

Научная статья
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>



Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP

Ковалев Д.А.[✉], Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н.

Ставропольский противочумный институт, Ставрополь, Россия

Аннотация

Цель. Филогенетический анализ штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в разные годы на территории Кавказа, с использованием мультилокусного анализа числа варьируемых тандемных повторов (MLVA) и полногеномного анализа распределения единичных нуклеотидных полиморфизмов (wgSNP). **Материалы и методы.** Объектами исследования служили геномные последовательности 16 клинических штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor из коллекции Ставропольского противочумного института, выделенных на территории Кавказа с 1970 по 1998 г., а также 87 полногеномных последовательностей *V. cholerae* из базы данных NCBI. MLVA проводили по 5 VNTR-локусам. Полногеномное секвенирование осуществляли на платформе «Ion Torrent PGM».

Результаты. Исследуемые штаммы относятся к 15 MLVA-типам и делятся на 3 группы в составе одного кластера. Осуществлен анализ структуры основных островов вирулентности и патогенности, а также нуклеотидных полиморфизмов в генах *ctxB*, *tcpA* и *RstR*. Проведен филогенетический анализ штаммов на основе wgSNP-типирования, описаны SNP, специфичные для каждой филогенетической группы.

Заключение. Установлено поликлональное происхождение генетически измененных вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Определено место штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, выделенных с 1970 по 1998 г. на территории Кавказа, в глобальной популяции возбудителя. Показано, что в указанный период на территории Кавказа циркулировали штаммы, принадлежащие к 1-й и 2-й волнам 7-й пандемии холеры. Подтверждено, что случаи холеры на Кавказе являются завозными с территории эндемичных стран, определены наиболее вероятные источники инфекции.

Ключевые слова: полногеномное секвенирование, филогенетический анализ, *Vibrio cholerae*, MLVA, wgSNP

Для цитирования: Ковалев Д.А., Шапаков Н.А., Писаренко С.В., Савельева И.В., Васильева О.В., Савельев В.Н., Сирица Ю.В., Жиров А.М., Ульшина Д.В., Кузнецова И.В., Бобрышева О.В., Куличенко А.Н. Генетическое типирование штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Кавказа в период 1970–1998 гг., с применением MLVA-5 и wgSNP. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(1): 46–58. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Original article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Genetic typing of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP

Dmitry A. Kovalev[✉], Nikolay A. Shapakov, Sergey V. Pisarenko, Irina V. Savel'eva, Oksana V. Vasil'eva, Vilory N. Savel'ev, Yulia V. Sirtsya, Andrey M. Zhiron, Diana V. Ul'shina, Irina V. Kuznetsova, Olga V. Bobrysheva, Aleksandr N. Kulichenko

Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia

Abstract

Aim. Our aim was to perform phylogenetic analysis of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biovar strains, isolated from the Caucasus region over the years, using MLVA and wgSNP methods.

Materials and methods. We studied genomic sequences of 16 clinical *V. cholerae* O1 strains of El Tor biovar isolated on the territory of Caucasus from 1970 to 1998. These strains were obtained from the State Collection of Pathogenic Microorganisms of Stavropol Plague Control Research Institute. 87 whole genome sequences of *V. cholerae* strains, obtained from NCBI database, were also included in the analysis. MLVA-typing was carried out at 5 VNTR-loci. Whole genome sequencing was performed on Ion Torrent PGM platform.

Results. We determined that the studied strains belong to 15 MLVA-types and are divided in 3 groups of 1 cluster. We performed an analysis of the structure of the main virulence and pathogenicity islands, as well as nucleotide polymorphisms in *ctxB*, *tcpA*, *RstR* genes. We performed a wgSNP-based phylogenetic analysis of the strains, and described SNPs, specific for each phylogenetic group.

Conclusion. We confirmed the polyclonal origin of genetically modified variants of *V. cholerae* O1 biovar El Tor. We determined the place of *V. cholerae* strains of biovar El Tor, isolated from 1970 to 1998 on the territory of the Caucasus, in the global population of the pathogen. It is shown that during this period, strains belonging to the first and second waves of the seventh cholera pandemic circulated within the Caucasus. It was confirmed that cases of cholera in the Caucasus were imported from the territory of endemic countries, and the most probable sources of infection were identified.

Keywords: whole genome sequencing, phylogenetic analysis, *Vibrio cholerae*, MLVA, wgSNP

For citation: Kovalev D.A., Shapakov N.A., Pisarenko S.V., Savel'eva I.V., Vasil'eva O.V., Savel'ev V.N., Siritsa Yu.V., Zhironov A.M., Ul'shina D.V., Kuznecova I.V., Bobrysheva O.V., Kulichenko A.N. Genetic typing of *Vibrio cholerae* strains biovar El Tor isolated from the Caucasus region during the 1970–1998 period using MLVA-5 and wgSNP. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021;98(1): 46–58. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-29>

Введение

Возбудитель холеры (*V. cholerae* O1, *ctxA*+) вызывает особо опасное острое инфекционное заболевание. Эпидемиологический надзор за холерой осуществляется в соответствии с Международными медико-санитарными правилами [1]. Согласно принятой классификации внутри вида *V. cholerae* выделяют 3 эпидемически опасных варианта: холерные вибрионы серогруппы O1 (биовары *classical* и El Tor) и O139.

Исторически выделяют 7 пандемий холеры: возбудителем первых шести считается *V. cholerae* классического биовара, но с 1961 г. произошла смена биовара на El Tor, явившийся причиной 7-й пандемии, продолжающейся до настоящего времени. Начиная с 1991 г. по всему миру распространились генетически измененные высокопатогенные геноварианты *V. cholerae* O1 биовара El Tor [2, 3].

Вспышки холеры, вызванные заносом инфекции, неоднократно фиксировались на территории Кавказа. Так, с начала 1970-х гг. в данном регионе было зарегистрировано несколько вспышек и эпидемий холеры: в 1970 г. — в Республике Дагестан, в 1985–1989 гг. — в Азербайджане, в 1990 г. — в Ставрополе, в 1994–1998 гг. — в Республике Дагестан [4–6].

Современные молекулярно-генетические методы исследования позволяют ретроспективно охарактеризовать геном штаммов возбудителя инфекции, вызвавших случаи заболевания холерой на различных территориях.

В последние годы для определения степени родства групп или отдельных штаммов *V. cholerae* [7–9] и типирования изолятов, выделенных как от людей во время вспышек, так и из объектов окружающей среды [10–12], широко применяется метод

мультилокусного анализа числа варибельных тандемных повторов (MLVA).

Один из актуальных методов генотипирования *V. cholerae* — определение единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP). При этом максимальную разрешающую способность демонстрирует полногеномный анализ распределения единичных нуклеотидных полиморфизмов (wgSNP) [13–17].

Безусловный научный интерес представляет изучение филогенетической принадлежности вариантов *V. cholerae* O1 биовара El Tor с последующим эволюционным и филогеографическим анализом.

Цель исследования — определение филогенетической принадлежности штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в разные годы на территории Кавказа.

Материалы и методы

В работе исследованы геномные последовательности 16 штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor из коллекции Ставропольского противочумного института, которые были изолированы из клинического материала во время эпидемических вспышек холеры на территории Кавказа с 1970 по 1998 г. Из них 7 — типичные *V. cholerae* биовара El Tor, выделенные в Республике Дагестан — 180Д (1970 г.); Азербайджане — 123Аз (1977 г.), 353Аз (1985 г.), 4017Аз (1989 г.); Ставрополе — С-347 (1980 г.), 454 (1990 г.); Краснодарском крае — 2278 (1987 г.). Остальные 9 — генетически измененные варианты *V. cholerae* биовара El Tor — выделены на территории Республики Дагестан — 157Д (1993 г.), 169Д (1993 г.), 1270Д (1994 г.), 17332 (1994 г.), 10213Д (1994 г.), 16241Д (1994 г.), 41Д (1998 г.); Краснодарского края — 286 (1994 г.); Ставропольского края — 8048 (1994 г.).

MLVA-типирование. Для типирования исследуемых штаммов возбудителя холеры использовали предложенную ранее схему MLVA-5 [10]. Для экстракции ДНК применяли набор реагентов «GeneJET Genomic DNA Purification Kit» («Thermo Scientific»). С помощью специфических праймеров в ПЦР нарабатывали продукты амплификации по 5 локусам для каждого из 16 штаммов. ПЦР проводили с использованием амплификатора «Терцик» («ДНК-Технология»), анализ ампликонов — путем капиллярного электрофореза с помощью анализатора «ABI Prism 3500» («Applied Biosystems»). Для оценки варибельности локусов использовали индекс разнообразия Хантера–Гастона [18].

При проведении кластерного анализа в качестве группы сравнения использовали доступные MLVA-генотипы штаммов *V. cholerae*, выделенных в Индии, Бангладеш, на Гаити. Кластерный анализ на основе данных MLVA выполняли с использованием программного пакета «BioNumerics v7.6» («Applied Maths»). Минимальное остовное дерево было построено на основе количества tandemных повторов с использованием категориального коэффициента дистанции.

Полногеномное секвенирование. Подготовку геномных библиотек проводили с использованием набора «Ion Xpress Plus Fragment Library Kit» («Life Technologies»), моноклональную амплификацию выполняли на микросферах — набор «Ion OneTouch 400 Template Kit» («Life Technologies») в соответствии с протоколами производителя. Секвенирование геномов осуществляли на секвенаторе «Ion Torrent PGM» и чипах «Ion 316 Chips Kit v2» («Life Technologies»).

Анализ геномов штаммов *V. cholerae*. Оценку качества полученных прочтений проводили с помощью программы «FastQC v0.11.3» [19]. Прочтения, содержащие нуклеотиды с низким значением качества, были отфильтрованы в программе «Trimmomatic v0.33» [20]. Прочтения со средним значением качества $Q < 15$ баллов, а также прочтения длиной < 75 нуклеотидов были удалены. Сборку геномов проводили в программном обеспечении «Newbler v3.0» («Roche»). Качество сборки геномов оценивали с использованием программы «Quast 3.0» [21], геномную последовательность штамма *V. cholerae* O1 El Tor N16961 (GenBank: GCF_000006745.1) использовали для определения точности и эффективности сборки. Аннотацию геномов выполняли с помощью NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline.

Для описания филогенетического контекста исследуемых изолятов использовали 87 полногеномных последовательностей *V. cholerae* из общедоступной базы данных NCBI¹.

Поиск SNP проводили в гомологичных регионах нуклеотидных последовательностей в онлайн-версии программы «REALPHY v1.10» [22]. Повторяющиеся и паралогичные последовательности были удалены в процессе множественного выравнивания с помощью алгоритма программы. Обнаруженные SNP были извлечены в файл VCF, после чего SNP, расположенные ближе чем 10 п.н. друг от друга, были отфильтрованы и удалены. Поиск SNP, отличающих близкородственные штаммы друг от друга, а также специфичных для отдельных групп штаммов, осуществляли среди SNP, прошедших фильтрацию с использованием собственных скриптов в программном обеспечении R.

Для филогенетической реконструкции на основе wgSNP-анализа штаммов *V. cholerae* применяли пакет программ «BEAST v2.3.0»². Для определения параметров эволюционной модели тестировали 88 различных моделей замещения на матрице множественного выравнивания геномов (коровый геном) в программе «Jmodeltest2». Оптимальную модель нуклеотидных замен выбирали на основе значений байесовского информационного критерия.

Поиск генов, кодирующих факторы вирулентности, и генов устойчивости к антибактериальным препаратам, проводили при помощи программного обеспечения «ABRicate v.0.8.13»³.

Результаты

При анализе фенотипических свойств установлено, что исследуемые штаммы относятся к токсигенным и гемолизотрицательным. Штаммы, изолированные до 1993 г., способны лизироваться бактериофагами ХДФ 3, ХДФ 4, ХДФ 5 и El Tor. В то же время изоляты, выделенные позднее, не обладают указанным свойством.

Анализ полученных данных MLVA-5 позволил установить, что 16 штаммов *V. cholerae* биовара El Tor представлены 15 MLVA-типами (табл. 1). При этом 7 изученных типичных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor принадлежат к 7 MLVA-типам, а 9 генетически измененных штаммов — к 8 различным MLVA-типам. Только 2 штамма геновариантов El Tor были отнесены к одному MLVA-типу (9-7-8-15-20): штамм 157Д, выделенный в 1993 г., и штамм 7332, выделенный в 1994 г. Это свидетельствует о заносе холеры из очага, существующего за пределами Республики Дагестан, в течение 2 лет. В целом полученные данные свидетельствуют о значительной варибельности геномов обеих групп.

В результате проведенного MLVA-типирования выявлены 3 аллели для локусов I хромосомы и 6–9 аллелей для II хромосомы. Индекс разнообразия Хантера–Гастона был $> 0,99$. При этом для ло-

¹ National Center for Biotechnology Information. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>

² URL: <https://www.beast2.org>

³ URL: <https://github.com/tseemann/abricate>

Таблица 1. MLVA-профили штаммов *V. cholerae* O1 биовара EI Tor
Table 1. MLVA profiles of *V. cholerae* strains O1 biovar EI Tor

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Location and year of isolation	Число повторов в MLVA-локусе Number of repeats in the MLVA locus				
			I хромосома / I chromosome			II хромосома / II chromosome	
			VC147 (белок FtsY) (protein FtsY)	VC437 (межгенная область) (intergenic region)	VC1650 (коллагеназа) (collagenase)	VCA171 (гипотетический белок) (hypothetical protein)	VCA283 (гипотетический белок) (hypothetical protein)
1	180Д 180D	Республика Дагестан, 1970 Republic of Dagestan, 1970	9	6	7	15	26
2	123А3 123Az	Республика Азербайджан, 1977 Republic of Azerbaijan, 1977	10	7	7	18	28
3	353А3 353Az	Республика Азербайджан, 1985 Republic of Azerbaijan, 1985	10	7	7	20	31
4	4017А3 4017Az	Республика Азербайджан, 1989 Republic of Azerbaijan, 1989	10	6	8	15	18
5	С-347 C-347	Ставрополь, 1980 Stavropol, 1980	9	7	7	20	23
6	454	Ставрополь, 1990 Stavropol, 1990	10	6	8	24	20
7	2278	Краснодар, 1987 Krasnodar, 1987	11	7	8	20	16
8	286	Краснодар, 1994 Krasnodar, 1994	9	7	8	15	21
9	1270Д 1270D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	10	7	8	15	22
10	157Д 157D	Республика Дагестан, 1993 Republic of Dagestan, 1993	9	7	8	15	20
11	169Д 169D	Республика Дагестан, 1993 Republic of Dagestan, 1993	9	7	7	15	20
12	8048	Кисловодск, 1994 Kislovodsk, 1994	10	7	8	28	–
13	10213Д 10213D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	8	15	23
14	16241Д 16241D	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	7	17	21
15	17332	Республика Дагестан, 1994 Republic of Dagestan, 1994	9	7	8	15	20

Типичные холерные вибрионы / Typical cholera vibrios

Генетически измененные варианты / Genetically modified variants

Окончание табл. 1.

End of Table 1.

№ No.	Штамм Strain	Место и год выделения Location and year of isolation	Число повторов в MLVA-локусе Number of repeats in the MLVA locus				
			I хромосома / I chromosome			II хромосома / II chromosome	
			VC147 (белок FtsY) (protein FtsY)	VC437 (межгенная область) (intergenic region)	VC1650 (коллагеназа) (collagenase)	VCA171 (гипотетический белок) (hypothetical protein)	VCA283 (гипотетический белок) (hypothetical protein)
16	41Д 41D	Республика Дагестан, 1998 Republic of Dagestan, 1998	9	8	8	15	22
17	569В	Индия, 1948 India, 1948	10	4	3	16	34
18	868	Индия, 1964 India, 1964	8	6	8	14	35
19	178	Индия, 2006 India, 2006	9	3	6	19	17
20	200	Индия, 2006 India, 2006	9	3	6	22	19
21	236	Индия, 2007 India, 2007	9	3	6	17	16
22	350	Индия, 2007 India, 2007	10	6	7	15	19
23	AR32732	Бангладеш, 2004 Bangladesh, 2004	9	3	6	22	12
24	MQ1795	Бангладеш, 2001 Bangladesh, 2001	9	3	6	16	11
25	MJ1236	Бангладеш, 1994 Bangladesh, 1994	8	7	8	12	19
26	MG116926	Бангладеш, 1991 Bangladesh, 1991	8	7	8	14	23
27	HC1037	Гаити, 2014 Haiti, 2014	7	3	6	14	8

кусов I хромосомы он варьировал в диапазоне 0,65–0,68, для локусов II хромосомы — 0,88–0,95, что свидетельствует об относительно высоком уровне стабильности первых хромосомных локусов. Полученные данные подтверждают результаты, описанные ранее [23–26].

Анализ построенной дендрограммы на основе MLVA-типирования по 5 вышеназванным локусам выявил деление всех штаммов на 2 кластера (рис. 1).

Первый кластер образован только генетически измененными штаммами, выделенными в Бангладеш в 2001 и 2004 гг. и в Индии в 2006 и 2007 гг. Сопоставление MLVA-генотипов указанных штаммов (табл. 1) показывает, что они различаются только по числу повторов 2 вариабельных локусов II хромосомы. При этом аллельные варианты VNTR

I хромосомы были идентичны (9-3-6), что говорит об общем происхождении изолятов. Также в этом субкластере отдельно расположен штамм из Гаити с аллельным профилем 7-3-4-14-8, что соответствует установленному происхождению холеры в Гаити из региона Непала [27]. Эти данные позволяют отметить продолжающиеся эволюционные изменения генома новых вариантов возбудителя холеры.

Во втором кластере можно выделить 3 группы: в первую вошли штаммы, выделенные в Республике Дагестан в 1970, 1993, 1994, 1998 гг., а также штаммы, изолированные в Краснодаре в 1987 и 1994 гг.

Вторую группу составили изоляты, выделенные в Республике Дагестан, Ставропольском крае (Кисловодск), Республике Азербайджан в 1989–1994 гг. Отдельное положение в группе занимает штамм 569В классического биотипа, выделенный в

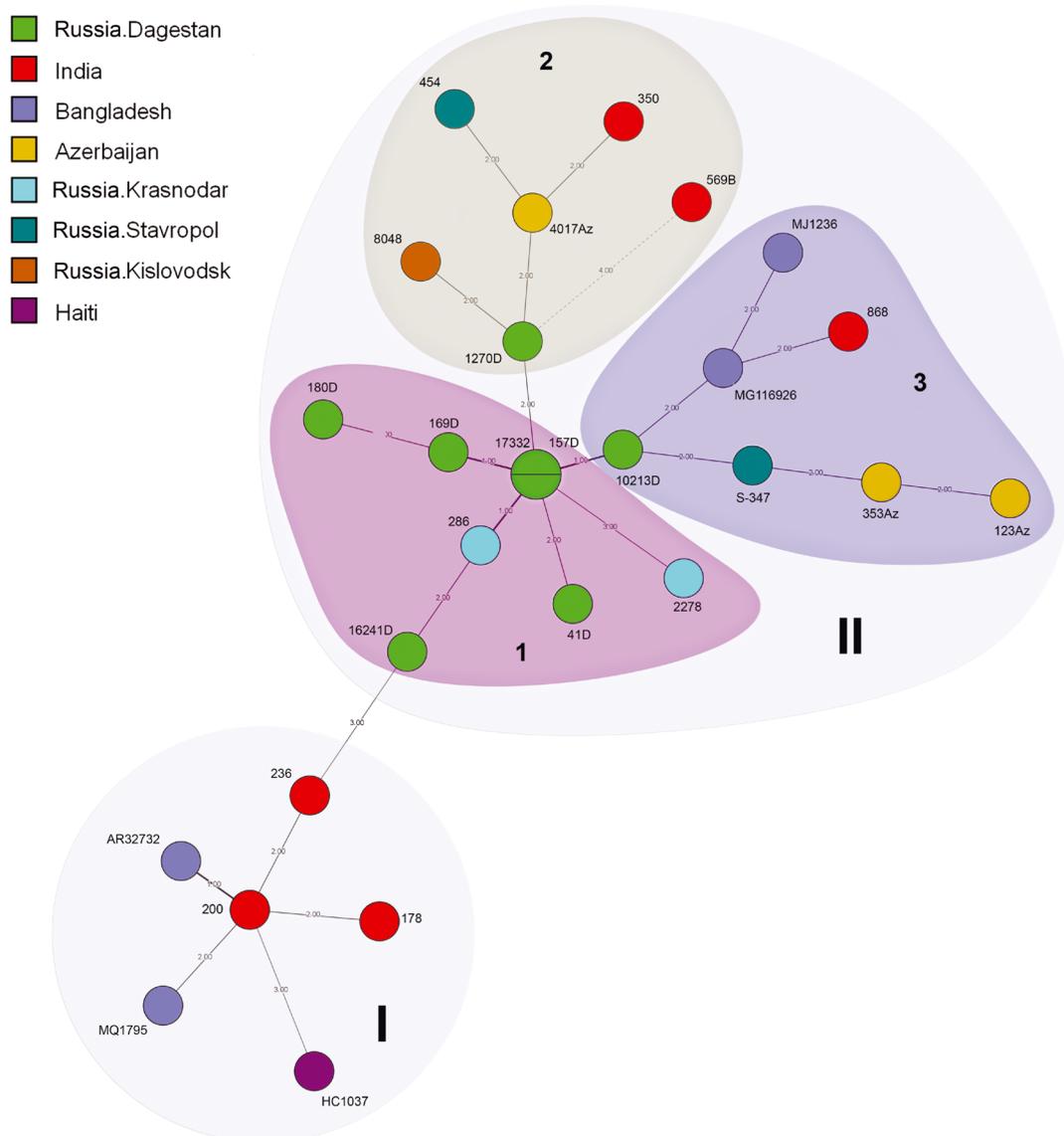


Рис. 1. Кластерный анализ на основе MLVA-типирования штаммов *V. cholerae* с использованием категориального коэффициента дистанции (программный пакет «BioNumerics v7.6»).

Римскими цифрами обозначены основные кластеры, арабскими — субкластеры в структуре кластера II.

Fig. 1. Cluster analysis based on MLVA typing of *V. cholerae* strains using the categorical distance coefficient (BioNumerics v7.6).

Roman numerals indicate the main clusters, arabic numerals indicate the subclusters in the structure of cluster II.

Индии в 1948 г. Штаммы, выделенные в Республике Азербайджан в 1989 г. и в Ставропольском крае (Ставрополь) в 1990 г., являются типичными холерными вибрионами биовара El Tor и имеют сходные MLVA-профили (10-6-8-15-18/10-6-8-24-20), что подтверждает клональное происхождение штаммов. Близкородственность генетически измененного штамма 350 из Индии, выделенного в 2007 г., и типичного штамма *V. cholerae* биовара El Tor, изолированного в Республике Азербайджан в 1989 г., свидетельствует о том, что вариабельность MLVA-генотипов не ассоциирована с изменениями генома, приводящими к формированию гибридных вариантов биовара El Tor.

Третья группа: штаммы, выделенные в Республике Дагестан в 1994 г., в Индии в 1964 г., в Бангладеш в 1991 и 1994 гг., а также в Ставропольском крае (Ставрополь, 1980 г.). Относительно генетически измененного штамма, выделенного в Республике Дагестан в 1994 г., можно предположить его происхождение из Бангладеш. Этот факт подтверждается тем, что MLVA-генотип штамма отличается 2 локусами от штамма MG1236, выделенного в Бангладеш в 1991 г. Штаммы, изолированные на территории Республики Азербайджан в 1977 и 1985 гг. в 3-й группе, различаются по количеству повторов в 2 вариабельных локусах II хромосомы. В то же время аллельный вариант ло-

кусов I хромосомы был идентичен (10-7-7/10-7-7), что позволило выделить их в отдельный кластерный комплекс.

В результате секвенирования *de novo* были получены незавершенные геномы со средним покрытием 76–105×, включающие от 91 до 169 контигов (>500 п.н.) Общий размер сборки геномов секвенированных штаммов составил от 3 877 025 до 4 103 351 п.н. (табл. 2).

У каждого анализируемого штамма обнаружено 47 общих генов вирулентности, а также 2–7 гена устойчивости к антибактериальным препаратам (*varG*, *dfrA1*, *catB9*, *aadA1*, *sul1*, *sul2*, *floR*, *tet(A)*, *aph(6)-ld* и *aph(3'')-ld*): карбапенемам, триметоприму, хлорамфениколу, стрептомицину, сульфонамидам, тетрациклинам.

Данные wgSNP позволили определить, что острова вирулентности (VPI-I и VPI-II) и патогенности (VSP-I и VSP-II), а также профаговая область CTX присутствуют в геномах всех исследуемых штаммов. При этом в структуре и нуклеотидных последовательностях данных областей установлены различия при сравнении с референсной последовательностью *V. cholerae* N16961.

Остров патогенности VPI-I всех исследуемых штаммов возбудителя холеры содержал несинони-

мичную SNP в гене *VC0817*, кодирующем транспозазу, в позиции *A937G*.

При анализе структуры острова патогенности VSP-I показана его 100% гомология по всем локусам с референсным геномом, кроме SNP в гене *VC0180* (гипотетический белок) в позиции *C1003T* у всех генетически измененных штаммов. Данная мутация характерна исключительно для штаммов, выделенных после 1990 г.

Анализ структурной организации VSP-II (локусы VC0490-516) позволил установить наличие у штаммов 41D, 169D и 1270D общей делеции, включающей ген *VC513*. При сравнении исследуемых геномов с референсным идентичность нуклеотидной последовательности VSP-II для указанных 3 штаммов составила 97,1–97,2 и 99,9% — для остальных штаммов. При этом у всех генетически измененных вариантов *V. cholerae* биовар El Tor отмечена SNP в позиции *C526T* в гене *VC496* (гипотетический белок). Кроме того, в геноме 7 штаммов из 10, выделенных в 1990-х гг., идентифицирована SNP в гене *VC0513* в позиции *T71C* (Helix-turn-helix transcriptional regulator — *RstR*). Следует отметить, что указанная мутация в гене *VC0513* несинонимична и приводит к замене треонина на изолейцин.

Таблица 2. Результаты полногеномного анализа

Table 2. Results of genome-wide analysis

№ No.	Штамм Strain	Число контигов The number of contigs	Длина генома, п.н. The length of genome, b.p.	GC, %	Всего генов Total number of genes	GenBank ID
1	180D	130	3906916	47,5	3666	GCA_004358215.1
2	123Az	120	3919566	47,5	3690	GCA_004358225.1
3	353Az	128	3953109	47,5	3660	GCA_009728505.1
4	4017Az	124	3907443	47,5	3594	GCA_009728295.1
5	C-347	125	3945425	47,5	3652	GCA_009728405.1
6	454	136	3893896	47,5	3572	GCA_009728525.1
7	2278	167	3877025	47,5	3544	GCA_009728225.1
8	157D	138	4078639	47,5	3843	GCA_004358245.1
9	169D	119	4102946	47,4	3936	GCA_003130485.1
10	1270D	133	4016316	47,5	3794	GCA_003130495.1
11	17332	144	4031067	47,4	3697	GCA_009728345.1
12	10213D	147	4020493	47,4	3487	GCA_003327445.1
13	16241D	141	4081404	47,5	3891	GCA_003130465.1
14	41D	140	4038688	47,5	3862	GCA_003130475.1
15	286	169	4068702	47,5	3802	GCA_004358285.1
16	8048	91	4103351	47,4	3823	GCA_009728375.1

Примечание. GC — доля гуанина (G) и цитозина (C) среди всех нуклеотидных остатков.

Note. GC — the proportion of guanine (G) and cytosine (C) among all nucleotide residues.

Последовательность острова VSP-II в геноме штамма *V. cholerae* 2278 (Краснодар, 1987 г.) содержит 34 SNP, в том числе 12 в составе гена *VC494* (гипотетический белок), 7 — *VC496* (гипотетический белок), 7 — *VC498* (рибонуклеаза H), 8 — *VC506* (гипотетический белок).

Дальнейший анализ показал, что аллель гена *ctxB* субъединицы холерного токсина штаммов, выделенных в период с 1970 по 1990 г., принадлежит к типу El Tor (*ctxB3*). Для других штаммов выборки характерно наличие ранее описанных SNP в позициях 115 и 203 гена *ctxB*, соответствующих аллелю *ctxB1* [28].

Последовательность гена *tcpA* всех исследуемых штаммов была идентична и соответствовала референсному геному.

При сравнительном анализе структуры генов, кодирующих факторы патогенности, выявлен

ряд несинонимичных замен; в частности, в геноме штамма 157D в гене *VC0983* (регуляторный белок ToxS) в позиции *A117G*; 2278 — *VC0984* (белок-активатор холерного токсина) в позиции *G410T*; 454 — *VC0984* (белок-активатор холерного токсина) в позиции *G21T*. У всех изучаемых генетически изменённых штаммов и 2 типичных *V. cholerae* O1 El Tor (454, 2278) идентифицирован SNP в гене *VC1318* (белок наружной мембраны OmpV) в позиции *G242T*. Также ДНК штамма C-347 содержит SNP в кластере *RTX* гена *VC1451*, кодирующего RtxA, в позиции *C1480T*.

Далее с целью определения филогенетических связей и регионов происхождения изолятов, выделенных на Кавказе, проведена филогенетическая реконструкция на основе wgSNP 103 геномов *V. cholerae*, изолированных в период 7-й пандемии (с 1937 по 2017 г.) на территории 23 стран (Аргентина, Бахрейн,

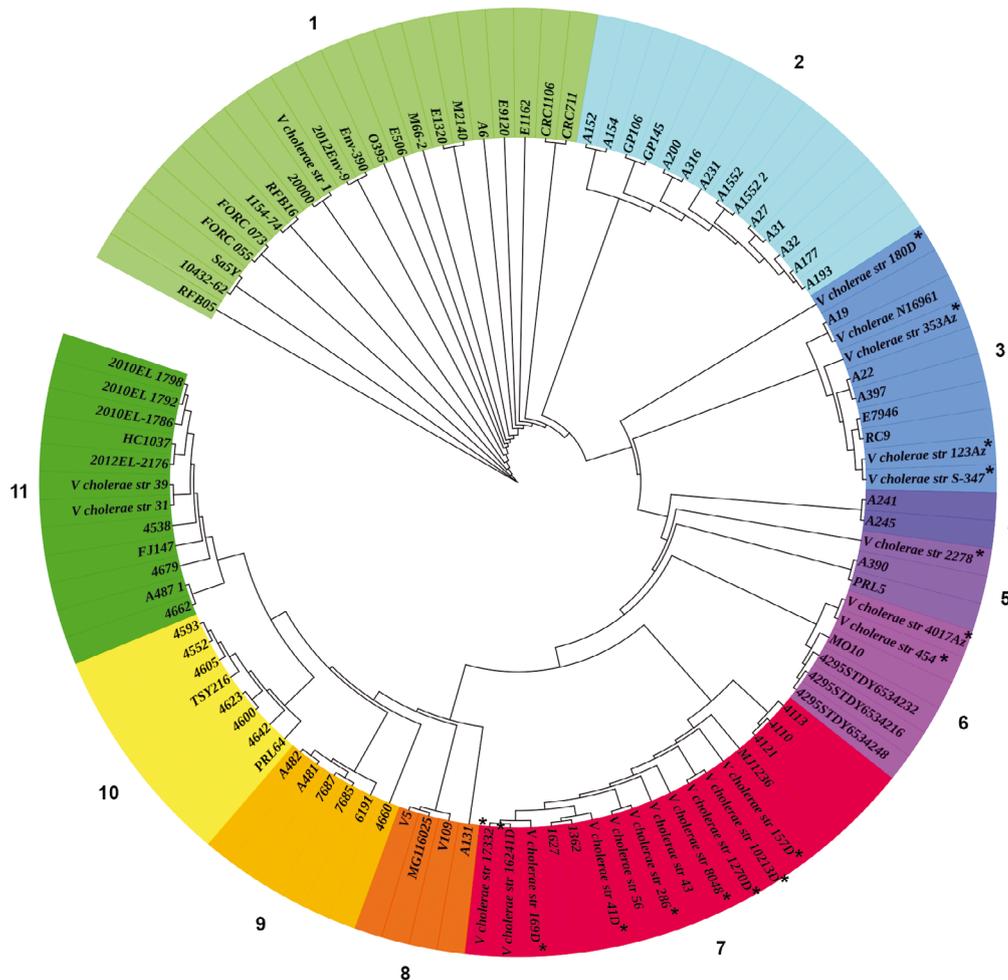


Рис. 2. Филогенетическое дерево на основе wgSNP-типирования штаммов *V. cholerae*, построенное с помощью «BEAST v2.3.0» с использованием строгих часов и модели замещения нуклеотидов GTR.

Цветом и цифрами 1–11 обозначены филогенетические группы. Звездочкой отмечены штаммы, геномы которых были секвенированы в рамках данного исследования.

Fig. 2. Phylogenetic tree based on wgSNP typing of *V. cholerae* strains, constructed using BEAST v2.3.0 using strict clocks and the GTR nucleotide substitution model.

The color and numbers 1–11 indicate phylogenetic groups. Asterisk indicates the strains whose genomes were sequenced in this study.

Бангладеш, Боливия, Китай, Колумбия, Джибути, Германия, Гаити, Индия, Индонезия, Кения, Мексика, Мозамбик, Перу, Филиппины, Россия, Южная Корея, Таиланд, Украина, США, Вьетнам).

Филогенетический анализ на основе wgSNP-типирования выявил деление изучаемых штаммов *V. cholerae* на 11 филогенетических групп (клад) (рис. 2).

К 1-й группе принадлежат штаммы классического *V. cholerae*, выделенные в постпериод 6-й пандемии холеры, содержащие на 2-й хромосоме 2 специфических SNP (921847 и 1024057). Данные штаммы по своим морфогенетическим свойствам соответствуют референсному штамму классического биотипа 0395 и выделены в США (1962, 1974, 2004, 2017 гг.), Южной Корее (2014, 2017 гг.), на Гаити (2012 г.), в Индии (1962, 1964, 1974 г.), Индонезии (1937, 1957, 1961 г.), Китае (1962, 1964 гг.), Австралии (1977 г.).

Группа 2 включает штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, изолированные в Мозамбике (1991 г.), Германии (1975 г.), Индии (1979 г.), Аргентине (1992, 1993 гг.), Мексике (1991 г.), Перу (1991, 1992 гг.), США (1992 г.), Колумбии (1992 г.), Боливии (1992 г.), содержащие специфические SNP на I и II хромосомах в позициях 775458 и 111100 соответственно. В эти годы завозов или заносов холеры из указанных стран на территорию Кавказа не зафиксировано.

Группа 3 представлена штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, не содержащими специфические SNP и выделенными в Бангладеш (1971, 1979, 1987 гг.), Бахрейне (1978 г.), Кении (1985 г.). В эту же группу вошли штаммы, изолированные в Дагестане (1970 г.), Азербайджане (1977 г.), Ставропольском крае (1980 г.) и референсный штамм 16961, что свидетельствует о близком родстве данной группы штаммов, а также позволяет предполагать завоз холеры на Кавказ из перечисленных выше эндемичных по холере стран.

Группа 4 состоит из 2 штаммов *V. cholerae* El Tor — *ctxA+*, *ctxB3*, выделенных во Вьетнаме (1989 г.) и содержащих специфические полиморфизмы на I (4 SNP) и II (2 SNP) хромосомах. Штаммы *V. cholerae*, выделенные на территории Кавказа, с подобной характеристикой не обнаружены.

Группа 5 представлена 3 штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, не содержащими специфические SNP, выделенными в Бангладеш (1987 г.), Индии (1980 г.), и филогенетически родственным им штаммом возбудителя холеры, обнаруженным в Сочи (Россия, 1987 г.), что было подтверждено при эпидемиологическом расследовании случая заражения туристки, прибывшей в Сочи из Бангладеш.

В группу 6 вошли штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, содержащие специфические SNP на I и II хромосомах, выделенные как в Бангладеш (2013,

2014 гг.) и Индии (1992 г.), так и в Азербайджане (1989 г.) и Ставрополе (1990 г.), что свидетельствует о близком генетическом родстве данных микроорганизмов. Эпидемиологически подтвержден завоз в Азербайджан в 1989 г. и в Ставрополь в 1990 г. холеры, возбудитель которой имел генетические свойства *V. cholerae*, обнаруженных в Бангладеш и Индии.

Группа 7 представлена штаммами *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB1*, т.е. генетически измененными вариантами *V. cholerae* биовара El Tor, содержащими специфические SNP на I и II хромосомах, выделенными с 1995 по 2005 г. (2-я волна распространения 7-й пандемии холеры).

Группа 8 включает штаммы *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*, выделенные в Бангладеш и Индии в 1989–1991 гг., что свидетельствует о близком родстве с группой 3 штаммов *V. cholerae* El Tor *ctxA+*, *ctxB3*.

В состав групп 9–11 входят штаммы, изолированные в период с 2001 по 2017 г. и являющиеся представителями 3-й волны 7-й пандемии. Для штаммов группы 9, выделенных на территории Африки и Индийского полуострова (Кения, Джибути, Индия и Бангладеш), найдено 3 специфических SNP.

Примечательно, что штаммы из группы 10 были выделены в основном на территории Индии в 1992–2007 гг., а штамм TSY216 — в Таиланде в 2010 г., что может свидетельствовать о заносе *V. cholerae* на территорию этой страны из Индии. Для штаммов указанной группы специфических SNP не обнаружено.

Группа 11 состоит из штаммов, выделенных на территории Гаити, Китая, Бангладеш и Украины. Штаммы данной группы содержат 2 специфических SNP, локализованные на I хромосоме.

Анализ нуклеотидных замен в геномах штаммов *V. cholerae* выявил 1157 SNP, большая часть которых относительно равномерно распределена на I хромосоме (табл. 3).

Заключение

Проведенное MLVA-типирование 16 штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor — как типичных, так и генетически измененных вариантов, выделенных от больных людей в разные периоды 7-й пандемии холеры, показало, что исследуемые штаммы относятся к 15 MLVA-типам и делятся на 3 группы в составе одного кластера. В то же время другой кластер образован только генетически измененными штаммами, использованными в качестве группы сравнения и изолированными после 2000 г. в Бангладеш (2001, 2004 гг.), Индии (2006 и 2007 гг.) и на Гаити (2014 г.). Принадлежность исследуемых штаммов к 15 разным MLVA-типам свидетельствует о продолжающихся эволюционных изменениях генома возбудителя холеры, что согласуется с данными, полученными ранее [25, 29].

Таблица 3. Специфичные SNP в геноме различных групп *V. cholerae*, выделенных на Кавказе в период 6-й и 7-й пандемий

Table 3. Specific SNPs in the genome of various *V. cholerae* groups isolated in the Caucasus during the 6th and 7th pandemics

№ группы Group No.	Число специфичных SNP Number of specific SNPs	Хромосома, координаты SNP Chromosome, coordinates of the SNP	Ген/локус Gene/locus	Белок/локус Protein/locus
1	2	2 (921847) 2 (1024057)	VCA0975 VCA1073(<i>putA</i>)	АТФ-связывающий белок ATP-binding protein Бифункциональная пролиндегидрогеназа Bifunctional proline dehydrogenase
2	2	1 (775458) 2 (111100)	VC0722(<i>ppx</i>) VCA0103	Экзополифосфатаза Exopolyphosphatase Белок-переносчик неорганических анионов семейства SulP SulP family inorganic anion transporter
3	0	–	–	–
4	6	1 (1720436) 1 (2285964) 1 (2695072) 1 (2801737) 2 (52695) 2 (118960)	VC1606 VC2132(<i>fliG</i>) VC2506(<i>rapA</i>) VC2630 VCA0044 VCA0109(<i>tssE</i>)	Белок семейства TolC TolC family protein Белок переключателя жгутиков FliG Flagellar motor switch protein FliG Связанный с РНК-полимеразой белок RNA polymerase-associated protein Белок семейства PilQ Type IV pilus secretin PilQ family protein Псевдоген Pseudogen Субъединица системы секреции TssE Secretion system baseplate subunit TssE
5	0	–	–	–
6	2	1 (2766100) 2 (636413)	VC2599(<i>mr</i>) VCA0697	Рибонуклеаза R Ribonuclease R Дигуанилатциклаза, сенсорный домен Sensor domain-containing diguanylate cyclase
7	6	1 (1317870) 1 (1830897) 2 (58725) 2 (62339) 2 (487649) 2 (796722)	<i>Intergenic</i> VC1697 VCA0051 VCA0055 VCA0550 VCA0849	Межгенное пространство Intergenic space NAD(P)H-связывающий белок NAD(P)H-binding protein Гипотетический белок Hypothetical protein Белок, содержащий домен Domain-containing protein Белок семейства site-2 протеаз Site-2 protease family protein Белок, содержащий модуль сдерживания Retention module-containing protein
8	0	–	–	–
9	3	1 (89430) 1 (2336676) 1 (2690901)	VC0091 VC2190(<i>flgL</i>) VC2503	SAM-зависимая метилтрансфераза SAM-dependent methyltransferase Белок FlgL, связанный с жгутиками Flagellar hook-associated protein FlgL Валин-тРНК лигаза Valine-tRNA ligase
10	0	–	–	–
11	2	1 (2424759) 1 (2669927)	VC2270 VC2489	Рибофлавинсинтаза Riboflavin synthase Регулятор транскрипции семейства TetR/AcrR TetR/AcrR family transcriptional regulator

Кроме того, данные MLVA-типирования подтвердили, что случаи холеры на Кавказе являются завозными с территории эндемичных стран и позволили определить наиболее вероятные источники инфекции, что важно для молекулярно-эпидемиологического мониторинга за возбудителем холеры.

Основываясь на полученных данных wgSNP и анализа структурных особенностей геномов, установлено место штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных в период с 1970 по 1998 г. на территории Кавказа, в глобальной популяции *V. cholerae*. Показано, что в указанный период на Кавказе циркулировали штаммы, принадлежащие 1-й и 2-й волнам 7-й пандемии холеры.

С использованием wgSNP выявлены ранее не описанные несинонимичные SNP в генах, ассоциированных с экспрессией факторов патогенности, которые могут в дальнейшем быть использованы в качестве дополнительных генетических маркеров для характеристики изолятов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- ВОЗ. Международные медико-санитарные правила (2005 г.). Available at: https://www.who.int/ihr/IHR_2005_ru.pdf
- Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019; 7: 203. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00203>
- Greig D.R., Schaefer U., Octavia S., Hunter E., Chattaway M.A., Dallman T.J., et al. Evaluation of whole-genome sequencing for identification and typing of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(11): e00831–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-18>
- Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Кругликов В.Д., Титова С.В., Водопьянов А.С., Куриленко М.Л. и др. Холера: оценка эпидемиологической обстановки в мире и России в 2008–2017 гг. Прогноз на 2018 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; (1): 36–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-36-43>
- Харченко Г.А., Кимирилова О.Г., Буркин В.С. Эпидемиология и клиника холеры 1970 года в Астраханской области. *Детские инфекции*. 2019; 18(1): 51–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-1-51-55>
- Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С., Монахова Е.В., Писанов Р.В., Водопьянов С.О. и др. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 33–41. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-33-41>
- Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Лозовский Ю.В., Гусева Н.П. Сравнительный MLVA-анализ штаммов *Vibrio cholerae* классического биовара, выделенных в России и за рубежом. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2016; (4): 88–92. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-88-92>
- George C.M., Rashid M., Almeida M., Saif-Ur-Rahman K.M., Monira S., Bhuyian M.S.I., et al. Genetic relatedness of *Vibrio cholerae* isolates within and between households during outbreaks in Dhaka, Bangladesh. *BMC Genomics*. 2017; 18(1): 903. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4254-9>
- Kachwamba Y., Mofham A.A., Lukupulo H., Urilo L., Majigo M., Moshaf F., et al. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates from outbreaks between 2011 and 2015 in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2252-9>
- Garrine M., Mandomando I., Vubil D., et al. Minimal genetic change in *Vibrio cholerae* in Mozambique over time: multilocus variable number tandem repeat analysis and whole genome sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(6): e0005671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005671>
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae*. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2017; 22(4): 195–200. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200>
- Водопьянов А.С., Мазрухо А.Б., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. VNTR-генотипирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных из объектов внешней среды на территории Российской Федерации в 2012 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; 91(2): 46–51.
- Селянская Н.А., Архангельская И.В., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Водяницкая С.Ю. и др. Типирование штаммов *Vibrio cholerae* не O1/не O139, изолированных в Ростовской области в 2014 году. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2016; 93(1): 3–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-1-3-9>
- Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н., Кругликов В.Д., Архангельская И.В. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации. *Здоровье населения и среда обитания*. 2015; (5): 41–4.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
- Сизова Ю.В., Писанов Р.В., Водопьянов А.С., Черепихина И.Я., Бурлакова О.С. Фенотипический и генотипический анализ токсинопродукции типичных и атипичных штаммов холерных вибрионов в стрессовых условиях окружающей среды. *Современные проблемы науки и образования*. 2017; (3): 141.
- Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И., Заднова С.П., Краснов Я.М., Крицкий А.А., Буаро М.И. и др. Молекулярно-генетические свойства штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, циркулирующих на Африканском континенте. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(1): 12–9. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-1-12-1>
- Buroni S., Pollini S., Rossolini G.M., Perrin E. Editorial: evolution of genetic mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Genet.* 2019; 10: 983. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00983>
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8): 1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
- Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5): 1077–88. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu088>
- Dash H.R., Shrivastava P., Mohapatra B.K., Das S., eds. *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*. Singapore: Springer; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1>
- Савельева И.В., Куличенко А.Н., Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Васильева О.В., Жиров А.М. и др. MLVA-типиро-

- вание клинических штаммов генетически измененных *Vibrio cholerae* biotype El tor, изолированных в России и Украине в период седьмой пандемии холеры. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018; 95(6): 37–43. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43>
25. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2015; 33(1): 15–22.
26. Nguyen D.T., Ngo T.C., Le T.H., Nguyen H.T., Morita M., Arakawa E., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in Northern Vietnam (2007–2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(9): 1007–12. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000317>
27. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., Li S., Voeglein J.B., Debes A.K., et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6): e0006492. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006492>
28. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 60: 80–8. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.02.023>
29. Hossain Z.Z., Leekitcharoenphon P., Dalsgaard A., Sultana R., Begum A., Jensen P.K.M., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Lett. Appl. Microbiol.* 2018; 67(4): 329–36. <https://doi.org/10.1111/lam.13046>
- REFERENCES
1. WHO. International Health Regulations (2005). Available at: https://www.who.int/ihr/IHR_2005_en.pdf
2. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., Das B., Ghosh A., Nair G.B. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front. Public Health*. 2019; 7: 203. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00203>
3. Greig D.R., Schaefer U., Octavia S., Hunter E., Chattaway M.A., Dallman T.J., et al. Evaluation of whole-genome sequencing for identification and typing of *Vibrio cholerae*. *J. Clin. Microbiol.* 2018; 56(11): e00831–18. <https://doi.org/10.1128/JCM.00831-18>
4. Moskvitina E.A., Tyuleneva E.G., Kruglikov V.D., Titova S.V., Vodop'yanov A.S., Kurilenko M.L., et al. Cholera: assessment of epidemiological situation on cholera around the world and in Russia in 2008–2017. Forecast for 2018. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2018; (1): 36–43. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2018-1-36-43> (in Russian)
5. Kharchenko G.A., Kimirilova O.G., Burkin V.S. Epidemiology and clinic of Cholera 1970 in the Astrakhan region. *Detskie infektsii*. 2019; 18(1): 51–5. <https://doi.org/10.22627/2072-8107-2019-18-1-51-55> (in Russian)
6. Onishchenko G.G., Moskvitina E.A., Vodop'yanov A.S., Monakhova E.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov S.O., et al. Retrospective molecular-epidemiological analysis of cholera epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 33–41. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-33-41> (in Russian)
7. Cheldyshova N.B., Kritskiy A.A., Lozovskiy Yu.V., Guseva N.P. Comparative MLVA-analysis of *Vibrio cholerae* strains of classical biovar, isolated in the Russian Federation and abroad. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2016; (4): 88–92. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2016-4-88-92> (in Russian)
8. George C.M., Rashid M., Almeida M., Saif-Ur-Rahman K.M., Monira S., Bhuyian M.S.I., et al. Genetic relatedness of *Vibrio cholerae* isolates within and between households during outbreaks in Dhaka, Bangladesh. *BMC Genomics*. 2017; 18(1): 903. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-4254-9>
9. Kachwamba Y., Mohammed A.A., Lukupulo H., Urio L., Majigo M., Mosha F., et al. Genetic characterization of *Vibrio cholerae* O1 isolates from outbreaks between 2011 and 2015 in Tanzania. *BMC Infect. Dis.* 2017; 17(1): 157. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2252-9>
10. Garrine M., Mandomando I., Vubil D., et al. Minimal genetic change in *Vibrio cholerae* in Mozambique over time: Multilocus variable number tandem repeat analysis and whole genome sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2017; 11(6): e0005671. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005671>
11. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2017; 22(4): 195–200. <https://doi.org/10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200> (in Russian)
12. Vodop'yanov A.S., Mazrukho A.B., Vodop'yanov S.O., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., et al. VNTR-genotyping of *Vibrio cholerae* strains isolated from objects in the territory of Russian Federation in 2012. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; 91(2): 46–51. (in Russian)
13. Selyanskaya N.A., Arkhangel'skaya I.V., Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Kruglikov V.D., Vodyanitskaya S.Yu., et al. Typing of *Vibrio cholerae* non O1/non O139 strains, isolated in Rostov region in 2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2016; 93(1): 3–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-1-3-9> (in Russian)
14. Vodop'yanov A.S., Vodop'yanov S.O., Oleynikov I.P., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaya I.V., et al. INDEL- and VNTR-typing *Vibrio cholerae* strains, isolated in 2013 from the environment objects in the Russian Federation. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*. 2015; (5): 41–4. (in Russian)
15. Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B.T., Levin S.A., Robinson T.P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015; 112(18): 5649–54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503141112>
16. Sizova Yu.V., Pisanov R.V., Vodop'yanov A.S., Cherepakhina I.Ya., Burlakova O.S. Phenotypic and genotypic analysis of toxin production of typical and atypical stamps of *Vibrio cholerae* in stress environmental conditions. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya*. 2017; (3): 141. (in Russian)
17. Cheldyshova N.B., Smirnova N.I., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Kritskiy A.A., Buaro M.I., et al. Molecular-genetic properties of *Vibrio cholerae* El tor strains circulating in Africa. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 35(1): 12–9. <https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-1-12-1>
18. Buroni S., Pollini S., Rossolini G.M., Perrin E. Editorial: evolution of genetic mechanisms of antibiotic resistance. *Front. Genet.* 2019; 10: 983. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00983>
19. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data; 2010. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
20. Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15): 2114–20. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
21. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013; 29(8): 1072–5. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086>
22. Bertels F., Silander O.K., Pachkov M., Rainey P.B., van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol. Biol. Evol.* 2014; 31(5): 1077–88. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu088>
23. Dash H.R., Shrivastava P., Mohapatra B.K., Das S., eds. *DNA Fingerprinting: Advancements and Future Endeavors*. Singapore: Springer; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-1583-1>

24. Savel'eva I.V., Kulichenko A.N., Savel'ev V.N., Kovalev D.A., Vasil'eva O.V., Zhirov A.M., et al. MLVA-typing of clinical stamps of genetically changed *Vibrio cholerae* biotype El tor insulated in Russia and Ukraine in the period of seventh pandemic cholera. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2018; 95(6): 37–43. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-37-43> (in Russian)
25. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Krasnov Ya.M. MLVA typing of clinical *Vibrio cholerae* strains isolated during different periods of the current cholera pandemic. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2015; 33(1): 15–22. (in Russian)
26. Nguyen D.T., Ngo T.C., Le T.H., Nguyen H.T., Morita M., Arakawa E., et al. Molecular epidemiology of *Vibrio cholerae* O1 in Northern Vietnam (2007–2009), using multilocus variable-number tandem repeat analysis. *J. Med. Microbiol.* 2016; 65(9): 1007–12. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000317>
27. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., Li S., Voeglein J.B., Debbs A.K., et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(6): e0006492. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006492>
28. Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. *Infect. Genet. Evol.* 2018; 60: 80–8. <https://doi.org/10.1016/j.mecgid.2018.02.023>
29. Hossain Z.Z., Leekitcharoenphon P., Dalsgaard A., Sultana R., Begum A., Jensen P.K.M., et al. Comparative genomics of *Vibrio cholerae* O1 isolated from cholera patients in Bangladesh. *Let. Appl. Microbiol.* 2018; 67(4): 329–36. <https://doi.org/10.1111/lam.13046>

Информация об авторах

Ковалев Дмитрий Анатольевич[✉] — к.х.н., зав. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Шапаков Николай Андреевич — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Писаренко Сергей Владимирович — к.х.н., в.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Савельева Ирина Вилорьевна — к.м.н., врач-бактериолог научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

Васильева Оксана Васильевна — к.м.н., зав. лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Савельев Вилорий Николаевич — д.м.н., г.н.с. лаб. эпидемиологии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Сирица Юлия Владимировна — биолог лаб. диагностики бактериальных инфекций Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Жиров Андрей Михайлович — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Ульшина Диана Васильевна — н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Кузнецова Ирина Владимировна — врач-бактериолог лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Бобрышева Ольга Викторовна — м.н.с. лаб. биохимии Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Куличенко Александр Николаевич — д.м.н., проф., член-корр. РАН, директор Ставропольского противочумного института, Ставрополь, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

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

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

Статья поступила в редакцию 28.05.2020;
принята к публикации 28.10.2020; опубликована 25.02.2021.

Information about the authors

Dmitry A. Kovalev[✉] — PhD (Chem.), Head, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, stavnipchi@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-9366-5647>

Nikolay A. Shapakov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9152-4026>

Sergey V. Pisarenko — PhD (Chem.), leading researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-6790>

Irina V. Savel'eva — PhD (Med.), doctor-bacteriologist, Research and production laboratory of drugs for the diagnosis of especially dangerous and other infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-1254-2259>

Oksana V. Vasil'eva — PhD (Med.), Head, Laboratory of diagnosis of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-8882-6477>

Vilory N. Savel'ev — D. Sci. (Med.), main researcher, Laboratory of epidemiology, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6458-3725>

Yulia V. Siritsa — biologist, Laboratory of diagnosis of bacterial infections, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-9442-6966>

Andrey M. Zhirov — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0002-7698-7361>

Diana V. Ul'shina — researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7754-2201>

Irina V. Kuznetsova — doctor-bacteriologist, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <http://orcid.org/0000-0001-9513-0761>

Olga V. Bobrysheva — junior researcher, Laboratory of biochemistry, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-6338-4476>

Aleksandr N. Kulichenko — D. Sci. (Med.), Prof., Associate Member of RAS, Director, Stavropol Plague Control Research Institute, Stavropol, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-9362-3949>

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.

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

The article was submitted 28.05.2020;
accepted for publication 28.10.2020; published 25.02.2021.