

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-101-107

УДК 579.843:579.25

А.Д. Катышев, Д.А. Агафонов, Д.А. Рыбальченко, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова

Выявление новых особенностей структуры генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор *ctxAB-tcpA*⁺

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

Цель исследования – сравнительный анализ структуры и распространенности генов патогенности, лекарственной устойчивости и персистенции среди природных нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺. **Материалы и методы.** Проанализированы полные геномы 73 токсигенных и 33 нетоксигенных штаммов холерных вибрионов с помощью методов мультилокусного сиквенс-типирования в онлайн-сервисе MLST2.0 на платформе CGE (Center Genomic Epidemiology) и филогенетического анализа с применением программы MrBayes v.3.2.7a. **Результаты и обсуждение.** Выявлены новые геномные особенности природных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* Эль Тор с генотипом *ctxAB-tcpA*⁺, относящихся к филогенетической линии L3. Установлено, что по ST-типу, наличию мобильных элементов ICE и VSP-II, аллельному профилю генов патогенности (*tcpA*, *rtxA*) и лекарственной устойчивости (*gyrA* и *parC*), а также присутствию гена *VC2346* ряд штаммов из этой группы имели значительное генетическое сходство с токсигенными и были, видимо, производными типичных или генетически измененных штаммов возбудителя холеры. Филогенетический анализ подтвердил явную генетическую близость этих изолятов с токсигенными и показал их принадлежность к филогенетической линии эпидемически опасных штаммов, а именно к L2. Таким образом, среди природных нетоксигенных холерных вибрионов Эль Тор *ctxAB-tcpA*⁺ обнаружены штаммы с генетическими маркерами возбудителя холеры, что указывает на их происхождение от этих штаммов и свидетельствует о необходимости разработки диагностических средств для дифференциации нетоксигенных штаммов с разным патогенным потенциалом.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, филогенетические линии, вариабельность генов, патогенность, персистенция, лекарственная устойчивость.

Корреспондирующий автор: Смирнова Нина Ивановна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Катышев А.Д., Агафонов Д.А., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Выявление новых особенностей структуры генома нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор *ctxAB-tcpA*⁺. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2026; 2:101–107. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-101-107

Поступила 18.03.2026. Отправлена на доработку 31.03.2026. Принята к публикации 06.04.2026.

A.D. Katyshev, D.A. Agafonov, D.A. Rybal'chenko, Yu.V. Lozovsky, N.I. Smirnova

Identification of New Genome Structure Features in Non-Toxigenic Strains of *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor *ctxAB-tcpA*⁺

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

Abstract. The aim of the study was to comparatively analyze the structure and prevalence of pathogenicity, drug resistance, and persistence genes among non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains, biovar El Tor *ctxAB-tcpA*⁺. **Materials and methods.** Nucleotide sequences of whole genomes were assessed for 73 toxigenic and 33 non-toxigenic strains of cholera vibrios applying multilocus sequence typing of the strains using the MLST 2.0 online service on CGE (Center Genomic Epidemiology) platform and phylogenetic analysis using MrBayes v.3.2.7a. **Results and discussion.** New genomic features of non-toxigenic *V. cholerae* El Tor strains with the *ctxAB-tcpA*⁺ genotype, belonging to the L3 phylogenetic lineage, have been identified. Significant genetic differences were revealed between *ctxAB-tcpA*⁺ strains from L3 line. It has been established that, based on ST type, the presence of ICE and VSP-II mobile elements, the allelic profile of pathogenicity genes (*tcpA*, *rtxA*) and drug resistance genes (*gyrA* and *parC*), the presence of the *VC2346* gene, a number of non-toxigenic strains are substantially genetically similar to toxigenic strains and are, presumably, derivatives of typical or genetically modified *V. cholerae* strains. Phylogenetic analysis has confirmed the pronounced genetic similarity of those isolates to toxigenic strains and demonstrated their affiliation to the phylogenetic lineage of epidemically dangerous strains, namely, L2. Thus, among the non-toxigenic cholera vibrios biovar El Tor *ctxAB-tcpA*⁺, strains with genetic markers of the cholera pathogen have been found, which indicates that they originated from toxigenic ones and that there is a need to develop diagnostic tools for differentiating non-toxigenic strains with different pathogenic potential.

Key words: *Vibrio cholerae*, phylogenetic lineages, gene variability, pathogenicity, persistence, drug resistance.

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

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

Corresponding author: Nina I. Smirnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Katyshev A.D., Agafonov D.A., Rybal'chenko D.A., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Identification of New Genome Structure Features in Non-Toxigenic Strains of *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor *ctxAB-tcpA*⁺. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 2:101–107. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-2-101-107

Received 18.03.2026. Revised 31.03.2026. Accepted 06.04.2026.

Katyshev A.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8260-4670>
Agafonov D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9273-6063>
Rybal'chenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3117-8229>

Lozovsky Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4382-7254>
Smirnova N.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7115-6286>

Холерные вибрионы серогруппы O1 биовара Эль Тор включают токсигенные и нетоксигенные штаммы, относящиеся к разным филогенетическим линиям. Токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 Эль Тор, вызвавшие 7-ю пандемию холеры, принадлежат к филогенетической линии L2 [1]. Вследствие нестабильности их генома на современном этапе пандемии широкое распространение получили природные генетические измененные штаммы, или геноварианты возбудителя, отличающиеся от типичных штаммов присутствием в геномах различных аллелей ключевых генов патогенности, пандемичности и персистенции [2, 3]. Для них характерны такие аллели генов *ctxB*, *tcpA*, *rtxA*, кодирующих ключевые и дополнительные факторы патогенности (В-субъединицу холерного токсина, основной белок токсин-корегулируемых пилей, или TCP – от toxin-coregulated pilus, и цитотоксин MARTX – от multifunctional autoprocessing repeats-in toxin), как *ctxB1* или *ctxB7*, *tcpA*^{CIRS101} и *rtxA4*, а также остров пандемичности VSP-II (от *Vibrio seventh pandemic island*) с протяженной делецией, включающей 21 ген [4–7]. Кроме того, геноварианты имеют различный спектр лекарственной устойчивости вследствие приобретения через горизонтальный перенос интегративного конъюгативного элемента ICE (от integrative conjugating element) с генами резистентности, а также мутаций в хромосомных генах *gyrA* (G248T) и *parC* (C254T), кодирующих топоизомеразы II (ДНК-гиразу) и IV, что привело к появлению устойчивости к налидиксовой кислоте [8, 9].

В отличие от токсигенных, нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор с генотипом *ctxAB*[–]*tcpA*⁺, содержащие в геноме остров патогенности VPI-1 с генами *tcpA-F*, кодирующими TCP, по генетической номенклатуре ветвей эволюции относятся к филогенетической линии L3 [1]. Эти штаммы, широко распространенные в поверхностных водоемах России, не способны вызывать эпидемии холеры, но могут быть причиной спорадических случаев и локальных вспышек острых кишечных инфекций [10, 11]. При определении нами ранее филогенетических связей между разными группами холерных вибрионов было показано, что ряд природных нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxAB*[–]*tcpA*⁺ оказались генетически близки к токсигенным [12–14]. Кроме того, недавно выявлено, что спонтанные мутанты токсигенных штаммов, утратившие гены холерного токсина, относятся к филогенетической линии L2, как и токсигенные [15]. Эти факты ставят вопрос о необходимости более детальных исследований природных нетоксигенных штаммов, поскольку имеющаяся информация о распространении среди них других генов, кодирующих важнейшие свойства холерных вибрионов, а также об их принадлежности к филогенетическим линиям является недостаточно полной [13–16].

Цель исследования – сравнительный анализ структуры и распространенности генов патогенности, лекарственной устойчивости и персистенции среди природных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с генотипом *ctxAB*[–]*tcpA*⁺.

Материалы и методы

В работе использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 73 токсигенных и 33 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, полученных из базы NCBI GenBank (90 штаммов) и секвенированных нами (16 штаммов). Бактерии выращивали в бульоне и на агаре LB (HiMedia, Индия) при 37 °C в течение 18–20 ч. Выделение и очистку геномной ДНК проводили из бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, США) в соответствии с протоколами производителей и МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Полногеномное секвенирование проводили на генетическом анализаторе Ion PGM (Ion Torrent), как описано ранее [14]. Результаты филогенетического анализа токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор получили методом байесовского анализа (Unipro UGENE 52) коровых SNP по данным полногеномного секвенирования. SNP-анализ провели программным пакетом Snippy 4.6. Дендрограмму визуализировали онлайн-приложением iTOL v.6 (<https://itol.embl.de>). Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программ UGENE v.45.1 и Bandage v.0.8.1. Сиквенс-типы (ST) исследованных штаммов определяли с использованием онлайн-сервиса MLST 2.0 (Multilocus Sequence Typing) на платформе CGE (<https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>) путем анализа нуклеотидных последовательностей семи генов «домашнего хозяйства»: *adk*, *gyrB*, *mdhI*, *metE*, *pntA*, *purM*, *pyrC*.

Результаты и обсуждение

К настоящему времени установлено, что токсигенные штаммы *V. cholerae* Эль Тор, принадлежащие к филогенетической линии L2 [1], относятся к сиквенс-типу 69 [17]. Для выяснения ST нетоксигенных штаммов *ctxAB*[–]*tcpA*⁺ из L3 проведено их мультилокусное сиквенс-типирование (таблица). В результате среди 33 изученных нетоксигенных штаммов обнаружены три группы, относящиеся к разным сиквенс-типам: 69, 71 и 75. При этом 16 нетоксигенных штаммов, циркулирующих на эндемичных территориях (Индия, Таиланд, Бангладеш, Вьетнам)

в период 7-й пандемии холеры, имели единый ST69 (таблица), характерный для всех токсигенных эпидемически опасных штаммов, включая референсный N16961 [17]. Дальнейшие исследования распространения генов патогенности и эпидемичности среди них позволили выявить другие различия между изолятами. Обнаружено, что штаммы, относящиеся к ST69, содержали различные аллели гена *tcpA*: *tcpA^{Eltor}*, характерный для типичных штаммов возбудителя

(9 изолятов), и *tcpA^{CIRS101}*, свойственный геновариантам (7 изолятов). При этом в хромосоме трех штаммов с *tcpA^{CIRS101}* присутствовал измененный ген *rtxA*, а именно его аллель *rtxA4*, выявленный ранее у ряда генетически измененных штаммов возбудителя холеры [5]. Что касается изолятов с аллелем *tcpA^{Eltor}*, то 8 штаммов из 9 проверенных имели аллель *rtxA1*, характерный для типичных штаммов возбудителя холеры (таблица).

Распространенность генов лекарственной устойчивости, патогенности, эпидемичности и персистенции среди нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор

Prevalence of drug resistance, pathogenicity, epidemicity, and persistence genes among non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor

№	Штамм Strain	Год и место выделения Year and site of isolation	ICE	Аллели генов Gene alleles				VPI-2	VSP-II	ST	vc2346
				<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>tcpA</i>	<i>rtxA</i>				
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Токсигенные штаммы / Toxigenic strains <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>											
1	N16961	Референс Reference	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
Нетоксигенные штаммы / Non-toxicogenic strains <i>ctxAB⁺tcpA⁺</i>											
2	GP60	1973, Индия India	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
3	GP106	1975, Германия Germany	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
4	476_167	1983, Таиланд Thailand	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
5	816ct634	1984, Таиланд Thailand	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	int	69	+
6	184AD112	1985, Таиланд Thailand	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	–	69	+
7	501_771	1985, Таиланд Thailand	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
8	V5	1989, Индия India	<i>VchInd5ΔVRIII</i>	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
9	4661	2001, Бангладеш Bangladesh	<i>VchInd5</i>	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA4</i>	int	Δ	69	+
10	MBRN14	2004, Индия India	<i>VchInd5</i>	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
11	4122	2007, Вьетнам Vietnam	–	G248T	C254T	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
12	4053024303	2010, Таиланд Thailand	<i>VchInd5ΔVRIII</i>	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA4</i>	int	Δ	69	+
13	471352	2011, Бангладеш Bangladesh	–	int	int	<i>CIRS</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
14	NHCM_017	2011, Бангладеш Bangladesh	–	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
15	P47	2011, Таиланд Thailand	–	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
16	S023208	2014, Бангладеш Bangladesh	<i>SXT^{TET}</i>	G248T	C254T	<i>CIRS</i>	<i>rtxA1</i>	int	Δ	69	+
17	VC_Water 6	2019, Индия India	<i>VchInd5</i>	G248T	C254T	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
18	2740-80	1980, США USA	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
19	2476-87	1987, США USA	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–

Окончание таблицы / Ending of the table

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
20	M139	1965, Туркмения Turkmenistan	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	Δ	–	75	–
21	M299	1965, Туркмения Turkmenistan	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
22	34K	1966, Афганистан Afghanistan	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA6</i>	int	Δ	71	–
23	A213	1984, Грузия Georgia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	–	75	–
24	56	1995, Мариуполь Mariupol	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
25	866	1996, Ялта Yalta	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
26	P18778	2005, Ростов-на-Дону Rostov-on-Don	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	Δ	–	75	–
27	M1501	2011, Калмыкия Kalmykia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	Δ	–	75	–
28	M1518	2012, Калмыкия Kalmykia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	–	75	–
29	M1524	2013, Калмыкия Kalmykia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
30	2688	2015, Калмыкия Kalmykia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
31	2613	2015, Калмыкия Kalmukia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA8</i>	int	–	75	–
32	124	2017, Калмыкия Kalmykia	–	<i>gyrA</i> *	<i>parC</i> *	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	–	75	–
33	M888D	Мутант Mutant	–	int	int	<i>Eltor</i>	<i>rtxA1</i>	int	int	69	+
34	P18899D	Мутант Mutant	<i>VchInd5</i>	G248T	int	<i>CIRS</i>	<i>rtxA4</i>	int	Δ	69	+

Примечания: int – интактные гены или интактные мобильные элементы VPI-I и VSP-II; * различные аллели генов *gyrA**, *parC** и *rtxA**; G248T – нуклеотидная замена в гене *gyrA*, обусловившая резистентность к налидиксовой кислоте; C254T – нуклеотидная замена в гене *parC*; M888D, P18899D – нетоксигенные штаммы, полученные в результате спонтанной утраты токсигенными изолятами профага CTX с генами холерного токсина.

Notes: int – intact genes or intact mobile elements VPI-I and VSP-II; * various alleles of the *gyrA**, *parC** and *rtxA** genes; G248T – nucleotide substitution in the *gyrA* gene, which caused resistance to nalidixic acid; C254T is a nucleotide substitution in the *parC* gene; M888D, P18899D – non-toxicogenic strains that emerged as a result of spontaneous loss of CTX prophage and cholera toxin genes by toxigenic isolates.

Далее определили встречаемость среди них генов резистентности к антибиотикам, размещенных на мобильном элементе ICE. В результате в геноме шести штаммов с ST69 обнаружили присутствие трех типов ICE (ICE*VchInd5*: *floR*, *strA*, *strB*, *sul2*, *dfrA1*; ICE*VchInd5*ΔVRIII: *dfrA1*; SXT^{TET}: *tetAR*, *strAB*, *sul2* и *dfrA1*) с различным набором генов лекарственной устойчивости. К тому же среди них у пяти изолятов имелись мутации в генах *gyrA*(G248T) и *parC*(C254T), обусловившие резистентность к налидиксовой кислоте. Полученные данные говорят о том, что лекарственная устойчивость ряда нетоксигенных штаммов из L3 может быть также связана с наличием в их геноме ICE и мутаций в хромосомных генах топоизомераз, как и в случае токсигенных изолятов.

В целом совокупность представленных результатов указывает на то, что в геноме нетоксигенных штаммов с ST69 присутствуют аллели генов пато-

генности и лекарственной устойчивости, характерные для типичных штаммов возбудителя холеры или его геновариантов. Более того, полученные данные позволяют полагать, что эти нетоксигенные штаммы могут быть, видимо, производными токсигенных, утративших профаг CTXφ с генами *ctxAB*, кодирующими холерный токсин. В пользу этого предположения свидетельствует также установленный нами факт присутствия в их геноме гена *VC2346* (таблица) – генетического маркера токсигенных штаммов *V. cholerae*, вызвавших 7-ю пандемию холеры [18].

В то же время в геноме 15 других нетоксигенных штаммов из L3, относящихся к иным ST-типам (71, 75), были другие аллели гена *rtxA* – *rtxA6* и *rtxA8* [5]. Кроме того, у них отсутствовали ICE-элементы, мутации в генах топоизомераз, приводящие к устойчивости к налидиксовой кислоте, а также ген *VC2346* (таблица). Таким образом, среди нетоксигенных штаммов *ctxAB*[–]*tcpA*⁺ обнаружены две группы, раз-

ликающиеся между собой ST-типом, составом генов патогенности и лекарственной устойчивости, а также наличием генетического маркера эпидемически опасных штаммов – гена *VC2346*.

Для поиска других отличий между этими группами штаммов мы определили встречаемость у них двух других участков ДНК, входящих в состав генома токсигенных штаммов: острова патогенности VPI-2 (57,3 т.п.н.) и острова пандемичности VSP-II (26,9 т.п.н.). Оказалось, что в хромосоме более 90 % проверенных нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* (в 28 из 33 изолятов) из обеих групп присутствовал интактный остров патогенности VPI-2 (таблица). Иную картину отмечали в случае острова пандемичности VSP-II. Геном всех штаммов из первой группы с ST69 содержал VSP-II, однако штаммы различались между собой по его структуре. Из 16 штаммов у 7 VSP-II был интактным, тогда как у 9 в его геноме были делеции разной протяженности: от 1,2 до 14,4 т.п.н. При этом у 8 из них в хромосоме присутствовали аллели генов патогенности (*tcpA^{CIRS101}* и/или *rtxA4*), характерные для геновариантов возбудителя холеры (таблица). Вместе с тем 14 (93,3 %) из 15 проверенных штаммов из второй группы, не относящиеся к ST69, были лишены VSP-II.

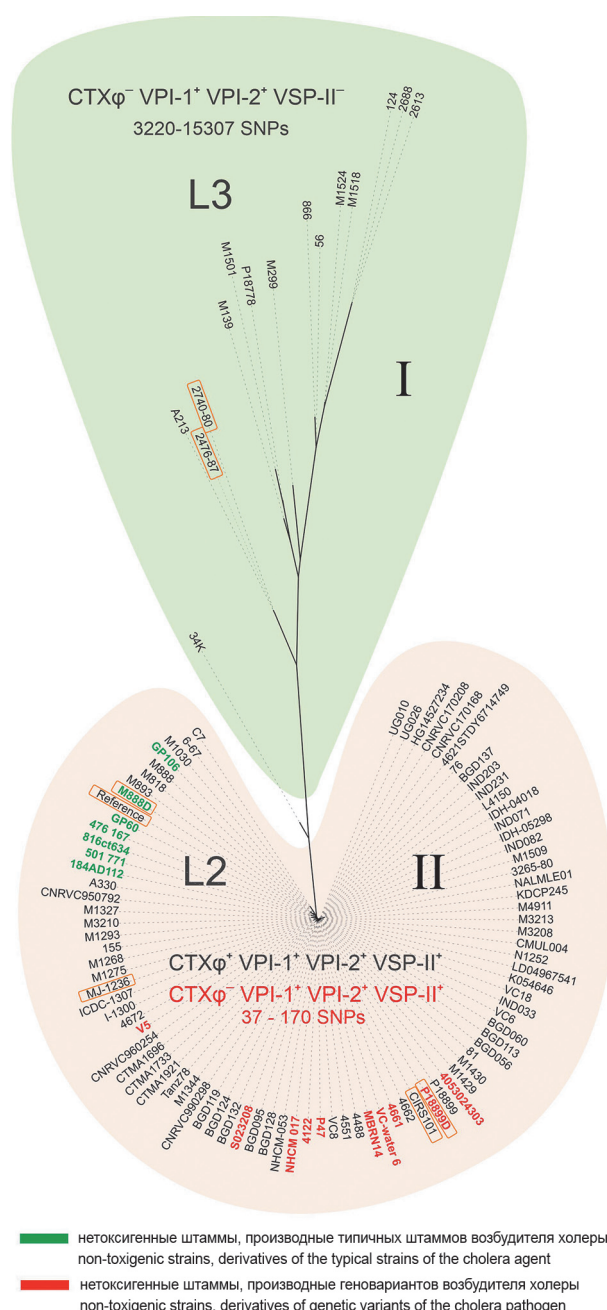
Таким образом, впервые установлено, что по ST-типу, наличию мобильных элементов ICE и VSP-II с генами резистентности к антибиотикам и эпидемичности соответственно, а также аллельному профилю генов патогенности (*tcpA*, *rtxA*) и хромосомных генов лекарственной устойчивости (*gyrA* и *parC*) нетоксигенные штаммы *ctxAB⁻tcpA⁺* включали две основные группы, одна из которых представлена штаммами, имеющими генетическое сходство с токсигенными.

Важным следствием выявленных отличий геномов нетоксигенных вибрионов из двух подгрупп стала их разная потенциальная эпидемическая опасность. У штаммов *ctxAB⁻tcpA⁺* с ST71 или ST75, отнесенных ранее к потенциально эпидемически опасным, возможна лишь реверсия в токсигенные либо через фаговую конверсию вследствие присутствия в их хромосоме генов *tcpA*, кодирующих TCP-рецептор для профага CTXφ [19], либо существующими альтернативными путями, включая приобретение фага CTX за счет трансформации в присутствии хитина [20, 21]. Вместе с тем отсутствие в их геноме островов пандемичности свидетельствуют о том, что одновременное приобретение ими в природных условиях трех протяженных участков ДНК (CTXφ, VSP-I и VSP-II), являющихся генетическими метками эпидемически опасных штаммов, не представляется возможным. В то же время потенциальная эпидемическая опасность нетоксигенных вибрионов *ctxAB⁻tcpA⁺* с ST69, отличающихся от возбудителя холеры только отсутствием профага CTXφ, вполне реальна. Формирование эпидемически опасного токсигенного клона может произойти в результате получения профага CTX через TCP-зависимую трансдукцию [19] либо другим путем [20, 21].

Таким образом, при сравнительном анализе геномов нетоксигенных штаммов филогенетической линии L3 имеющиеся сведения [14] существенно дополнены новыми данными о значительных различиях между ними по составу и структуре мобильных элементов (ICE, VPI-1, VPI-2, VSP-II) и коровых генов.

Получение новых сведений о геномных особенностях нетоксигенных штаммов с генотипом *ctxAB⁻tcpA⁺* послужило основанием для установления их филогенетических связей с токсигенными штаммами методом SNP-типирования. На рисунке изображено филогенетическое дерево, построенное на основании анализа полногеномных последовательностей 105 штаммов, из которых 30 относились к природным нетоксигенным. Кроме того, в анализ в качестве контрольных взяты два экспериментальных нетоксигенных штамма M888ΔCTX и P18899ΔCTX, полученных нами ранее из токсигенных в результате спонтанной утраты профага CTXφ при нахождении изолятов в водной среде [19]. В результате установлено четкое деление взятых штаммов на два кластера. Кластер I включал 15 нетоксигенных изолятов *ctxAB⁻tcpA⁺*, относящихся к L3 (контрольные штаммы 2476-87 и 2740-80) и отличающихся от референсного по 3220–15307 SNPs. Кластер II содержал 90 штаммов, из которых 73 были токсигенными (*ctxAB⁺tcpA⁺*) и по общепринятой классификации относились к пандемической линии L2. Вместе с тем в состав этой филогенетической линии вошли 16 нетоксигенных штаммов *ctxAB⁻tcpA⁺*. Относительно небольшое число нуклеотидных замен (37–170 SNPs), отличающих эти штаммы от референсного пандемического штамма N16961, указывало на их тесную генетическую связь с токсигенными. Эти результаты подтвердили наше предположение об их происхождении от токсигенных (типичных или геновариантов) в результате спонтанной потери генов холерного токсина в составе профага CTXφ. В пользу этого предположения свидетельствует также их большое генетическое сходство с ранее полученными нами нетоксигенными штаммами M888ΔCTX и P18899ΔCTX из токсигенных в результате спонтанной утраты профага CTXφ [22]. Следует отметить, что все нетоксигенные штаммы этого кластера были изолированы в эндемичных по холере регионах, поверхностные водоемы которых часто контаминированы токсигенными холерными вибрионами.

Таким образом, на основе SNP-типирования показано, что природные нетоксигенные штаммы *ctxAB⁻tcpA⁺* входят в состав двух филогенетически обособленных групп (L2 и L3), различающихся между собой по наличию/отсутствию генетического сходства с токсигенными и эпидемическому потенциалу. Явная генетическая близость нетоксигенных штаммов *ctxAB⁻tcpA⁺* с токсигенными подтвердила высказанное нами ранее предположение об их происхождении от эпидемически опасных штаммов *V. cholerae* Эль Тор в результате спонтанной потери



Результаты филогенетического анализа токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (названия штаммов в квадратных рамках обозначают контрольные штаммы с известной принадлежностью к каждой филогенетической линии)

Results of phylogenetic analysis of toxigenic and non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor (framed strains stand for control strains with known affiliation to each phylogenetic lineage)

профага CTXφ последними [12]. В связи с этим можно предположить возможность их реверсии в эпидемически опасные путем приобретения профага CTXφ через фаговую конверсию при их совместном обитании с токсигенными изолятами в различных экологических нишах. В целом полученные данные углубляют наше понимание происхождения нетоксигенных штаммов и микроэволюционной изменчивости *V. cholerae* Эль Тор и будут полезны для повышения эффективности молекулярно-эпидемиологического мониторинга за холерными вибрионами.

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

- 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.
- Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
- Pant A., Das B., Bhadra R.K. CTX phage of *Vibrio cholerae*: Genomics and applications. *Vaccine*. 2020; 38 Suppl. 1:A7-A12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.034.
- Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Нестабильность генома возбудителя холеры: роль в эволюции патогенности, лекарственной устойчивости и адаптации к меняющейся среде обитания. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2025; 43(2):3–13. DOI: 10.17116/molgen2025430213.
- Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA*-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624. DOI: 10.1128/mBio.00624-12.
- Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308(2):130–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x.
- O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., Boyd E.F. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology*. 2004; 150(Pt. 12):4053–63. DOI: 10.1099/mic.0.27172-0.
- Waldor M.K., Tschäpe H., Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 1996; 178(14):4157–65. DOI: 10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996.
- Kim H.B., Wang M., Ahmed S., Park C.H., LaRocque R.C., Faruque A.S., Salam M.A., Khan W.A., Qadri F., Calderwood S.B., Jacoby G.A., Hooper D.C. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(2):799–803. DOI: 10.1128/AAC.01045-09.
- Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Гаевская Н.Е. Нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1, вызвавшие гастроэнтероколиты в Запорожской и Херсонской областях: описание случаев и молекулярно-генетическая характеристика возбудителей. *Инфекция и иммунитет*. 2025; 15(3):575–81. DOI: 10.15789/2220-7619-NVC-17787.
- Монахова Е.В., Кругликов В.Д., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б., Евтеев А.В., Гаевская Н.Е. Характеристика уникальных завозных штаммов холерных вибрионов, вызвавших в 2023 году в Москве случаи острой кишечной инфекции. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29(6):407–14. DOI: 10.17816/EID654005.
- Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
- Смирнова Н.И., Агафонов Е.Ю., Щелканова Е.Ю., Агафонов Д.А., Краснов Я.М., Ливанова Л.Ф., Кутырев В.В. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2018; 36(2):76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
- 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.

15. 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):122–31. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-122-131.
 16. 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-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
 17. Siripap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew C., Aarestrup F.M., Suthetikul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.
 18. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boney J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.
 19. 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.
 20. Титова С.В., Монахова Е.В. О потенциальной опасности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, содержащих гены токсин-корегулируемых пилей адгезии. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2016; (5):65–72.
 21. Sinha-Ray S., Alam M.T., Bag S., Morris J.G. Jr, Ali A. Conversion of a *recA*-mediated non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strain to a toxigenic strain using chitin-induced transformation. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2562. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02562.
 22. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кулышань Т.А., Щелканова Е.Ю., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Влияние делеции профага CTXφ возбудителя холеры на экспрессию регуляторных генов, контролирующих вирулентность и образование биопленки. *Генетика*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
- ## References
1. 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.
 2. Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2002; 99(3):1556–61. DOI: 10.1073/pnas.042667999.
 3. Pant A., Das B., Bhadra R.K. CTX phage of *Vibrio cholerae*: Genomics and applications. *Vaccine*. 2020; 38 Suppl. 1:A7–A12. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.034.
 4. Smirnova N.I., Rybal'chenko D.A., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Genome instability of the cholera agent: role in the evolution of pathogenicity, drug resistance and adaptation to a changing environment]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2025; 43(2):3–13. DOI: 10.17116/molgen2025430213.
 5. Dolores J., Satchell K.J. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique *rtxA* variants in environmental strains and an *rtxA*-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013; 4(2):e00624. DOI: 10.1128/mBio.00624-12.
 6. Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel *Vibrio cholerae* VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 2010; 308(2):130–7. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x.
 7. O'Shea Y.A., Finnan S., Reen F.J., Morrissey J.P., O'Gara F., Boyd E.F. The *Vibrio* seventh pandemic island-II is a 26.9 kb genomic island present in *Vibrio cholerae* El Tor and O139 serogroup isolates that shows homology to a 43.4 kb genomic island in *V. vulnificus*. *Microbiology*. 2004; 150(Pt. 12):4053–63. DOI: 10.1099/mic.0.27172-0.
 8. Waldor M.K., Tschäpe H., Mekalanos J.J. A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139. *J. Bacteriol.* 1996; 178(14):4157–65. DOI: 10.1128/jb.178.14.4157-4165.1996.
 9. Kim H.B., Wang M., Ahmed S., Park C.H., LaRocque R.C., Faruque A.S., Salam M.A., Khan W.A., Qadri F., Calderwood S.B., Jacoby G.A., Hooper D.C. Transferable quinolone resistance in *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(2):799–803. DOI: 10.1128/AAC.01045-09.
 10. Monakhova E.V., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Gaevskaya N.E. [Non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains that caused gastroenterocolitis in Zaporozhe and Kherson regions: case reports and molecular-genetic characteristics of the pathogen]. *Infektsiya i Immunitet [Russian Journal of Infection and Immunity]*. 2025; 15(3):575–81. DOI: 10.15789/2220-7619-NVC-17787.
 11. Monakhova E.V., Kruglikov V.D., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B., Evteev A.V., Gaevskaya N.E. [Characteristics of unique imported *Vibrio cholerae* strains which caused cases of acute intestinal infection in Moscow in 2023]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2024; 29(6):407–14. DOI: 10.17816/EID654005.
 12. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Y., Krasnov Y.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of nontoxicogenic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
 13. Smirnova N.I., Agafonova E.Yu., Shchelkanova E.Yu., Agafonov D.A., Krasnov Ya.M., Livanova L.F., Kutyrev V.V. [Genomic diversity of non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in the territory of Russia and neighboring states]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology]*. 2018; 36(2):76–84. DOI: 10.18821/0208-0613-2018-36-2-76-84.
 14. Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutyrev V.V. [Comparative analysis of molecular-genetic properties in non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strains biovar El Tor, isolated in Russia and on cholera endemic territories]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (3):72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.
 15. Mironova L.V., Fedotova I.S., Galach'yants Yu.P., Ponomareva A.S., Erdynееv 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]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (2):122–31. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-2-122-131.
 16. 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-toxicogenic lineages. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(2):e0008046. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008046.
 17. Siripap A., Leekitcharoenphon P., Kaas R.S., Theethakaew C., Aarestrup F.M., Suthetikul O., Hendriksen R.S. Characterization and genetic variation of *Vibrio cholerae* isolated from clinical and environmental sources in Thailand. *PLoS One*. 2017; 12(1):e0169324. DOI: 10.1371/journal.pone.0169324.
 18. Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahourou G., Freeman M., Joyce K., Turnsek M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boney J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic *Vibrio cholerae* from Haiti, 2010–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(11):2122–9. DOI: 10.3201/eid1711.110805.
 19. 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.
 20. Titova S.V., Monakhova E.V. [On the potential danger of non-toxicogenic strains of cholera vibrios containing genes of toxin-co-regulated pilli of adhesion]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases]*. 2016; (5):65–72.
 21. Sinha-Ray S., Alam M.T., Bag S., Morris J.G. Jr, Ali A. Conversion of a *recA*-mediated non-toxicogenic *Vibrio cholerae* O1 strain to a toxigenic strain using chitin-induced transformation. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2562. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02562.
 22. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Shchelkanova E.Yu., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutyrev V.V. [Effect of CTXφ prophage deletion in cholera agent on expression of regulatory genes controlling virulence and biofilm formation]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2017; 53(3):284–97. DOI: 10.7868/S0016675817020114.
- Authors:**
 Katyshev A.D., Agafonov D.A., Rybal'chenko D.A., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
- Об авторах:**
 Катышев А.Д., Агафонов Д.А., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.