

Разработка системы INDEL-типирования *ctx+* штаммов *Vibrio cholerae* седьмой пандемии

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов
Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Седьмая пандемия холеры сопровождается формированием клонов холерного вибриона с новыми генетическими свойствами, в том числе обладающих способностью к пандемическому распространению и вызывающих заболевания с более тяжёлым клиническим течением [1–3]. Повсеместное распространение подобных генетических вариантов *Vibrio cholerae* и возможность их завоза на территорию Российской Федерации обуславливают необходимость постоянного комплексного мониторинга с применением современных молекулярно-генетических технологий.

Цель работы — совершенствование INDEL-типирования *ctx+* штаммов *V. cholerae* седьмой пандемии путём использования дополнительных INDEL-локусов.

Материалы и методы. Проведён биоинформационный анализ 2105 полногеномных сиквенсов токсигенных *ctxAB+tcpA+* штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor из открытых баз данных с целью поиска INDEL-локусов для молекулярного типирования. На основе критерия удобства идентификации размера аллелей отобрано восемь INDEL-локусов. Три локуса описаны ранее, а пять были идентифицированы в результате проведённой работы. Сконструированные праймеры формировали ампликоны размером от 67 до 390 пар оснований, что позволило их уверенно идентифицировать при проведении электрофореза в геле.

Результаты. Распределение аллелей сформировало 11 уникальных INDEL-кластеров, обозначенных нами А–К. По количеству штаммов в составе кластеров выявлено три типа кластеров: мажорные (А, В и С) составили 89% изученных последовательностей, промежуточные (D, E, F, G и H) — 10,5% геномов. Три минорных кластера (I, J и K) были представлены единичными штаммами. Четыре кластера объединяли штаммы, выделенные в XX веке (А — в 1941 году, F — в 1957 году, G — в 1993 году, E — в 1999 году), а семь кластеров — в XXI веке (с 2003 по 2016 год). В период с 2019 по 2023 год активность проявляли представители INDEL-кластеров: А, В, D и E.

Заключение. Изучение сроков циркуляции позволило предположить, что представители разных кластеров обладают различным эпидемическим потенциалом, что проявилось в отсутствии выделения штаммов некоторых кластеров в последние годы. Сравнительное изучение INDEL-типирования с приёмом SNP-типирования при анализе *in silico* 378 геномов штаммов, изолированных на Африканском континенте, свидетельствует, что предлагаемый способ INDEL-типирования по разрешающей способности не уступает приёму SNP-типирования.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; молекулярное типирование; INDEL-локусы; INDEL-генотипирование.

Как цитировать:

Водопьянов С.О., Водопьянов А.С. Разработка системы INDEL-типирования *ctx+* штаммов *Vibrio cholerae* седьмой пандемии // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2024. Т. 29, № 4. С. 00-00. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID631523>

Статья поступила: 02.05.2024

Статья одобрена: 18.06.2024

Опубликована online: 19.07.2024

Development of an INDEL typing system for *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* from the seventh pandemic

Sergey O. Vodopyanov, Alexey S. Vodopyanov
Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

ABSTRACT

Background: The seventh cholera pandemic is accompanied by the formation of *Vibrio cholerae* clones with new genetic properties, including those with the ability to spread pandemically and cause diseases with a more severe clinical course [1–3]. The widespread distribution of such genetic variants of *Vibrio cholerae* and the possibility of their introduction into the territory of the Russian Federation necessitate constant comprehensive monitoring using modern molecular genetic technologies.

Aim of the work is to improve INDEL typing of *ctx+* strains of *V. cholerae* of the seventh pandemic by using additional INDEL loci.

Materials and methods: A bioinformatic analysis of 2105 full-genome sequences of toxigenic *ctxAB+tcpA+* strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor from open databases was carried out in order to search for INDEL loci for molecular typing. Based on the convenience criterion for allele size identification, eight INDEL loci were selected. Three loci have been described previously, and five were identified as a result of this work. The designed primers formed amplicons ranging in size from 67 to 390 base pairs, which made it possible to confidently identify them during gel electrophoresis.

Results: The distribution of alleles formed 11 unique INDEL clusters, which we designated A–K. Based on the number of strains within the clusters, three types of clusters were identified: major (A, B and C) made up 89% of the total number of sequences studied, intermediate (D, E, F, G and H) 10.5% of the genomes. Three minor clusters (I, J and K) were represented by single strains. Four clusters united strains isolated in the 20th century (A — in 1941, F — in 1957, G — in 1993, E — in 1999), and seven clusters — in the 21st century in the period from 2003 to 2016. In the period from 2019 to 2023, representatives of INDEL clusters were active: A, B, D and E.

Conclusion: The study of the timing of circulation suggested that representatives of different clusters have different epidemic potential, which was manifested in the absence of isolation of strains of some clusters in recent years. A comparative study of INDEL typing with SNP typing in the *in silico* analysis of 378 genomes of strains isolated on the African continent indicates that the proposed INDEL typing method is not inferior to SNP typing in terms of resolution.

Keywords: *Vibrio cholerae*; molecular typing; INDEL loci; INDEL genotyping.

To cite this article:

Vodopyanov SO, Vodopyanov AS. Development of an INDEL typing system for *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* from the seventh pandemic. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2024;29(4):??-??. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID631523>

Received: 02.05.2024

Accepted: 18.06.2024

Published online: 19.07.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Седьмая пандемия холеры сопровождается формированием клонов холерного вибриона с новыми генетическими свойствами, в том числе обладающих способностью к пандемическому распространению и вызывающих заболевания с более тяжёлым клиническим течением [1–3]. Повсеместное распространение подобных генетических вариантов *Vibrio cholerae* и возможность их завоза на территорию Российской Федерации обуславливают необходимость постоянного комплексного мониторинга с применением современных молекулярно-генетических технологий, обеспечивающих ускоренную диагностику, своевременную идентификацию с определением эпидемической значимости возбудителя холеры для принятия оперативных управленческих решений [4 - 6].

Молекулярно-генетический мониторинг *V. cholerae* основан на анализе ряда хорошо изученных генетических маркеров. Широкое распространение получили методы анализа VNTR- и INDEL-локусов. На основании определения кратности вариабельных tandemных повторов (VNTR) предложен и широко используется довольно сложный и трудоёмкий метод VNTR-типирования токсигенных *V. cholerae*, изолированных в различных регионах мира [7–11]. Довольно высокая стабильность VNTR-локусов способствует получению достоверных результатов [12]. В последнее время VNTR-типирование успешно используется в сочетании с приёмом полногеномного секвенирования [10, 13–15].

Метод INDEL-типирования более прост и доступен и основан на определении наличия «вставок-делеций» (INsertion-DELetion) в различных генах [16]. Каждый из методов INDEL- и VNTR-типирования имеет свои достоинства, но наиболее информативные результаты получены при сочетании двух приёмов типирования [17].

Однако сравнительно простой в использовании приём INDEL-типирования *V. cholerae* хорошо подходит лишь для изучения нетоксигенных штаммов [17], но не позволяет проводить внутривидовое типирование токсигенных штаммов, поскольку все *ctx+* культуры при используемом наборе INDEL-локусов формируют лишь один INDEL-генотип [16].

Цель работы — совершенствование INDEL-типирования *ctx+* штаммов *V. cholerae* седьмой пандемии путём использования дополнительных INDEL-локусов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использованы данные полногеномного секвенирования токсигенных (*ctxAB+tcpA+*) штаммов *V. cholerae* O1 E1Toг, полученные на платформе Illumina MiSeq в ходе выполнения стратегической инициативы социально-экономического развития Российской Федерации до 2030 года «Санитарный щит страны — безопасность для здоровья (предупреждение, выявление, реагирование)» (40 штаммов), 1531 генома из базы данных NCBI и 534 геномов из базы ENA (European Nucleotide Archive), представленных в виде ридов, сборку которых проводили с использованием программы Spades [18]. Информацию о дате выделения и месте изоляции штамма получали из прилагаемого описания [19].

Для анализа использовали собственные скрипты, написанные на языках программирования Java и Python. Геокодирование мест выделения штаммов проводили с использованием API-сервиса Nominatum. Разработку онлайн геоинформационной системы осуществляли с использованием языков программирования HTML, JavaScript и PHP. В качестве ядра использовали свободно-распространяемую библиотеку Leaflet, написанную на языке Java Script, в качестве картографических данных — карты, полученные от сообщества Open Streetmap.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате биоинформационного анализа было проверено свыше 40 перспективных INDEL-локусов для проведения внутривидового типирования токсигенных штаммов *V. cholerae*. Каждый INDEL-локус в хромосоме представлен двумя аллелями, поэтому размер аллеля должен быть легко определяем по результатам электрофореза после проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) при наличии культуры *in vitro* или *in silico* по данным биоинформационного анализа нуклеотидной последовательности из баз данных. По итогам проверки для дальнейшей работы отобран набор из восьми INDEL-локусов. В их состав вошли как уже описанные локусы 1095 [20], 3186 [16], *rtxA4* [21], так и идентифицированные в данном исследовании: 2566, 0667, 1446, 730 и 834. К идентифицированным локусам были сконструированы праймеры (табл. 1),

которые при проведении ПЦР формировали ампликоны размером в пределах 67–390 пар оснований, что позволило их уверенно идентифицировать при проведении электрофореза в геле. Распределение аллелей восьми INDEL-локусов среди 2105 изученных *ctx+* геномов сформировало 11 уникальных INDEL-кластеров, обозначенных нами А–К (табл. 2).

Таблица 1. INDEL-локусы для типирования *ctx+* *Vibrio cholerae*

Table 1. INDEL loci for typing of *ctx+* *Vibrio cholerae*

№ п/п	Локус	Праймеры	Позиция в геноме*	Размер аллелей INDEL-локусов
1	1095	ccatcagtctgectctgacac ftcgacaatcgtcagtagcg	CP028828: 1053058 - 1052964	87/95
2	rtxA4	tgcaactgggtataaccaatggg tgggtaccaagacgttcgcca	CP028827: 1533766 - 1533377	330/390
3	VC2566	tggtatggattgctgcaagt agtcagtcgctccagcattt	CP028827: 333608 - 333522	87/171
4	VCA0667	gacggatattgttcagtcagc ctcccagatactccatgtacc	CP028828: 606894 - 606795	88/100
5	VC1446	gcctatcaagcttgcattgtg tggccaatacggattgctg	CP028827: 1540677 - 1540770	94/100
6	3186	agttggagtcgctcaaca gcagggtgatagacgggtgat	CP028827: 212759 - 212693	67/74
7	VCA0730	gggatgaagtaaatgttccga aacaactctacgcaggcttg	CP028828: 677974 - 677879	90/96
8	VCA0834	tcgcgataaaaggtttagtgatc aaggatccacttcgctcc	CP028828: 781715 - 781810	89/96

* позиция указана по референсному геному *Vibrio cholerae* El Tor N16961 (NCBI Accession Numbers CP028827, CP028828).

* position is indicated according to the reference genome of *Vibrio cholerae* El Tor N16961 (NCBI Accession Numbers CP028827, CP028828).

Таблица 2. INDEL-генотипы *ctx+* *Vibrio cholerae* и размеры аллелей восьми INDEL-локусов

Table 2. INDEL genotypes of *ctx+* *Vibrio cholerae* and allele sizes of eight INDEL loci

INDEL-генотип	Размеры ампликонов, пар оснований							
	1095	rtxA4	VC2566	VCA0667	VC1446	3186	VCA0730	VCA0834
A	95	390	87	100	94	67	96	96
B	87	390	87	100	94	67	96	96
C	87	330	87	100	94	67	96	96
D	87	330	87	88	94	67	96	96
E	95	390	171	100	94	74	96	96
F	95	390	171	100	94	67	96	96
G	95	390	87	100	94	67	96	89
H	95	390	87	100	94	67	90	96
I	95	390	171	100	100	74	96	96
J	95	390	87	100	100	67	96	96
K	87	389	87	100	94	67	96	96

Таблица 3. Характеристика длительности циркуляции *ctx+* штаммов *Vibrio cholerae* различных INDEL-кластеров

Table 3. Characteristics of the duration of circulation of *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* of various INDEL clusters

№ п/п	INDEL-кластер	Число штаммов в составе INDEL-кластера	Годы выделения штаммов	Время активной циркуляции, лет
1	A	1284	1941–2023	Активен с 1941 года
2	B	415	2004–2022	19
3	C	161	2012–2018	7
4	D	101	2016–2023	Активен с 2016 года

5	E	55	1999–2021	22
6	F	36	1957–1997	41
7	G	27	1993–2000	8
8	H	15	2003–2017	15
9	I	2	2006–2010	5
10	J	2	2015–2017	3
11	K	7	2011–2014	4

На основании количества штаммов в составе кластеров три кластера — А, В и С — относились к мажорным, и в сумме они составили 89% изученных последовательностей. Кластеры D, E, F, G и H относились к промежуточному типу и включали 10,5% изученных последовательностей. Три кластера — I, J и K — были представлены единичными штаммами (табл. 3). INDEL-кластеры *ctx+* *V. cholerae* различались по сроку формирования. Штаммы, входящие в состав первых четырёх кластеров, были изолированы в XX веке (А — в 1941 году, F — в 1957 году, G — в 1993 году, E — в 1999 году), остальные штаммы, изолированные в XXI веке (с 2003 по 2016 год), вошли в состав семи кластеров (среди которых присутствовали два мажорных — В и С).

Таблица 4. Характеристика географического распределения *ctx+* штаммов *Vibrio cholerae* различных INDEL-кластеров

Table 4. Characteristics of the geographical distribution of *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* of various INDEL clusters

№ п/п	INDEL-кластер	Характеристика основного очага	Заносы инфекции из основного очага
1	A	Индия, 1941 г.	Пандемическое распространение на всех континентах. Заносы в РФ (34 шт): 1970–1973, 1993–1994, 1999, 2001, 2005, 2011, 2014, 2023 гг.
2	B	Индия, 2004 г.	Гаити, 2010–2022 г.; Африка, 2009–2012 гг. Последнее выделение 26 штаммов — Англия, 2019 г. Заносы в РФ: 2010, 2011 гг.
3	C	Индия, 2012 г.	Африка, 2015–2018 гг.; Йемен, 2016, 2017 гг.
4	D	Индия, 2016 г.; Бангладеш, 2018 г. Из 101 штамма 91 культура изолирована в Индии и Бангладеш	Ирак, 2017 г.; США, 2019, 2021–2022 гг.; Австралия, 2022 г.; Пакистан, 2022 г.; ЮАР, 2023 г. Заносы в РФ: 2023 г. (Тамбов, Москва)
5	E	Тайвань, 2007 г. Из 55 из 45 штаммов изолированы на Тайване	Южная Африка, 2018–2020 гг.; Китай, 2021 г.
6	F	Индонезия, 1957 г.; Австралия, 1977–1997 гг. Из 36 штаммов 30 изолированы в Австралии	США, 1974, 1978, 1986 гг.
7	G	Китай, 1993 г.	Заносы в РФ: 1999 г.
8	H	Непал, 2003 г.	Тайвань, 2004–2017 гг.; Ирак, 2017 г.; Южная Корея, 2016 г.
9	I	Китай, 2006 г.	Нет заносов
10	J	Конго, 2015 г.	Гаити, 2017 г.
11	K	Нигерия, Того, 2011 г.	Гана, 2014 г.

ОБСУЖДЕНИЕ

За последнее пятилетие (период с 2019 по 2023 год) активность проявляли представители четырёх INDEL-кластеров: А, В, D и E, причём за последние три года зарегистрировано выделение представителей только изолятов из кластеров А, В и D. Время циркуляции (период выделения) штаммов различалось и варьировало для представителей различных кластеров от 4 до 21 года. Кластеры F и G, на наш взгляд, можно рассматривать как «угасшие», поскольку в течение последних 20 лет штаммов с такими генотипами выделено не было (табл. 3).

Представители мажорных INDEL-кластеров А, В, С вызвали ряд серьёзных вспышек на различных континентах, что позволяет предположить, что штаммы, образующие эти кластеры, обладают высоким эпидемическим потенциалом. Так, эпидемические осложнения в Гаити и заносы в Африку в период 2009–2012 годов обусловлены представителями кластера В, вспышку в Йемене вызвали штаммы кластера С (табл. 4). Интересно, что в 2023 году на территории РФ были выделены три токсигенных штамма: один представитель кластера А (г. Ростов-на-Дону) и два — D (г. Тамбов, г. Москва).

Изучение сроков циркуляции *ctx+* *V. cholerae*, входящих в состав INDEL-кластеров (табл. 3 и 4), позволило предположить, что представители разных кластеров обладают различным

эпидемическим потенциалом. Так, штаммы, циркулировавшие в Индонезии и Австралии до 1997 года и отнесённые к кластеру F, были выделены в США в результате исследования трёх единичных заносов. На наш взгляд, это может свидетельствовать об «угасании» данной ветви, обусловленном низким эпидемическим потенциалом входящих в её состав *ctx+* штаммов. В пользу низкого эпидемического потенциала штаммов, входящих в промежуточные и минорные INDEL-кластеры E–K, свидетельствует низкое число выносов возбудителя из очагов циркуляции. По этому критерию в данный период времени штаммы INDEL-кластеров A, B и D характеризуются повышенным эпидемическим потенциалом и, вероятно, вытесняют ранее сформированные штаммы [2, 22].

Представлялось интересным оценить *in silico* эффективность предложенной схемы INDEL-типирования *ctx+* *V. cholerae* с аналогичной системой, основанной на использовании SNP-анализа полногеномных сиквенсов.

На основании анализа 1757 SNP идентифицировано 3 волны и минимум 8 различных филогенетических линий *V. cholerae*, причём изоляты классического биотипа образовали отдельную сильно кластеризованную группу, далёкую от изолятов из ET07 седьмой пандемии [22, 23]. На первый взгляд штаммы мажорного INDEL-кластера A, описанные в данном исследовании, могут соответствовать штаммам волны 1, для которых характерно отсутствие интегративного конъюгативного элемента ICE, что отличает их от штаммов волны 2 [22]. Однако INDEL-кластер A включает как ICE-позитивные, так и ICE-негативные изоляты. Вероятно, в дальнейшем в случае необходимости для дифференциации подгрупп в составе пандемического INDEL-кластера A целесообразно провести поиск дополнительных INDEL-маркеров.

Впоследствии другая группа авторов использовала этот же приём SNP-типирования для анализа штаммов 1070 холерных вибрионов O1, изолированных в 45 африканских странах за 49-летний период по 9300 однонуклеотидным заменам [24], в дальнейшем схема типирования была расширена при изучении 1203 геномов по 9986 SNP [25]. В последующей работе [26] авторы использовали 10 679 SNP, что привело к идентификации уже 15 сублиний (AFR1–AFR15). Возможно, расширение числа использованных SNP обусловлено стремлением повысить достоверность метода, поскольку описаны случаи существенного расхождения результатов SNP-типирования при использовании различного набора SNP [27].

Для сравнения двух различных способов молекулярного типирования было проведено сравнительное изучение вспышек холеры на Африканском континенте разработанным нами методом INDEL-типирования и приёмом SNP-типирования [24, 25] (табл. 5).

При SNP-типировании было показано, что эпидемические осложнения были связаны со штаммами одной расширенной линии, завезёнными как минимум 11 раз начиная с 1970 года. Всего при SNP-типировании выявлено 12 сублиний *V. cholerae* (T1–T12), в последующей работе была обнаружена 13-я сублиния, обусловившая вспышку холеры в Йемене [24, 25].

Таблица 5. Сравнительное изучение *ctx+* штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных на Африканском континенте методом INDEL-типирования и SNP-анализом

Table 5. Comparative study of *ctx+* strains of *Vibrio cholerae* isolated on the African continent by INDEL typing and SNP analysis

Число штаммов	Годы выделения штаммов	INDEL-кластер	SNP-сублинии по схеме [24,25]
322	1981–2017	A	T1–T12
23	2009–2012	B	T12
18	2014–2018	C	T13
7	2018–2020	E	Нет
1	2015	J	T7
7	2011–2014	K	T12

Результаты INDEL-типирования показали, что заносы в страны Африканского континента вызвали штаммы, входящие в состав восьми кластеров A, B, C, E, J и K из 11 описанных, а не одной SNP-линии. Присутствия представителей INDEL-кластеров D, F, G и H в Африке не обнаружено. В состав мажорного INDEL-кластера A входили представители всех 12 сублиний, выявленных при SNP-анализе (T1–T12). Минорный INDEL-кластер J соответствовал сублинии T7. Штаммы сублинии T12 входили в состав INDEL-кластеров A, B и K (табл. 5). Интересно, что в схему Weill, 2017 не входили штаммы INDEL-кластера E, вызвавшие неоднократные заносы в Южную Африку в 2018, 2019 и 2020 годах (табл. 4).

Результаты анализа штаммов, изолированных на Африканском континенте, свидетельствуют, что предлагаемый способ INDEL-типирования *ctx+* штаммов *V. cholerae* по разрешающей

способности не уступает приёму SNP-типирования [24, 25]. Достоинством предлагаемого способа является простота и наглядность представления результатов.

На основании проведённой работы на основании распределения восьми выявленных INDEL-локусов создана геоинформационная система «INDEL-генотипы штаммов *V. cholerae* O1», расположенная на геоинформационном портале ФКУЗ «Ростовского-на-Дону противочумного института» Роспотребнадзора (http://gis.antiplague.ru/s_Vcholerae_INDEL.php). Встроенная удобная система фильтров и поиска позволяет оперативно проводить молекулярный мониторинг *ctx+* штаммов из доступных баз данных по различным запросам, отображать на карте места выделения и число изолированных культур (рис. 1).

Способ SNP-типирования крайне трудоёмок, требует высокого качества секвенирования и значительного машинного времени для обработки данных полногеномного секвенса. Часто его результат зависит от числа используемых SNP. Предлагаемый приём INDEL-типирования по восьми локусам при необходимости можно оперативно провести с помощью рутинной ПЦР, не прибегая к трудоёмкому и дорогостоящему секвенированию. Преимуществом предлагаемого способа INDEL-типирования *ctx+* *V. cholerae* является возможность проведения исследования как в формате *in vitro* при наличии культуры возбудителя, так и в формате *in silico* при анализе полногеномной нуклеотидной последовательности с целью молекулярного мониторинга холеры.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные INDEL-типирования позволяют рассматривать популяцию *ctx+* *V. cholerae* как сложную биологическую систему, представленную несколькими, генетически отличающимися INDEL-кластерами. Причём на наших глазах происходит процесс формирования и угасания отдельных кластеров [22]. Активными в данный период времени можно считать кластеры А и D, обусловившие заносы в РФ в 2023 году. В дальнейшем целесообразно проведение поиска дополнительных локусов, в перспективе позволивших проведение внутрикластерного типирования мажорных INDEL-кластеров. Перспективными мишенями для анализа могут выступать ICE-элементы или гены, обеспечивающие резистентность к токсическому действию тяжёлых металлов. Кроме того, на наш взгляд, усилия исследователей, направленные на выявление новых факторов и детерминант патогенности, следует сконцентрировать на представителях данных генетических групп. В этом случае в качестве «негативного контроля» при сравнительном изучении геномов можно рассматривать представителей неактивных INDEL-кластеров.



Рис. 1. Внешний вид геоинформационной системы «INDEL-генотипы штаммов *V. cholerae* O1». Представлен результат запроса по географическому распределению штаммов мажорного INDEL-кластера А. Кружки демонстрируют места выделения штаммов, цифра в кружке соответствует числу выделенных штаммов. Цвет маркера и его форма отражает количество выделенных культур: единичные штаммы — звёздочка; от 2 до 10 — зелёный круг; от 10 до 100 — жёлтый круг; свыше 100 — оранжевый круг.

Fig. 1. Appearance of the geographic information system “INDEL genotypes of *V. cholerae* O1 strains” The result of a query on the geographical distribution of strains of the major INDEL cluster A is presented. The circles show the places where the strains were isolated, the number in the circle corresponds to the number of isolated strains. The color of the marker and its shape reflect the number of isolated cultures: single strains — with an star; from 2 to 10 — green circle; from 10 to 100 — yellow circle, over 100 — orange circle.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении работы.

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

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: С.О. Водопьянов — проведение биоинформационного анализа коллекции штаммов, написание и редактирование текста статьи; А.С. Водопьянов — идентификация INDEL-маркеров, написание текста статьи.

ADDITIONAL INFORMATION

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

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. S.O. Vodopyanov — conducting bioinformatics analysis of a collection of strains, writing and editing the text of the article; A.S. Vodopyanov — identification of INDEL markers, writing the text of the article.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ramamurthy T., Mutreja A., Weill F.X., et al. Revisiting the global epidemiology of cholera in conjunction with the genomics of *Vibrio cholerae* // Front Public Health. 2019. Vol. 7. P. 203. doi: 10.3389/fpubh.2019.00203 Erratum in: Front Public Health. 2019. Vol. 7. P. 237. doi: 10.3389/fpubh.2019.00237
2. Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Анализ изменения генома геновариантов *Vibrio cholerae* O1 E1Тогвсовременный период пандемии холеры // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2023. Т. 100, № 5. С. 346–357. doi: 10.36233/0372-9311-389
3. Jubyda F.T., Nahar K.S., Barman I., et al. *Vibrio cholerae* O1 associated with recent endemic cholera shows temporal changes in serotype, genotype, and drug-resistance patterns in Bangladesh // Gut Pathog. 2023. Vol. 15, N 1. P. 17. doi:10.1186/s13099-023-00537-0
4. Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С., и др. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 33–41. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41
5. Носков А.К., Кругликов В.Д., Лопатин А.А., и др. Результаты мониторинга холеры на административных территориях России в период с 2013 по 2019 год // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. 2021. Т. 98, №2. С. 163–175. doi: 10.36233/0372-9311-56
6. Мишанькин Б.Н., Водопьянов А.С., Ломов Ю.М., и др. Ретроспективный VNTR-анализ генотипов штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Ростовской области в годы VII пандемии холеры // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2004. № 4. С. 28. EDN: OJXXPF
7. Danin-Poleg Y., Cohen L.A., Gancz H., et al. *Vibrio cholerae* Strain Typing and Phylogeny Study Based on Simple Sequence Repeats // J Clin Microbiol. 2007. Vol. 45, N 3. P. 736–746. doi: 10.1128/jcm.01895-06
8. Lam C., Octavia S., Reeves P.R., Lan R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae* // BMC Microbiol. 2012. Vol. 12. P. 82. doi: 10.1186/1471-2180-12-82

9. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Краснов Я.М. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2015. Т. 33, № 1. С. 15–22. EDN: TEWRYN
10. Bwire G., Sack D.A., Almeida M., et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS // PLoS Negl Trop Dis. 2018. Vol. 12, N 6. P. e0006492. doi:10.1371/journal.pntd.0006492
11. George C.M., Hasan K., Monira S., et al. A prospective cohort study comparing household contact and water *Vibrio cholerae* isolates in households of cholera patients in rural Bangladesh // PLoS Negl Trop Dis. 2018. Vol. 12, N 7. P. e0006641. doi:10.1371/journal.pntd.0006641
12. Миронова Л.В., Хунхеева Ж.Ю., Басов Е.А., и др. Анализ стабильности генотипа *Vibrio cholerae* в условиях низкой температуры и дефицита питательных веществ // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 3. С. 52–56. doi: 10.21055/0370-1069-2016-3-52-56
13. Rashid M.U., Almeida M., Azman A.S., et al. Comparison of inferred relatedness based on multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1 // FEMS Microbiol Lett. 2016. Vol. 363, N 12. P. fw116. doi:10.1093/femsle/fnw116
14. Ambroise J., Ireng L.M., Durant J.F., et al. Backward compatibility of whole genome sequencing data with MLVA typing using a new MLVA type shiny application for *Vibrio cholera* // PLoS One. 2019. 14, N 12. P. e0225848. doi:10.1371/journal.pone.0225848
15. Mwaba J., Debes A.K., Murt K.N., et al. Three transmission events of *Vibrio cholerae* O1 into Lusaka, Zambia // BMC Infect Dis. 2021. Vol. 21, N 1. P. 570. doi:10.1186/s12879-021-06259-5
16. 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: 10.17816/EID40978
17. Водопьянов А.С., Водопьянов С.О., Олейников И.П. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации // Здоровье населения и среда обитания — ЗНиСО. 2015. № 5 (266). С. 41–44. EDN: UCHPMN
18. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing // J Comput Biol. 2012. Vol. 19, N 5. P. 455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
19. Benamrouche N., Belkader C., Njamkepo E., et al. Outbreak of Imported Seventh Pandemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Algeria, 2018 // Emerging Infectious Diseases. 2022. Vol. 28, N 6. P. 1241–1245. doi:10.3201/eid2806.212451
20. 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. Т. 97, №3. С. 265–270. doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-9
21. 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. N 3. P. 17–26. doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26
22. Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., et al. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic // Nature. 2011. Vol. 477, N 7365. P. 462–465. doi:10.1038/nature10392
23. Monir M.M., Islam M.T., Mazumder R., et al. Genomic attributes of *Vibrio cholerae* O1 responsible for 2022 massive cholera outbreak in Bangladesh // Nat Commun. 2023. Vol. 14, N 1. P. 1154. doi:10.1038/s41467-023-36687-7
24. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., et al. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa // Science. 2017. Vol. 358, N 6364. P. 785–789. doi:10.1126/science.aad5901
25. Weill F.X., Domman D., Njamkepo E., et al. Genomic insights into the 2016–2017 cholera epidemic in Yemen // Nature. 2019. Vol. 565, N 7738. P. 230–233. doi:10.1038/s41586-018-0818-3 Erratum in: Nature. 2019. Vol. 566, N 7745. P. E14. doi: 10.1038/s41586-019-0966-0
26. Smith A.M., Sekwadi P., Erasmus L.K., et al. Imported Cholera Cases, South Africa, 2023 // Emerg Infect Dis. 2023. Vol. 29, N 8. P. 1687–1690. doi:10.3201/eid2908.230750
27. Kuleshov K.V., Vodop'ianov S.O., Dedkov V.G., et al. Travel-Associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia // Emerging Infectious Diseases. 2016. Vol. 22, N 11. P. 2006–2008. doi: 10.3201/eid2211.151727

REFERENCES

1. Ramamurthy T, Mutreja A, Weill FX, et al. 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 Erratum in: *Front Public Health*. 2019;7:237. doi:10.3389/fpubh.2019.00237
2. Smirnova NI, Rybalchenko DA, Lozovskiy YV, Krasnov YM, Kutyrev VV. Analysis of changes in the genome of *Vibrio cholerae* O1 El Tor genovariants during the current period of the cholera pandemic. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2023;100(5):346–357. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-389
3. Jubyda FT, Nahar KS, Barman I, et al. *Vibrio cholerae* O1 associated with recent endemic cholera shows temporal changes in serotype, genotype, and drug-resistance patterns in Bangladesh. *Gut Pathog*. 2023;15(1):17. doi:10.1186/s13099-023-00537-0
4. Onishchenko GG, Moskvitina EA, Vodop'yanov AS, et al. Retrospective Molecular-Epidemiological Analysis of Cholera Epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(4):33–41. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41
5. Noskov AK, Kruglikov VD, Lopatin AA, et al. Results of cholera monitoring in administrative territories of Russia from 2013 to 2019. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(2):163–175. doi: 10.36233/0372-9311-56
6. Mishankin BH, Vodopyanov AS, Lomov YuM, et al. Retrospective VNTR-Analysis of Genotypes of *Vibrio Cholerae* O1 Strains Isolated, During the 7th Cholera Pandemic, in Rostov Region. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2004;(4):28. (In Russ.) EDN: OJXXPF
7. Danin-Poleg Y, Cohen LA, Gancz H, et al. *Vibrio cholerae* Strain Typing and Phylogeny Study Based on Simple Sequence Repeats. *J Clin Microbiol*. 2007;45(3):736–746. doi: 10.1128/jcm.01895-06
8. Lam C, Octavia S, Reeves PR, Lan R. Multi-locus variable number tandem repeat analysis of 7th pandemic *Vibrio cholerae*. *BMC Microbiol*. 2012;12:82. doi: 10.1186/1471-2180-12-82
9. Smirnova NI, Kul'shant' TA, Krasnov YM. MLVA Typing of Clinical *Vibrio Cholerae* Strains Isolated During Different Periods of the Current Cholera Pandemic. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2015;30(1):15–22. EDN: TEWRYN
10. Bwire G, Sack DA, Almeida M, et al. Molecular characterization of *Vibrio cholerae* responsible for cholera epidemics in Uganda by PCR, MLVA and WGS. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(6):e0006492. doi:10.1371/journal.pntd.0006492
11. George CM, Hasan K, Monira S, et al. A prospective cohort study comparing household contact and water *Vibrio cholerae* isolates in households of cholera patients in rural Bangladesh. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12(7):e0006641. doi:10.1371/journal.pntd.0006641
12. Mironova LV, Khunkheeva ZhYu, Basov EA, et al. Analysis of *Vibrio cholerae* Genotype Stability at Low Temperature and Nutrients Deficiency. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2016;(3):52–56. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2016-3-52-56
13. Rashid MU, Almeida M, Azman AS, et al. Comparison of inferred relatedness based on multilocus variable-number tandem-repeat analysis and whole genome sequencing of *Vibrio cholerae* O1. *FEMS Microbiol Lett*. 2016;363(12):fnw116. doi:10.1093/femsle/fnw116
14. Ambroise J, Irengue LM, Durant JF, et al. Backward compatibility of whole genome sequencing data with MLVA typing using a new MLVA type shiny application for *Vibrio cholerae*. *PLoS One*. 2019;14(12):e0225848. doi:10.1371/journal.pone.0225848
15. Mwaba J, Debes AK, Murt KN, et al. Three transmission events of *Vibrio cholerae* O1 into Lusaka, Zambia. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):570. doi:10.1186/s12879-021-06259-5
16. Vodop'yanov AS, Vodop'yanov SO, Oleynikov IP, Mishan'kin BN. Indel-genotyping of *Vibrio cholerae* strains. *Epidemiology and Infectious Diseases*. 2017;22(4):195–200. (In Russ.) doi: 10.17816/EID40978
17. Vodopyanov AS, Vodopyanov SO, Oleynikov IP, et al. INDEL- и VNTR-typing *Vibrio cholerae* strains, isolated in 2013 from the environment objects in the Russian Federation. *Public Health and Life Environment — PH&LE*. 2015;(5(266)):41–44. (In Russ.) EDN: UCHPMN
18. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol*. 2012;19(5):455–477. doi:10.1089/cmb.2012.0021
19. Benamrouche N, Belkader C, Njamkepo E, et al. Outbreak of Imported Seventh Pandemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Algeria, 2018. *Emerging Infectious Diseases*. 2022;28(6):1241–1245. doi:10.3201/eid2806.212451
20. 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. *Journal of Microbiology,*

Epidemiology and Immunobiology. 2020;97(3):265–270. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-2020-97-3-9

21. Monakhova EV, 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;(3):17–26. doi: 10.21055/0370-1069-2020-3-17-26

22. 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

23. Monir MM, Islam MT, Mazumder R, et al. Genomic attributes of *Vibrio cholerae* O1 responsible for 2022 massive cholera outbreak in Bangladesh. *Nat Commun*. 2023;14(1):1154. doi:10.1038/s41467-023-36687-7

24. Weill FX, Domman D, Njamkepo E, et al. Genomic history of the seventh pandemic of cholera in Africa. *Science*. 2017;358(6364):785–789. doi:10.1126/science.aad5901

25. Weill FX, 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 Erratum in: *Nature*. 2019;566(7745):E14. doi: 10.1038/s41586-019-0966-0

26. Smith AM, Sekwadi P, Erasmus LK, et al. Imported Cholera Cases, South Africa, 2023. *Emerg Infect Dis*. 2023;29(8):1687–1690. doi:10.3201/eid2908.230750

27. Kuleshov KV, Vodop'ianov SO, Dedkov VG, et al. Travel-Associated *Vibrio cholerae* O1 El Tor, Russia. *Emerging Infectious Diseases*. 2016;22(11):2006–2008. doi: 10.3201/eid2211.151727

ОБ АВТОРАХ	AUTHORS' INFO
<p>*Водопьянов Сергей Олегович, д-р мед. наук; адрес: Россия 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, д.117/40; ORCID: 0000-0003-4336-0439; eLibrary SPIN: 4672-9310; e-mail:serge100v@gmail.com</p>	<p>*Sergey O. Vodopyanov, MD, Dr. Sci. (Medicine); address: 117/40 st. M. Gorky 344002, Rostov-on-Don, Russia; ORCID: 0000-0003-4336-0439; eLibrary SPIN: 4672-9310; e-mail:serge100v@gmail.com</p>
<p>Водопьянов Алексей Сергеевич, канд. мед. наук; ORCID: 0000-0002-9056-3231; eLibrary SPIN: 7319-3037; e-mail:vodopyanov_as@antiplague.ru</p>	<p>Alexey S. Vodopyanov, MD, Cand. Sci. (Medicine); ORCID: 0000-0002-9056-3231; eLibrary SPIN: 7319-3037; e-mail:vodopyanov_as@antiplague.ru</p>

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Accepted for publication