

ГЕНОМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERA*E O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПЕРИОД ТРЕХ ВОЛН 7-Й ПАНДЕМИИ ХОЛЕРЫ

Смирнова Н. И. ¹,

Рыбальченко Д. А. ¹,

Лозовский Ю. В. ¹,

Краснов Я. М. ¹,

Щелканова Е. Ю. ¹,

Федоров А. В. ¹,

Кутырев В. В. ¹

¹ ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора,
Саратов, Российская Федерация.

**GENOMIC DIVERSITY OF TOXIGENIC *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 BIOVAR
EL TOR STRAINS ISOLATED DURING THREE WAVES OF THE 7TH
CHOLERA PANDEMIC**

Smirnova N. I. ^a,

Rybal'chenko D. A. ^a,

Lozovsky Yu. V. ^a,

Krasnov Ya. M. ^a,

Shchelkanova E. Yu. ^a,

Fedorov A. V. ^a,

Kutyrev V. V. ^a

^a FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov,
Russian Federation.

Резюме

Введение. Высокая вариабельность генома возбудителя 7-й пандемии холеры *V. cholerae* Эль Тор привела к возникновению различных генетических вариантов, имеющих разный набор измененных генов, кодирующих факторы патогенности и резистентность к антибиотикам. Цель работы – анализ динамики изменения генов патогенности, эпидемичности и лекарственной устойчивости токсигенных штаммов *V. cholerae* Эль Тор из России и эндемичных по холере регионов, выделенных в период трех волн текущей пандемии, и их филогенетический анализ. *Материалы и методы.* Использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 155 токсигенных штаммов *V. cholerae* Эль Тор, полученных нами (42 штаммов) и взятых из NCBI GenBank (113 изолятов). Секвенирование ДНК проводили на платформе «Ion PGM» Филогенетические связи штаммов определяли на основе байесовского анализа коровых SNP, полученных с помощью программного пакета Snippy 4.6. Резистентность к антибиотикам оценивали диско-диффузионным методом. *Результаты.* На основании SNP-анализа установлено деление исследуемых штаммов (1970-2023 гг.) на три кластера. Показана четкая корреляция между генотипом штаммов каждого кластера и временным периодом их выделения. Обособление генетические измененных штаммов из кластеров II и III, выделенных в период 2-й и 3-й волн пандемии, от типичных штаммов из кластера I, было связано с приобретением ими новых участков ДНК (гена *ctxB1* и разных типов ICE), а также мутациями в генах патогенности и лекарственной устойчивости. Вследствие разного сочетания мутаций штаммы кластера III были генетически неоднородны. Сравнение геномов изучаемых штаммов показало, что их разнообразие значительно возросло в период 3-й волны пандемии, что привело к появлению новых геновариантов с повышенным патогенным и эпидемическим потенциалом. Показано, что резистентность к антибиотикам штаммов как из эндемичных регионов, так и из России за последние 30 лет (1993-2023 гг.) претерпела существенные изменения за счет различных мутаций. При этом меняющаяся

лекарственная устойчивость вариантов четко коррелировало с возникновением в их геноме мутаций в различных генах патогенности. *Заключение.* Показано, что на протяжении двух последних десятилетий происходило довольно быстрое изменение генома возбудителя, следствием которого явилось возникновение различных геновариантов. Установлена смена вариантов возбудителя в России. Особую обеспокоенность вызывают штаммы, сочетающие генетические маркеры гипервирулентности и множественной лекарственной устойчивости. Вариабельность генома штаммов из России указывает на необходимость проведения постоянного геномного надзора за ними с целью получения данных об изменении их эпидемически важных свойств для своевременного создания новых средств диагностики и профилактики.

Ключевые слова: *V. cholerae*, вариабельность генома, патогенность, лекарственная устойчивость, филогения, геномный надзор.

Abstract.

Introduction. High genome variability of the 7th cholera pandemic agent, *V. cholerae* El Tor, led to emergence of genovariants with distinct set of altered genes. *The aim* of the work was to analyze the dynamics of changes in pathogenicity, epidemicity as well as drug resistance and phylogeny in toxigenic strains of *V. cholerae* El Tor isolated in Russia and endemic regions during three waves of ongoing pandemic. *Materials and methods.* We used whole-genome nucleotide sequences of 155 strains, obtained by us (42) and taken from the NCBI Genbank (113). DNA sequencing was performed on Ion PGM platform. Phylogenetic relations were determined based on the Bayesian analysis of core SNPs obtained using Snippy 4.6 software package. Antibiotic resistance was assessed applying disk diffusion test. *Results.* SNP data revealed that the studied strains (1970-2023) might be divided into three clusters. A clear correlation between each-cluster strain genotype and relevant isolation timing was observed. Separation of genetically altered cluster II and III strains isolated during the 2nd and 3rd waves of the pandemic from typical cluster I strains is associated with acquisition of new DNA regions and mutations in pathogenicity and drug resistance genes. Due to different combination of mutations, cluster III strains are genetically heterogeneous. Genome comparison showed that this diversity increased dramatically during the 3rd wave, which led to emergence of new genovariants with higher pathogenic and epidemic potential. It is demonstrated that antibiotic resistance in strains both from endemic regions and Russia over the past 30 years (1993-2023) has undergone significant changes. Thereat, the changing drug resistance clearly correlated with the occurrence of mutations in various pathogenicity genes. *Conclusion.* It is shown that over the past two decades the agent genome underwent a rather rapid change resulting in emergence of various genovariants. A change in the pathogen variants in Russia has been established. Strains combining genetic markers of hypervirulence and multiple drug resistance are of particular concern. Genome variability of the strains identified in points at a need for constant genomic surveillance to

obtain data on altering epidemically important properties for timely generation of new diagnostic and preventive means.

Keywords: *V. cholerae*, genome variability, pathogenicity, drug resistance, phylogeny, genomic surveillance.

1 **1 Введение**

2 На протяжении более 60 лет мы являемся свидетелями развития 7-й
3 пандемии холеры, начавшейся в 1961 г. на Индийском субконтиненте, откуда
4 происходило ее распространение по всему миру тремя независимыми, но
5 перекрывающимися волнами [1, 19]. Продолжающиеся в настоящее время
6 эпидемии и вспышки холеры в эндемичных странах Юго-Восточной Азии,
7 Африки, Южной Америки создают реальные риски ее завоза в другие
8 регионы, включая Россию, территория которой является неэндемичной. Все
9 зарегистрированные эпидемические вспышки или спорадические случаи
10 холеры в России всегда имели заносной характер [4, 6]. Возбудителем текущей
11 пандемии являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* серогруппы O1
12 биовара Эль Тор, относящиеся к типичным и генетическим измененным или
13 геновариантам. Патогенность типичных штаммов, вызвавших 1-ю волну
14 пандемии (1961-1990 гг.), обусловлена присутствием в геноме профага
15 СТХф^{EITor} с опероном *ctxAB3*, кодирующим холерный токсин (или СТ), и
16 острова патогенности VPI-1 с генами *tcpA*^{EITor}-*F*, определяющими продукцию
17 токсин-корегулируемых пилей (или TCP) - основного фактора колонизации
18 кишечника человека [21, 23]. Пандемический (эпидемический) потенциал
19 связан с островом пандемичности VSP-II, продукты генов которого
20 обеспечивают высокий уровень адаптации возбудителя к меняющимся
21 условиям окружающей среды [15].

22 Однако в дальнейшем геном возбудителя в процессе эволюции
23 претерпел большие изменения, что привело к появлению различных
24 геновариантов, отличающихся от типичных штаммов генетическими и
25 фенотипическими свойствами. Впервые возникшие генетические варианты
26 (1991-1994 гг.) вызвали 2-ю волну пандемии, вытеснив типичные штаммы [19,
27 20]. Ключевым событием в их формировании стало приобретение
28 возбудителем холеры Эль Тор горизонтально перенесенных генов *ctxAB1* из
29 профага СТХф^{Class} холерных вибрионов классического биовара - возбудителя
30 предыдущих шести пандемий азиатской холеры [20]. Второе важное событие

31 – появление в геноме патогена интегративного конъюгативного элемента (или
32 ICE) SXT с генами резистентности к различным антибиотикам [10, 25]. Из 30
33 его известных типов наиболее распространенными были ICEVchInd5(*floR*,
34 *strAB*, *sul2*, *dfrA1*) и ICEVchBan9(*floR*, *strAB*, *sul2*, *tetAR*, *dfrA1*). Основное
35 различие между ними - разный набор генов резистентности к антибиотикам.
36 [2, 7, 16, 25]. Приобретение новой генетической информации привело к
37 повышению вирулентности и антимикробной устойчивости патогена, а также
38 получению вариантами селективного преимущества относительно типичных
39 штаммов, что обусловило вытеснение последних практически во всех
40 эндемичных регионах [12,28]. Тем не менее, примерно через 10 лет в период
41 3-й волны пандемии произошла замена этих вариантов новыми [19].

42 Характерной особенностью генома штаммов из 3-й волны пандемии
43 стали точечные мутации в ключевых и дополнительных генах патогенности и
44 лекарственной устойчивости, а также внутригеномная перестройка острова
45 пандемичности VSP-II. Однонуклеотидные замены в генах *ctxB1* и *tcpA* из
46 профага СТХφ и острова патогенности VPI-1 привели к появлению их новых
47 аллелей *ctxB7* и *tcpA^{CIRS101}* соответственно и продукции измененных факторов
48 патогенности [22, 26]. Результатом мутации в гене *rtxA*, кодирующем
49 многофункциональный цитотоксин MARTX, стало появление его аллеля *rtxA4*
50 с потерей функции этого гена [14]. К тому же за счет протяженной делеции
51 около 30 генов в VSP-II произошла утрата генетического материала и
52 образование VSP-II^Δ(*vc0495* – *vc0512*) [27]. Кроме того, возникли мутации,
53 которые повлекли изменение резистентности к антибиотикам – возникновение
54 устойчивости к налидиксовой кислоте за счет мутаций в генах *gyrA* (G248T) и
55 *parC* (C254T) [17] и чувствительности к полимиксину В в результате
56 однонуклеотидной замены в гене *carR* (G265A) [24]. Следствием указанных
57 событий стало формирование высокопатогенных новых геновариантов с
58 уникальным набором факторов вирулентности, антимикробной
59 резистентности и высоким уровнем адаптации к стрессовым воздействиям
60 окружающей среды, что привело к их глобальному распространению [11, 19,

61 22] и росту заболеваемости холерой в мире с увеличенным числом случаев
62 тяжелого течения [13].

63 Первые эпидемические проявления холеры в Российской Федерации
64 (РФ) начались в 1970 г. в период 1-й волны пандемии и были связаны с завозом
65 возбудителя в Астраханскую область из Ирана и дальнейшим
66 распространением инфекции в других населенных пунктах Поволжья [3].
67 Кроме того, небольшие вспышки и единичные случаи холеры
68 регистрировались и в других регионах РФ (Украина, Азербайджан, Грузия,
69 Башкирия, Ставрополь) [1, 5]. Исследование ряда клинических изолятов
70 показало, что они относились к типичным штаммам, содержащим в составе
71 оперона *ctxAB* аллель *ctxB3*. Однако в дальнейшем во время двух других волн
72 пандемии все известные случаи холеры в РФ были связаны с другими
73 вариантами [4, 6, 18].

74 Впервые генетически измененные штаммы с *ctxB1* были завезены в
75 различные регионы РФ в 1993-2001 гг., став причиной эпидемических
76 вспышек, либо спорадических случаев холеры в разных регионах страны [9,
77 10, 18]. Однако вскоре, начиная с 2004 г., на территорию России были завезены
78 другие варианты возбудителя с дополнительными мутациями в эпидемически
79 важных генах. Мутациями были затронуты гены патогенности (*ctxB1*, *tcpA^{EITor}*,
80 *rtxA1*) и лекарственной устойчивости [4, 11, 18]. При этом различные штаммы
81 вариантов имели разный набор мутантных генов, что определяло их
82 неодинаковый патогенный и эпидемический потенциалы.

83 Высокая скорость эволюции и адаптации возбудителя холеры к внешней
84 среде будет и в дальнейшем приводить к формированию новых вариантов и
85 их заносу в РФ. Это обстоятельство указывает на необходимость проведения
86 геномного надзора за патогеном с целью мониторинга генетических
87 изменений штаммов, как занесенных в Россию, так и циркулирующих в
88 эндемичных регионах, для своевременного создания адекватных средств
89 диагностики и профилактики холеры. Несмотря на большой интерес многих
90 исследователей к генетическому анализу различных вариантов возбудителя [2,

91 4, 8, 9, 11, 18], получение системных данных об изменении эпидемически
92 важных свойств штаммов *V. cholerae* Эль Тор за последние 50 лет (1970-2023
93 гг.) остается актуальной задачей, решение которой позволит повысить
94 оперативность и качество общей системы эпидемиологического надзора.

95 Цель работы – анализ динамики изменения генов патогенности,
96 эпидемичности и лекарственной устойчивости токсигенных штаммов *V.*
97 *cholerae* Эль Тор из Российской Федерации и эндемичных регионов,
98 выделенных в период трех волн текущей пандемии, и их филогенетический
99 анализ.

100 2 Материалы и методы

101 Использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 155
102 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в разные
103 периоды текущей пандемии в России и эндемичных регионах (табл. 1).
104 Нуклеотидные последовательности штаммов были получены нами (42
105 штамма) или взяты из NCBI GenBank (113 штаммов).

106 Бактерии культивировали в бульоне и агаре LB при 37°C.
107 Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли диско-
108 диффузионным методом с использованием препаратов полимиксина В (300
109 мкг) и налидиксовой кислоты (30 мкг) фирм HiMedia Laboratories Pvt. Limited
110 (Индия).

111 Секвенирование проводили на платформе «Ion PGM» (Ion Torrent, США).
112 Подготовку геномной ДНК выполняли согласно протоколу производителя из
113 обработанной мертиолятом натрия бактериальной суспензии с использование
114 коммерческого набора Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit.
115 Подготовку ДНК библиотек проводили по стандартному протоколу в
116 соответствии с рекомендациями производителя. Для сборки геномов
117 применяли программное обеспечение Ion Torrent Suite Software v. 5.4 и
118 Newbler GS Assembler v. 2.6. Средняя глубина прочтений секвенированных
119 штаммов составила 50.

120 Анализ полногеномных последовательностей исследуемых штаммов
121 проводили относительно последовательности генома референсного штамма *V.*
122 *cholerae* N16961 с помощью программы UGEN v.45.1.

123 Для обнаружения SNP и построения филогенетического дерева
124 использовали Байесовский филогенетический анализ с применением
125 программы MrBayes v.3.2.7a. на основе SNP-матрицы, полученной с помощью
126 программы Snippy 4.6.0. Визуализацию полученных результатов
127 осуществляли в программе iTOL v.6.

128 3 Результаты

129 *Филогенетический анализ токсигенных штаммов V. cholerae Эль Тор из*
130 *России и эндемичных регионов, выделенных в разные временные периоды 7-ой*
131 *пандемии.* Для выяснения генетических связей различных штаммов из России
132 с другими штаммами возбудителя, изолированными в разные годы на
133 различных эндемичных территориях (табл. 1), мы провели их
134 филогенетический анализ. На рис.1 изображено филогенетическое дерево,
135 построенное на основании анализа 1950 коровых SNPs полногеномных
136 последовательностей 119 штаммов, из которых 47 было занесено на
137 территорию Российской Федерации. Установлено четкое деление взятых
138 штаммов на три основных кластера. Типичные штаммы, выделенные в период
139 1-й волны пандемии (1970-1991 гг.), образовали отдельный кластер I,
140 включающий 23 штамма из России (12 изолятов) и эндемичных регионов Азии
141 (Индия, Бангладеш) и Африки (Мозамбик, Гвинея). Все штаммы, независимо
142 от места и времени выделения, имели одинаковый генотип –
143 *ctxB3tcpA^{Eltor}rtxA1VSP-II*, идентичный таковому референсного штамма
144 N16961, были чувствительны к налидиксовой кислоте (NaI^S), резистентны к
145 полимиксину В (PoI^R) и не содержали в геноме ICE. Кластер II (22 изолята)
146 включал штаммы из России (19 изолятов), изолированных во 2-ю волну
147 пандемии (1993-2001 гг.), а также три штамма из эндемичных стран, на
148 территории которых в это время были зарегистрированы вспышки холеры

149 (рис. 1). Обособление этих штаммов от изолятов из кластера I четко
 150 коррелировало с приобретением ими новых участков ДНК – гена *ctxB1* (в
 151 составе профага СТХφ) от холерных классических вибрионов и разных типов
 152 мобильного элемента ICE от неизвестных доноров. В результате эти первые
 153 варианты возбудителя имели генотип *ctxB1tcpA^{Eltor}rtxA1VSP-II* ICE, отличный
 154 от такового референсного штамма N16961. Различия между штаммами из
 155 кластеров I, II и референсным N16961 составляли в среднем 83 и 114 SNPs
 156 соответственно. Что касается 74 других исследуемых штаммов, выделенных
 157 как в России (16 изолятов), так и в эндемичных регионах Азии и Африки (58
 158 изолятов), то все они относились к разным геновариантам, возникшим в
 159 период 3-й волны пандемии (2022 -2023гг.), которые образовали кластер III,
 160 различаясь от референсного штамма по 137 SNPs (рис. 1). Эти варианты
 161 возбудителя отличались от измененных штаммов из 2-волны разного типа
 162 дополнительными мутациями – однонуклеотидными заменами в ключевых
 163 (*ctxA*, *tcpA*) и дополнительных (*rtxA*) генах патогенности и лекарственной
 164 устойчивости (*gyrA*, *parC*, *carA*), делецией генов в VSP-II и разными типами
 165 ICE, включая ICEVchInd5Δ, утративший 4 гена(*floRstrABsul2*). Вследствие
 166 разного сочетания мутаций штаммы кластера III были генетически
 167 неоднородны, образовав шесть отдельных ветвей с разными генотипами: “а”
 168 *ctxB1tcpA^{CIRS101}rtxA1gyrA(G248T)parC(C254T)carRVSP-*
 169 *II^ΔSXT^{TET}(tetARstrABsul2dfrA1)* или *ICEVchInd5(floRstrABsul2dfrA1)*, “b”
 170 *ctxB1tcpA^{CIRS101}rtxA4 gyrA(G248T)parC(C254T)carRVSP-II^ΔICEVchInd5*; “c”
 171 *ctxB7tcpA^{CIRS101}rtxA4gyrA(G248T)parC(C254T)carRVSP-II^ΔICEVchInd5*; “d”
 172 *ctxB7tcpA^{CIRS101}rtxA4gyrA(G248T)parC(C254T)carR(G265A)VSP-*
 173 *II^ΔICEVchInd5*; “e”
 174 *ctxB7tcpA^{CIRS101}rtxA4gyrA(G248T)parC(C254T)carR(G265A)VSP-*
 175 *II^ΔICEVchInd5Δ*; “f”*ctxB7tcpA^{CIRS101}rtxA4-*
 176 *agyra(G248T)parC(C254T)carR(G265A)VSP-II^ΔICEVchInd5Δ*. Обособление
 177 кластера III было связано с формированием геновариантов не только с
 178 усиленной вирулентностью, высоким эпидемическим потенциалом и разным

179 спектром резистентности к антибиотикам, но также с утратой Pol^R –
180 специфического маркера вибрионов Эль Тор. Таким образом, показано, что
181 деление исследуемых штаммов на три филогенетические группы,
182 различающиеся между собой по структуре генома, совпадает с временным
183 периодом 3-х волн глобального распространения возбудителя в мире из
184 первичного очага. Присутствие в каждом кластере эпидемически опасных
185 штаммов как из России, так и из эндемичных стран указывает на их
186 генетическую близость. Очевидное большое геномное разнообразие штаммов
187 возбудителя, изолированных на протяжении более 50 лет (1970-2023 гг.),
188 обусловлено горизонтальным переносом разных участков ДНК и различного
189 типа мутациями в генах, входящих в состав мобильных элементов и коровой
190 части хромосом.

191 *Распространенность измененных генов патогенности, эпидемичности и*
192 *лекарственной устойчивости среди различных штаммов возбудителя холеры,*
193 *занесенных в Россию. Анализ 47 секвенированных геномов показал различия*
194 *в распространенности измененных ключевых генов патогенности и*
195 *эпидемичности между штаммами, занесенными в Россию из различных*
196 *эндемичных очагов холеры в разные годы текущей пандемии. Как и*
197 *ожидалось, все исследуемые штаммы из 1-й волны пандемии (12 изолятов;*
198 *1970-1990 гг.) относились к типичным, имели характерные для них гены*
199 *патогенности и пандемичности ($ctxB3$, $tcpA^{Eltor}$, VSP-II) и были лишены ICE*
200 *(рис. 2а). Вместе с тем, в последующее десятилетие (1993-2001 гг.) на*
201 *территории России были обнаружены генетические варианты возбудителя с*
202 *измененным геном вирулентности $ctxB1$ и приобретенными генами*
203 *резистентности к антибиотикам в составе ICE. Появление таких штаммов в*
204 *России полностью совпало с периодом 2-й волны (рис. 2а). В то же время в 3-*
205 *ю волну пандемии в 2004-2014 гг. были выявлены разные типы геновариантов.*
206 *Наряду с сохранившимися вариантами с генотипом $ctxB1tcpA^{Eltor}VSP-II$*
207 *(12,5%) появились другие варианты с генотипами $ctxB1tcpA^{CIRS101}VSP-$*
208 *II($vc0495-vc0512$) и $ctxB7tcpA^{CIRS101}VSP-II^A(vc0495-vc0512)$. При этом более*

209 60, 0% из них относились к недавно возникшим вариантам, несущим
210 измененный ген *ctxB7*, являющийся генетическим маркером штаммов с
211 повышенным патогенным потенциалом (рис. 2а, б). Особый интерес, на наш
212 взгляд, представляли штаммы, занесенные в России в 2023 г. после
213 девятилетнего периода эпидемического благополучия [8]. Обращает на себя
214 внимание тот факт, что они относились к разным типам геновариантов,
215 имеющих различные мутации в ключевых генах, связанных с патогенностью
216 и способностью к эпидемическому распространению. Два клинических
217 изолята (KM3208 и KM3213) имели полный набор измененных генов
218 вирулентности (*ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}*) и эпидемичности (*VSP-II^{Δ(vc0495–vc0512)}*),
219 характерный для штаммов с высоким патогенным потенциалом. В то же время
220 штамм, выделенный из воды (KM3210), имел лишь один измененный ген
221 (*ctxB1*) и относился к первым по времени выделения геновариантам с более
222 низкой вирулентностью (табл. 1, рис. 2а). Таким образом, геномы штаммов
223 возбудителя холеры, занесенных в Россию в период разных волн пандемии,
224 четко различались между собой набором мутаций в ключевых генах
225 патогенности и эпидемичности, входящих в состав мобильных элементов
226 (СТХφ, VPI-1 и VSP-II), что указывает на их разный патогенный потенциал.

227 Другим не менее важным был вопрос об изменении резистентности к
228 антибиотикам, поскольку возникновение устойчивости возбудителя холеры к
229 лекарственным препаратам является большой проблемой современности.
230 Прежде всего, как отмечалось выше, изменение резистентности было связано
231 с появлением в геноме первых вариантов разных типов ICE. Следствием таких
232 событий стал занос в Россию штаммов в 1993-2001 г. с двумя типами ICE:
233 ICE*Vch*Ind5(*floR*, *strAB*, *sul2*, *dfrA1*) и ICE*Vch*Ban9(*floR*, *strAB*, *sul2*, *tetAR*,
234 *dfrA1*), различающимися набором генов резистентности (рис.3а). Дальнейшие
235 изменения устойчивости к антибиотикам были обусловлены появлением у
236 геновариантов с ICE мутаций в различных коровых генах. В результате
237 штаммы, изолированные в России в 3-ю волну пандемии (2004-2014 гг.), стали
238 устойчивыми к новым антибиотикам и по профилю резистентности были более

239 разнообразными по сравнению с изолятами из предыдущего десятилетия. У
240 87,5% штаммов была выявлена резистентность к налидиксовой кислоте (Nal^R),
241 возникающая за счет двух точечных мутаций в коровых генах *gyrA* (G248T) и
242 *parC* (C254T), кодирующих топоизомеразу II (ДНК-гиразу) и топоизомеразу
243 IV. Лишь небольшое число штаммов (12,5%) оставалось Nal^S. Более того
244 оказалось, что в 12,5% случаях Nal^R штаммы утратили устойчивость к
245 полимиксину В (Pol^S) в результате точечной мутации в гене *carR*(G265A)
246 (рис.3а, с). Поскольку резистентность к полимиксину В используется в
247 качестве ключевого маркера для дифференциации вибрионов биовара Эль Тор
248 от холерных вибрионов классического биовара, то утрата возбудителем этого
249 свойства может создавать определенные трудности при диагностике
250 выделяемых штаммов. Что касается штаммов, обнаруженных в 2023 г., то все
251 клинические изоляты были Nal^RPol^S, что подтверждает широкое
252 распространение таких штаммов в эндемичных очагах (рис. 3а). Кроме того,
253 впервые обнаружен занос в Россию штаммов, несущих в ICE*Vch*Ind5 делецию
254 (около 10 т. п. н.), затронувшую четыре гена, кодирующих резистентность к
255 хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strA*, *strB*) и сульфаниламиду (*sul2*).
256 Сохранился лишь ген *dfrA1*, кодирующий устойчивость к триметоприму
257 (рис.3а). Таким образом, резистентность к антибиотикам занесенных в Россию
258 штаммов за 30 лет (1993-2023 гг.) претерпела существенные изменения. При
259 этом изменение резистентности геновариантов четко коррелировало с
260 возникновением в их геноме мутаций в различных генах патогенности (рис.
261 2а, 3а), что привело к изменению многих важнейших свойств патогена,
262 включая его вирулентность, чувствительность к антибактериальным
263 препаратам и утрату одного из диагностически значимых признаков.

264 *Сравнительный анализ геномов токсигенных штаммов V. cholerae Эль*
265 *Тор, выделенных в эндемичных очагах холеры на разных этапах текущей*
266 *пандемии.* Появление различных вариантов возбудителя в России, занесенных
267 из различных эндемичных очагов, ставит вопрос об их распространенности на
268 этих территориях. В этой связи мы сопоставили геномы 108 штаммов,

269 изолированных в 17 странах Азии (Индия, Бангладеш, Йемен, Пакистан,
270 Вьетнам, Непал) и Африки (Конго, Мозамбик, Кот-д'Ивуар, Нигерия, Камерун,
271 Гвинея, Малави, Нигер, Танзания, Уганда, Кения) в 1970-2023 гг. Анализ
272 секвенированных участков генома, содержащих мобильные элементы СТХф,
273 VPI-1 и VSP-II с ключевыми генами патогенности и эпидемичности, выявил
274 заметные изменения их структуры у штаммов, изолированных в последние 30
275 лет (1991-2023 гг.) по сравнению с типичными штаммами из более раннего
276 этапа пандемии (1970-1990 гг.) (рис. 2b). Одно из важнейших изменений в
277 период 2-й волны пандемии (1991-2001 гг.) – появление большого количества
278 изолятов (66,7%) с аллелем *ctxB1*, среди которых 6,7% штаммов одновременно
279 несли мутантный ген *tcpA^{CIRS101}*, а также протяженную делецию в VSP-II (VSP-
280 II^Δ(*vc0495–vc0512*). К тому же в хромосоме большинства штаммов
281 присутствовали разные типы ICE (рис. 2b, 3b). Вначале 3-й волны пандемии
282 (2002-2014 гг.), наряду со штаммами с генотипом, характерным для 2 й волны,
283 были выявлены штаммы (в 40,0% от числа изученных) с новым аллелем *ctxB7*,
284 несущими и другие измененные гены - *tcpA^{CIRS101}* и VSP-II^Δ(*vc0495–vc0512*).
285 Кроме того, более 90,0% исследуемых штаммов оказались NaI^R за счет
286 указанных выше мутаций в генах *gyrA* и *parC*. Что касается последнего
287 десятилетия (2015-2023 гг.), то при незначительном количестве вариантов с
288 геном *ctxB1* (8,5%), более 90,0% изолятов относились к новым вариантам с
289 набором мутантных генов *ctxB7*, *tcpA^{CIRS101}*, *gyrA*(G248T), *parC*(C254T), VSP-
290 II^Δ(*vc0495–vc0512*), которые обусловили повышение продукции ключевых
291 факторов патогенности и усиление устойчивости к антибиотикам. Кроме того,
292 вследствие мутации еще в одном гене – *carR*, более 75,0% изученных штаммов
293 утратили PoI^R - диагностический признак вибрионов Эль Тор (рис. 2b, 3b).
294 Таким образом, приведенные данные свидетельствуют о большом геномном
295 разнообразии штаммов в эндемичных регионах, где на протяжении двух
296 последних волн пандемии происходило довольно быстрое изменение генома
297 возбудителя, что привело к появлению его различных вариантов. К наиболее
298 распространенным в последние годы следует отнести штаммы, сочетающие

299 мутации в генах патогенности, эпидемичности и лекарственной устойчивости,
300 что связано с усилением вирулентности патогена, изменением его
301 резистентности к антибиотикам и утратой диагностически значимого
302 свойства.

303 4 Обсуждение

304 Изменчивость генома возбудителя холеры Эль Тор – одна из основных
305 проблем молекулярной микробиологии этого патогена, поскольку ее решение
306 открывает новые возможности в расшифровке причин формирования в
307 природных популяциях атипичных по вирулентным и диагностически
308 значимым свойствам штаммов. Возрастающая значимость холеры для
309 здравоохранения России и других стран может быть связана с возникновением
310 в последние десятилетия различных генетических вариантов возбудителя,
311 распространение которых быстро приобрело глобальные масштабы. При
312 проведении полногеномного SNP-анализа показано, что деление исследуемых
313 штаммов на три филогенетические группы, различающиеся между собой по
314 структуре генома, совпадает с временным периодом 3-х волн глобального
315 распространения возбудителя в мире из первичного очага. Присутствие в
316 каждой группе токсигенных изолятов как из России, так и из эндемичных
317 стран указывает на их генетическое сходство. Очевидное изменение генома
318 возбудителя на протяжении более 50 лет (1970-2023 гг.) связано с такими
319 молекулярными событиями, как горизонтальный перенос генетической
320 информации и возникновение мутаций (однонуклеотидные замены, делеции)
321 в нуклеотидной последовательности генов, кодирующих различные белки.
322 При этом такие мутации приводят к изменению важнейших свойств
323 возбудителя, включая его вирулентность и способность к эпидемическому
324 распространению. Эти результаты полностью совпадают с данными других
325 исследователей и подтверждают общую тенденцию последних лет –
326 возрастание уровня генетической изменчивости этого патогена.

327 Сравнение геномов 155 штаммов возбудителя холеры, выделенных в
328 России и эндемичных очагах в 1970-2023 гг., показало, что изоляты из разных

329 волн пандемии четко различались между собой набором мутаций в ключевых
330 генах патогенности и эпидемичности, входящих в состав мобильных
331 элементов (СТХφ, *VPI-1* и *VSP-II*), что указывает на их разный патогенный
332 потенциал. Геномное разнообразие штаммов значительно возросло в период 3-
333 й волны пандемии за счет возникновения различных мутаций в генах,
334 кодирующих факторы вирулентности и лекарственной устойчивости, что
335 привело к появлению новых геновариантов с повышенным патогенным и
336 эпидемическим потенциалом. Установлено, что исследуемые штаммы,
337 различающиеся между собой набором мутантных генов, принадлежали к
338 шести разным генотипам. Анализ динамики изменения генома показал, что,
339 если вначале 3-й волны пандемии (2002-2014 гг.) лишь 40,0% штаммов из
340 эндемичных регионов относились к недавно возникшим вариантам, несущим
341 измененный ген *ctxB7*, являющийся генетическим маркером штаммов с
342 повышенным патогенным потенциалом, то в последние десятилетия (2015-
343 2023 гг.) этот показатель превысил 90,0%. Вследствие таких генетических
344 изменений возбудителя в эндемичных странах, занесенные в Россию штаммы
345 в 3-ю волну пандемии преимущественно также относились к новым
346 геновариантам (в 62,5% и 66,7% случаях в зависимости времени выделения
347 штаммов).

348 Отдельным был вопрос о динамике изменения устойчивости штаммов
349 к лекарственным препаратам. Оказалось, что резистентность к антибиотикам
350 исследуемых штаммов за 30 лет также претерпела существенные изменения.
351 Такое событие в первую очередь было связано с появлением в геноме первых
352 вариантов из 2-й волны пандемии (1991-2001 гг.) разных типов ICE,
353 различающимися набором генов резистентности. Тем не менее в период 3-й
354 волны пандемии (2002-2023 гг.) у геновариантов с ICE произошли дальнейшие
355 изменения устойчивости к антибиотикам. Точечные мутации в коровых генах
356 *gyrA* (G248T) и *parC* (C254T) привели к появлению штаммов, резистентных к
357 налидиксовой кислоте. В эндемичных странах и занесенных в Россию штаммы
358 Nal^R составляли 90,0% и 87,5% соответственно. Другим важным событием

359 стала утрата штаммами устойчивости к полимиксину В, используемой в
360 качестве ключевого маркера для дифференциации вибрионов биовара Эль Тор
361 от холерных вибрионов классического биовара. Причиной потери штаммами
362 одного из диагностических свойств вибрионов Эль Тор стала точечная
363 мутации в регуляторном гене *carR*(G265A). При этом происходил быстрый
364 рост числа штаммов с такой мутацией. Если вначале 3-й волны штаммы *Pol^S*
365 из эндемичных регионов составляли лишь 16,0%, то через десять лет их число
366 достигло более 80, 0%. Изменение таких свойств геновариантов может
367 создавать определенные трудности при диагностике штаммов возбудителя
368 холеры, заносимых в Россию. Таким образом, изменение резистентности
369 геновариантов четко коррелировало с возникновением в их геноме мутаций в
370 различных генах патогенности, что привело к появлению и широкому
371 распространению штаммов с усиленной вирулентностью, измененной
372 лекарственной устойчивостью и утраченным диагностически значимым
373 свойством. Совместное присутствие таких мутаций в геноме новых вариантов
374 обусловило, видимо, селективные преимущества, следствием которых стало
375 их широкое распространение.

376 5 Заключение

377 Установлено, что геномное разнообразие токсигенных штаммов
378 значительно возросло в период 3-й волны пандемии за счет различных
379 мутаций, что привело к появлению новых геновариантов с повышенным
380 патогенным и эпидемическим потенциалом. Показана довольно быстрая смена
381 вариантов возбудителя, что является, видимо, следствием высокой скорости
382 эволюции генома и адаптации возбудителя к человеческой популяции и
383 меняющимся условиям внешней среды. Из известных вариантов особую
384 обеспокоенность вызывают штаммы, сочетающие генетические маркеры
385 гипервирулентности, множественной лекарственной устойчивости и
386 утраченного диагностически значимого признака. Появление таких
387 генетических вариантов возбудителя на территории России в результате
388 заноса указывает на необходимость проведения постоянного геномного

389 надзора за патогеном для понимания направления и скорости изменения
390 генома в процессе эволюции и своевременного распознавания
391 доминирующего геноварианта. Полученные нами сведения о генетических
392 свойствах широко распространенных вариантов возбудителя из России и
393 эндемичных регионов могут быть востребованы при создании новых средств
394 их лабораторной диагностики, основанной на идентификации генетических
395 маркеров гипервирулентности. При оценке фенотипических и генетических
396 свойств выделяемых штаммов следует также учитывать возможную утрату
397 генетическими вариантами устойчивости к полимиксину В – диагностически
398 значимого свойства, а также вариабельность их резистентности к
399 лекарственным препаратам.

400 **Дополнительная информация**

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

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

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Генетические свойства штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор из России и эндемичных по холере стран.

Table 1. Genetic features of *V. cholerae* O1 El Tor strains isolated in Russia and cholera-endemic countries.

Штаммы, годы выделения Strains, years of isolation	Ал лел ь ген а <i>ctx</i> <i>B</i> <i>ctx</i> <i>B</i> gen e allel e	Аллел ь гена <i>tcpA</i> <i>tcpA</i> gene allele	Алл ель ген а <i>rtxA</i> <i>rtxA</i> gen e allel e	VSP -II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
Штаммы из РФ Strains isolated in Russian Federation							
1970-1990 гг. M888, M893, M1062, M818, M1011, M1067, M1020, P8194, M671, M642, M1261, C402	<i>ctx</i> <i>B3</i>	<i>tcpA</i> ^{ElTor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
1993-2001 гг. 1275, M1270, M1293, I1181*, 28, 155, M1327, I1344*, I1300*, I1298*, I1187*, M1266, M1268, P17644, M1344	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{ElTor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
2001-2014 гг. M1429, M1430, P18899, 81	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1} ₀₁	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>
L3226, RND19187, L4150, RND13188, 76, 153, 39, 186,	<i>ctx</i> <i>B7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1} ₀₁	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>

1509, 3265/80,	<i>ctx</i> <i>B7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i> (G26 5A)
89,147	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
2015-2023 гг. M3208, M3213	<i>ctx</i> <i>B7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i> (G26 5A)
M3210	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
Штаммы из эндемичных стран Азии и Африки Strains from endemic Asian and African countries							
1970-1990 гг. * CNRVC960629, CNRVC960959,A19,N16961, A18,A10,GP145,GP160,CNR VC930171,PRL18,A131,V109 ,A155,A154,V212- 1,VC51,A330, CNRVC940103,CNRVC9401 90,MJ- 1236,CNRVC960254,CNRVC 960218,F3835,4679,4672,194 4_CDC,956_CDC,4662	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
1991-2001 гг. * A155, CNRVC940190, CNRVC960218, F3835, A154	<i>ctx</i> <i>B3</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
V212-1,VC51,A330, CNRVC940103,MJ-1236, CNRVC960254,4672, 4679, 956_CDC	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
4662	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
2002-2014 гг. * B33, 1362	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{EITor}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>carR</i>
4488,4656,4623,4551,VN243 P_07, VC-8, BGD119, BGD122, BGD095	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 1	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>
CIRS101, 4646, CISM1020229.6, CISM1020231.9	<i>ctx</i> <i>B1</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>
4519, IND033, IND041, VC- 18, IND051 IDH-04808,	<i>ctx</i> <i>B7</i>	<i>tcpA</i> ^{CIRS1 01}	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>

IND071, IDH-05298, IND082,IND090	<i>ctx</i> B7	<i>tcpA</i> ^{CIRSI} ₀₁	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i> (G265 A)
2015-2023 гг. * BGD128, BGD143, NALMLE36, NALMLE05, KDCP183	<i>ctx</i> B1	<i>tcpA</i> ^{CIRSI} ₀₁	<i>rtxA</i> 1	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>
CMR33,NER211,NGA002,N GA016,NGA001,NGA236,C MR57,CMR56,CMR50,CMR 44	<i>ctx</i> B7	<i>tcpA</i> ^{CIRSI} ₀₁	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i>
IND220,IND231, CNRVC170168, CNRVC170175,UG020,UG01 0,4621STDY6714780,THSTI5 6695,THSTI56712,CNRVC17 0179,CNRVC170208,KDCP1 36,KDCP208,KDCP245,DMA VC-20, DMAVC-1, DMAVC- 16,DMAVC-19,DMAVC-4, DMAVC-11,DMAVC- 18,DMAVC-21, N1252,Q4233,622,619, K19,K15	<i>ctx</i> B7	<i>tcpA</i> ^{CIRSI} ₀₁	<i>rtxA</i> 4	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i> (G265 A)
K054646, K054662,K054666,K054671, K054681,K054685,K054684, K054659,K054670,K054682	<i>ctx</i> B7	<i>tcpA</i> ^{CIRSI} ₀₁	<i>rtxA</i> 4a	VSP- II ^Δ	<i>gyrA</i> (G248 T)	<i>parC</i> (C254 T)	<i>carR</i> (G265 A)

Примечание: VSP-II^Δ – делеция *vc0495-vc0512*. *Полногеномные нуклеотидные последовательности штаммов взяты из базы данных NCBI Genbank

Note: VSP-II^Δ –*vc0495-vc0512* deletion. *Whole genome nucleotide strain sequences are retrieved from the NCBI Genbank database

РИСУНКИ

Рисунок 1. Филогенетический анализ токсигенных штаммов *V.cholerae* O1 Эль Тор, выделенных в 1970-2023 гг. в Российской Федерации и эндемичных по холере странах Азии и Африки. Проведен по данным полногеномного секвенирования на основе байесовского анализа (выполненного в приложении Mr.Bayes 3.2.7) коровых SNP, полученных с помощью программного пакета Snippy 4.6. Дендрограмма, укорененная на референсный штамм *V.cholerae* N16961, визуализирована с помощью online приложения iTOL v6. (<https://itol.embl.de>).

Figure 1. Phylogenetic analysis of toxigenic *V.cholerae* O1 El Tor strains isolated in the Russian Federation and cholera-endemic Asian and African countries in 1970-2023. Analysis was conducted using full-genome sequencing data based on Bayesian test (performed in the Mr.Bayes 3.2.7 application) of core SNPs obtained using the Snippy 4.6 software package. The dendrogram rooted to the reference strain *V.cholerae* N16961 was visualized using the iTOL v6 online application. (<https://itol.embl.de>).

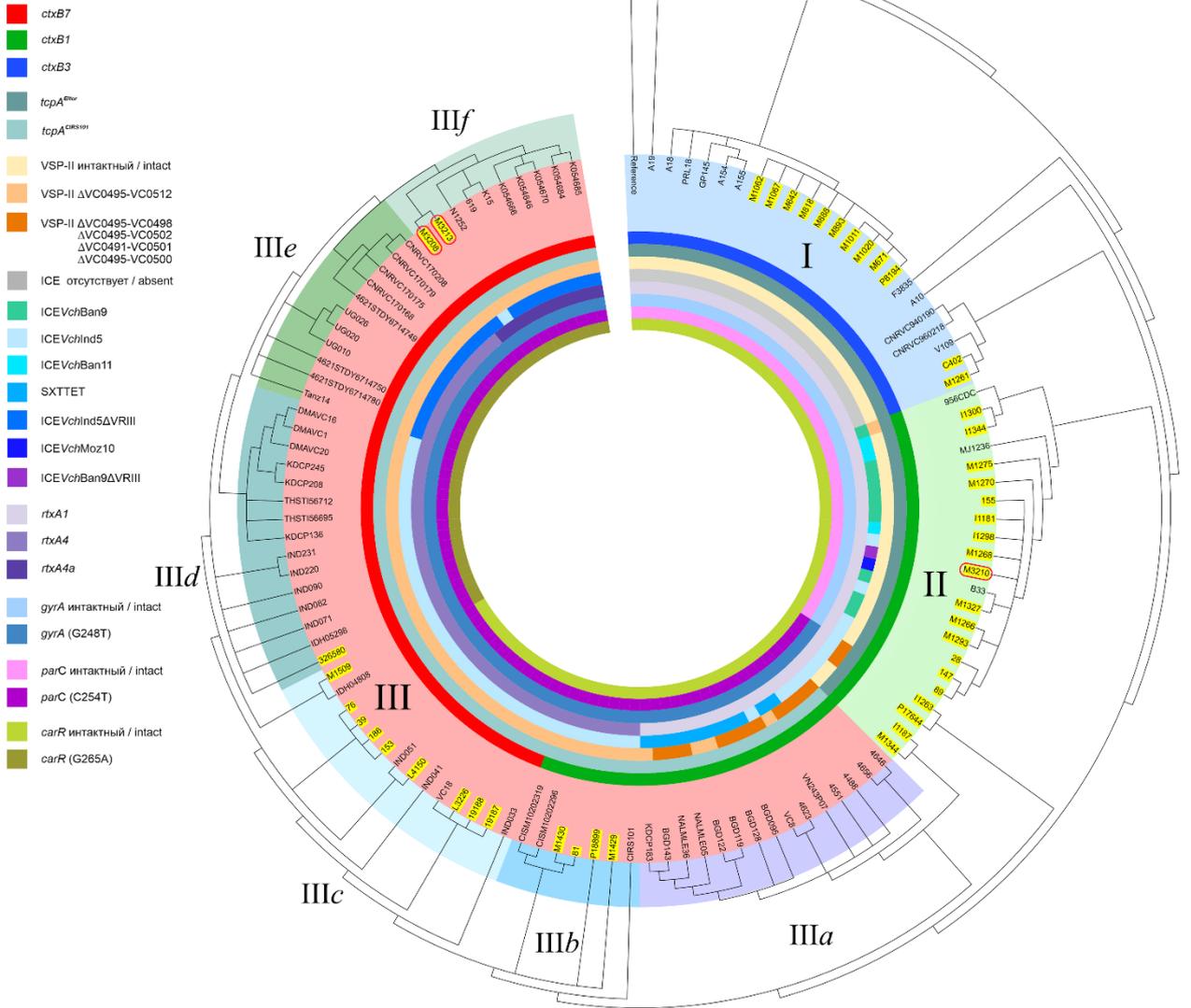


Рисунок 2. Динамика изменения распространенности мутантных генов вирулентности *ctxB* и *tcpA*,.deleted pandemicity island VSP-II и ICE SXT элемента среди токсигенных штаммов *V.cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации (a) и эндемичных по холере стран Азии и Африки (b) Нуклеотидные последовательности аллелей генов *ctxB* и *tcpA* (c).

Figure 2. Dynamic prevalence changes for mutant virulence genes *ctxB* and *tcpA*, deleted pandemicity island VSP-II and ICE SXT element among toxigenic *V.cholerae* O1 El Tor strains isolated in Russian Federation (a) and cholera-endemic Asian and African countries (b) Nucleotide sequences of *ctxB* and *tcpA* gene alleles (c).

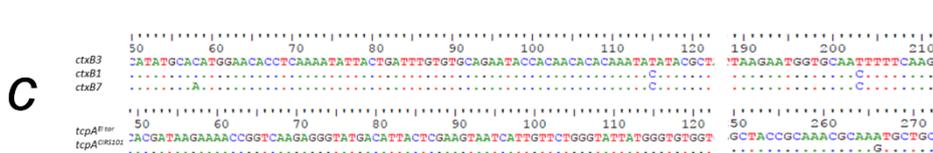
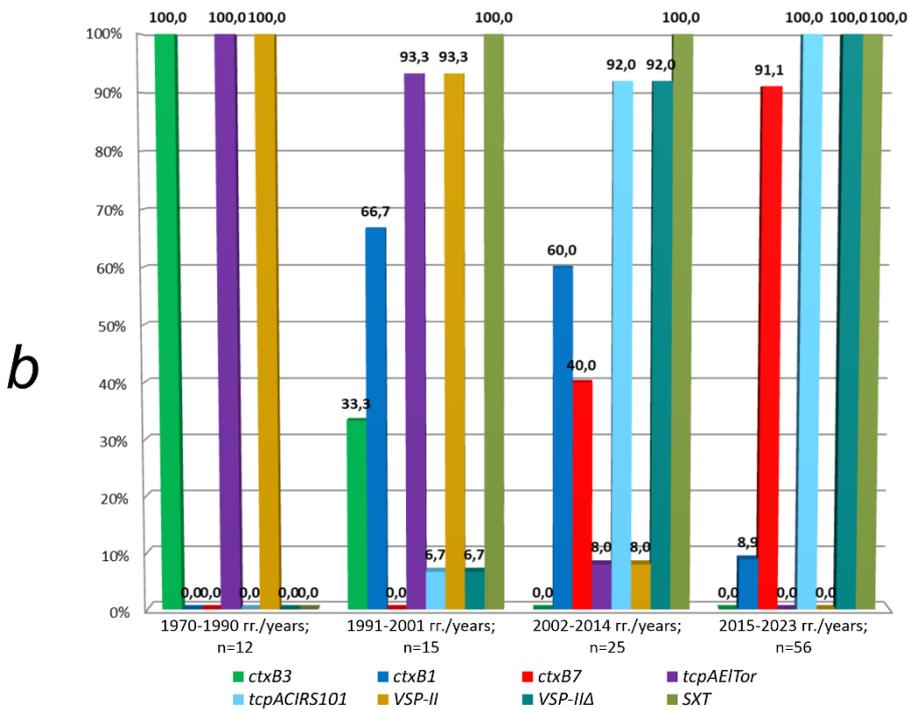
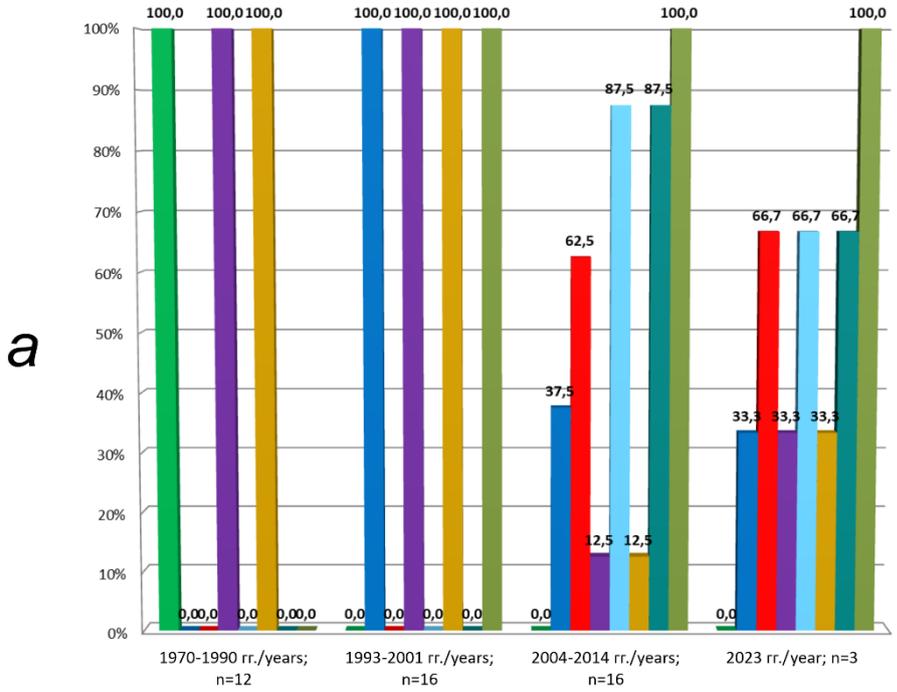
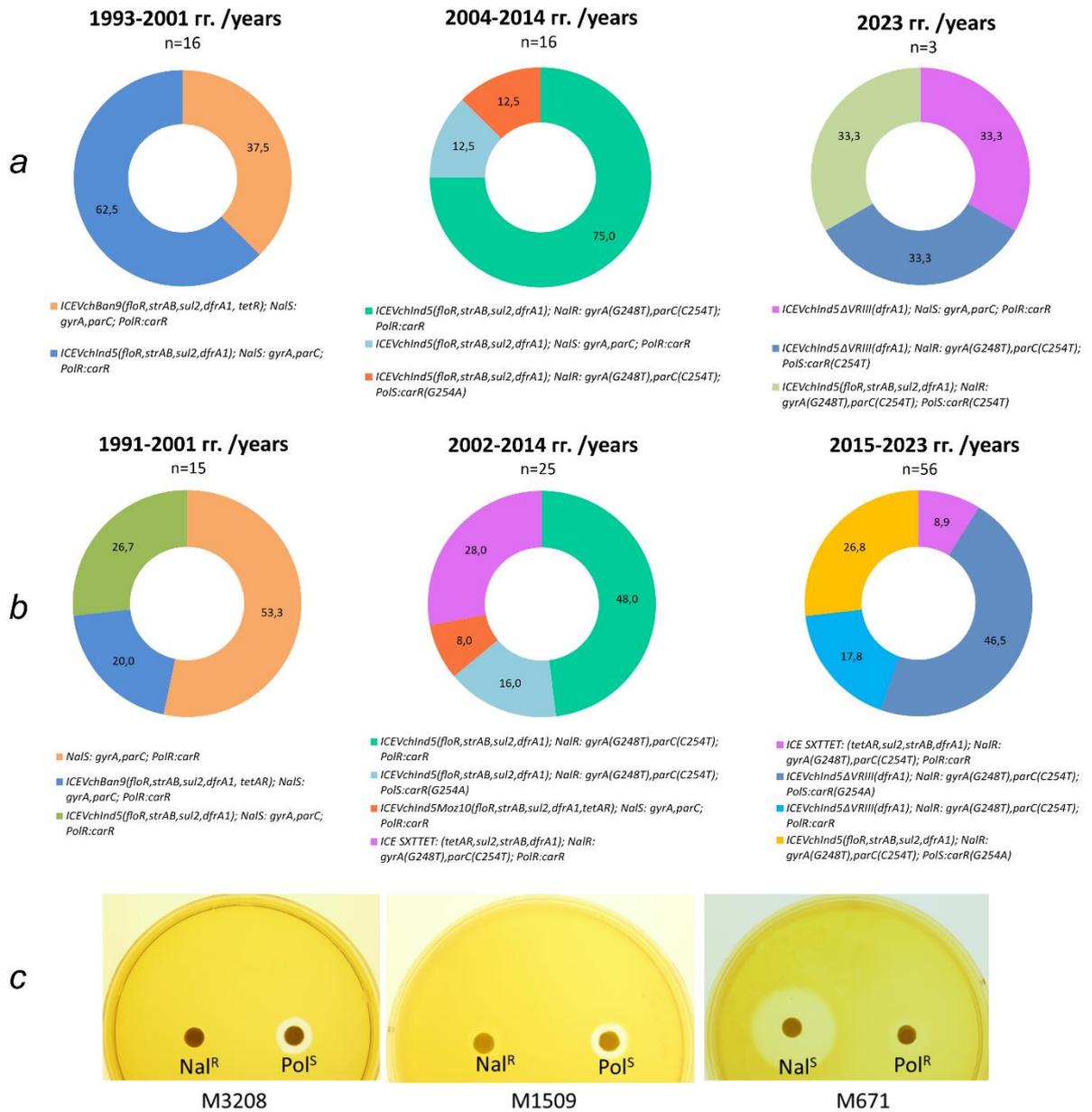


Рисунок 3. Динамика изменения распространенности генов лекарственной устойчивости среди различных вариантов возбудителя холеры, изолированных в Российской Федерации (а) и эндемичных странах Азии и Африки (б) в период 2-ой и 3-ей волны текущей пандемии холеры. Чувствительность к полимиксину В (Pol^S) и резистентность к налидиксовой кислоте (Nal^R) изученных изолятов: М3208 и М1509 – штаммы геновариантов с мутациями в генах *gyrA*, *parC* и *carR*; М671 – типичный штамм с интактными генами *gyrA*, *parC* и *carR*, взятый в качестве контроля (с).

Figure 3. Dynamic prevalence changes in drug resistance genes among various variants of the cholera pathogen isolated in Russian Federation (a) and endemic Asian and African countries (b) during the 2nd and 3rd waves of the current cholera pandemic. Sensitivity to polymyxin B (Pol^S) and resistance to nalidixic acid (Nal^R) of the studied isolates: M3208 and M1509 – genovariant strains with mutant *gyrA*, *parC* and *carR* genes; M671 is a typical strain with intact *gyrA*, *parC* and *carR* genes used as a control (c).



ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Смирнова Нина Ивановна, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов отдела микробиологии ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Российская Федерация
адрес: 410012, Россия, Саратов, ул. Университетская, 46;
телефон: 8(905)321-33-77;

ORCID: [0000-0002-7115-6286](https://orcid.org/0000-0002-7115-6286);

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Smirnova N.I., Doctor of Biological Sciences, Professor, Chief Researcher at the Laboratory of Pathogenic Vibrios, Department of Microbiology FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;
address: 46, Universitetskaya St., Saratov, 410012, Russian Federation;
telephone: 8(905)321-33-77;

ORCID: [0000-0002-7115-6286](https://orcid.org/0000-0002-7115-6286);

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Блок 2. Информация об авторах

Рыбальченко Д. А., научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов отдела микробиологии ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: 0000-0002-3117-8229;

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Rybal'chenko D.A., Researcher at the Laboratory of Pathogenic Vibrios, Department of Microbiology, Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

ORCID: 0000-0002-3117-8229;

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Лозовский Ю. В., кандидат медицинских наук, младший научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов отдела микробиологии ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: 0000-0003-4382-7254;

e-mail:

rusrapi@microbe.ru

Lozovsky Yu. V., MD, PhD, Junior Researcher at the Laboratory of Pathogenic Vibrios, Department of Microbiology, FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

ORCID: 0000-0003-4382-7254;

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Краснов Я. М., кандидат химических наук, заведующий лабораторией геномного и протеомного анализа отдела микробиологии ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: [0000-0002-4909-2394](https://orcid.org/0000-0002-4909-2394);

e-mail:

rusrapi@microbe.ru

Krasnov Ya.M., PhD (Chemical Sciences), Head of the Genomic and Proteomic Analysis Laboratory, Department of Microbiology, FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

ORCID: [0000-0002-4909-2394](https://orcid.org/0000-0002-4909-2394);

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Щелканова Е. Ю., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела «Государственная коллекция патогенных бактерий» ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: [0009-0001-7163-206X](https://orcid.org/0009-0001-7163-206X);

E-mail:

rusrapi@microbe.ru

Shchelkanova E.Yu., Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher at the Department "State Collection of Pathogenic Bacteria", FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Федоров А. В., младший научный сотрудник лаборатории геномного и протеомного анализа отдела микробиологии ФКУН Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: [0000-0001-7190-4427](https://orcid.org/0000-0001-7190-4427);

e-mail:

rusrapi@microbe.ru

Fedorov A.V., Junior Researcher at the Genomic and Proteomic Analysis Laboratory, Department of Microbiology, FSSI Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

ORCID: [0000-0001-7190-4427](https://orcid.org/0000-0001-7190-4427);

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Кутырев В. В., академик РАН, доктор медицинских наук, профессор, директор института Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора;

ORCID: 0000-0003-3788-3452;

e-mail:

rusrapi@microbe.ru

Kutyrev V.V., Academician of the Russian Academy of Sciences, Doctor of Medical Sciences, Professor, Director of the Russian Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation;

ORCID: 0000-0003-3788-3452;

e-mail: rusrapi@microbe.ru

Блок 3. Метаданные статьи

ГЕНОМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР, ВЫДЕЛЕННЫХ В ПЕРИОД ТРЕХ ВОЛН 7-Й ПАНДЕМИИ ХОЛЕРЫ
GENOMIC DIVERSITY OF TOXIGENIC *VIBRIO CHOLERAE* O1 BIOVAR EL TOR STRAINS ISOLATED DURING THREE WAVES OF THE 7TH CHOLERA PANDEMIC

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ГЕНОМНОЕ РАЗНООБРАЗИЕ *V. CHOLERAE* O1

V. CHOLERAE O1 GENOMIC DIVERSITY

Ключевые слова: *V. cholerae*, вариабельность генома, патогенность, лекарственная устойчивость, филогения. геномный надзор.

Keywords: *V. cholerae*, genome variability, pathogenicity, drug resistance, phylogeny, genomic surveillance.

Оригинальная статья.

Количество страниц текста – 14, количество таблиц – 1, количество рисунков – 3.

27.06.2024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядков ый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет- адрес (URL) цитируемой статьи и/или doi
1.	Бароян О.В. Холера Эль-Тор. Москва: Медицина, 1971. 256 с.	Baroyan O.V. Cholera Biovar El Tor. Moskva: Meditsina, 1971. 256 p.	-
2.	Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Титова С.В. Распространенность ICE элементов различных типов у V. cholerae // Здоровье	Vodop'yanov S.O., Vodop'yanov A.S., Oleynikov I.P., Titova S.V. Prevalence of ice elements of different types in V. cholerae.	https://zniso.fcgie.ru/jour/article/view/319

	населения и среда обитания. 2018. № 1. С. 33–35.	Public Health and Life Environment – PH&LE, 2018, no. 1, pp. 33-35.	
3.	Кологоров А.И., Кедрова О.В., Пахомов Д.А., Пискунова Н.В., Ковтунов А.И., Васенин А.С., Кабин В.В., Илюхин А.А., Грачева И.В., Раздорский А.С., Сафронов В.А. Закономерности распространения холеры в бассейне Волги в 1970–1973 гг. // Проблемы особо опасных инфекций. 2010. № 104. С. 22-27.	Kologorov A.I., Kedrova O.V., Pakhomov D.A., Piskunova N.V., Kovtunov A.I., Vasenin A.S., Kabin V.V., Ilyukhin A.A., Gracheva I.V., Razdorskiy A.S., Safronov V.A. Regularities of Cholera Spread in the Volga Basin in 1970- 1973. Problemy	https://doi.org/10.2105 5/0370-1069-2010- 2(104)-22-27

		Osobo Opasnykh Infektsii, 2010, no. 104, pp. 22-27.	
4.	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.	Monakhova E.V., Ghosh A., Mutreja A., Weill F., Ramamurthy T. Endemic Cholera in India and Imported Cholera in Russia: What is Common? Problems of Particularly Dangerous Infections, 2020, no. 3, pp. 17- 26.	https://doi.org/10.2105 5/0370-1069-2020-3- 17-26
5.	Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Кругликов В.Д., Титова	Onishchenko G.G., Moskvitina E.A.,	https://doi.org/10.1569 0/vramn.v70i2.1320.

	С.В., Адаменко О.Л., Водопьянов А.С., Водопьянов С.О. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии // Вестник РАМН. 2015. Т. 70, № 2. С. 249–256.	Kruglikov V.D., Titov S.V., Adamenko O.L., Vodop'yarov A.S., Vodop'yarov S.O. Surveillance of cholera in Russia during the seventh pandemic. Annals of the Russian Academy of Medical Sciences. 2015, vol. 70, no. 2, pp. 249–256.	
6.	Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б., Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Чемисова О.С., Лопатин А.А., Иванова	Popova A.Yu., Noskov A.K., Ezhlova E.B., Kruglikov V.D.,	https://doi.org/10.2105 5/0370-1069-2024-1- 76-88

	<p>С.М., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Савина И.В. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2024. № 1. С. 76– 88.</p>	<p>Monakhova E.V., Chemisova O.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Podoynitsyna O.A., Vodop'yarov A.S., Levchenko D.A., Savina I.V. Epidemiological Situation on Cholera in the Russian Federation in 2023 and Forecast for 2024. Problems of Particularly Dangerous Infections, 2024, no. 1, pp. 76– 88.</p>	
--	--	---	--

7.	Рыбальченко Д.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Смирнова Н.И. Распространенность разных типов интегративного конъюгативного элемента SXT/R391, кодирующего множественную резистентность к антибиотикам, среди клинических штаммов возбудителя холеры // Проблемы особо опасных инфекций. 2022. № 1. С. 137- 147.	Rybal'chenko D.A., Shchelkanova E.Yu., Lozovsky Yu.V., Fedorov A.V., Smirnova N.I. Prevalence of Different Types of Integrative Conjugative Element SXT/R391 Encoding Multiple Antibiotic Resistance Among Clinical Strains of Cholera Agent. Problems of Particularly Dangerous Infections,	https://doi.org/10.2105 5/0370-1069-2022-1- 137-147
----	---	--	--

		2022, no. 1, pp. 137-147.	
8.	Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Щелканова Е.Ю., Смирнова Н.И. Молекулярно-генетический анализ штаммов <i>Vibrio cholerae</i> O1 Эль-Тор, выявленных на территории России в 2023 г. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2024. Т. 42, № 1. С. 34-42.	Rybal'chenko D.A., Lozovsky Yu.V., Krasnov Ya.M., Shchelkanova E.Yu., Smirnova N.I. Molecular-Genetic Analysis of <i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor Strains Identified in Russia in 2023. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2024, vol. 42, no. 1, pp. 34-42.	https://doi.org/10.17116/molgen20244201134

9.	Савельев В.Н., Савельева И.В., Васильева О.В., Бабеньшев Б.В., Ковалев Д.А., Грижебовский Г.М., Антоненко А.Д., Курбанов Ш.Х., Бутаев Т.М., Куличенко А.Н. Эволюция <i>Vibrio cholerae</i> eltor и обнаружение их генотипических вариантов на Кавказе // Проблемы особо опасных инфекций. 2012. Т. 4, № 114. С. 58-60.	Savel'Ev V.N., Savel'Eva I.V., Vasil'Eva O.V., Babenyshev B.V., Kovalev D.A., Grizhebovsky G.M., Antonenko A.D., Kurbanov Sh.Kh., Butaev T.M., Kulichenko A.N. Evolution of <i>Vibrio cholerae</i> El Tor and Detection of Their Gene-Variants in the Caucasus. Problems of Particularly Dangerous Infections,	https://doi.org/10.2105/5/0370-1069-2012-4-58-60
----	--	--	---

		2012, vol. 4, no. 114, pp. 58-60.	
10.	Смирнова Н.И., Заднова С.П., Шашкова А.В., Кутырев В.В. Вариабельность генома измененных вариантов <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> биовара Эль Тор, завезенных на территорию России в современный период // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2011. Т. 26, № 3. С. 102–110.	Smirnova N.I., Zadnova S.P., Shashkova A.V., Kutyrev V.V. Genome variability in the altered variants of <i>Vibrio cholerae</i> biovar El Tor isolated in Russia. <i>Molecular</i> <i>Genetics,</i> <i>Microbiology and</i> <i>Virology</i> . 2011, vol. 26, no. 3, pp. 102- 110.	https://doi.org/10.3103 /S0891416811030062
11.	Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Плеханов Н.А.,	Smirnova N.I., Rybal'chenko D.A.,	https://doi.org/10.1711 6/molgen20234101110

	Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Кутырев В.В. Новые генетические варианты возбудителя холеры и их распространение в эндемичных странах и России // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2023. Т. 41, № 1. С. 10–17.	Plekhanov N.A., Lozovsky Yu.V., Fedorov A.V., Kuttyrev V.V. New genetic variants of cholera agent and their distribution in epidemic countries and Russia. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2023, vol. 41, no. 1, pp. 10-17.	
12.	Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical <i>Vibrio cholerae</i> - A review. Infect.	-	https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104726

	Genet. Evol., 2021, vol. 89, pp. 104726.		
13.	Chaguza C., Chibwe I., Chaima D., Musicha P., Ndeketa L., Kasambara W., Mhango C., Mseka U.L., Bitilinyu-Bangoh J., Mvula B., Kipandula W., Bonongwe P., Munthali R.J., Ngwira S., Mwendera C.A., Kalizang'oma A., Jambo K.C., Kambalame D., Kamng'ona A.W., Steele D., Chauma-Mwale A., Hungerford D., Kagoli M., Nyaga M.M., Dube Q., French N., Msefula C.L., Cunliffe N.A., Jere K.C. Genomic insights into the 2022–2023 <i>Vibrio cholerae</i>	-	https://doi.org/10.1101/2023.06.08.23291055

	outbreak in Malawi. [Электронный ресурс]. URL: https://www.medrxiv.org/ content/10.1101/2023.06.08.23 291055v1 (дата обращения 02.05.2024).		
14.	Dolores J., Satchell K.J. Analysis of <i>Vibrio cholerae</i> genome sequences reveals unique rtxA variants in environmental strains and an rtxA-null mutation in recent altered El Tor isolates. <i>mBio</i> , 2013, vol. 4, no. 2, pp. 1–9.	-	https://doi.org/10.1128 /mBio.00624-12
15.	Dziejman M., Balon E., Boyd D., Fraser C.M., Heidelberg J.F., Mekalanos J.J. Comparative genomic analysis	-	https://doi.org/10.3410 /f.1004686.53905

	of <i>Vibrio cholerae</i> : genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 2002, vol. 9, no. 3, pp. 1556-1561.		
16.	Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Bochalgin N.O., Mironova L.V. Antibiotic resistance in <i>Vibrio cholerae</i> El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. Infect. Genet. Evol., 2020, vol. 78, pp. 104096.	-	https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.104096
17.	Kim H.B., Wang M., Ahmed S., Park C.H., LaRocque C. R., Faruque A.S., Salam M.A., Khan W.A., Qadri F.,	-	https://doi.org/10.1128/AAC.01045-09

	Calderwood S.B., Jacoby G.A., Hooper D.C. Transferable Quinolone Resistance in <i>Vibrio</i> <i>cholerae</i> . <i>Antimicrob. Agents</i> <i>Chemother.</i> , 2010, vol. 54, pp. 799–803.		
18.	Mironova L.V., Gladkikh A.S., Ponomareva A.S., Feranchuk S.I., Bochalgin N.O., Basov E.A., Khunkheeva Yu.Z., Balakhonov S.V. Comparative genomics of <i>Vibrio cholerae</i> El Tor strains isolated at epidemic complications in Siberia and at the Far East. <i>Infect. Genet.</i> <i>Evol.</i> , 2018, vol. 60, pp. 80–88.	-	https://doi.org/10.1016 /j.meegid.2018.02.023
19.	Mutreja A., Kim D. W., Thomson N., Connor T. R., Lee	-	https://doi.org/10.1038 /nature10392

	<p>J. H., Kariuki S., Croucher N.J., Choi S.Y., Harris S.R., Lebens M., Niyogi S.K., Kim E.J., Ramamurthy T., Chun J., Wood J.L., Clemens J.D., Czerkinsky C., Nair G.B., Holmgren J., Parkhill J., Dougan G.</p> <p>Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic.</p> <p>Nature., 2011, vol. 477, pp. 462–465.</p>		
20.	<p>Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A.</p> <p>New variants of <i>Vibrio cholerae</i> O1 biotype El Tor with attributes of the classical</p>	-	<p>https://doi.org/10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002</p>

	biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. <i>J. Clin. Microbiol.</i> , 2002, vol. 40, no. 9, pp. 3296–3299.		
21.	Pant A., Das B., Bhadra R.K. CTX phage of <i>Vibrio cholerae</i> : Genomics and applications. <i>Vaccine.</i> , 2020, vol. 29, no. 38, Suppl. 1:A7-A12.	-	https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.06.034
22.	Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S., Walker M., Kent H., Tarr C., Talkington D., Rowe L., Olsen-Rasmussen M., Frace M., Sammons S., Dahourou G. A., Boncy J., Smith A. M., Mabon P., Petkau A., Graham M., Gilmour M. W., Gerner-	-	https://doi.org/10.3201/eid1711.110794

	Smidt P. Comparative Genomics of <i>Vibrio cholerae</i> from Haiti, Asia, and Africa. <i>Emerg. Infect. Dis.</i> , 2011, vol. 17, no. 11, pp. 2113–2121.		
23.	Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of <i>Vibrio cholerae</i> O1. <i>Trends Microbiol.</i> , 2010, vol. 18, pp. 46–54.	-	https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.10.003
24.	Samanta P., Mandal R.S., Saha R.N. Shaw S., Ghosh P., Dutta S., Ghosh A., Imamura D., Morita M., Ohnishi M., Ramamurthy T., Mukhopadhyay AK. A point mutation in <i>carR</i> is involved in the emergence of polymyxin B-	-	https://doi.org/10.1128/IAI.00080-20

	sensitive <i>Vibrio cholerae</i> O1 El Tor biotype by influencing gene transcription. <i>Infect. Immun.</i> , 2020, vol. 88, no. 5, pp. e00080-20.		
25.	Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., Fondi M., Taviani E., Fani R., Colombo M.M., Colwell R.R., Balloux F. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic <i>Vibrio cholerae</i> lineage. <i>mBio.</i> , 2014, vol. 5, no. 4, pp. e01356-14.	-	https://doi.org/10.1128/mBio.01356-14
26.	Talkington D., Bopp C., Tarr C., Parsons M.B., Dahour G., Freeman M., Joyce K., Turnsek	-	https://doi.org/10.3201/eid1711.110805

	<p>M., Garrett N., Humphrys M., Gomez G., Stroika S., Boncy J., Ochieng B., Oundo J., Klena J., Smith A., Keddy K., Gerner-Smidt P. Characterization of toxigenic <i>Vibrio cholerae</i> from Haiti, 2010—2011. <i>Emerg. Infect. Dis.</i>, 2011, vol. 17, no. 11, pp. 2122-2129.</p>		
27.	<p>Taviani E., Grim C.J., Choi J., Chun J., Haley B., Hasan N.A., Huq A., Colwell R.R. Discovery of novel <i>Vibrio cholerae</i> VSP-II genomic islands using comparative genomic analysis. <i>FEMS Microbiol. Lett.</i>, 2010, vol. 308, pp. 130–137.</p>	-	<p>https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02008.x</p>

28.	Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., Tarr C., Rauzier J., Fawal N., Keddy K.H., Salje H., Moore S., Mukhopadhyay A.K., Bercion R., Luquero F.J., Ngandjio A., Dosso M., Monakhova E., Garin B., Bouchier C., Pazzani C., Mutreja A., Grunow R., Sidikou F., Bonte L., Breurec S., Damian M., Njanpop- Lafourcade B.M., Sapriel G., Page A.L., Hamze M., Henkens M., Chowdhury G., Mengel M., Koeck J.L., Fournier J.M., Dougan G., Grimont P.A.D., Parkhill J., Holt K.E., Piarroux R., Ramamurthy T., Quilici	-	https://doi.org/10.1126/science.aad5901
-----	--	---	---

	M.L., Thomson N.R. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. Science., 2017, vol. 358, no. 6364, pp. 785–789.		
--	---	--	--