	4	5	6	7	8
18298	2000	–	–	–	#	wbe-	Приморский край, Владивосток, р. Седанка Primorsky Territory, Vladivostok, Sedanka river
15865	1991	–	–	–	#	wbe-	Республика Казахстан, Мангистаурская область, г. Шевченко, 14-й микрорайон Republic of Kazakhstan, Mangistaur Region, Shevchenko, 14th micro-district
18237	1998	–	–	–	#	wbe-	Рязанская область, Сасово, р. Сасовка Ryazan Region, Sasovo, Sasovka river
13910	1988	–	–	–	#	wbe-	Республика Казахстан, Актау, берег моря, 5-й микрорайон Republic of Kazakhstan, Aktau, seashore, 5th micro-district
16290	1993	–	–	–	#	wbe-	Забайкальский край, Читинский р-н, п. Домна Transbaikal Territory, Chita district, Domna settlement
8-19	2019	–	–	–	–	wbe-	Иркутск, оз. Юность Irkutsk, Lake Yunost'
218-16-n	2016	–	–	–	–	wbe-	Находка, оз. Солёное Nakhodka, Solenoe lake
8256	1974	#	–	–	–	wbe+	Крым, Керчь, больной Crimea, Kerch, patient
15000	1990	#	–	–	–	wbe+	Россия, Брянск, вибрионоситель Russia, Bryansk, vibrio carrier
15898	1991	#	–	–	–	wbe+	Узбекистан, Канал Uzbekistan, Kanal

Примечания: * wbf отсутствовал у всех штаммов; ctx, tcp отсутствовали у всех штаммов кроме 8256; ** 1/4 т – 1/4 диагностического титра холерной сыворотки; *** 1/2 т – 1/2 диагностического титра холерной сыворотки.

Notes: * wbf was absent in all strains; ctx, tcp were absent in all strains except 8256; ** 1/4 t – 1/4 diagnostic titer of cholera serum; *** 1/2 t – 1/2 diagnostic titer of cholera serum.

ление, реагирование)». Секвенирование проводилось на платформе MiSeq (Illumina) с получением ридов длиной 250 п.н. с использованием набора реагентов nextera DNA flex library prep (Illumina) и на платформе MinION (Oxford Nanopore) с получением длинных непарных ридов с использованием набора SQK-LSK109 вместе с NEBNext Companion Module E7180S (Oxford Nanopore).

Качество исходных чтений оценивали с помощью FastQC [12]. Для очистки ридов использовали программу для фильтрации данных Trimmomatic [13]. Сборка геномов исследуемых штаммов выполнена с помощью SPAdes (v.3.11.1) [14] в гибридном режиме из данных Illumina и Oxford Nanopore. Оценка качества сборки проводилась в программе Quast (v.5.0.2) [15].

Глобальное выравнивание и идентификация генов в геноме методом ДНК-белкового выравнивания при сравнении *wb** и их аннотации выполнялись с использованием программы exonerate версии 2.4.0 [16]. Поиск границ *wb** кластеров и сопоставление ортологических генов внутри них проводились с помощью программы BLAST из пакета ncbi-blast-suite версии 2.13.0 [17]. Манипуляции с последовательностями кластеров и визуализация данных проводились с помощью скриптов на языке Python и пакетов pyGenomeViz, Biopython.

Филогенетическое дерево построено на основании множественного выравнивания корового генома с использованием программы goary (v.3.13.0) [18]. Полногеномное выравнивание проводилось про-

граммами nucmer и promer из пакета MUMmer 4 версии 4.0 [19].

Результаты и обсуждение

В составе геномов, включенных в исследование штаммов *V. cholerae*, определены *wb** кластеры, ответственные за биосинтез, транспорт и модификацию О-антигена, и проведено сравнение транслированных аминокислотных последовательностей *wb** регионов штаммов R-варианта с аминокислотными последовательностями представленных в базе данных NCBI референсных штаммов. На рис. 1 представлено парное глобальное выравнивание аминокислотных последовательностей *wb** регионов группы из 13 штаммов, среди которых – референсный штамм *V. cholerae* RIMD 2214261 O23-серогруппы. Его транслированными последовательностям *wb** региона соответствовали таковые 10 штаммов *V. cholerae* R-варианта и двух – *V. cholerae* nonO1/nonO139.

Три штамма (два *V. cholerae* nonO1/nonO139 и референсный) не имели отличий в последовательностях, которые были бы свойственны только им и при этом не свойственны группе R-варианта. То есть уникальных маркеров, отличающих данные штаммы от R-варианта, в составе кластера O23 выявить не удалось.

Для другой группы, состоящей из девяти штаммов, установлено сходство с транслированными аминокислотными последовательностями *wb** региона референсного штамма *V. cholerae* RIMD 2214297

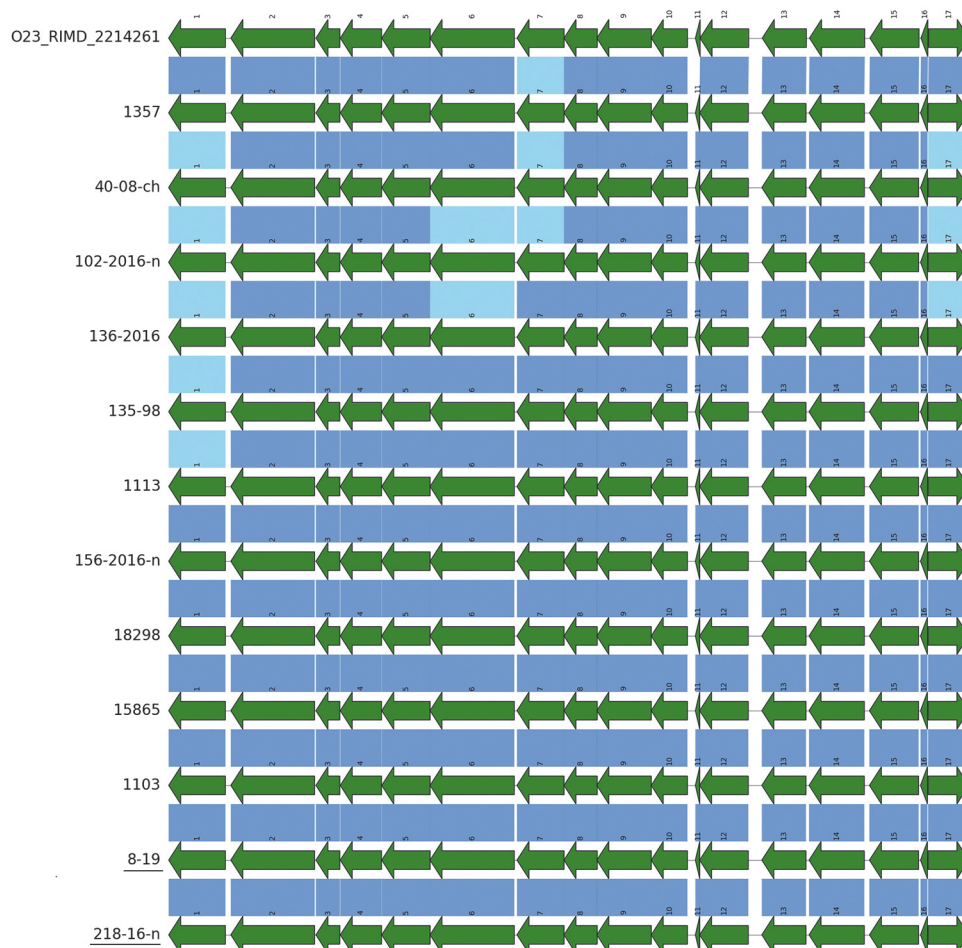


Рис. 1. Сравнение аминокислотных последовательностей продуктов генов *wb** региона девяти штаммов R-варианта, двух – *V. cholerae* nonO1/nonO139 с белками *wb** референсного штамма *V. cholerae* RIMD 2214261 O23-серогруппы

Пояснение: номера штаммов, отнесенных к *V. cholerae* nonO1/nonO139 подчеркнуты; соединительные линии синего цвета соответствуют 100 % идентичности между аминокислотными последовательностями белков, голубого цвета – идентичность в интервале 95,0–99,9 %; параметр покрытия для попарно сравниваемых белков – 98 %

Fig. 1. Comparison of amino acid sequences of *wb** gene products of nine R-variants strains and two strains of *V. cholerae* nonO1/nonO139 with the proteins of the reference strain *V. cholerae* RIMD 2214261 of O23 serogroup

Clarification remark: the strains classified as *V. cholerae* nonO1/nonO139 are underlined; blue connecting lines indicate 100 % identity between protein sequences, while light blue indicates identity within the range of 95.0–99.9 %; the coverage parameter for the compared proteins is 98 %

O59-серогруппы (рис. 2, А). В составе белков внутри этой группы присутствует большее разнообразие, чем в предыдущей. Необходимо отметить, что для аминокислотных последовательностей, транслированных с *wb** области штамма 13910, выявлена 100 % идентичность таковым референсного штамма RIMD 2214297. То есть при 100 % идентичности белковых продуктов *wb** региона этих двух штаммов их фенотипы различаются – референсный штамм, как следует из данных NCBI, агглютинируется типовой сывороткой O59, а *V. cholerae* 13910 является R-вариантом. Это может свидетельствовать о том, что причины, по которым штаммы становятся способны агглютинироваться RO-сывороткой, могут быть различными и не всегда обусловлены изменениями генетических последовательностей внутри *wb** региона.

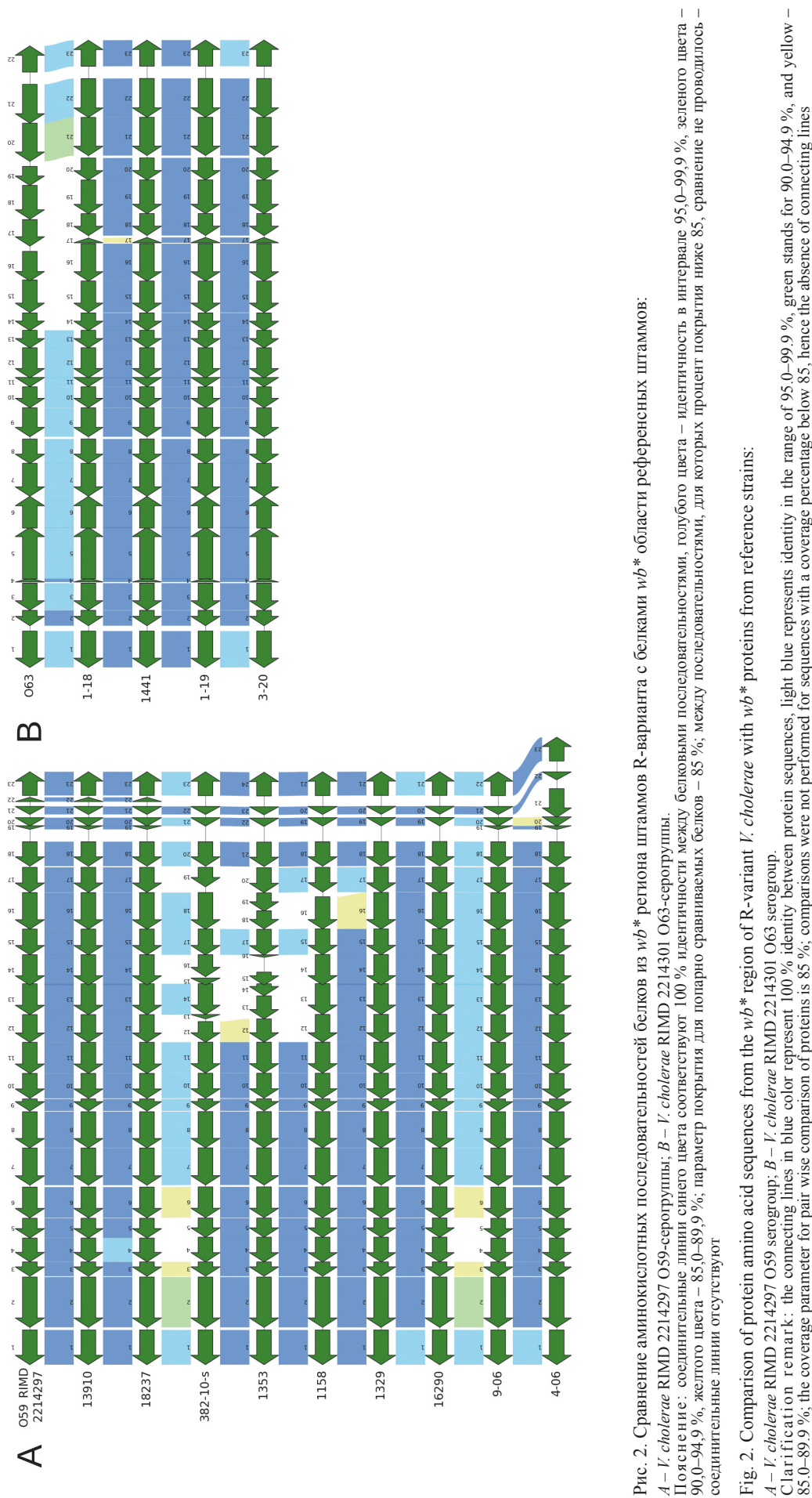
Еще одна сформировавшаяся группа состояла из четырех штаммов, продукты трансляции генов *wb** кластера которых близки аминокислотным последовательностям *wb** области референсного штамма *V. cholerae* RIMD 2214301 O63-серогруппы (рис. 2, В).

В данной группе три штамма из четырех выделены из р. Ушаковки (Иркутская область, г. Иркутск) в 2018, 2019, 2020 гг., а один штамм – из р. Оби (Алтайский край, г. Барнаул) в 2009 г. Для данной группы штаммов характерно меньшее сходство с

референсной последовательностью (95,0–99,9 %), чем друг с другом (преимущественно 100 %), а в середине кластера попарное выравнивание небольшой группы белков соответствовало менее чем 85 %, в связи с чем идентичность последовательностей не определена.

Кроме того, нам удалось установить соответствие *wb** области между *V. cholerae* 1199 и штаммом RIMD 2214252 O14-серогруппы (рис. 3).

У остальных вибрионов не удалось установить тип *wb** региона, поскольку обнаруженные у исследуемых штаммов последовательности не соответствовали полностью ни одному кластеру, имеющемуся в референсной группе. В то же время для нескольких штаммов установлено, что часть продуктов трансляции совпадали с референсными, что показано на рис. 3. Так, у штамма 150-03-s большая часть белков, кодируемых *wb** кластером, обнаруживается у штамма *V. cholerae* RIMD 2214308 O70-серогруппы; у двух штаммов (1376 и 1147) выявлено сходство белков, транслируемых с *wb** кластера, с референсным *wb** кластером штамма RIMD 2214249 O11-серогруппы. Интересная особенность обнаружена у *V. cholerae* R-варианта 19336, *wb** кластер которого кодирует белки, характерные частично для O59-серогруппы и частично для O11-серогруппы. Такое разнообразие среди последовательностей, кодирующих белки биосинтеза



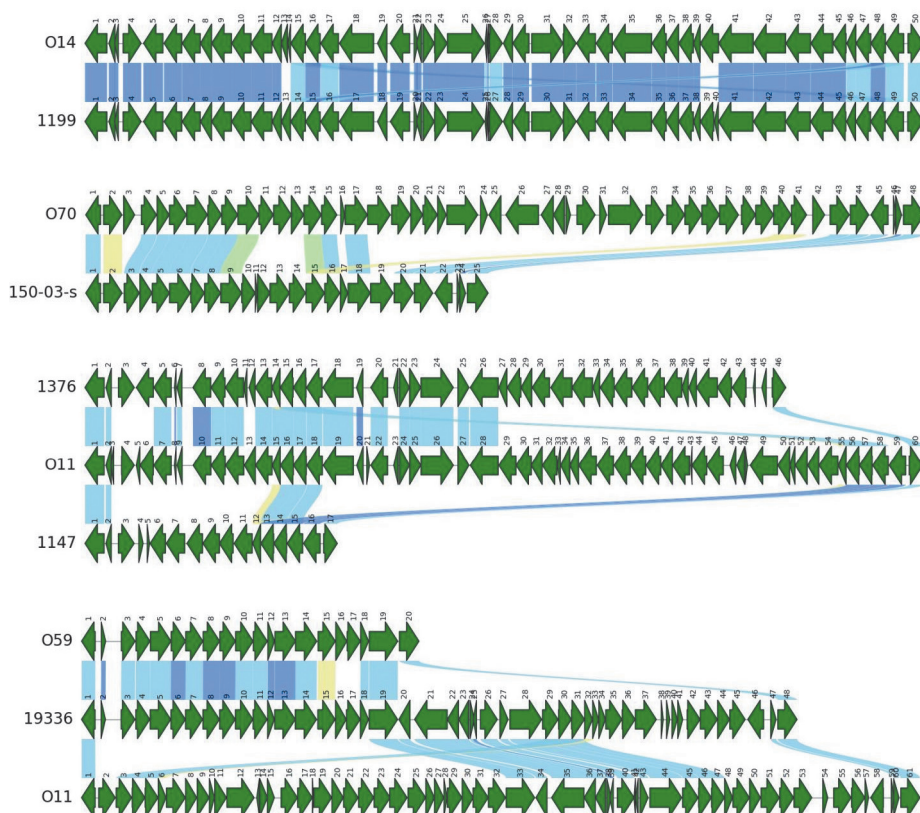


Рис. 3. Сравнение аминокислотных последовательностей белков четырех разных типов *wb** регионов с белками *wb** областей пяти штаммов R-варианта:

Пояснение к рисунку аналогично таковому к рис. 2

Fig. 3. Comparison of amino acid sequences of proteins in four different types of *wb** regions with proteins in *wb** regions of five R-variant strains:

Clarification remark for the Fig. 3 is similar to that of Fig. 2

О-антигена, свидетельствует об их высокой вариабельности, которая может быть связана с адаптационной изменчивостью вибрионов.

Для построения филогенетического дерева взяты штаммы *V. cholerae* R-варианта, *V. cholerae* O1, а также референсные штаммы серогрупп O23, O59, O14, O63, O11 и O70 и два штамма *V. cholerae* nonO1/nonO139, *wb** кластеры которых соответствовали *V. cholerae* RIMD 2214261 O23-серогруппы.

Оказалось, что штаммы группировались преимущественно в соответствии с типом кластера (при построении филогенетического дерева гены, расположенные внутри кластера, не использовались, поскольку не входили в состав корового генома). Так, все штаммы с O23-типом *wb** кластера, как R-варианты, так и *V. cholerae* nonO1/nonO139, а также сам референсный штамм расположились в одной кладе вне зависимости от типа агглютинации. В общей сложности в данную кладу вошли 13 штаммов — все с O23-типом *wb** кластера (рис. 4).

Вместе с тем четыре штамма (3-20, 1441, 1-19 и 1-18) с *wb** кластерами, проявляющими сходство с референсным штаммом *V. cholerae* RIMD 2214301 O63-серогруппы, образовали кладу (на рис. 4 отмечена серым цветом), в которую референсный штамм не вошел. Несмотря на то, что *wb** кластер *V. cholerae* RIMD 2214301 O63 демонстрирует сходство с данной группой, в аминокислотных последовательностях белков, тем не менее, присутствуют и отличия (рис. 3). Следует отметить, что три штамма из этой группы выделены из одной стационарной точки на р. Ушаковке (г. Иркутск) в течение трех лет подряд.

Не исключено, что указанные штаммы могут относиться к новой серогруппе, проявляющей сходство с O63. Однако это предположение требует проведения дополнительных исследований геномных и фенотипических особенностей указанных изолятов.

Наиболее гетерогенной была группа из 9 штаммов с *wb** последовательностью, соответствующей референсному штамму O59-серогруппы. Она оказалась полифилетической и разделилась на три клады (рис. 4). Гетерогенность внутри группы *V. cholerae* с кластером типа O59 может быть обусловлена тем, что эволюционно она существует более длительный период времени и претерпела большее количество эволюционных событий, повлекших изменения генома, и/или имел место горизонтальный перенос участка, кодирующего О-антиген, в результате чего близкий по строению *wb** регион существует в филогенетически далеких друг от друга вибрионах.

В общую кладу сгруппировались референсный *V. cholerae* O11 и два штамма, в *wb** кластере которых есть единичные гены, имеющиеся в O11-кластере. Помимо этого, отдельную самостоятельную кладу образовала также группа из двух штаммов: референсного *V. cholerae* O14 и R-варианта с *wb** регионом O14-типа.

Кластер размером около 47 т.п.н., аналог которого отсутствовал среди 206 референсных штаммов разных серогрупп, обнаружен у штамма *V. cholerae* 19336. В его составе присутствуют участки с аминокислотными последовательностями, встречающимися у типовых *V. cholerae* серогрупп O59 и O11. Штаммы O1-серогруппы сформировали на дендро-

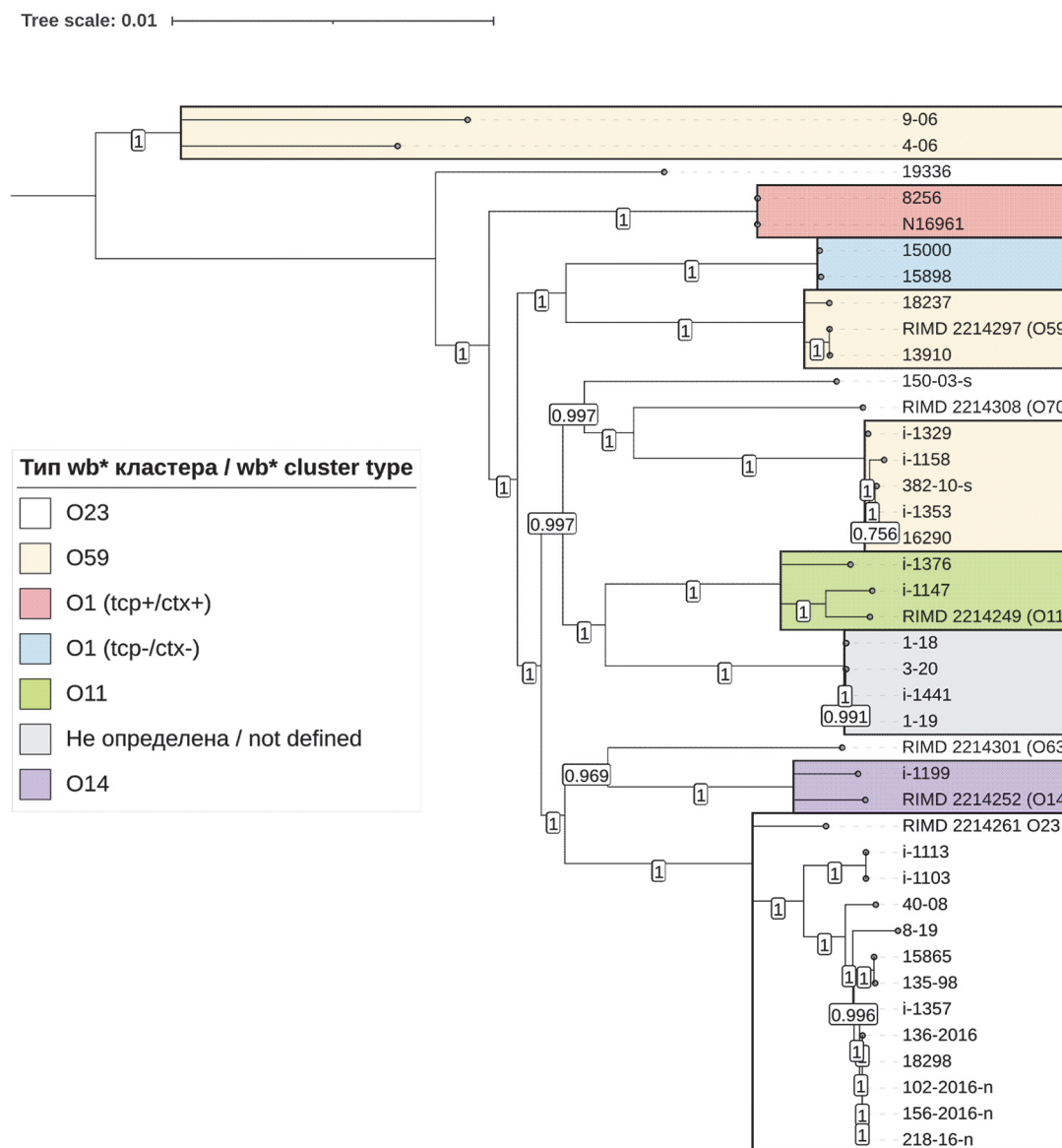


Рис. 4. Филогенетическое дерево на основании последовательностей корового генома. Значения поддержки топологии (bootstrap) указаны для внутренних узлов. Цвет фона клады обозначает тип *wb** кластера

Fig. 4. Phylogenetic tree based on sequences of the core genome. Support values (bootstrap) are provided for internal nodes. The background color of each clade represents the type of *wb** cluster

грамме два кластера, в составе которых отсутствуют штаммы *V. cholerae* R-варианта.

В структуре локуса *wb** исследуемых вибрионов не удалось выявить специфических генетических изменений, свойственных только штаммам *V. cholerae* R-варианта, которые предположительно могли бы способствовать переходу в R-фенотип. Среди исследованных штаммов R-варианта не обнаружено *wb** кластеров O1-серогруппы. С большой уверенностью можно констатировать, что все рассмотренные в данной работе штаммы R-варианта не содержат генов *wbe* кластера и не являются *V. cholerae* O1 с изменениями по признаку агглютинабельности.

Вне зависимости от того, способны штаммы к агглютинации холерной диагностической сывороткой RO или нет, филогенетически они располагают-

ся на кладограмме преимущественно в соответствии с типом *wb** региона.

Соответственно, фенотип R-вариант – это не систематический признак, а приобретенная особенность штаммов, которая затрудняет определение серогрупповой принадлежности. Выяснение вероятных причин приобретения холерным вибрионом способности агглютинироваться RO-сывороткой при отсутствии мутаций в структуре локуса *wb** требует проведения дополнительных исследований.

При этом штамм может обладать генами, классифицирующими его как *V. cholerae* nonO1/nonO139 либо как *V. cholerae* O1-серогруппы, различными по эпидемической значимости.

С учетом изложенного можно заключить, что отсутствие у штаммов *V. cholerae* R-варианта генов биосинтеза O1- и O139-антигенов при наличии ви-

доспецифических генетических детерминант по результатам ПЦР дает основание для отнесения их к *V. cholerae* nonO1/nonO139. При обнаружении таких вибрионов в объектах окружающей среды идентификация их должна осуществляться в соответствии с нормативно-методическими документами в лабораториях территориального уровня. В случае выделения культуры *V. cholerae* с указанными выше фенотипическими и молекулярно-генетическими характеристиками из клинического материала идентификация культуры проводится в лабораториях регионального и федерального уровней с использованием дополнительных методов, в частности секвенирования геномов и анализа локуса *wb**, с целью уточнения принадлежности штамма к той или иной серологической группе.

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

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

Благодарность. Авторы выражают особую благодарность Е.С. Герасимову за оказанную неоценимую помощь в обработке данных.

Список литературы

- Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Архангельская И.В., Якушева О.А., Алексеева Л.П., Водопьянов С.О., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение диапазона изменчивости по агглютинабельности штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных при мониторинговых исследованиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:107–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114.
- Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1639(2):65–79. DOI: 10.1016/j.bbadis.2003.08.004.
- Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.
- Aydinian A., Tang L., Morris J.G., Johnson J.A., Stine O.C. Genetic diversity of O-antigen biosynthesis regions in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(7):2247–53. DOI: 10.1128/AEM.01663-10.
- Xu J., Zhang J., Lu X., Liang W., Zhang L., Kan B. O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4. *J. Bacteriol.* 2013; 195(4):798–806. DOI: 10.1128/JB.01770-12.
- Li M., Shimada T., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2441-2453.2002.
- De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
- Алексеева Л.П., Черепакхина И.Я., Сальникова О.И., Бурлакова О.С. Изучение антигенных взаимосвязей атипичных R-форм холерного вибриона на основе моноклональных антител. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; (4):9–12.
- Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
- Заднова С.П., Смирнова Н.И. Роль внеклеточного экзополисахарида в адаптации возбудителя холеры во внешней среде. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2010; 3:13–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.
- Shimada T., Sakazaki R. R antigen of *Vibrio cholerae*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1973; 26(4):155–60. DOI: 10.7883/yoken1952.26.155.
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8):1072–5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
- Slater G.S., Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics*. 2005; 6:31. DOI: 10.1186/1471-2105-6-31.
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 2000; 7(1-2):203–14. DOI: 10.1089/10665270050081478.
- Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., Wong V.K., Reuter S., Holden M.T., Fookes M., Falush D., Keane J.A., Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015; 31(22):3691–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421.
- Marçais G., Delcher A.L., Phillippy A.M., Coston R., Salzberg S.L., Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput. Biol.* 2018; 14(1):e1005944. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005944.
- Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. [Assessment of the variation range of agglutinability in *Vibrio cholerae* strains isolated in the course of monitoring studies]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):107–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114.
- Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1639(2):65–79. DOI: 10.1016/j.bbadis.2003.08.004.
- Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.
- Aydinian A., Tang L., Morris J.G., Johnson J.A., Stine O.C. Genetic diversity of O-antigen biosynthesis regions in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(7):2247–53. DOI: 10.1128/AEM.01663-10.
- Xu J., Zhang J., Lu X., Liang W., Zhang L., Kan B. O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4. *J. Bacteriol.* 2013; 195(4):798–806. DOI: 10.1128/JB.01770-12.
- Li M., Shimada T., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2441-2453.2002.
- De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
- Alekseeva L.P., Cherepakina I.Ya., Sal'nikova O.I., Burlakova O.S. [A monoclonal antibody-based study of the antigenic interrelations of typical and R forms of *Vibrio cholerae*]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; (4):9–12.
- Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
- Zadnova S.P., Smirnova N.I. [The Role of Extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; (3):13–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.
- Shimada T., Sakazaki R. R antigen of *Vibrio cholerae*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1973; 26(4):155–60. DOI: 10.7883/yoken1952.26.155.
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

References

- Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., Yakusheva O.A., Alekseeva L.P., Vodop'yanov S.O., Ezhova M.I., Noskov A.K. [Assessment of the variation range of agglutinability in *Vibrio cholerae* strains isolated in the course of monitoring studies]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; (3):107–14. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-107-114.
- Chatterjee S.N., Chaudhuri K. Lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae*. I. Physical and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003; 1639(2):65–79. DOI: 10.1016/j.bbadis.2003.08.004.
- Blokesch M., Schoolnik G.K. Serogroup conversion of *Vibrio cholerae* in aquatic reservoirs. *PLoS Pathog.* 2007; 3(6):e81. DOI: 10.1371/journal.ppat.0030081.
- Aydinian A., Tang L., Morris J.G., Johnson J.A., Stine O.C. Genetic diversity of O-antigen biosynthesis regions in *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2011; 77(7):2247–53. DOI: 10.1128/AEM.01663-10.
- Xu J., Zhang J., Lu X., Liang W., Zhang L., Kan B. O antigen is the receptor of *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor typing phage VP4. *J. Bacteriol.* 2013; 195(4):798–806. DOI: 10.1128/JB.01770-12.
- Li M., Shimada T., Morris J.G. Jr, Sulakvelidze A., Sozhamannan S. Evidence for the emergence of non-O1 and non-O139 *Vibrio cholerae* strains with pathogenic potential by exchange of O-antigen biosynthesis regions. *Infect. Immun.* 2002; 70(5):2441–53. DOI: 10.1128/IAI.70.5.2441-2453.2002.
- De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
- Alekseeva L.P., Cherepakina I.Ya., Sal'nikova O.I., Burlakova O.S. [A monoclonal antibody-based study of the antigenic interrelations of typical and R forms of *Vibrio cholerae*]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; (4):9–12.
- Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
- Zadnova S.P., Smirnova N.I. [The Role of Extracellular exopolysaccharide in cholera agent adaptation in the environment]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2010; (3):13–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2010-3(105)-13-19.
- Shimada T., Sakazaki R. R antigen of *Vibrio cholerae*. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* 1973; 26(4):155–60. DOI: 10.7883/yoken1952.26.155.
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.

14. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
15. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics.* 2013; 29(8):1072–5. DOI: 10.1093/bioinformatics/btt086.
16. Slater G.S., Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics.* 2005; 6:31. DOI: 10.1186/1471-2105-6-31.
17. Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.* 2000; 7(1-2): 203–14. DOI: 10.1089/10665270050081478.
18. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., Wong V.K., Reuter S., Holden M.T., Fookes M., Falush D., Keane J.A., Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015; 31(22):3691–3. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421.
19. Marçais G., Delcher A.L., Phillippy A.M., Coston R., Salzberg S.L., Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput. Biol.* 2018; 14(1):e1005944. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005944.

Authors:

Podoinitsyna O.A., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Levchenko D.A., Temyakova S.Yu., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaaanet.ru.

Mironova L.V., Fedotova I.S., Galach'yants Yu.P., Basov E.A., Ponomareva A.S. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Подойницына О.А., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Телякова С.Ю., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaaanet.ru.

Миронова Л.В., Федотова И.С., Галачянц Ю.П., Басов Е.А., Пономарева А.С. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.