

© Коллектив авторов, 2022

УДК 579.843.1:576.3:612.017.4



Разработка схемы типирования токсигенных холерных вибрионов на основе данных биоинформационного анализа

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, Е.В. Монахова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ул. М. Горького, д. 117/40, г. Ростов-на-Дону, 344002, Российская Федерация

Резюме

Введение. Современный этап седьмой пандемии холеры характеризуется возникновением новых геновариантов *Vibrio cholerae*, постепенно вытесняющих своих предшественников и занимающих доминирующую позицию в этиологии заболевания. Определение их эпидемического потенциала с помощью идентификации целого ряда генетических маркеров непригодно для оперативного анализа. Поэтому актуальной представляется разработка способа дифференциации возбудителей, основанного на ПЦР-детекции ограниченного числа маркеров.

Цель исследования: создание на основе биоинформационного анализа базы данных полногеномных сиквенсов *V. cholerae*, содержащих разные аллели генов *cheA3* (VCA1095) и *rtxA*, и разработка простой и информативной схемы типирования токсигенных вибрионов.

Материалы и методы. Для анализа использовали полученные из базы NCBI результаты полногеномного секвенирования 3309 штаммов холерных вибрионов, выделенных в период 1962–2021 гг. Программное обеспечение разрабатывали на языке Java.

Результаты. Биоинформационный анализ базы полногеномных сиквенсов *V. cholerae*, включающей 3309 геномов штаммов третьей волны, позволил разделить их на три группы – «прегаитянскую», «гаитянскую» и «постгаитянскую». Все содержали аллели генов токсин-корегулируемых пилей *tcpA*^{CRS101} и цитотоксина MARTX *rtxA4* с null-мутацией, обусловившей формирование преждевременного стоп-кодона. Однако у «прегаитянских» штаммов всегда выявлялся ген субъединицы В холерного токсина классического типа *ctxB1* и прототипный ген гистидинкиназы *cheA3* (VCA1095), который в ПЦР образовал ампликон длиной 95 п.н. и был обозначен как VCA1095-95. У «гаитянских» штаммов в этом гене произошла делеция 8 п.н., и ПЦР-ампликон укоротился до 87 п.н. (VCA1095-87). Выявлено его обязательное сочетание с аллелем *ctxB7*. «Постгаитянские» штаммы содержали еще более укороченный аллель *rtxA4* за счет делеции 60 п.н. в проксимальной части.

Заключение. Поскольку анализ большого числа геномов выявил строгие корреляции между присутствием определенных аллелей в каждой группе, мы сочли возможным для оперативного анализа использовать всего два маркера – аллели генов *cheA3* и *rtxA*. Схема типирования, основанная на их ПЦР-детекции, в дальнейшем может быть применена для ускоренного определения эпидемического потенциала свежее выделенных культур.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, биоинформационный анализ, молекулярное типирование.

Для цитирования: Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Монахова Е.В. Разработка схемы типирования токсигенных холерных вибрионов на основе данных биоинформационного анализа // Здоровье населения и среда обитания. 2022. Т. 30. № 7. С. 66–71. doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-7-66-71>

Сведения об авторах:

Водопьянов Сергей Олегович – д.м.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры и других кишечных инфекций; e-mail: serge100v@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

✉ **Водопьянов** Алексей Сергеевич – к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии природно-очаговых и зоонозных инфекций; e-mail: alexvod@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Олейников Игорь Павлович – научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры и других кишечных инфекций; e-mail: alexvod@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>.

Монахова Елена Владимировна – д.б.н., главный научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры и других кишечных инфекций; e-mail: unicorm54@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: Водопьянов С.О.; сбор данных: Водопьянов А.С., Олейников И.П., Монахова Е.В.; анализ и интерпретация результатов: Водопьянов С.О., Водопьянов А.С.; подготовка рукописи: Водопьянов А.С. Все авторы ознакомились с результатами работы и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: Протокол исследования одобрен Комиссией по биомедицинской этике ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Протокол № 1 от 28.01.2021.

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Статья получена: 25.06.21 / Принята к публикации: 08.07.22 / Опубликовано: 29.07.22

Elaboration of a Toxigenic *Vibrio cholerae* Typing Scheme Based on Bioinformatics Analysis Data

Sergey O. Vodopyanov, Alexey S. Vodopyanov, Igor P. Oleynikov, Elena V. Monakhova

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute,
117/40 Maxim Gorky Street, Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation

Summary

Introduction: The current stage of the seventh cholera pandemic is characterized by the emergence of novel *Vibrio cholerae* gene variants, gradually replacing their predecessors and occupying a dominant position in the etiology of the disease. Determining their epidemic potential by identifying the number of genetic markers is unsuitable for operational analysis. Thus, the development of a method for differentiating pathogens based on PCR detection of a limited number of markers seems relevant.

Objective: To create a database of whole genome *V. cholerae* sequences containing different alleles of *cheA3* (VCA1095) and *rtxA* genes based on bioinformatics analysis data and to elaborate a simple and informative toxigenic vibrio typing scheme.

Materials and methods: The NCBI database-extracted results of whole genome sequencing of 3,309 strains of *Vibrio cholerae* isolated in 1962–2021 were used for the analysis. The software was developed in Java.

Results: The bioinformatics analysis of the database of whole genome *V. cholerae* sequences, including 3,309 genomes of third wave strains, enabled us to divide them into three groups: “pre-Haitian”, “Haitian”, and “post-Haitian”. All of them contained alleles of the genes of toxin-co-regulated *tcpA*^{CRS101} pili and the MARTX *rtxA4* cytotoxin with a null mutation that caused a premature stop codon. However, in the “pre-Haitian” strains, the gene of the cholera toxin subunit B of the classical *ctxB1* type and the prototype gene of histidine kinase *cheA3* (VCA1095) were always detected, which in PCR formed a

95 bp long amplicon and was designated as VCA1095-95. In the “Haitian” strains, a deletion of 8 bp occurred in this gene, and the PCR amplicon was shortened to 87 bp (VCA1095-87). Its mandatory combination with the *ctxB7* allele was revealed. The “post-Haitian” strains contained an even shorter *rtxA4a* allele due to the deletion of 60 bp in the proximal part.

Conclusion: Since the analysis of a large number of genomes revealed strict correlations between certain alleles in each group, we consider it possible to use only two markers for operational analysis, i.e. alleles of the *cheA3* and *rtxA* genes. The typing scheme based on their PCR detection can be used to facilitate determination of the epidemic potential of newly isolated cultures.

Keywords: *Vibrio cholerae*, bioinformatic analysis, molecular typing.

For citation: Vodopyanov SO, Vodopyanov AS, Oleynikov IP, Monakhova EV. Elaboration of a toxigenic *Vibrio cholerae* typing scheme based on bioinformatics analysis data. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2022;30(7):66-71. (In Russ.) doi: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2022-30-7-66-71>

Author information:

Sergey O. **Vodopyanov**, Dr. Sci. (Med.), Chief Researcher, Laboratory of Microbiology of Cholera and Other Intestinal Infections; e-mail: serge100v@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>.

✉ Alexey S. **Vodopyanov**, Cand. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology of Naturally Occurring and Zoonotic Infections; e-mail: alexvod@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>.

Igor P. **Oleynikov**, Researcher, Laboratory of Microbiology of Cholera and Other Intestinal Infections; e-mail: alexvod@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2390-9773>.

Elena V. **Monakhova**, Dr. Sci. (Biol.), Chief Researcher, Laboratory of Microbiology of Cholera and Other Intestinal Infections; e-mail: unicorm54@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9216-7777>.

Author contributions: study conception and design: *Vodopyanov S.O.*; data collection: *Vodopyanov A.S.* *Oleynikov I.P.*, *Monakhova E.V.*; analysis and interpretation of results: *Vodopyanov S.O.*, *Vodopyanov A.S.*; draft manuscript preparation: *Vodopyanov A.S.* All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: The study protocol was approved by the Biomedical Ethics Commission of the Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Minutes No. 1 of January 28, 2021.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

Received: June 25, 2021 / Accepted: July 8, 2022 / Published: July 29, 2022

Введение. Возбудитель холеры находится в процессе постоянной эволюции, и поэтому практически каждая крупная вспышка инфекции вызывается генетически отличающимися вариантами. На территории Российской Федерации неоднократно регистрировали завозы токсигенных холерных вибрионов, однако распространения среди людей удавалось избежать благодаря своевременному проведению комплекса мероприятий. Условием обеспечения адекватного ответа является быстрое определение эпидемического потенциала каждого свежeweделенного штамма, включающее выявление полного спектра уникальных генетических маркеров, позволяющих установить происхождение конкретного возбудителя.

В настоящее время описано много генетических детерминант, позволяющих судить о патогенном потенциале вибрионов: аллельный профиль генов субъединицы В холерного токсина (*ctxB*) и структурной единицы токсин-регулируемых пилей адгезии (*tcpA*), структура острова пандемичности VSP-II, гены дополнительных токсинов, ICE-элементы, островок VcB, набор уникальных SNP и ряд других [1–5]. Однако быстрое и одномоментное выявление столь большого числа генетических маркеров представляет определенные трудности. Наиболее информативен метод полногеномного секвенирования с последующим биоинформационным анализом, но его использование в оперативных целях затруднено. Для оперативного анализа наиболее пригоден метод ПЦР, позволяющий получить информацию о наличии конкретных генетических детерминант в течение нескольких часов с момента выделения культуры.

Показателем интереса исследователей является число депонированных нуклеотидных последовательностей в международных базах данных. Так, если в 2019 году в базу NCBI было добавлено 442 генома холерных вибрионов, то в 2020 г. — уже 1872 генома, из которых 1697 — в декабре 2020 г. Этот массив данных открывает возможность для биоинформационного анализа.

По результатам анализа установлено, что геном *V. cholerae* обладает высокой пластичностью и поэтому штаммы, вызвавшие крупные вспышки в последнее время (Гаити, Йемен), отличаются рядом уникальных маркеров [3–5].

Первые геноварианты отличались от типичных штаммов Эль Тор только наличием гена *ctxB1* классического типа (вместо *ctxB3* типа Эль Тор). В дальнейшем им на смену стали приходить штаммы, содержащие сразу 2 отличных от типовых маркера: аллель *tcpA^{CIRS101}* вместо *tcpA^{El Tor}* и гена *rtxA*, кодирующего синтез высокомолекулярного цитотоксина-актиномодулятора MARTX, с null-мутацией, приведшей к формированию преждевременного стоп-кодона. Этот аллель с укороченной ORF был обозначен Dolores, Satchell [3, 6] как *rtxA4*. Такие штаммы мы условно называем «предгаитянскими», поскольку они, по всей видимости, являются предшественниками т.н. «гаитянских» штаммов, которые приобрели новый аллель *ctxB7*. Последний сформировался на фоне генотипа *tcpA^{CIRS101}rtxA4*. С 2010 г. после крупномасштабной эпидемии в Гаити началось их стремительное распространение по всему миру. Наконец, в последнее время наметилась тенденция к замещению «гаитянской» линии «постгаитянской», представители которой содержат еще более укороченный *rtxA* за счет делеции 60 пар нуклеотидов (п.н.) в проксимальной части гена в дополнение к null-мутации на дистальном конце; этот аллель обозначен как *rtxA4a* [3]. Позднее для «гаитянских» штаммов была описана делеция 8 п.н. в гене VCA1095 [7]. Он локализован в составе кластера хемотаксиса III на малой хромосоме и кодирует гистидинкиназу CheA-3 [8–10]. Две указанные делеции рассматриваются как перспективные маркеры токсигенных штаммов холерного вибриона, распространившихся в течение последних нескольких лет [3, 7]. Однако это предположение высказано на основании исследования ограниченного числа штаммов.

Цель исследования: создание на основе биоинформационного анализа базы данных

полногеномных сиквенсов *V. cholerae*, содержащих разные аллели генов *cheA3* (VCA1095) и *rtxA*, и разработка простой и информативной схемы типирования токсигенных вибрионов.

Материалы и методы. Для анализа использовали полученные из базы NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) результаты полногеномного секвенирования 3309 штаммов холерных вибрионов, выделенных в период 1962–2021 гг. Наименования генов и позицию INDEL-маркера VCA1095 указывали по референсному геному штамма *V. cholerae* N16961 (GenBank Accession Number NC002505.1 и NC002506.1). Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [1, 7]. Программное обеспечение разрабатывали на языке программирования Java. Кластерный анализ проводили с использованием авторского программного обеспечения по методу UPGMA. Сведения о свойствах штаммов (дате, месте выделения) брали из аннотаций к сиквенсам.

Результаты. Первым этапом работы было создание локальной базы данных геномов на основе поиска в NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). База включала 3309 геномов, 10 из которых были представлены в виде набора ридов. При этом до 2010 г. было выделено 1032 штамма, а начиная с 2010 г. изолировано 2277 штаммов.

Как установлено ранее, делеция 8 п.н. в гене *cheA3* (VCA1095) приводит к формированию в ПЦР фрагмента длиной 87 п.н., обозначенного авторами как «гаитянский» маркер VCA1095-87 в противовес прототипному фрагменту размером 95 п.н. – маркер VCA1095-95 [7]. В локальной базе выявлено 583 штамма, несущих «гаитянский» маркер VCA1095-87. Все штаммы обладали генами холерного токсина, имели идентичный INDEL-генотип [11], характерный для токсигенных штаммов, и содержали ICE-элемент «индийского» типа [2]. До 2010 г. распространение

штаммов с «гаитянским» маркером VCA1095-87 имело единичный характер: восемь штаммов выявлено в Индии и один в Китае. Резкий подъем заболеваемости холерой, вызванной штаммами вибрионов с маркером VCA1095-87, был отмечен начиная с 2010 г. (табл. 1). При этом данным маркером обладали все 266 представленных в NCBI штаммов, выделенных собственно в Гаити за период 2010–2017 гг. В последующем штаммы с маркером VCA1095-87 выделялись ежегодно при всех крупных вспышках.

Первый токсигенный штамм с аллелем *rtxA4a* был выделен в 2012 г. в Индии, в этом же году такой штамм был завезен из Индии в РФ [3]. Всего выявлено 135 штаммов, несущих аллель *rtxA4a* и маркер «гаитянского» типа VCA1095-87. Распределение штаммов, несущих одновременно «гаитянский» маркер VCA1095-87 и *rtxA4a*, приведенное в табл. 1, показывает их несколько меньшее распространение по сравнению со штаммами с VCA1095-87 и *rtxA4*. Интересно отметить, что ни одного штамма с маркером *rtxA4a* не было выделено в Гаити, несмотря на продолжение вспышки до 2017 г. и на достаточно широкое распространение подобных штаммов по всему миру. Это свидетельствует в пользу отсутствия повторных заносов холеры в Гаити в последующие годы.

Начиная с 2012 г. штаммы с маркерами VCA1095-87 и *rtxA4a* ежегодно выделялись на территории Индии, что свидетельствовало об их укоренении, причем это укоренение сопровождалось неоднократными заносами в другие регионы мира. Самой крупной вспышкой, вызванной этим типом, явились события в Йемене, когда все штаммы одновременно несли оба изучаемых признака. Учитывая клональную природу вспышки в Йемене [12], полученные данные на наш взгляд позволяют рассматривать вибрионы,

Таблица 1. Распределение ctx+ штаммов *V. cholerae*, несущих «гаитянский» маркер VCA1095-87 и аллель *rtxA4a*

Table 1. Distribution of ctx+ strains of *V. cholerae* carrying the “Haitian” VCA1095-87 marker and the *rtxA4a* allele

Год выделения / Year of isolation	Маркер VCA1095-87 + аллель <i>rtxA4</i> / VCA1095-87 marker + <i>rtxA4</i> allele		Маркер VCA1095-87 + аллель <i>rtxA4a</i> / VCA1095-87 marker + <i>rtxA4a</i> allele	
	Число штаммов / Number of strains	Территория / Territory	Число штаммов / Number of strains	Территория / Territory
2010	41	Гаити, Бангладеш, Камерун, РФ / Haiti, Bangladesh, Cameroon, Russia	–	–
2011	22	Бангладеш, Камерун, Украина / Bangladesh, Cameroon, Ukraine	–	–
2012	35	Гаити, Бангладеш, Индия, РФ / Haiti, Bangladesh, India, Russia	2	Индия, РФ / India, Russia
2013	46	Гаити, Индия, Мексика / Haiti, India, Mexico	5	Индия / India
2014	24	Гаити, Индия, РФ, Уганда / Haiti, India, Russia, Uganda	8	Индия, РФ, Уганда / India, Russia, Uganda
2015	70	Гаити, Индия, Танзания / Haiti, India, Tanzania	30	Индия, Танзания / India, Tanzania
2016	51	Гаити, Индия, Танзания, Йемен, Уганда / Haiti, India, Tanzania, Yemen, Uganda	20	Индия, Бангладеш, Йемен, Уганда / India, Bangladesh, Yemen, Uganda
2017	77	Гаити, Индия, Танзания, Йемен, Бангладеш, Кения, Ирак / Haiti, India, Tanzania, Yemen, Bangladesh, Kenya, Iraq	23	Индия, Танзания, Йемен, Бангладеш, Кения, Ирак / India, Tanzania, Yemen, Bangladesh, Kenya, Iraq
2018	27	Бангладеш, Китай, Зимбабве, Йемен, Индия / Bangladesh, China, Zimbabwe, Yemen, India	27	Бангладеш, Китай, Зимбабве, Йемен, Индия / Bangladesh, China, Zimbabwe, Yemen, India
2019	33	Англия / England	6	не указано / not specified

несущие одновременно маркеры VCA1095-87 и *rtxA4a*, как «постгаитянский» тип. В этом случае группу, условно названную «предгаитянской», сформировали штаммы, несущие VCA1095-95 и *rtxA4*. Штаммов, имеющих сочетание VCA1095-95 и *rtxA4a*, не обнаружено.

Описанный подход был апробирован нами для анализа выборки объемом 471 штамм холерного вибриона серогруппы O1, выделенных, по сведениям GenBank, начиная с 2015 г. По данным биоинформационного анализа, 357 штаммов содержали профаг CTX, остров патогенности VPI, островок VcB, ICE-элементы и характеризовались INDEL-генотипом, типичным для токсинпродуцирующих культур [1–4, 11], что позволяет отнести их к штаммам третьей волны седьмой пандемии [4, 5].

По результатам анализа выборки токсигенных штаммов установлено, что «гаитянские» VCA1095-87 *rtxA4* штаммы выделялись на Гаити до 2017 г. и в Индии (2015 г.), а также во многих других странах вплоть до 2018 г. (табл. 1). В 2019 г. в Англии от людей было изолировано 27 штаммов данного типа (при этом информация о характере вспышки в литературе отсутствует). Очевидно, это обусловлено тем фактом, что вытеснение линий происходит очень постепенно. Тем не менее штаммы, циркулировавшие в мире до появления «предгаитянской» группы, содержащие VCA1095-95 и прототипный аллель *rtxA1* (без null-мутации), а также *ctxB1* и *tcpA^{El Tor}*, на настоящий момент практически утратили актуальность и встречаются редко, вызывая лишь спорадические либо групповые случаи [3, 12], поэтому не были включены в наше исследование.

Согласно предложенной классификации «постгаитянские» штаммы, помимо Йемена, в период 2015–2020 гг. неоднократно выделялись в Бангладеш, Индии, Танзании, Кении, Китае и Зимбабве [13]. Штаммы, относящиеся к «предгаитянскому» типу, в настоящее время циркулируют в Бангладеш, о чем свидетельствует их практически ежегодное выделение в Конго (2015–2017 гг.), отмечены их заносы в Танзанию, Уганду (2015 г.), Катар, Судан (2017 г.), Анголу (2018 г.) [14–17]. Предлагаемая классификация, на взгляд авторов, имеет большое значение, поскольку результаты ежегодного мониторинга за холерой свидетельствуют о высоком эпидемическом потенциале холерного вибриона и сохранении постоянной угрозы заноса холеры на территорию Российской Федерации [18–21].

Обсуждение. На основании проведенной работы по наличию двух генетических детерминант мы предлагаем разделить все токсигенные штаммы, представляющие третью волну [4, 13], на три группы: «предгаитянскую», «гаитянскую» и «постгаитянскую». Данная классификация проста и понятна и может служить хорошим дополни-

ем к имеющейся классификации, основанной на детекции различных аллелей гена *ctxB*.

Ранее было показано, что «предгаитянские» штаммы приобрели сразу 2 маркера — *tcpA^{CIRS}* и *rtxA4*, сохранив аллель *ctxB1*, и высказано предположение о том, что способность к синтезу холерного токсина классического типа сделало излишним энергозатратное функционирование высокомолекулярного MARTX, и продукт усеченного гена утратил биологическую активность. На этом фоне возник аллель *ctxB7* [6] — маркер «гаитянской» линии. Одновременно с ним нами установлено появление усеченного гена *cheA3* (VCA1095-87) за счет сдвига рамки считывания и формирования преждевременного стоп-кодона в результате делеции 8 п.н. [7]. Мы не исключаем, что продукт этого гена, подобно продукту *rtxA4*, также утратил свойственную ему активность в целях энергосбережения для успешного размножения, тем более что, согласно данным Gosink и соавт. [8], он не оказывает существенного влияния на хемотаксис (в отличие от его гомолога CheA2 — продукта гена VC2063 в составе большой хромосомы). Наконец, дополнительная делеция 60 п.н. в гене *rtxA4* привела к дальнейшему укорочению MARTX и образованию аллеля *rtxA4a* — маркера «постгаитянской» линии [3].

Заключение. Результаты проведенного нами анализа большой выборки геномов эпидемических штаммов холерных вибрионов позволили установить, что «предгаитянские» штаммы всегда содержат аллель *ctxB1* и прототипный *cheA3* (VCA1095-95), тогда как у «гаитянских» присутствует обязательное сочетание *ctxB7* и «гаитянского» *cheA3* (VCA1095-87), а «постгаитянские» отличаются от последних содержанием аллеля *rtxA4a*.

Поскольку определение аллелей *ctxB*, *tcpA* и *rtxA* связано с применением МАМА-ПЦР [14–16], постановка которой представляет определенные трудности, мы сочли возможным для оперативного анализа использовать два маркера, что сократит материальные, трудовые и временные затраты. Выявление двух маркеров VCA 1095-87 и *rtxA4a* не представляет особой сложности и может быть оперативно проведено в течение нескольких часов с момента выделения чистой культуры. Кроме того, ранее нами уже разработан способ детекции с помощью ПЦР в формате реального времени по конечной точке прототипного и «гаитянского» аллелей гена *cheA3* (VCA1095-95 и VCA1095-87), который может быть проведен в течение менее двух часов [17]. На наш взгляд, разработка подобного способа идентификации делеции 60 п.н. в гене *rtxA4a* в таком же формате не представляет особой сложности. Таким образом, предлагаемая схема типирования токсигенных вибрионов по выявлению двух маркеров VCA 1095-87 и *rtxA4a* в дальнейшем может быть с успехом применена для оперативного анализа свежесделанных культур.

Таблица 2. Распределение *ctx+* штаммов *V. cholerae*, выделенных с 2015 по 2020 г. по наличию двух генетических детерминант – VCA1095 и *rtxA4*

Table 2. Distribution of *ctx+* strains of *V. cholerae* isolated in 2015–2020 by the presence of VCA1095 and *rtxA4* genetic determinants

Группа / Group	Тип штамма / Strain type	Число штаммов O1 / Number of O1 strains	Маркер гена <i>cheA3</i> / <i>cheA3</i> (VCA1095) marker	Аллель гена <i>rtxA</i> / <i>rtxA</i> allele
1	«предгаитянский» / “pre-Haitian”	95	VCA 1095-95	<i>rtxA4</i>
2	«гаитянский» / “Haitian”	153	VCA 1095-87	<i>rtxA4</i>
3	«постгаитянский» / “post-Haitian”	109	VCA 1095-87	<i>rtxA4a</i>

Список литературы

1. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Мишанькин Б.Н., Олейников И.П., Дуванова О.В. Корреляция между наличием области вариабельного tandemного повтора VCB и островком патогенности VPI-1 у *Vibrio cholerae* // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2017. Т. 35. № 2. С. 49–52. doi: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-49-52
2. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Титова С.В. Распространенность ICE элементов различных типов у *V. cholerae* // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 1 (298). С. 33–35. doi: 10.35627/2219-5238/2018-298-1-33-35
3. Монахова Е.В., Ghosh A., Mutreja A., Weill F., Ramamurthy T. Эндемичная холера в Индии и завозная холера в России: что общего? // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 3. С. 17–26. doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26
4. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011;477(7365):462–465. doi: 10.1038/nature10392
5. Ramamurthy T, Mutreja A, Weill FX, Das B, Ghosh A, Nair GB. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front Public Health*. 2019;7:203. doi: 10.3389/fpubh.2019.00203
6. Dolores J, Satchell KJ. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013;4(2):e00624. doi: 10.1128/mBio.00624-12
7. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Писанов Р.В. Выявление штаммов *Vibrio cholerae* «гаитянской» группы с помощью полимеразной цепной реакции на основе INDEL-типирования // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2020. № 3. С. 265–270. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-9
8. Gosink KK, Kobayashi R, Kawagishi I, Häse CC. Analyses of the roles of the three cheA homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2002;184(6):1767–1771. doi: 10.1128/JB.184.6.1767-1771.2002
9. Ortega DR, Kjaer A, Briegel A. The chemosensory systems of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2020;114(3):367–376. doi: 10.1111/mmi.14520
10. Ringgaard S, Hubbard T, Mandlik A, Davis BM, Waldor MK. RpoS and quorum sensing control expression and polar localization of *Vibrio cholerae* chemotaxis cluster III proteins in vitro and in vivo. *Mol Microbiol*. 2015;97(4):660–675. doi: 10.1111/mmi.13053
11. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П., Мишанькин Б.Н. INDEL-типирование штаммов *Vibrio cholerae* // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2017. Т. 22. № 4. С. 195–200. doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
12. Weill F-X, Domman D, Njamkepo E, et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature*. 2019;565(7738):230–233. doi: 10.1038/s41586-018-0818-3
13. Baddam R, Sarker N, Ahmed D, et al. Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2020;11(1):e03339-19. doi: 10.1128/mBio.03339-19
14. Ghosh P, Naha A, Basak S, et al. Haitian variant tcpA in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in Kolkata, India. *J Clin Microbiol*. 2014;52(3):1020–1021. doi: 10.1128/JCM.03042-13
15. Ghosh P, Naha A, Pazhani GP, Ramamurthy T, Mukhopadhyay AK. Genetic traits of *Vibrio cholerae* O1 Haitian isolates that are absent in contemporary strains from Kolkata, India. *PLoS One*. 2014;9(11):e112973. doi: 10.1371/journal.pone.0112973
16. Naha A, Pazhani GP, Ganguly M, et al. Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant ctxB in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. *J Clin Microbiol*. 2012;50(5):1733–1736. doi: 10.1128/JCM.00387-12
17. Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П. Способ выявления токсигенных штаммов O1 *Vibrio cholerae* «гаитянской» группы методом ПЦР в режиме реального времени по конечной точке. Патент РФ на изобретение RU 2729218. C12Q 1/68 (2020.02). Опубликовано: 05.08.2020, Бюл. № 22. Доступно по: https://yandex.ru/patents/doc/RU2729218C1_20200805. Ссылка активна на 25 января 2022.
18. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д. и др. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии // Вестник Российской академии медицинских наук. 2015. Т. 70. № 2. С. 249–256. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1320
19. Москвитина Э.А., Янович Е.Г., Куриленко М.Л. и др. Холера: мониторинг эпидемиологической обстановки в мире и России (2010–2019 гг.). Прогноз на 2020 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2020. № 2. С. 38–47. doi: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47
20. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Характеристика эпидемиологической ситуации по холере в мире и в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз на 2021 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2021. № 1. С. 43–51. doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51
21. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Холера: тенденции развития эпидемического процесса в 2021 г., прогноз на 2022 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 1. С. 24–34. doi: 10.21055/0370-1069-2022-1-24-34

References

1. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Mishan'kin BN, Oleinikov IP, Duvanov OV. Correlation between the presence of the VCB variable tandem repeat region and the VPI-1 pathogenicity island in *Vibrio cholerae*. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2017;35(2):49–52. (In Russ.) doi: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-49-52
2. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Titova SV. Prevalence of ICE elements of different types in *V. cholerae*. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2018;(1298):33–35. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2018-298-1-33-35
3. Monakhova EV, 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. doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26
4. Mutreja A, Kim DW, Thomson NR, et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic. *Nature*. 2011;477(7365):462–465. doi: 10.1038/nature10392
5. Ramamurthy T, Mutreja A, Weill FX, Das B, Ghosh A, Nair GB. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae*. *Front Public Health*. 2019;7:203. doi: 10.3389/fpubh.2019.00203
6. Dolores J, Satchell KJ. Analysis of *Vibrio cholerae* genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates. *mBio*. 2013;4(2):e00624. doi: 10.1128/mBio.00624-12
7. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Pisanov RV. Identification of *Vibrio cholerae* strains of the “Haitian” group by PCR based on INDEL-typing. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2020;(3):265–270. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-9
8. Gosink KK, Kobayashi R, Kawagishi I, Häse CC. Analyses of the roles of the three cheA homologs in chemotaxis of *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol*. 2002;184(6):1767–1771. doi: 10.1128/JB.184.6.1767-1771.2002
9. Ortega DR, Kjaer A, Briegel A. The chemosensory systems of *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol*. 2020;114(3):367–376. doi: 10.1111/mmi.14520
10. Ringgaard S, Hubbard T, Mandlik A, Davis BM, Waldor MK. RpoS and quorum sensing control expression

- and polar localization of *Vibrio cholerae* chemotaxis cluster III proteins in vitro and in vivo. *Mol Microbiol.* 2015;97(4):660-675. doi: 10.1111/mmi.13053
11. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Oleinikov IP, Mishankin BN. INDEL-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni.* 2017;22(4):195-200. (In Russ.) doi: 10.18821/1560-9529-2017-22-4-195-200
 12. Weill F-X, Domman D, Njamkepo E, *et al.* Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen. *Nature.* 2019;565(7738):230-233. doi: 10.1038/s41586-018-0818-3
 13. Baddam R, Sarker N, Ahmed D, *et al.* Genome dynamics of *Vibrio cholerae* isolates linked to seasonal outbreaks of cholera in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2020;11(1):e03339-19. doi: 10.1128/mBio.03339-19
 14. Ghosh P, Naha A, Basak S, *et al.* Haitian variant tcpA in *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 2014;52(3):1020-1021. doi: 10.1128/JCM.03042-13
 15. Ghosh P, Naha A, Pazhani GP, Ramamurthy T, Mukhopadhyay AK. Genetic traits of *Vibrio cholerae* O1 Haitian isolates that are absent in contemporary strains from Kolkata, India. *PLoS One.* 2014;9(11):e112973. doi: 10.1371/journal.pone.0112973
 16. Naha A, Pazhani GP, Ganguly M, *et al.* Development and evaluation of a PCR assay for tracking the emergence and dissemination of Haitian variant ctxB in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated from Kolkata, India. *J Clin Microbiol.* 2012;50(5):1733-1736. doi: 10.1128/JCM.00387-12
 17. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP. [An end-point real-time PRC method for detection of toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 of Haitian variant.] RUS No. 2729218 C1 (Patent) 2020. (In Russ.) Accessed January 25, 2022. https://yandex.ru/patents/doc/RU2729218C1_20200805
 18. Onishhenko GG, Moskvitina JeA, Kruglikov VD, *et al.* Epidemiological surveillance of cholera in Russia during the period of the seventh pandemic. *Vestnik Rossiyskoy Akademii Meditsinskikh Nauk.* 2015;70(2):249-256. doi: 10.15690/vramn.v70i2.1320
 19. Moskvitina EA, Yanovich EG, Kurilenko MI, *et al.* Cholera: Monitoring of epidemiological situation around the world and in Russia (2010–2019). Forecast for 2020. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy.* 2020;(2):38-47. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2020-2-38-47
 20. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, *et al.* Characteristics of the epidemiological situation on cholera in the world and in the Russian Federation in 2020 and forecast for 2021. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy.* 2021;(1):43-51. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2021-1-43-51
 21. Noskov AK, Kruglikov VD, Moskvitina EA, *et al.* Cholera: Trends in the development of the epidemic process in 2021, forecast for 2022. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy.* 2022;(1):24-34. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2022-1-24-34

