

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-118-122

УДК 616.932:579.25

О.А. Подойницына, В.Д. Кругликов, Д.А. Левченко, А.С. Водопьянов, М.И. Ежова, А.К. Носков

Изучение структуры липополисахаридного кластера в геномах штаммов *Vibrio cholerae* R-вариантов

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт», Ростов-на-Дону, Российская Федерация

При определении способности штаммов *Vibrio cholerae* агглютинироваться диагностическими холерными сыворотками возможны затруднения при отнесении вибрионов к той или иной серогруппе в случае отклонения культуры от типичных по агглютинабельности признаков. Изучение генетических детерминант, позволяющих установить серогруппу, является актуальной задачей при проведении мониторинга контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов. **Целью** данной работы явилось сравнительное изучение структурной организации липополисахаридных кластеров (O-LPS) штаммов холерных вибрионов R-вариантов. **Материалы и методы.** Полногеномное секвенирование проведено на приборе Illumina MiSeq. Сборка осуществлялась *de novo* программой-сборщиком SPAdes (v. 3.11.1). Для поиска генов использовали программу blastn 2.5.0, для аннотирования входящих в кластеры генов – программу GeneMarkS. Поиск гомологичных участков проводили с помощью программы nucmer. Визуализация O-LPS-кластеров выполнена в программе SnapGene Viewer. **Результаты и обсуждение.** Кластеры генов, ответственных за биосинтез O-антигена, различались у разных штаммов *V. cholerae* R-вариантов. Определено три типа O-LPS-кластеров, отличающихся размером и количеством входящих в их состав генов. Уникальных участков ДНК, общих для всей группы штаммов *V. cholerae* R-вариантов, обнаружить не удалось. Определены два гена, встречающиеся у всех R-вариантов, но они не являются уникальными для этой группы штаммов и присутствуют также у представителей других серогрупп. Для двух типов кластеров обнаружен общий с *V. cholerae* O1 участок, содержащий IS-элемент.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, R-вариант, липополисахаридный кластер, серогруппа, *wbe*, *rfb*.

Корреспондирующий автор: Подойницына Оксана Андреевна, e-mail: podoinitsyna_oa@antiplague.ru.

Для цитирования: Подойницына О.А., Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Носков А.К. Изучение структуры липополисахаридного кластера в геномах штаммов *Vibrio cholerae* R-вариантов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 3:118–122. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-118-122
Поступила 15.06.2022. Отправлена на доработку 03.08.2022. Принята к публ. 06.09.2022.

O.A. Podoinitsyna, V.D. Kruglikov, D.A. Levchenko, A.S. Vodop'yanov, M.I. Ezhova, A.K. Noskov

Investigation of the Lipopolysaccharide Cluster Structure in the Genomes of *Vibrio cholerae* Rough Variants

Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. Determination of *Vibrio cholerae* affiliation to one or another serogroup may meet some difficulties in cases of atypical agglutination with diagnostic cholera sera. The study of genetic determinants that allows for identifying a serogroup is a relevant task in monitoring of surface water body contamination with cholera vibrios. **The aim** of the work was to compare the structural organization (quantitative and qualitative gene composition) of LPS clusters in *V. cholerae* rough variants. **Materials and methods.** We used Illumina MiSeq for the whole genome sequencing; SPAdes software (version 3.11.1) for *de novo* assembly; and blastn (v. 2.5.0) for gene searching. GeneMarkS software was deployed for annotation of the genes incorporated in the clusters; nucmer – for searching homologous sites. Visualization of O-LPS clusters was carried out by means of SnapGene Viewer. **Results and discussion.** Strains of *V. cholerae* rough variants had diverse gene clusters responsible for O-antigen biosynthesis. We have identified three types of O-LPS clusters with different size and number of genes. Unique DNA sites, common to the whole group of *V. cholerae* rough variants, have not been detected. Two genes present in all rough strains have been defined, but they are not unique for this group of strains and can be found in representatives of other serogroups. For two types of clusters, a region containing the IS-element, common with *V. cholerae* O1, has been revealed.

Key words: *Vibrio cholerae*, R-variant, lipopolysaccharide cluster, serogroup, *wbe*, *rfb*.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The authors declare no additional financial support for this study.

Corresponding author: Oksana A. Podoinitsyna, e-mail: podoinitsyna_oa@antiplague.ru.

Citation: Podoinitsyna O.A., Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Vodop'yanov A.S., Ezhova M.I., Noskov A.K. Investigation of the Lipopolysaccharide Cluster Structure in the Genomes of *Vibrio cholerae* Rough Variants. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 3:118–122. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-118-122

Received 15.06.2022. Revised 03.08.2022. Accepted 06.09.2022.

Podoinitsyna O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Levchenko D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4676-0377>

Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Ezhova M.I., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4254-3313>
Noskov A.K., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Одной из основных характеристик биологических свойств штаммов холерных вибрионов, выделяемых в ходе мониторинга контаминации холерными вибрионами поверхностных водоемов, является их способность агглютинироваться в диагностических титрах диагностическими холерными сыворотками O1 и O139. Штаммы этих серогрупп могут содержать гены, кодирующие основные факторы патогенности: гены холерного токсина (*ctxAB*) и токсин-корегулируемых пилей адгезии (*tcpA*) [1]. Известно, что среди холерных вибрионов, изолируемых в ходе мониторинга, могут встречаться типичные по культурально-морфологическим и биохимическим свойствам штаммы, находящиеся в гладкой (S – smooth) форме, но проявляющие при этом атипичные свойства в отношении способности агглютинироваться диагностическими холерными сыворотками. Адаптивно измененные холерные вибрионы, которые агглютинируются в диагностических титрах только RO-сывороткой при отсутствии агглютинации холерными сыворотками O1, O139, относятся к R-вариантам. Некоторые культуры могут агглютинироваться одновременно RO- и O-сыворотками [2]. Вибрионы R-вариантов представляют интерес как изоляты, являющиеся атипичными по признаку агглютинабельности, но при этом в ряде случаев также способны нести гены факторов патогенности [3].

У возбудителя холерных вибрионов выделяют три типа полисахаридных структур: липополисахарид (ЛПС), компонентом которого является O-антиген; капсульный полисахарид, или K-антиген; и ругозный полисахарид, также известный как экзополисахарид (ЭПС), или вибриополисахарид [4, 5].

Серологические особенности R-вариантов связаны со строением ЛПС. Согласно данным K. De et al., штаммы *Vibrio cholerae*, утратившие способность к полноценному синтезу O-антигена и презентующие на поверхности клетки только коровую часть ЛПС, не способны агглютинироваться диагностическими холерными сыворотками до рабочих титров, но агглютинируются RO-сывороткой [6, 7]. Такие штаммы формируют колонии, морфологически не отличающиеся от колоний в S-форме [3]. В свою очередь штаммы, образующие морщинистые колонии, т.е. имеющие ругозный (*rugose*) фенотип, являются таковыми за счет продукции ЭПС, за синтез которого отвечает кластер генов VPS (*Vibrio polysaccharide*). Повышенная продукция ЭПС на поверхности отдельных клеток приводит к изменению морфологии клеток и формированию ругозных колоний [8, 9]. Напротив, R-варианты имеют особый тип строения ЛПС, за биосинтез O-антигена в котором отвечают гены кластера *wbe*. В этом состоит принципиальное различие между ругозными формами и R-вариантами.

В ситуации, когда штамм не агглютинируется холерными диагностическими сыворотками, возникает вопрос о том, не является ли он атипичной формой штамма O1-серогруппы.

В связи с этим **целью** данной работы явилось сравнительное изучение структурной организации O-липополисахаридных кластеров (O-LPS) штаммов холерных вибрионов R-вариантов.

В задачи исследования входило проведение секвенирования области, отвечающей за продукцию O-антигена, и последующий сравнительный биоинформационный анализ для определения наличия/отсутствия общих последовательностей среди штаммов *V. cholerae* R-вариантов, *V. cholerae* O1 и *V. cholerae* O139.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы. Для изучения O-LPS кластера в исследование взяты шесть штаммов *V. cholerae* R-вариантов из лаборатории «Коллекция патогенных вибрионов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора: N16290 (Забайкальский край, 1993), N13910 (Казахстан, 1988), N18237 (Рязанская область, 1998), N15865 (Казахстан, 1991), N18298 (Приморский край, 2000), N19336 (Республика Калмыкия, 2012), агглютинирующихся в диагностическом рабочем титре (1/800). У всех указанных штаммов отсутствовали гены *ctxAB* и *tcpA-F*, кодирующие основные факторы патогенности. Для сравнения генетических детерминант кластеров, кодирующих O-антиген, взяты нуклеотидные последовательности типовых штаммов *V. cholerae* N16961 O1 серотипа Инаба и *V. cholerae* O139 MO45.

Полногеномное секвенирование проведено на приборе MiSeq (Illumina). Выделение ДНК производили с использованием набора для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп». Подготовку геномных библиотек осуществляли с помощью набора Nextera DNA flex в соответствии с инструкцией производителя. Для секвенирования использован набор реагентов MiSeq v2 Reagent Kit (500 Cycles PE).

Биоинформационный анализ. Последующая проверка качества ридов реализована с помощью программы FastQC [10]. Для очистки ридов использовали программу для фильтрации данных Trimmomatic [11], сборка осуществлялась *de novo* программой-сборщиком SPAdes (v. 3.11.1) [12]. На собранных контигах с помощью программы blastn 2.5.0 (нуклеотидный BLAST – Basic local alignment search tool) [13] осуществлен поиск генов, фланкирующих O-LPS-кластеры. Присутствие определенных генов в каждом из кластеров также проверяли с помощью алгоритма blastn 2.5.0. Аннотирование входящих в кластеры генов проводили с использованием программы GeneMarkS [14]. Поиск гомологичных участков проводили с использованием программы nucmer из пакета программ MUMmer4 (версия 4.0.0) с параметрами “--maxmatch --mincluster=100” [15]. Координатные файлы, полученные nucmer, визуализировали с помощью *circus* (версия 0.69-8) [16].

Визуализация O-LPS-кластеров выполнена в программе SnapGene Viewer [17].

Результаты и обсуждение

При сравнении ответственных за синтез О-антигена участков с *wbe*-кластером типового штамма *V. cholerae* N16961 серотипа Инаба обнаружено, что изучаемые последовательности не идентичны между собой и значительно отличаются от *wbe*-кластера *V. cholerae* N16961. По количеству генов, входящих в отвечающий за биосинтез ЛПС участок, штаммы разделились на три группы (рис. 1).

В первую группу вошли два из шести штаммов, обладавшие О-LPS-кластером, размер которого не превышал 18,6 т.п.н., а в его составе с помощью программы GeneMarkS определено 15 генов (включая гены, фланкирующие весь фрагмент и одинаковые для всех *V. cholerae*). Во вторую группу вошли три штамма, содержавшие О-LPS-кластер размером около 23,8 т.п.н., с 21 геном в нем (включая фланкирующие). Третью группу образовал один штамм *V. cholerae*, обладавший протяженным О-LPS-кластером размером свыше 48 т.п.н. с 47 генами. Взятый для сравнения штамм *V. cholerae* N16961 нес в составе первой хромосомы О-LPS-кластер размером более 24 т.п.н. с 20 генами, включая фланкирующие. Для *V. cholerae* MO45 O139 размер этого участка соответствует 38,7 т.п.н.

Представляло интерес выявление последовательностей, общих для липополисахаридных кластеров *V. cholerae* R-вариантов, но отсутствующих у *V. cholerae* O1, а также у штаммов других серогрупп. Обнаружено, что во всех трех типах кластеров присутствует участок размером 2,4 т.п.н., на котором расположены два гена, кодирующие галактозилтрансферазу и предполагаемую эпимеразу/дегидратазу. У *V. cholerae* O1 N16961 данные гены отсутствовали. На рис. 2 схематично показаны О-LPS-кластеры R-вариантов, а также представителей O1 и O139-серогрупп. На схеме ярко-зеленым цветом выделены области, где расположены гомологичные для представленных кластеров гены, кодирующие галактозилтрансферазу и предполагаемую эпимеразу/дегидратазу. Чтобы определить, является ли рассматриваемый участок уникальным для О-LPS-кластера R-вариантов, нами осуществлен поиск данных генов у штаммов *V. cholerae*, геномы которых представлены в базе данных NCBI. В результате установлено, что гены галактозилтрансферазы и предполагаемой эпимеразы/дегидратазы присутствуют у штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, в том числе у *V. cholerae* O139, при этом они могут располагаться как рядом друг с другом, так и на расстоянии. Но в любом случае данные гены не обнаруживаются у холерных вибрионов O1. Таким образом, определено, что гены галактозилтрансферазы и предполагаемой эпимеразы/дегидратазы не являются особенностью

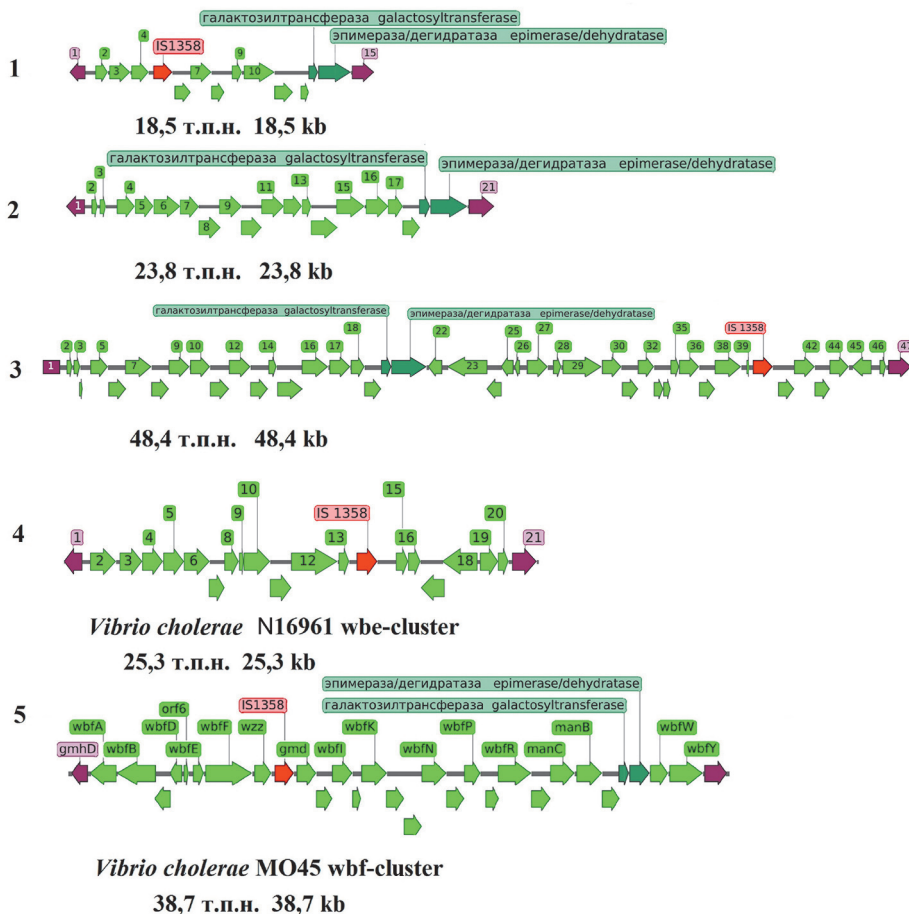


Рис. 1. Структура О-LPS-кластеров:
 1 – О-LPS-кластер размером около 18,6 т.п.н. Обнаружен у *V. cholerae* 15865 (Казахстан, 1991), 18298 (Приморский край, 2000); 2 – О-LPS-кластер размером около 23,8 т.п.н. Обнаружен у *V. cholerae* 16290 (Забайкальский край, 1993), 13910 (Казахстан, 1988), 18237 (Рязанская область, 1998); 3 – О-LPS-кластер размером около 48,4 т.п.н. Обнаружен у *V. cholerae* 19336 (Республика Калмыкия, 2012); 4 – О-LPS-кластер размером около 24 т.п.н. *V. cholerae* O1 N16961; 5 – О-LPS-кластер размером около 38,7 т.п.н. *V. cholerae* O139 MO45

Fig. 1. Structure of O-LPS clusters:
 1 – O-LPS cluster the size of approximately 18.6 kb, detected in *V. cholerae* 15865 (Kazakhstan, 1991), 18298 (Primorsk Territory, 2000); 2 – O-LPS cluster the size of 23.8 kb, detected in *V. cholerae* 16290 (Trans-Baikal Territory, 1993), 13910 (Kazakhstan, 1988), 18237 (Ryazan Region, 1998); 3 – O-LPS cluster the size of 48.4 kb, detected in *V. cholerae* 19336 (Republic of Kalmykia, 2012); 4 – O-LPS cluster the size of approximately 24 kb, *V. cholerae* O1 N16961; 5 – O-LPS cluster the size of 38.7 kb in *V. cholerae* O139 MO45

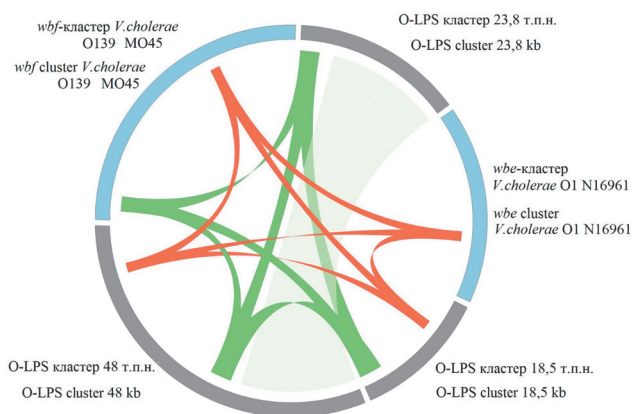


Рис. 2. Схематичное расположение генов, общих для O1/O139, а также *V. cholerae* R-вариантов O-LPS-кластеров:

Показаны гомологичные участки трех типов O-LPS-кластеров R-вариантов. Соединительные линии красного цвета обозначают гомологичный фрагмент, включающий в себя ген, кодирующий *IS 1358*, и небольшие участки до и после этого гена размером около 100–130 п.н. Ярко-зеленым цветом обозначены гомологичные области, содержащие гены галактозилтрансферазы и предполагаемой эпимеразы/дегидратазы. Лентой светло-зеленого цвета показана область более 16 т.п.н., включающая идентичные наборы генов у второго и третьего типов кластеров

Fig. 2. Schematic arrangement of genes common to *V. cholerae* O1/O139, as well as O-LPS clusters of *V. cholerae* rough variants:

Homologous sites of three types of O-LPS clusters in rough variants of *V. cholerae* are depicted. Connecting lines of red color indicate a homologous fragment including the gene encoding *IS 1358* and small areas about 100–130 bp before and after this gene. Bright green line indicates homologous regions containing the genes of galactosyltransferase and putative epimerase/dehydratase. A light green stripe shows an area covering more than 16 kb, comprising identical sets of genes in the second and third types of clusters

R-вариантов, но при этом, по-видимому, являются типичными для представителей различных (но не всех) серогрупп.

У двух кластеров (второго и третьего типов) обнаружен протяженный гомологичный участок размером более 16 т.п.н. На рис. 2 показано расположение этого участка. Однако в кластере первого типа участков, гомологичных данному локусу, не обнаружено.

Для установления общих черт в строении исследуемых кластеров, а также их возможного происхождения, реализована задача найти последовательности, общие для O1-серогруппы и для рассматриваемых в данном исследовании O-LPS-кластеров R-вариантов. В результате у *V. cholerae* O1 и у двух кластеров из трех обнаружен участок размером 1,3 kb с 94–96 % идентичности, включающий последовательность *IS 1358* (предположительно IS-элемент), и небольшие участки до и после него размером около 100–130 п.н. На рис. 2 показана локализация *IS 1358* у четырех кластеров из пяти. Данный ген присутствовал на самой большей последовательности из трех (48,4 т.п.н.), а также на самой маленькой (18,5 т.п.н.). У штаммов холерных вибрионов 16290 и 13910, обладавших вторым типом O-LPS-кластера (23,8 т.п.н.), *IS 1358* не выявлен. Другие названия гена *IS 1358*, которые можно встретить в базах данных и литературе: *rfbQRS* или *tnpA*.

В соответствии с литературными данными, *IS 1358* присутствует в хромосомах штаммов различных серогрупп, в частности обнаружен у *V. cholerae*

O1, O2, O22, O139, O155. При этом у серогрупп O15, O39, O141 этот ген, напротив, отсутствует. Кроме того, он может встречаться в геноме как в одной, так и в нескольких копиях [18]. Ген, кодирующий *IS 1358*, обнаружен нами также и в кластере O-LPS *V. cholerae* O139, что продемонстрировано на рис. 2 и также соответствует литературным данным [18]. Ген *wbeT*, являющийся маркерным при определении принадлежности штаммов к O1-серогруппе методом ПЦР с использованием набора реагентов для выявления ДНК *V. cholerae* «АмплиСенс *Vibrio cholerae*-FL», находится внутри O-LPS-кластера штаммов, относящихся к O1-серогруппе. У шести взятых в исследование R-вариантов данный ген не обнаружен.

Таким образом, O-LPS-кластеры штаммов *V. cholerae* R-вариантов демонстрируют значительные различия в своем строении и составе. У них не удалось обнаружить участков ДНК, свойственных только этой группе штаммов. Пара генов, присутствующих у всех взятых в исследование R-вариантов, обнаружена также у *V. cholerae* O139, а значит, не является уникальной. По всей видимости, изучаемые штаммы в прошлом являлись представителями разных серогрупп, одним из которых, в частности, свойственно наличие гена *IS 1358*, а другим нет. Вероятно, эти штаммы утратили способность к полноценному синтезу O-антигена и в настоящее время агреггируются только RO-сывороткой, так как, согласно данным литературы, такой способностью обладают клетки, на поверхности которых присутствует только коровая часть ЛПС [7]. Поскольку маркерный ген *wbeT*, используемый в качестве мишени для установления серогруппы, также отсутствовал на кластерах *V. cholerae* R-вариантов, это дополнительно свидетельствует о принадлежности данных штаммов к серогруппам неO1/неO139.

Принимая во внимание факт, что в составе кластеров O-LPS у *V. cholerae* O1 и рассматриваемых в данной работе штаммов либо вообще отсутствуют общие последовательности, либо присутствует только один общий ген, можно сделать вывод, что изучаемые штаммы не могут быть отнесены к представителям O1-серогруппы, поскольку кластеры, ответственные за продукцию O-антигена, дающего тот или иной тип агреггации с диагностическими холерными сыворотками, полностью отличаются от такового у *V. cholerae* O1, за исключением одного гена, являющегося IS-элементом. В то же время нельзя исключать возможность происхождения других, не рассматриваемых в данном исследовании R-вариантов от представителей O1-серогруппы, поскольку дефекты в синтезе полноценного O-антигена, предположительно, могут быть свойственны любым штаммам. По-видимому, утратить способность к образованию полноценного ЛПС и стать R-вариантом могут штаммы любой серогруппы, в том числе и O1.

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

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

Список литературы

- Cabral J.P. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010; 7(10):3657–703. DOI: 10.3390/ijerph7103657.
- Подосинникова Л.С., Черепяхина И.Я. Изменчивость холерных вибрионов. *Проблемы особо опасных инфекций*. 1998; 4:9–12.
- Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
- Rashid M.H., Rajanna C., Ali A., Karaolis D.K. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 227(1):113–9. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00657-8.
- Sozhamannan S., Yildiz F.H. Diversity and genetic basis of polysaccharide biosynthesis in *Vibrio cholerae*. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera*. Infectious Disease Series. New York: Springer; 2011. P. 129–60.
- Алексеева Л.П., Черепяхина И.Я., Сальникова О.И., Бурлакова О.С. Изучение антигенных взаимосвязей типичных и R-форм холерных вибрионов на основе моноклональных антител. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1998; 4:9–12.
- De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
- Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(7):4028–33. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4028.
- Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):995–1007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x.
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29(12):2607–18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607.
- Marçais G., Delcher A.L., Phillippy A.M., Coston R., Salzberg S.L., Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput. Biol.* 2018; 14(1):e1005944. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005944.
- Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones S.J., Marra M.A. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009; 19(9):1639–45. DOI: 10.1101/gr.092759.109.
- Kahl L.J., Endy D. A survey of enabling technologies in synthetic biology. *J. Biol. Eng.* 2013; 7(1):13. DOI: 10.1186/1754-1611-7-13.
- Dumontier S., Trieu-Cuot P., Berche P. Structural and functional characterization of IS1358 from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(23):6101–6. DOI: 10.1128/JB.180.23.6101-6106.1998.
- Podosinnikova L.S., Cherepakhina I.Ya. [Variability of *Vibrio cholerae*]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 1998; (4):9–12.
- Mitra R.K., Nandy R.K., Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., Yamasaki S., Shimada T., Takeda Y., Nair G.B. Molecular characterisation of rough variants of *Vibrio cholerae* isolated from hospitalised patients with diarrhoea. *J. Med. Microbiol.* 2001; 50(3):268–76. DOI: 10.1099/0022-1317-50-3-268.
- Rashid M.H., Rajanna C., Ali A., Karaolis D.K. Identification of genes involved in the switch between the smooth and rugose phenotypes of *Vibrio cholerae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003; 227(1):113–9. DOI: 10.1016/S0378-1097(03)00657-8.
- Sozhamannan S., Yildiz F.H. Diversity and genetic basis of polysaccharide biosynthesis in *Vibrio cholerae*. In: Ramamurthy T., Bhattacharya S.K., editors. *Epidemiological and Molecular Aspects on Cholera*. Infectious Disease Series. New York: Springer; 2011. P. 129–60.
- Алексеева Л.П., Черепяхина И.Я., Сальникова О.И., Бурлакова О.С. [Investigation of antigenic interrelations of typical and rough forms of *Vibrio cholerae* based on monoclonal antibodies]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 1998; (4):9–12.
- De K., Ramamurthy T., Faruque S.M., Yamasaki S., Takeda Y., Nair G.B., Nandy R.K. Molecular characterisation of rough strains of *Vibrio cholerae* isolated from diarrhoeal cases in India and their comparison to smooth strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 2004; 232(1):23–30. DOI: 10.1016/S0378-1097(04)00013-8.
- Yildiz F.H., Schoolnik G.K. *Vibrio cholerae* O1 El Tor: identification of a gene cluster required for the rugose colony type, exopolysaccharide production, chlorine resistance, and biofilm formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1999; 96(7):4028–33. DOI: 10.1073/pnas.96.7.4028.
- Beyhan S., Yildiz F.H. Smooth to rugose phase variation in *Vibrio cholerae* can be mediated by a single nucleotide change that targets c-di-GMP signaling pathway. *Mol. Microbiol.* 2007; 63(4):995–1007. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05568.x.
- Yang X., Liu D., Liu F., Wu J., Zou J., Xiao X., Zhao F., Zhu B. HTQC: a fast quality control toolkit for Illumina sequencing data. *BMC Bioinformatics*. 2013; 14:33. DOI: 10.1186/1471-2105-14-33.
- Bolger A.M., Lohse M., Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014; 30(15):2114–20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
- Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
- Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 1990; 215(3):403–10. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Besemer J., Lomsadze A., Borodovsky M. GeneMarkS: a self-training method for prediction of gene starts in microbial genomes. Implications for finding sequence motifs in regulatory regions. *Nucleic Acids Research*. 2001; 29(12):2607–18. DOI: 10.1093/nar/29.12.2607.
- Marçais G., Delcher A.L., Phillippy A.M., Coston R., Salzberg S.L., Zimin A. MUMmer4: A fast and versatile genome alignment system. *PLoS Comput. Biol.* 2018; 14(1):e1005944. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005944.
- Krzywinski M., Schein J., Birol I., Connors J., Gascoyne R., Horsman D., Jones S.J., Marra M.A. Circos: an information aesthetic for comparative genomics. *Genome Res*. 2009; 19(9):1639–45. DOI: 10.1101/gr.092759.109.
- Kahl L.J., Endy D. A survey of enabling technologies in synthetic biology. *J. Biol. Eng.* 2013; 7(1):13. DOI: 10.1186/1754-1611-7-13.
- Dumontier S., Trieu-Cuot P., Berche P. Structural and functional characterization of IS1358 from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 1998; 180(23):6101–6. DOI: 10.1128/JB.180.23.6101-6106.1998.

References

- Cabral J.P. Water microbiology. Bacterial pathogens and water. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010; 7(10):3657–703. DOI: 10.3390/ijerph7103657.

Authors:

Podoinitsyna O.A., Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Vodop'yanov A.S., Ezhova M.I., Noskov A.K. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aanet.ru.

Об авторах:

Подойница О.А., Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Водопьянов А.С., Ежова М.И., Носков А.К. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aanet.ru.