

Научная статья

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

## Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ

Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А.<sup>✉</sup>, Крицкий А.А., Кутырев В.В.

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Россия

### Аннотация

**Цель работы** — выявление и молекулярно-генетическая характеристика чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара, выделенных на территории России.

**Материалы и методы.** В работе использовали 56 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных от больных и из внешней среды в России в 1970–2020 гг. Устойчивость к полимиксину В определяли согласно МУК 4.2.2218-07. Для изучения способности штаммов формировать биоплёнку на абиотической поверхности использовали фотометрический метод. Нуклеотидные последовательности генов устанавливали с применением программ «UGENE v.1.32» и «MEGA X». Филогенетический анализ и построение дерева производили с помощью программы «MEGA X», используя метод «максимальной бережливости».

**Результаты и обсуждение.** Выявлены 2 чувствительных к полимиксину В клинически генетически изменённых штамма *V. cholerae* O1 El Tor биовара M1509 и 3265/80, завезённых в Россию из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно. При изучении структуры 12 генов, обеспечивающих устойчивость штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В, установлено, что указанные штаммы содержат аллель гена *carR<sup>S</sup>*, что характерно для всех чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae*. Изучение филогении штаммов *V. cholerae* M1509 и 3265/80 на основе SNP-анализа показало, что они входят в один кластер с изолятами, содержащими аллель *carR<sup>S</sup>* и выделенными в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.). При сравнительном изучении способности штаммов *V. cholerae* M1509 и 3256/8 к формированию биоплёнки установлено, что они не отличаются по данному свойству от других, взятых в анализ генетически изменённых штаммов *V. cholerae*.

**Заключение.** В Россию завозятся высоковирулентные штаммы возбудителя холеры с изменёнными диагностически значимыми признаками, что необходимо учитывать при идентификации штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, выделяемых от больных и из внешней среды при мониторинговых исследованиях.

**Ключевые слова:** *Vibrio cholerae* O1 El Tor биовара, чувствительность к полимиксину В, филогенетический анализ

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Для цитирования:** Заднова С.П., Краснов Я.М., Плеханов Н.А., Крицкий А.А., Кутырев В.В. Выявление чувствительных к полимиксину В штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара и их молекулярно-генетический анализ. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(5):538–547.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

Original article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

## Identification of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis

Svetlana P. Zadnova, Yaroslav M. Krasnov, Nikita A. Plekhanov<sup>✉</sup>,  
Andrey A. Kritskiy, Vladimir V. Kuttyrev

Russian Research Anti-Plague Institute «Microbe», Saratov, Russia

### Abstract

**The aim** of the work was the identification and genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B among isolates imported to Russia.

**Materials and methods.** We used 56 toxigenic and non-toxigenic strains of *V. cholerae* isolated from patients and from the environmental samples on the territory of Russia in 1970-2020. Resistance to polymyxin B was determined according to MR4.2.218-07. The ability of strains to form a biofilm on the abiotic surface was assessed by a photometric method. Nucleotide sequences of genes were determined using UGENE 1.32 and MEGA X software. Phylogenetic analysis and tree construction were performed using "maximum parsimony" method in MEGA X software.

**Results and discussion.** Two genetically modified strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor, M1509 and 3265/80, which were imported to Russia from India in 2012 and 2014, respectively, were identified. The analysis of 12 genes responsible for the resistance of *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains to polymyxin B demonstrated that these strains contain the allele of the *carR<sup>S</sup>* gene, which is typical for all strains of cholera vibrio sensitive to polymyxin B. Study of *V. cholerae* M1509 and 3265/80 phylogeny based on SNP analysis showed that they fall into the same cluster with isolates containing the *carR<sup>S</sup>* allele isolated in India (2015) and Bangladesh (2018). *V. cholerae* M1509 and 3265/80 strains had the ability to form a biofilm similar to those observed in other genetically modified strains of cholera vibrio included into analysis.

**Conclusion.** Highly virulent strains of the cholera agent with altered diagnostically significant features are imported into Russia, which should be taken into account when identifying *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains isolated from patients and environmental samples during monitoring studies.

**Keywords:** *Vibrio cholerae* O1 El Tor biovar; sensitivity to polymyxin B, phylogenetic

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Conflict of interest.** The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**For citation:** Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Plekhanov N.A., Kritsky A.A., Kutryev V.V. Identification of *Vibrio cholerae* O1 strains of the El Tor biovar sensitive to polymyxin B and their molecular genetic analysis. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, èpidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(5):538–547.  
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-138>

## Введение

Возбудителями холеры, острой инфекционной болезни с диарейным синдромом, распространяющейся в виде эпидемий и пандемий, являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы (классического и El Tor биоваров) и O139 серогруппы. Штаммы *V. cholerae* O1 классического биовара предположительно были причиной первых 6 опустошительных пандемий. В 1961 г. началась 7-я пандемия, обусловленная типичными токсигенными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара [1]. Вибрионы O139 серогруппы, явившиеся производными El Tor вибрионов и вызвавшие ряд тяжёлых эпидемий в 1992–1994 гг., в настоящее время не имеют эпидемиологической значимости. Классические вибрионы, продуцируя повышенное количество холерного токсина, ответственное за развитие диареи, вызывают более тяжёлую форму холеры, в отличие от El Tor вибрионов, но последние лучше выживают во внешней среде. В 1990-х гг. было зафиксировано появление генетически изменённых штаммов (геновариантов) *V. cholerae* O1 El Tor биовара с повышенной вирулентностью, которые в результате горизонтального переноса приобрели гены классических вибрионов. Данные штаммы содержали в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез холерного токсина, ген *ctxB* холерных вибрионов классического биовара (аллель *ctxB1*). Дальнейшие эволюционные преобразования геновариантов привели к появлению штаммов с новой аллелью гена *ctxB* — *ctxB7*, а также изменённой структурой дру-

гих генов патогенности и пандемичности. Геноварианты очень быстро вытеснили типичные штаммы на эндемичной территории и вызвали ряд крупных эпидемий в разных странах мира [2, 3]. Начиная с 1993 г. все вспышки и единичные случаи холеры на территории России также были вызваны генетически изменёнными штаммами *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Молекулярно-генетические свойства завезённых в Россию геновариантов изучены достаточно подробно. Многие штаммы секвенированы и депонированы в базе данных NCBI GenBank [4–9].

Холерные вибрионы классического и El Tor биоваров, несмотря на принадлежность к одной O1 серогруппе, отличаются по фенотипическим свойствам, которые используются для дифференциации биоваров. При определении биовара исследуют чувствительность к холерным диагностическим фагам (классическому и El Tor), способность расти на средах с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В, агглютинировать куриные эритроциты, образовывать ацетилметилкарбинол в реакции Фогес–Проскауэра. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, в отличие от классических вибрионов, чувствительны к диагностическому холерному фагу El Tor, агглютинируют куриные эритроциты, устойчивы к полимиксину В (Po1B<sup>R</sup>) и образуют ацетилметилкарбинол в реакции Фогес–Проскауэра [1]. При этом признак устойчивости El Tor вибрионов к полимиксину В долгое время оставался одним из стабильных диагностически значимых тестов. Однако в Индии в 2012 г. впервые за всю историю 7-й пандемии хо-

леры были выделены чувствительные к полимиксину В (PolB<sup>S</sup>) штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара. Начиная с 2014 г. практически все циркулирующие на данной территории штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара были PolB<sup>S</sup> [10, 11]. Чувствительные к полимиксину В штаммы *V. cholerae* не только быстро распространились в Индии, но и были занесены в другие страны Азии и в Африку. Так, крупнейшая эпидемия холеры в Йемене (более 1 млн заболевших) в 2016–2018 гг., охватившая все области страны, была вызвана PolB<sup>S</sup> штаммами *V. cholerae* O1 El Tor. Данные штаммы также явились причиной вспышки холеры в Кении в 2015–2017 гг. [11–14].

Устойчивость штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В обеспечивается участием продуктов 12 генов: *almGFE* (VC1577-VC1579), *vexB* (VC0164), *msbB/lpxN* (VC0212), *gspIFE* (VC2728, 2731, 2732), *VC0224*, *lpxL* (VC0213), *carRS/vprAB* (VC1320, VC1319) [15–19]. При этом важный механизм резистентности к данному антибиотику связан с уменьшением отрицательного заряда липополисахарида внешней мембраны в результате его модификации (аминоацелирование и глицилирование). Глицилирование липополисахарида (присоединение глицина или диглицина) происходит при участии продуктов генов *almEFG* оперона. В результате данного процесса катионный антибиотик полимиксин В теряет способность связываться с липополисахаридным слоем клеток штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара. В свою очередь транскрипция генов *almEFG* оперона положительно регулируется белками двухкомпонентной *carRS* (или *vprAB*) системы, включающей сенсорный белок CarS (VprA) и ДНК-связывающийся регуляторный белок CarR (VprB) [18, 19]. Необходимо отметить, что система *carRS* не только контролирует транскрипцию генов *almEFG* оперона, но и является негативным регулятором процесса формирования биоплёнки. Белок CarR репрессирует экспрессию генов *vps*, ответственных за продукцию важного компонента биопленки — экзополисахарида [20].

При проведении молекулярно-генетического исследования PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара было установлено, что они, в отличие от штаммов классического биовара, имеют иной механизм появления чувствительности к полимиксину В. В штаммах *V. cholerae* O1 классического биовара изменена структура гена *almF*, в то же время отличительной особенностью PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара является наличие единичной замены гуанина на аденин в позиции 265 в гене *carR* (аллель *carR<sup>S</sup>*). PolB<sup>S</sup> штаммы El Tor биовара, содержащие аллель *carR<sup>S</sup>*, синтезируют белок CarR со сниженной транскрипционной активностью, что приводит к уменьшению экспрессии *almEFG* оперона и снижению процесса модификации липополисахарида клеточной стенки [10, 21].

Таким образом, в современный период 7-й пандемии холеры на эндемичной территории появились и распространяются высоковирулентные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара с изменённым диагностически значимым признаком — чувствительные к полимиксину В, что диктует необходимость детального изучения их патогенных и адаптивных свойств.

Учитывая нестабильную эпидемиологическую ситуацию по холере в мире и возможность завоза высоковирулентных штаммов возбудителя холеры в нашу страну, **цель** работы состояла в выявлении и молекулярно-генетической характеристике чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара, выделенных на территории России.

## Материалы и методы

В работе было использовано 56 штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, изолированных от людей или из открытых водоёмов на территории России, из которых 10 являются типичными токсигенными изолятами (1970–1990 гг.), 21 — токсигенными генетически изменёнными (1993–2014 гг.) и 25 — нетоксигенными (2012–2020 гг.) штаммами. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб».

Чувствительность штаммов к полимиксину В («Sigma») определяли в соответствии с Методическими указаниями МУК 4.2.2218-07 (2007), культивируя их при 37°C на пластинках питательного LB агар (рН 7,2) с добавлением антибиотика из расчёта 50 мкг на 1 мл среды. В качестве отрицательного контроля использовали штамм *V. cholerae* 569В O1 серогруппы классического биовара (Индия, 1950).

Способность штаммов к формированию биоплёнки определяли, выращивая культуру в полистироловых плашках (объём 200 мкл) в LB бульоне («Difco») при 37°C в течение 18–24 ч. Образовавшуюся биоплёнку фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и окрашивали 0,4% раствором кристаллвиолета. Окрашенную биоплёнку растворяли в диметилсульфоксиде и измеряли оптическую плотность раствора на приборе «Stat Fax 2100» («Awareness Technology Inc.») при длине волны 570 нм [22]. Эксперимент проводили трехкратно, результаты представляли в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего арифметического.

Для анализа нуклеотидных последовательностей генов, участвующих в обеспечении устойчивости штаммов *V. cholerae* к полимиксину В, использовали последовательности полных геномов штаммов *V. cholerae*, секвенированные ранее и депонированные в международной базе данных NCBI GenBank [4]. Структура гена *carR* была изучена нами у 71 штамма с применением программ «UGENE v.1.32» (Россия) и «MEGA X» (США). Сравнение

проводили относительно генома референс-штамма *V. cholerae* O1 серогруппы El Tor биовара N16961 (AE003852.1). Для филогенетического анализа и построения дерева применяли программу «MEGA X», используя метод «максимальной бережливости». В работу были взяты полные геномы 1246 штаммов *V. cholerae*, представленные на момент проведения филогенетического анализа в NCBI GenBank. Для оценки достоверности филогенетической реконструкции проводили Bootstrap анализ с числом повторных выборов, равным 100.

## Результаты

### Изучение устойчивости штаммов *V. cholerae* биовара El Tor к полимиксину В

На первом этапе работы было проведено изучение устойчивости взятых в исследование токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара к полимиксину В. В результате установлено, что все типичные штаммы были устойчивы к данному антибиотику и хорошо росли на среде LB с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В (рис. 1, таблица).

Полученные нами сведения об устойчивости типичных штаммов El Tor биовара к полимиксину В были ожидаемыми и соответствовали данным литературы [1].

В отличие от типичных штаммов, при анализе геновариантов были выявлены две группы. Изоляты первой, наиболее многочисленной группы (90,5%), сохраняли данный диагностически значимый признак и были PolB<sup>R</sup>. Штаммы второй группы, включающей всего два изолята — *V. cholerae* M1509 и 3265/80, были чувствительны к полимиксину В (таблица, рис. 1). Эти штаммы были завезены в Россию



Рис. 1. Рост штаммов *V. cholerae* на агаре LB без (а) и с добавлением 50 мкг/мл полимиксина В (б).

1 — *V. cholerae* O1 классического биовара 569В (отрицательный контроль); 2 — типичный штамм *V. cholerae* O1 El Tor биовара М818 (положительный контроль); 3–7 — геноварианты *V. cholerae* O1 El Tor биовара М1509, М1293, L3226, М1430, 3265/80 соответственно.

Fig. 1. Growth of *V. cholerae* strains on LB agar without (a) and with addition of 50 µg/ml of polymyxin B (b).

1 — *V. cholerae* O1 classical biovar 569B (negative control); 2 — typical M818 strain of *V. cholerae* O1, biovar El Tor (positive control); 3–7 — genovariants of *V. cholerae* O1, biovar El Tor, M1509, M1293, L3226, M1430, 3265/80, respectively.

из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно. Стоит обратить внимание, что штаммы *V. cholerae* L3226 и L4150, также завезённые из Индии, но в 2010 г., являются PolB<sup>R</sup> и относятся к первой группе (таблица). Полученные нами данные согласуются со сведениями литературы о появлении PolB<sup>S</sup> изолятов на территории Индии начиная с 2012 г. [10].

Учитывая, что каждый год на территории нашей страны при мониторинговых исследованиях открытых водоёмов выделяется значительное количество нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, мы расширили список исследуемых штаммов, взяв в работу изоляты, выделенные в 2012–2020 гг. (таблица). При проведении анализа указанных штаммов установлено, что все они были PolB<sup>R</sup>.

Таким образом, при изучении устойчивости взятых в анализ штаммов *V. cholerae* к полимиксину В обнаружены два PolB<sup>S</sup> изолята, которые завезены в Россию в последние годы и относятся к клиническим токсигенным генетически изменённым штаммам *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

### Молекулярно-генетический и филогенетический анализ PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара

Учитывая данные литературы о влиянии на устойчивость к полимиксину В продуктов 12 генов, мы изучили нуклеотидную последовательность данных генов у взятых в анализ токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, полные геномы которых представлены в базе данных GenBank (таблица). В результате установлено, что, действительно, только у PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* M1509 и 3265/80 присутствует несинонимичная SNP (замена G на A в позиции 265) в гене *carR* (аллель *carR<sup>S</sup>*). В результате замены гуанина на аденин в нуклеотидной последовательности гена *carR* происходят смена кодона GAC на AAC и замещение отрицательно заряженной аспарагиновой кислоты в позиции 89 на нейтрально заряженный аспарагин в белке CarR (рис. 2). Именно данная замена приводит к конформационным изменениям белковой молекулы, снижению транскрипционной активности белка CarR и появлению чувствительности к полимиксину В [21].

Ранее установлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 имеют структуру генома, характерную для современных высоковирулентных штаммов возбудителя холеры [5, 9, 23]. При филогенетическом анализе они вошли в один кластер со штаммами, выделенными в Непале в 2010 г. (VC-25, VC-26, VC-14) и на острове Гаити (HC-19A1<sup>AGUJ01</sup>, HC-80A1<sup>AGVB01</sup>, HC-22A1<sup>AGUL01</sup>, HC-23A1<sup>AGUM01</sup>, HC-28A1<sup>AGUN01</sup>, HC-43A1<sup>AGUQ01</sup>, HC-06A1<sup>AGUI01</sup>, 2010EI-1786<sup>SANM10863496</sup>) [9, 24]. Мы изучили нуклеотидную последовательность гена *carR* у всех штаммов данной группы и определили, что они имеют аллель *carR<sup>R</sup>* (данные не показаны).

Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor биовара, использованные в работе, их чувствительность к полимиксину В и способность к формированию биоплёнки

Strains of *Vibrio cholerae* O1, biovar El Tor, used in this work, their sensitivity to polymyxin B and ability to form biofilm

Штамм Strain	Год, место и источник выделения The year, site and source of isolation	Рост на среде LB + 50 мкг/мл PoIB Growth on LB + 50 medium, µg/ml PoIB	Формирование био- плёнки (оптическая плотность при 570 нм) Biofilm formation (optical density at 570 nm)
<b>Типичные токсигенные штаммы / Typical toxigenic strains</b>			
M818 <sup>LAHM01</sup>	1970, Балаково, человек / 1970, Balakovo, patient	+	H/o / N/d
M887, M893 <sup>SSAA01</sup> , M1062 <sup>SSAB01</sup>	1970, Астрахань, человек / 1970, Astrakhan, patient	+	H/o / N/d
M736, M738	1970, Пермь, человек / 1970, Perm, patient	+	H/o / N/d
M1011 <sup>SSAC01</sup> , M1013	1972, Уфа, человек / 1972, Ufa, patient	+	H/o / N/d
M1261	1990, Пермь, человек / 1990, Permian, patient	+	H/o / N/d
C402	1990, Ставрополь, человек / 1990, Stavropol, patient	+	H/o / N/d
<b>Генетически изменённые токсигенные штаммы / Genetically altered toxigenic strains</b>			
M1270 <sup>VXCC01</sup>	1993, Набережные Челны, человек 1993, Naberezhnye Chelny, patient	+	7,5 ± 0,12
M1264	1993, Краснодар, человек / 1993, Krasnodar, patient	+	4,4 ± 0,18
M1298	1993, Краснодар, человек / 1993, Krasnodar, patient	+	7,0 ± 0,24
M1275 <sup>LRAF01</sup>	1993, Каспийск, человек / 1993, Kaspiysk, patient	+	8,2 ± 0,09
M1297	1993, Каспийск, человек / 1993, Kaspiysk, patient	+	5,3 ± 0,1
M1268	1994, Магнитогорск, человек / 1994, Magnitogorsk, patient	+	4,8 ± 0,15
M1293 <sup>JFFW01</sup>	1994, Дагестан, человек / 1994, Dagestan, patient	+	8,3 ± 0,16
R17644 <sup>JRTW01</sup>	1997, Ачинск, человек / 1997, Achinsk, patient	+	4,5 ± 0,1
M1326	1998, Дагестан, человек / 1998, Dagestan, patient	+	6,1 ± 0,14
M1327	1998, Дагестан, человек / 1998, Dagestan, patient	+	H/o / N/d
M1344 <sup>NEDY01</sup>	2001, Казань человек / 2001, Kazan, patient	+	7,3 ± 0,22
M1345	2001, Казань, человек / 2001, Kazan, patient	+	H/o / N/d
M1429 <sup>LAEM01</sup>	2004, Белорецк, человек / 2004, Beloretsk, patient	+	5,5 ± 0,18
M1430	2005, Тверь, человек / 2005, Tver, patient	+	7,1 ± 0,1
P-18899 <sup>LAKM01</sup>	2006, Мурманск, человек / 2006, Murmansk, patient	+	6,1 ± 0,2
L3226 <sup>JDVX01</sup>	2010, Москва, человек / 2010, Moscow, patient	+	9,3 ± 0,09
L4150	2010, Москва человек / 2010, Moscow, patient	+	6,8 ± 0,16
301 <sup>AJFN01</sup>	2011, Таганрог, в.с. / 2011, Taganrog, e.s.	+	H/o / N/d
M1509 <sup>NEDZ01</sup>	2012, Москва, человек / 2012, Moscow, patient	–	9,8 ± 0,1
3265/80 <sup>JRQL01</sup>	2014, Москва, человек / 2014, Moscow, patient	–	7,2 ± 0,13
81 <sup>JRQM01</sup>	2014, Ростов, в.с. / 2014, Rostov, e.s.	+	H/o / N/d
<b>Нетоксигенные штаммы / Non-toxigenic strains</b>			
M1517 <sup>VTZZ01</sup> , 29 <sup>VUAB01</sup> , M1516 <sup>VTZY01</sup> , M1526 <sup>VUAA01</sup> , M1518 <sup>LQZR01</sup> , 111 <sup>VTLQ01</sup>	2012, Элиста, в.с. / 2012, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
132 <sup>VUAC01</sup> , 85 <sup>VUAF01</sup> , M1524 <sup>LQZS01</sup>	2013, Элиста, в.с. / 2013, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
8 <sup>PYCF01</sup> , M1522 <sup>LQCA01</sup>	2014, Элиста, в.с. / 2014, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
2613 <sup>PYCA01</sup> , 2687 <sup>PYCB01</sup> , 2688 <sup>PYCC01</sup> , 124 <sup>PYCD01</sup>	2015, Элиста, в.с. / 2015, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
433 <sup>NEDW01</sup>	2015, Сочи, в.с. / 2015, Sochi, e.s.	+	H/o / N/d
2843 <sup>PYCG01</sup>	2016, Элиста, в.с. / 2016, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
3178 <sup>PYCH01</sup> , 124 <sup>PYCD01</sup>	2017, Элиста, в.с. / 2017, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
120 <sup>VTLL01</sup> , 136 <sup>VTLK01</sup> , 2439 <sup>VTLL01</sup> , 3017 <sup>VTLM01</sup>	2018, Элиста, в.с. / 2018, Elista, e.s.	+	H/o / N/d
50863, 10349	2020, Татарстан, в.с. / 2020, Tatarstan, e.s.	+	H/o / N/d

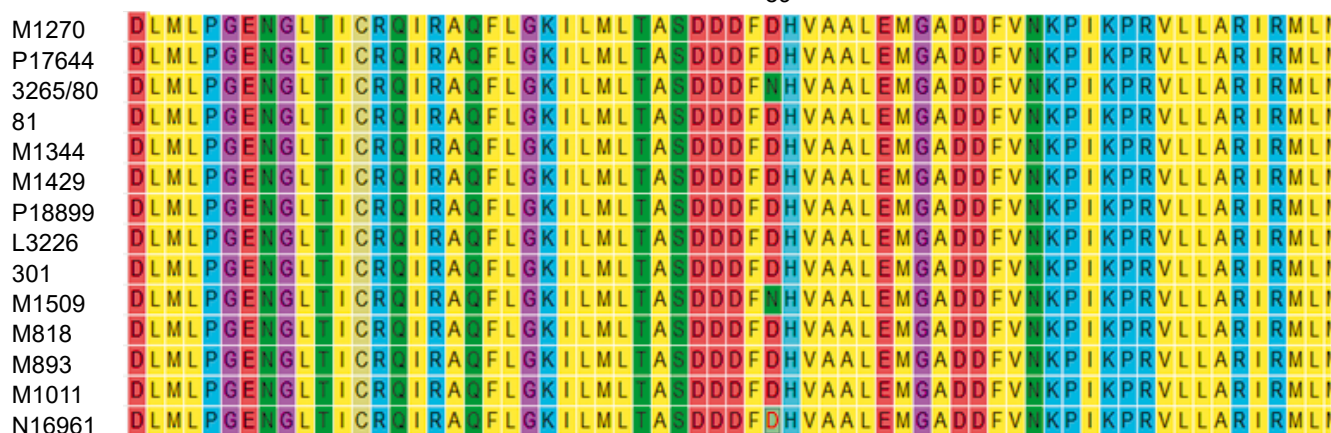
**Примечание.** В надстрочном индексе штаммов указан сокращённый код доступа в GenBank; в.с. — внешняя среда;

«+» — штамм даёт рост на среде с полимиксином В, «–» — рост отсутствует; н/о — не определяли.

**Note.** In the superscript index of strains, the abbreviated GenBank accession number is indicated; e.s. — environmental sample; «+» — the strain grows on the medium with polymyxin B, «–» — no growth; n/d — was not determined.



89



**Рис. 2.** Фрагмент аминокислотной последовательности белка CarR штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

Цифрами 89 сверху отмечена варибельная позиция (замена аспарагиновой кислоты на аспарагин).  
PolB<sup>R</sup> штаммы: геноварианты — M1270, P17644, 81, M1344, M1429, P18899, L3226, 301; типичные — M818, M893, M1011.  
PolB<sup>S</sup> штаммы: геноварианты — 3265/80, M1509. N16961 — референс-штамм *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

**Fig. 2.** Fragment of the amino acid sequence of the CarR protein of *V. cholerae* O1 strains, biovar El Tor.

The variable position (substitution of aspartic acid to asparagine) is indicated by the number 89 at the top.  
PolB<sup>R</sup> strains: genovariants — M1270, P17644, 81, M1344, M1429, P18899, L3226, 301; typical — M818, M893, M1011.  
PolB<sup>S</sup> strains: genovariants — 3265/80, M1509. N16961 — reference strain of *V. cholerae* O1, biovar El Tor.

Учитывая, что в настоящее время в GenBank депонированы штаммы *V. cholerae* El Tor биовара, изолированные на эндемичной территории в последние годы, в том числе PolB<sup>S</sup> изоляты [21], нами также был проведён сравнительный филогенетический SNPs анализ и построено филогенетическое дерево (рис. 3).

В результате показано, что наиболее близкими к штаммам *V. cholerae* M1509 и 3256/80 были изоляты, выделенные в Бангладеш (провинция Дакка) в 2018 г., и штамм *V. cholerae* IDN 08148<sup>SISQ01</sup>, изолированный в Индии (Калькутта) в 2015 г. При анализе нуклеотидной последовательности гена *carR* у данных штаммов было установлено, что все они содержат аллель *carR<sup>S</sup>*.

Необходимо отметить, что клинические штаммы, выделенные в Бангладеш (провинция Дакка) в 2018 г., а также ранее (2015, 2016 гг.), образовывали ещё один кластер (рис. 3). Изучение последовательности гена *carR* штаммов этого кластера показало наличие аллеля *carR<sup>R</sup>*. Отличия от группы *carR<sup>S</sup>* штаммов составили 78–110 SNPs.

Устойчивый к полимиксину В штамм *V. cholerae* L3226 (Москва, 2010) вошёл в одну группу со штаммами, выделенными на Гаити в 2010–2012 гг., что соответствует ранее полученным данным [9]. При анализе нуклеотидной последовательности гена *carR* штаммов данной группы выявлено, как и ожидалось, что они имеют аллель *carR<sup>R</sup>*.

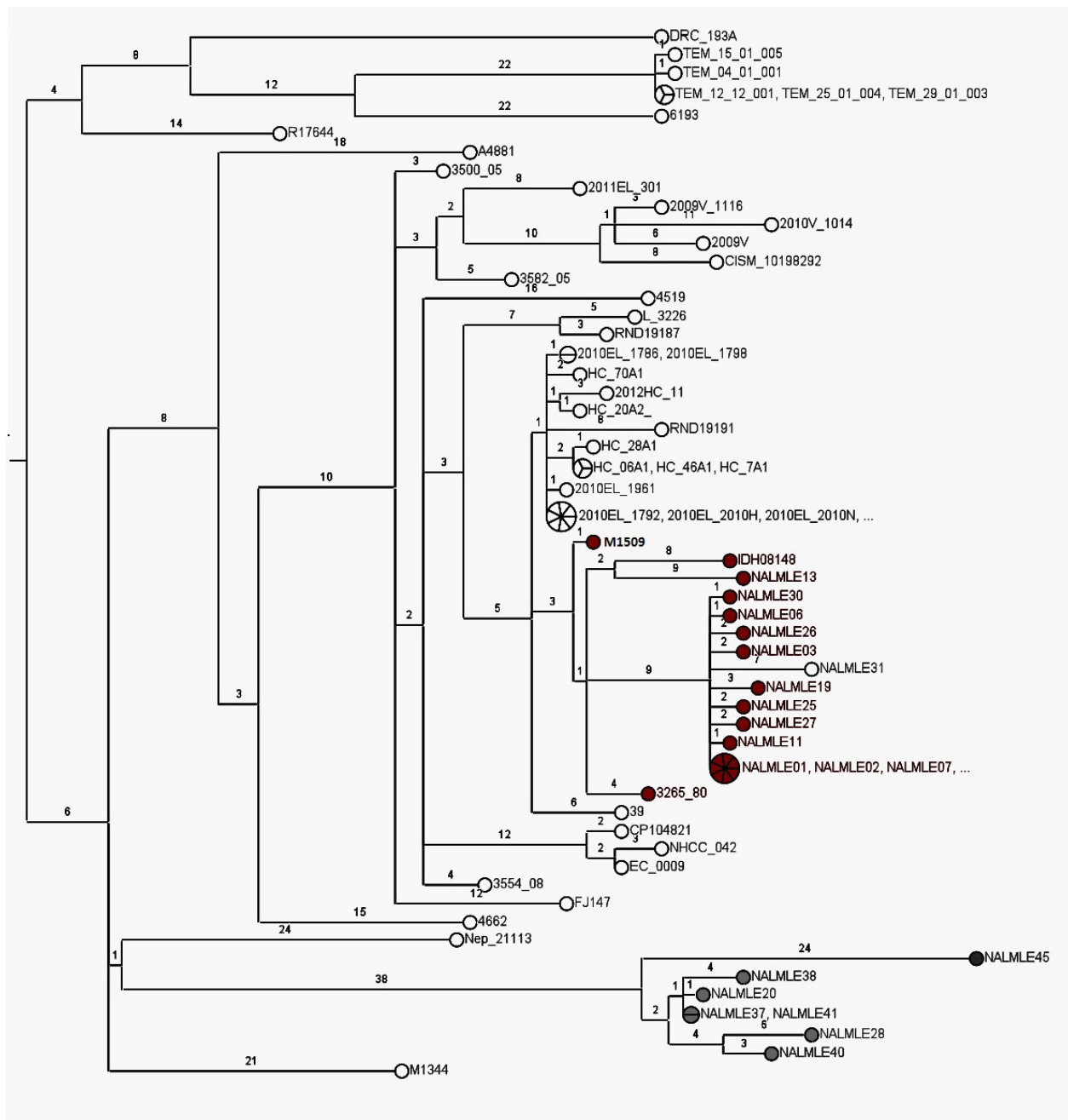
Таким образом, штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 филогенетически родственны штаммам *V. cholerae* El Tor биовара, выделенным в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.) и имеющим аллель *carR<sup>S</sup>*.

### Способность к формированию биоплёнки у PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae*

*V. cholerae* может существовать в двух разных экологических нишах (вода открытых водоёмов и человек). Одной из важных стратегий, обеспечивающих адаптацию патогена при смене среды обитания, является способность к формированию биоплёнки. Биоплёнка защищает возбудителя холеры от действия стрессовых факторов и повышает его выживаемость как в воде открытых водоёмов, так и в кишечнике человека [25]. Учитывая важную роль биоплёнки в жизненном цикле патогена и отсутствие сведений о способности PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* образовывать биоплёнку, нами была изучена данная способность у взятых в анализ штаммов *V. cholerae*. Кроме того, было высказано предположение, что изменение функциональной активности белка CarR у PolB<sup>S</sup> штаммов могло снизить его негативное влияние на процесс формирования биоплёнки. В результате установлено, что все геноварианты формировали хорошо выраженную биоплёнку. При этом PolB<sup>S</sup> штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/8 не отличались по биоплёнкообразованию от других взятых в анализ генетически изменённых штаммов *V. cholerae* (таблица). Вероятно, присутствие аллеля *carR<sup>S</sup>* не оказывает влияния на процесс формирования биоплёнки. Однако для окончательного решения данного вопроса необходимо проведение исследований на большем количестве PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae*.

### Обсуждение

Эволюционные преобразования генома геновариантов *V. cholerae* El Tor биовара продолжают появляться. Мутации в генах вирулентности, панде-



**Рис. 3.** Филогенетическое дерево, построенное на основе SNP-анализа полногеномных последовательностей токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биоара.

Чувствительные к полимиксину В *carR<sup>S</sup>* штаммы *V. cholerae* M1509, 3265/80 и родственные им изоляты, выделенные в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.), отмечены темно-бордовыми точками. *CarR<sup>R</sup>* штаммы, изолированные в Бангладеш в 2015 и 2016–2018 гг., указаны серыми точками. Остальные проанализированные токсигенные *carR<sup>R</sup>* PoIB<sup>R</sup> штаммы *V. cholerae*, завезённые в Россию в разные годы, относятся к разным филогенетическим группам (не отмечены).

**Fig. 3.** Phylogenetic tree based on SNPs analysis of genome-wide sequences of toxigenic strains of *V. cholerae* O1, biovar El Tor.

Susceptible to polymyxin B *carR<sup>S</sup>* *V. cholerae* strains M1509, 3265 and related isolates from India (2015) and Bangladesh (2018) are marked with maroon dots. *CarR<sup>R</sup>* strains isolates from Bangladesh in 2015 and 2016–2018 are indicated with gray dots. The remaining *carR<sup>R</sup>* PoIB<sup>R</sup> toxigenic strains of *V. cholerae* introduced into the Russian Federation in different years belong to different phylogenetic groups (not marked).

мичности, адаптации, жизнеобеспечения, антибиотикорезистентности [4, 5, 11, 23, 26]. Происходят изменения и в генах, ответственных за проявление диагностически значимых признаков, варибель-

ность которых уже показана многими исследователями. Так, среди 54 изученных клинических штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп, выделенных в Индии в 1975–2015 гг., у 22% изолятов отсутство-

вала способность к агглютинации куриных эритроцитов, а у 24% — гемолитическая активность [14]. Показано, что у геновариантов изменена (снижена или отсутствует) способность к образованию ацетилметилкарбинола в реакции Фогес–Проскауэра. Одна из причин данного явления — изменение структуры гена *alsD* (делеция нуклеотида Т в позиции 315), что приводит к сдвигу рамки считывания, образованию преждевременного стоп-кодона и биосинтезу дефектного фермента ацетолактат декарбоксилазы [27, 28]. Появление устойчивых к диагностическому холерному фагу El Tor нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара способствовало активизации работ по поиску новых рас диагностических фагов [29]. Изменился и такой стабильный диагностический признак, как устойчивость к полимиксину В. Генетический механизм появления PolB<sup>S</sup> штаммов *V. cholerae* El Tor биовара связан с изменением структуры гена *carR* и появлением аллеля *carR<sup>S</sup>* [10, 21]. Вполне возможно, что в связи с вариабельностью диагностически значимых признаков у современных штаммов возбудителя холеры постановка фенотипических тестов определения биовара становится излишней, и ведущая роль принадлежит выявлению биоварспецифических аллелей генов генетическими методами.

Штаммы *V. cholerae*, чувствительные к полимиксину В, заносятся и в Россию. Выявлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80, завезённые из Индии в 2012 и 2014 гг. соответственно, являются PolB<sup>S</sup> и имеют аллель *carR<sup>S</sup>* (замена G на A в позиции 265), что характерно для всех чувствительных к полимиксину В штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара, выделяемых в последние годы [10, 11]. Возможно, указанная SNP может стать ещё одной генетической меткой современных штаммов возбудителя холеры и использоваться при создании генодиагностических препаратов.

При филогенетическом SNPs анализе установлено, что штаммы *V. cholerae* M1509 и 3256/80 родственны *carR<sup>S</sup>* штаммам, выделенным в Индии (2015 г.) и Бангладеш (2018 г.). Из-за отсутствия в литературе сведений об их чувствительности к полимиксину В можно лишь высказать предположение, что данные штаммы также являются PolB<sup>S</sup>.

Чувствительные к полимиксину В высоковирулентные штаммы *V. cholerae* El Tor биовара, видимо, имеют более высокий адаптационный потенциал, т.к. не только вытеснили PolB<sup>R</sup> изоляты *V. cholerae* El Tor биовара на территории Индии, но и явились причиной эпидемий и вспышек холеры в других странах Юго-Восточной Азии, а также на Африканском континенте [10, 11, 13, 21]. При этом повышение их адаптационных способностей, возможно, не связано со способностью формировать биоплёнку, а обусловлено изменением каких-то других свойств, исследование которых будет целью дальнейшей работы.

Таким образом, в Россию завозятся высоковирулентные штаммы возбудителя холеры с изменёнными диагностически значимыми свойствами, что необходимо учитывать при идентификации клинических и выделенных при мониторинговых исследованиях внешней среды штаммов *V. cholerae* O1 El Tor биовара.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
2. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
4. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кульшань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. *Вестник Российской академии медицинских наук.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109>
5. Smirnova N.I., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Alkhova Z.V., Kutyrev V.V. Whole-genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014). *Genome Announc.* 2017; 5(8): e01640-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01640-16>
6. Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2011; 88(5): 12–8.
7. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ изменённых вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2012; (1): 57–61. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(111\)-57-61](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(111)-57-61)
8. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабенышев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль-Тор. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012; (5): 31–5.
9. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kruglikov V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
10. Samanta P., Ghosh P., Chowdhury G., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Sensitivity to polymyxin B in El Tor *Vibrio cholerae* O1 strain, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11): 2100–2. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150762>
11. Samanta P., Saha R.N., Chowdhury G., Naha A., Sarkar S., Dutta S., et al. Dissemination of newly emerged polymyxin B sensitive *Vibrio cholerae* O1 containing Haitian-like genetic traits in different parts of India. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(9): 1326–33. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000783>
12. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
13. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates responsible for cholera outbreaks in Kenya between



- 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
14. Kanampalliwari A., Singh D.V. Virulence pattern and genomic diversity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated from clinical and environmental sources in India. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01838>
  15. Bina X.R., Provenzano D., Nguyen N., Bina J.E. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 2008; 76(8): 3595–605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>
  16. Matson J.S., Yoo H.J., Hakansson K., DiRita V.J. Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J. Bacteriol.* 2010; 192(8): 2044–52. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
  17. Hankins J.V., Madsen J.A., Giles D.K., Childers B.M., Klose K.E., Brodbelt J.S., et al. Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol. Microbiol.* 2011; 81(5): 1313–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07765.x>
  18. Herrera C.M., Crofts A.A., Henderson J.C., Pingali S.C., Davies B.W., Trent M.S. The *Vibrio cholerae* Vpra-Vprb two-component system controls virulence through endotoxin modification. *MBIO.* 2014; 5(6): e02283-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02283-14>
  19. Bilecen K., Fong J.C.N., Cheng A., Jones C.J., Zamorano-Sánchez D., Yildiz F.H. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect. Immun.* 2015; 83(3): 1199–209. <https://doi.org/10.1128/IAI.02700-14>
  20. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8): 2015–29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x>
  21. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., Shaw S., Ghosh P., Dutta S. et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020; 88(5): e00080-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
  22. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1): 435–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.435-445.2001>
  23. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.X., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? *Проблемы особо опасных инфекций.* 2020; (3): 17–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26>
  24. Титова С.В., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Чемисова О.С., Писанов Р.В., Водопьянов А.С. и др. Ситуация по холере в мире в 2018 году, прогноз на 2019 год. Научное обеспечение совершенствования эпидемиологического надзора за холерой в Российской Федерации. В кн.: *Холера и патогенные для человека вибрионы: Сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Выпуск № 32.* Ростов-на-Дону; 2019: 12–21.
  25. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1): 275–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.1.275-283.1983>
  26. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI00189-16>
  27. Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Адамов А.К., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Сравнительный анализ метаболизма глюкозы в штаммах *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017; 35(2): 64–9. <https://doi.org/10.3103/S0891416817020112>
  28. Lee D., Kim E.J., Baek Y., Lee J., Yoon Y., Nair G.B., et al. Alterations in glucose metabolism in *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor biotype strains. *Nature.* 2020; 10(1): 308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57093-4>
  29. Гаевская Н.Е., Македонова Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2016; 61(12): 849–52. <https://doi.org/10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852>

## REFERENCES

1. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1): 48–89. <https://doi.org/10.1128/CMR.8.1.48>
2. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(9): 3296–9. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002>
3. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2010; 18(1): 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003>
4. Smirnova N.I., Agafonov D.A., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M., Kutyrev V.V. Microevolution of cholera agent in the modern period. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2014; 69(7-8): 46–53. <https://doi.org/10.15690/vramn.v69i7-8.1109> (in Russian)
5. Smirnova N.I., Krasnov Ya.M., Agafonova E.Y., Shchelkanova E.Y., Alkhova Z.V., Kutyrev V.V. Whole-Genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014). *Genome Announc.* 2017; 5(8): e01640-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01640-16>
6. Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S., et al. Detection of "hybrid" *Vibrio cholerae* El Tor strains during epidemic complications in Siberia and the Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2011; 88(5): 12–8. (in Russian)
7. Zadnova S.P., Shashkova A.V., Krasnov Ya.M., Smirnova N.I. Phenotypic and genetic analysis of altered variants of *Vibrio cholerae* biovar El Tor. *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2012; (1): 57–61. [https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1\(11\)-57-61](https://doi.org/10.21055/0370-1069-2012-1(11)-57-61) (in Russian)
8. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshev B.V., Kulichenko A.N. The evolution of the pathogen and the clinical and epidemiological features of the recent cholera (El Tor). *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2012; (5): 31–5. (in Russian)
9. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., Markelov M.L., Deviatkin A.A., Kругликов V.D., et al. Travel-associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11): 2006–8. <https://doi.org/10.3201/eid2211.151727>
10. Samanta P., Ghosh P., Chowdhury G., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Sensitivity to polymyxin B in El Tor *Vibrio cholerae* O1 strain, Kolkata, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(11): 2100–2. <https://doi.org/10.3201/eid2111.150762>
11. Samanta P., Saha R.N., Chowdhury G., Naha A., Sarkar S., Dutta S., et al. Dissemination of newly emerged polymyxin B sensitive *Vibrio cholerae* O1 containing Haitian-like genetic traits in different parts of India. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(9): 1326–33. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000783>
12. Weill F.-X., Domman D., Njamkepo E., Almesbahi A.A., Naji M., Nasher S.S., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019; 565(7738): 230–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0818-3>
13. Bundi M., Shah M.M., Odoyo E., Kathiiko C., Wandera E., Miring'u G., et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates

- responsible for cholera outbreaks in Kenya between 1975 and 2017. *Microbiol. Immunol.* 2019; 63(9): 350–8. <https://doi.org/10.1111/1348-0421.12731>
14. Kanampalliar A., Singh D.V. Virulence pattern and genomic diversity of *Vibrio cholerae* O1 and O139 strains isolated from clinical and environmental sources in India. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 1838. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01838>
15. Bina X.R., Provenzano D., Nguyen N., Bina J.E. *Vibrio cholerae* RND family efflux systems are required for antimicrobial resistance, optimal virulence factor production, and colonization of the infant mouse small intestine. *Infect. Immun.* 2008; 76(8): 3595–605. <https://doi.org/10.1128/IAI.01620-07>
16. Matson J.S., Yoo H.J., Hakansson K., DiRita V.J. Polymyxin B resistance in El Tor *Vibrio cholerae* requires lipid acylation catalyzed by MsbB. *J. Bacteriol.* 2010; 192(8): 2044–52. <https://doi.org/10.1128/JB.00023-10>
17. Hankins J.V., Madsen J.A., Giles D.K., Childers B.M., Klose K.E., Brodbelt J.S., et al. Elucidation of a novel *Vibrio cholerae* lipid A secondary hydroxy-acyltransferase and its role in innate immune recognition. *Mol. Microbiol.* 2011; 81(5): 1313–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07765.x>
18. Herrera C.M., Crofts A.A., Henderson J.C., Pingali S.C., Davies B.W., Trent M.S. The *Vibrio cholerae* Vpra-Vprb two-component system controls virulence through endotoxin modification. *MBIO.* 2014; 5(6): e02283-14. <https://doi.org/10.1128/MBIO.02283-14>
19. Bilecen K., Fong J.C.N., Cheng A., Jones C.J., Zamorano-Sánchez D., Yildiz F.H. Polymyxin B resistance and biofilm formation in *Vibrio cholerae* are controlled by the response regulator CarR. *Infect. Immun.* 2015; 83(3): 1199–209. <https://doi.org/10.1128/IAI.02700-14>
20. Bilecen K., Yildiz F.H. Identification of a calcium-controlled negative regulatory system affecting *Vibrio cholerae* biofilm formation. *Environ. Microbiol.* 2009; 11(8): 2015–29. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.01923.x>
21. Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N., Shaw S., Ghosh P., Dutta S. et al. A point mutation in *carR* is involved in the emergence of polymyxin B-sensitive *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. *Infect. Immun.* 2020; 88(5): e00080-20. <https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20>
22. Nesper J., Lauriano C.M., Klose K.E., Kapfhammer D., Kraiss A., Reidl J. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor galU and galE mutants: influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* 2001; 69(1): 435–45. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.1.435-445.2001>
23. Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F.X., Ramamurthy T. Endemic cholera in India and imported cholera in Russia: What is common? *Problemy osobo opasnykh infektsiy.* 2020; (3): 17–26. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-17-26> (in Russian)
24. Titova S.V., Moskvitina E.A., Kruglikov V.D., Chemisova O.S., Pisanov R.V., Vodopyanov A.S. The situation of cholera in the world in 2018, forecast for 2019. Scientific support for improving epidemiological surveillance of cholera in the Russian Federation. In: *Cholera and Vibrio Pathogens for Humans: Collection of Articles by the Problem Commission (48.04) of the Coordinating Scientific Council for the Sanitary and Epidemiological Protection of the Russian Federation. Issue No. 32 [Kholera i patogennyye dlya cheloveka vibriony: Sbornik statey po sanitarno-epidemiologicheskoy okhrane territorii Rossiyskoy Federatsii. Vypusk № 32].* Rostov-na-Donu; 2019: 12–21. (in Russian)
25. Huq A., Small E.B., West P.A., Huq M.I., Rahman R., Colwell R.R. Ecological relationships between *Vibrio cholerae* and planktonic crustacean copepods. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983; 45(1): 275–83. <https://doi.org/10.1128/AEM.45.1.275-283.1983>
26. Satchell K.J.F., Jones C.J., Wong J., Queen J., Agarwal S., Yildiz F.H. Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain. *Infect. Immun.* 2016; 84(9): 2473–81. <https://doi.org/10.1128/IAI00189-16>
27. Zadnova S.P., Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Adamov A.K., Devdariani Z.L., Kuttyrev V.V. Comparative analysis of glucose metabolism in strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2017; 35(2): 64–9. <https://doi.org/10.3103/S0891416817020112> (in Russian)
28. Lee D., Kim E.J., Baek Y., Lee J., Yoon Y., Nair G.B., et al. Alterations in glucose metabolism in *Vibrio cholerae* serogroup O1 El Tor biotype strains. *Nature.* 2020; 10(1): 308. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57093-4>
29. Gaevskaya N.E., Makedonova L.D. The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2016; 61(12): 849–52. <https://doi.org/10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852> (in Russian)

#### Информация об авторах

**Заднова Светлана Петровна** — д.б.н., в.н.с. лаб. патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

**Краснов Ярослав Михайлович** — к.х.н., зав. лаб. геномного и протеомного анализа РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

**Плеханов Никита Александрович** — к.б.н., с.н.с. лаб. патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

**Крицкий Андрей Александрович** — к.б.н., зав. лаб. патогенных вибрионов РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

**Кутырев Владимир Викторович** — д.м.н., проф., академик РАН, директор РосНИПЧИ «Микроб», Саратов, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

**Участие авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 22.04.2021;  
принята к публикации 15.07.2021;  
опубликована 30.10.2021

#### Information about the authors

**Svetlana P. Zadnova** — D. Sci. (Biol), leading researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

**Yaroslav M. Krasnov** — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

**Nikita A. Plekhanov** — Cand. Sci. (Biol), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, [rusrapi@microbe.ru](mailto:rusrapi@microbe.ru), <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

**Andrey A. Kritskiy** — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-5506-4285>

**Vladimir V. Kuttyrev** — D. Sci. (Med), Prof., Academician of the Russian Academy of Sciences, Director, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-3788-3452>

**Author contribution.** All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.