

DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-124-130

УДК 616.932:578.347

Ю.В. Сизова, М.П. Погожова, Н.Е. Гаевская, А.В. Тюрина, А.С. Водопьянов

Биологическая и генетическая характеристика нового бактериофага, выделенного из холерных вибрионов, изолированных от больного (Москва, 2023 г.)

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

В настоящее время холера остается актуальной инфекционной болезнью, требующей поиска новых альтернативных антимикробных агентов для лечения и профилактики, в роли которых могут выступать бактериофаги. **Цель** исследования – выделение нового бактериофага из культуры холерных вибрионов, изолированных от больного в Москве в 2023 г., и характеристика его биологических и генетических свойств. **Материалы и методы.** В работе использовали токсигенный штамм *Vibrio cholerae* O1 Ogawa 21197. Для изучения биологических свойств бактериофага (морфологии негативных колоний, чувствительности к высоким и низким температурам и хлороформу, литической активности и специфичности) использовали двухслойный агаровый метод Грация. Морфологию фаговых частиц изучали в электронном микроскопе. Генетическая характеристика проведена на основе полногеномного секвенирования с использованием программ SeqAnalyzer, PhageAnalyzer 2.0, а также алгоритмов BLASTN 2.2.29 и BLASTX 2.12.0+. **Результаты и обсуждение.** Выделенный бактериофаг на питательных средах формирует прозрачные негативные колонии с неровным краем без вторичного роста и ореола. В электронной микроскопии выявлено, что бактериофаг имеет многогранную головку и короткий хвост. Фаг специфичен и обладает высокой литической активностью в отношении холерных вибрионов, выделенных от человека, чувствителен к нагреванию и устойчив к воздействию хлороформа и заморозке. Анализ результатов секвенирования показал, что бактериофаг принадлежит к классу *Caudoviricetes* семейства *Zobellviridae*, размер генома составляет 48 074 п.н. с содержанием G+C=42,7 %. Полученный геном проверен на гомологию нуклеотидной последовательности с последовательностями ДНК других бактериофагов. Обнаружено 9 геномов *Vibrio phage* семейства *Zobellviridae* класса *Caudoviricetes* с высоким процентом перекрытия, выделенных из воды в Индии.

Ключевые слова: бактериофаг, холера, биологические свойства.

Корреспондирующий автор: Сизова Юлия Владимировна, e-mail: sizova_yuv@antiplague.ru.

Для цитирования: Сизова Ю.В., Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Водопьянов А.С. Биологическая и генетическая характеристика нового бактериофага, выделенного из холерных вибрионов, изолированных от больного (Москва, 2023 г.). *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 4:124–130. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-124-130

Поступила 12.07.2024. Отправлена на доработку 01.10.2024. Принята к публ. 09.10.2024.

Yu.V. Sizova, M.P. Pogozhova, N.E. Gaevskaya, A.V. Tyurina, A.S. Vodop'yanov

Biological and Genetic Characteristics of a New Bacteriophage Isolated from Cholera Vibrios from a Patient (Moscow, 2023)

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

Abstract. Currently, cholera remains a relevant infectious disease that requires new alternative antimicrobial agents for treatment and prevention, which can be bacteriophages. **The aim** of the study was to obtain a new bacteriophage from a culture of cholera vibrios isolated from a patient in Moscow in 2023, and characterize its biological and genetic properties. **Materials and methods.** The toxigenic strain *Vibrio cholerae* O1 Ogawa 21197 was used in the work. A two-layer agar Grazia method was applied to study biological properties of the bacteriophage (morphology of negative colonies, sensitivity to high and low temperatures and chloroform, lytic activity and specificity). The morphology of phage particles was studied under an electron microscope. The genetic characterization was carried out on the basis of genome-wide sequencing using the programs “SeqAnalyzer”, “PhageAnalyzer 2.0”, as well as the algorithms BLASTN 2.2.29 and BLASTX 2.12.0+. **Results and discussion.** Isolated bacteriophage forms transparent negative colonies with an uneven edge without secondary growth and halo on nutrient media. Electron microscopy revealed that the isolated bacteriophage has a multifaceted head and a short tail. The phage is specific and has high lytic activity against cholera vibrios isolated from humans, is sensitive to heat and resistant to chloroform and freezing. Analysis of the sequencing results has shown that the phage belongs to the *Caudoviricetes* class of the *Zobellviridae* family, the genome size is 48,074 bp with a G+C content=42.7 %. The resulting genome was checked for nucleotide sequence homology with DNA sequences of other bacteriophages. 9 *Vibrio phage* genomes of the *Zobellviridae* family of the *Caudoviricetes* class were found, having a high percentage of overlap, isolated out of the water in India.

Key words: bacteriophage, cholera, biological properties.

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

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

Corresponding author: Yulia V. Sizova, e-mail: sizova_yuv@antiplague.ru.

Citation: Sizova Yu.V., Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Vodop'yanov A.S. Biological and Genetic Characteristics of a New Bacteriophage Isolated from Cholera Vibrios from a Patient (Moscow, 2023). *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; 4:124–130. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-124-130

Received 12.07.2024. Revised 01.10.2024. Accepted 09.10.2024.

Sizova Yu.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7831-7767>
Pogozhova M.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-3577>
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

Tyurina A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9359-3997>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>

Холера – острое инфекционное заболевание, характеризующееся диарейным синдромом и фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, водным, пищевым и контактно-бытовыми путями распространения инфекции. Относится к группе особо опасных инфекций. Данное заболевание могут вызывать холерные вибрионы O1-серогруппы (биоваров Эль Тор и классического) и O139-серогруппы (МУК 4.2.3745-22 «Методы лабораторной диагностики холеры»).

За последние 30 лет в мире зарегистрировано 9 607 470 случаев холеры, из которых 45 % – в странах Азии. С 2013 по 2022 г. зарегистрированы случаи заболевания холерой в 71 стране мира, в том числе в 29 странах Азии (3 871 687 случаев – 77,4 % мировой заболеваемости), в 34 странах Африки (официально 944 298 случаев) и т.д. При этом в рассматриваемый период выявлено 1903 случая завоза болезни, в том числе в странах Азии – 1319 (69,3 %), Африки – 420 (22,1 %), Европы – 80 (4,2 %), Америки – 72 (3,8 %) и Австралии с Океанией – 12 (0,6 %) [1].

Приведенные цифры говорят о сохранении угрозы завоза холеры на территорию Российской Федерации из отдельных стран Азии, Африки и региона Карибского бассейна, где сформировались эндемичные очаги. Примером этому может служить случай выявления больного на территории Москвы. У прилетевшего в сентябре 2023 г. из Нью-Дели журналиста на фоне проявления характерного симптомокомплекса были выявлены холерные вибрионы. Обследованы все контактные лица, установлено медицинское наблюдение, включая проведение медосмотра, лабораторных обследований, антибиотикопрофилактики, однако проявлений инфекционного заболевания, как и обнаружения культуры, у обследованных не было [2]. Выделенная культура передана в Референс-центр по мониторингу за холерой на базе ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора для дальнейшей характеристики биологических и генетических свойств, в том числе возможного выделения специфического бактериофага, в рамках поиска новых альтернативных антимикробных агентов для лечения и профилактики холеры.

Впервые холерный бактериофаг был обнаружен Ф. Д'Эреллем в 1921 г. в испражнениях больного холерой на стадии выздоровления. Ученый считал, что бактериофаг играет значимую роль в процессе развития эпидемий холеры, характере течения инфекционного процесса у человека и его выздоровлении [3]. Дальнейшее изучение холерных бактериофагов показало, что они могут демонстрировать два различных жизненных цикла: в литическом жизненном цикле фаг заражает и быстро убивает клетку-хозяина, а в лизогенном цикле фаг интегрируется

в геном хозяина как профаг или существует в виде плазмид, кодирующих факторы вирулентности, внутри клетки-хозяина [4]. Поиск новых средств для лечения, профилактики и диагностики инфекционных заболеваний, в том числе холеры, в настоящее время приобрел особую актуальность в связи с увеличением числа выделений антибиотикоустойчивых и фагоустойчивых (к уже существующим диагностическим препаратам) культур. Дифференциация вирулентных или умеренных бактериофагов играет большую роль при создании диагностических и профилактических препаратов на их основе, в связи с чем необходимо знание биологических и генетических свойств применяемых бактериофагов [5, 6].

В связи с этим **цель** нашего исследования состояла в выделении нового бактериофага из культуры холерных вибрионов, изолированных от больного в Москве в 2023 г., и характеристике его биологических и генетических свойств.

Материалы и методы

В работе использовали токсигенный штамм *Vibrio cholerae* O1 Ogawa 21197, выделенный от больного с подозрением на острую кишечную инфекцию невыясненной этиологии в Москве. Свойства штамма изучали в соответствии с МУК 4.2.3745-22.

В качестве индикаторного штамма при выделении бактериофага использовали *V. cholerae* O1 Ogawa 2066/75M (*ctx⁺tcp⁺*, выделен в Индии, 1966 г.). В суточную бульонную культуру *V. cholerae* 21197 добавляли хлороформ, перемешивали, после чего пробу центрифугировали при 2000 об/мин в течение 30 мин. Полученный супернатант наносили на индикаторный штамм *V. cholerae* 2066, засеянный двухслойным методом. Посевы выращивали при 37 °C в течение 18–20 ч. Отмечали форму и величину негативных колоний, характер краев, степень прозрачности, наличие вторичного роста и зоны неполного лизиса по периферии. Моноизоляты получали последовательным трехкратным выделением из отдельных негативных колоний.

Для проведения электронной микроскопии готовый препарат после центрифугирования и добавления полиэтиленгликоля вновь центрифугировали, удаляли супернатант и растворяли осадок деионизованной водой. Контрастирование образцов на специальной основе проводили 2 % водным раствором уранилацетата. Просмотр подготовленного препарата проводили в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011 (JEOL) с использованием программного обеспечения iTEM-TEMimagingPlatform (ResAlta) [6].

Титр обнаруженного фага, оценку специфичности и спектра литической активности осуществляли

с помощью метода Грация (метод агаровых слоев) в соответствии с ОФС 1.7.1.0002.15 «Бактериофаги лечебно-профилактические» с использованием 181 штамма холерных вибрионов из разных источников выделения с различной генотипической характеристикой: 140 штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, 20 штаммов биовара classical, 20 штаммов *V. cholerae* O139, а также штаммы *V. methchnikovii*, *V. parahemolyticus*, *V. alginolyticus*, *Sh. dysenteriae*, *S. Typhi*, *S. paratyphi*, *E. coli*, *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*, хранящиеся в коллекции лаборатории бактериофагов ФКУЗ Ростовского-на-Дону противочумного института Роспотребнадзора.

Исследуемый бактериофаг наносили дорожками на двухслойный агар Мартена с испытуемыми штаммами [7]. Чашки инкубировали в течение 18–20 ч при 37 °С. Оценку литической активности выделенного бактериофага учитывали по крестовой системе, где (+) – низкая литическая активность, (++) – образование зоны лизиса с большим количеством колоний вторичного роста бактерий, (+++) – зона лизиса с единичными колониями вторичного роста культуры, (+++++) – прозрачная зона лизиса без колоний вторичного роста [8].

Для оценки биологических свойств изучали влияние температур на холерный бактериофаг. Бульонную культуру бактериофага (10^9 БОЕ/мл) прогревали при +60 и +70 °С в течение 30 и 60 мин. Также исследовали влияние заморозки при –20 °С в течение 3 мес. с повторным замораживанием [9, 10].

Выделение ДНК холерных вибрионов и фага осуществляли в соответствии со стандартными методами [11]. При помощи флуориметра QuantiFluor контролировали количество ДНК в пробе, а качество – проведением электрофореза в 0,8 % агарозном геле. Дополнительно методом ПЦР оценивали наличие бактериальной ДНК в пробах. Геномную последовательность определяли с использованием полногеномного секвенатора Miseq (Illumina). Использование программы FastQC позволило провести оценку первичных данных, полученных при секвенировании [12]. Также использовали программу Spades 13.0 для сборки в контиги [13] и алгоритм

Trimmomatic 0.39 для корректировки ридов [14]. Анализ данных полногеномного секвенирования холерного вибриона проводили с помощью программы SeqAnalyzer (<http://antiplague.ru/seqanalyzer>).

С помощью алгоритма BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) проводили сравнение полученного генома с геномными последовательностями известных холерных фагов. Присутствие генов, свойственных умеренным или вирулентным бактериофагам, оценивали при помощи созданной базы данных и программного обеспечения PhageAnalyzer 2.0 (<http://antiplague.ru/phageanalyzer/>) [6]. Используя программу BLASTX 2.12.0+ (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), проводили прогнозирование возможных функций белков [15].

Результаты и обсуждение

Первый этап исследования состоял в изучении свойств токсигенного штамма *V. cholerae* 21197. Культура характеризовалась специфическим ростом на щелочном агаре, характерной морфологией клеток, положительным оксидазным тестом, агглютинировалась холерными диагностическими сыворотками O1 до 1/1600 и Ogawa до 1/800, лизировалась диагностическим холерным бактериофагом эльтор до 10^{-3} , содержала гены *ompW*, *wbeT*, *hlyA*, *ctxA* и *ctxB7*, *cep*, *ace*, *zot*, *tcpA*, *mshA*, ICE-элемент индийского типа.

При изучении культуры на наличие лизогении и возможности использования в качестве штамм-хозяина для выделения бактериофага с применением разных индикаторных культур и методов выделения получен бактериофаг, сохранивший активность при многократных пассажах (рабочее название 5342). При культивировании на питательных средах он формирует крупные и мелкие прозрачные негативные колонии (2–5 мм) с неровным краем без вторичного роста и ореола (рис. 1, А).

При изучении морфологии бактериофага методом электронной микроскопии выявлено, что он имеет многогранную головку и короткий хвост (рис. 1, В), что позволило отнести его к подовирусам.

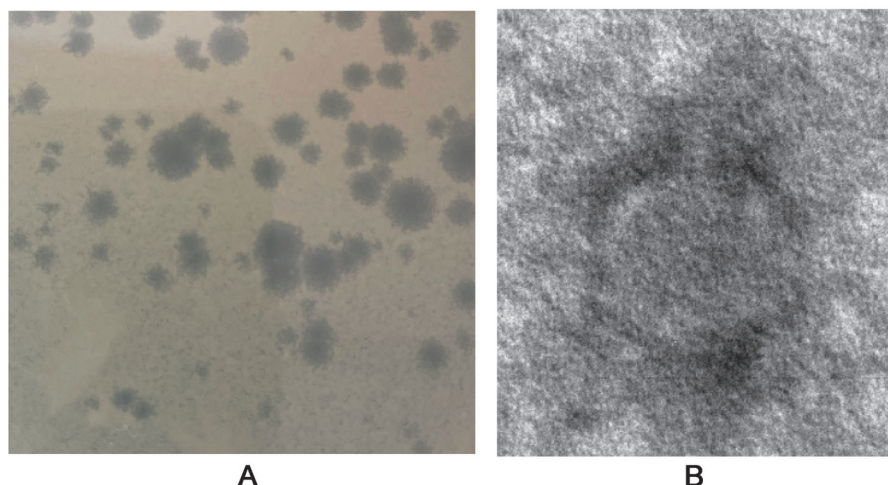


Рис. 1. Морфология бактериофага 5342:

А – морфология негативных колоний; В – морфология в электронном микроскопе (Jeol JEM 1011, увеличение 200000)

Fig. 1. Morphology of bacteriophage 5342:

А – morphology of negative colonies; В – morphology in electron microscopy (Jeol JEM 1011, magnification 200000)

Концентрация бактериофага 5342 (по Грациа) составила $3,2 \cdot 10^9$ БОЕ/мл в фаголизате, полученном при размножении на индикаторной культуре *V. cholerae* 13169 в бульоне Мартена.

Исследованный фаг устойчив к воздействию хлороформа. Изучение влияния высоких температур на полученный бактериофаг проводили при температуре +60 и +70 °C в течение 30 и 60 мин. Как показали исследования, бактериофаг плохо переносит повышенные температуры: при прогревании в течение 30 мин при +60 °C титр снизился до $2 \cdot 10^6$ БОЕ/мл, а с увеличением экспозиции до 60 мин концентрация составила $4 \cdot 10^5$ БОЕ/мл. После прогревания при +70 °C в течение 30 мин бактериофаг обнаружить не удалось.

При выяснении отношения бактериофага к низкой температуре (–20 °C) отмечено, что он не только не снижает титр после замораживания и последующего размораживания в течение месяца (рис. 2, А, В), но и неплохо переносит повторное замораживание (рис. 2, С).

При дальнейшем хранении бактериофага 5342 в условиях низкой температуры спустя 2 и 3 мес. отмечалось незначительное снижение титра: с $5 \cdot 10^9$ до $3,5 \cdot 10^9$ БОЕ/мл (2 мес.) и до $7 \cdot 10^8$ БОЕ/мл (3 мес.).

Для оценки литической активности фага в работу взяты штаммы холерных вибрионов различных серологических групп и биоваров, выделенные как от людей, так и из водных объектов окружающей среды (ООС). Исследуемый бактериофаг не лизировал культуры вибрионов, относящиеся к O139-серогруппе. В отношении классических холерных вибрионов O1-серогруппы наблюдалась низкая литическая активность, составившая 30 %. Несколько выше оказалась литическая активность *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Она составила 43 %. Однако при проведении исследований нами учтено, что бактериофаг выделен из штамма холерных вибрионов, полученного от больного человека, в связи с чем представляло интерес проверить литическую активность в отношении

культур из разных источников. Для этого проанализирована активность бактериофага в отношении 66 штаммов, выделенных из объектов окружающей среды (вода речная, морская, сточная, ил и т.д.), и 71 штамма от людей и обнаружено, что наиболее подвержены воздействию фага именно последние – чувствительными оказались 50 штаммов *V. cholerae* El Tor, т.е. литическая активность составила 70 %, в то время как у «водных» штаммов – только 17 % (11 штаммов чувствительны к бактериофагу 5342).

Специфичность бактериофага в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей семейства *Vibrionaceae* и порядка *Enterobacteriales*.

Результаты секвенирования холерного бактериофага 5342 показали, что размер генома составляет 48 074 п.н. с содержанием G+C=42,7 % и выделенный фаг принадлежит к классу *Caudoviricetes* семейства *Zobellviridae*. Полученный геном проверен на гомологию нуклеотидной последовательности с последовательностями ДНК других бактериофагов с помощью алгоритма BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (рис. 3).

При проведении анализа обнаружено 9 геномов *Vibrio phage* семейства *Zobellviridae* класса *Caudoviricetes*, имеющих высокий процент перекрытия (от 91 до 100 %) и идентичность (от 97,73 до 99,99 %) (таблица).

Пик заболеваемости холерой в странах Южной Азии обычно коррелирует с присутствием холерных бактериофагов в водной среде. Появление вирулентных фагов в водных объектах окружающей среды совпадало с выделением фага в образцах стула больных холерой [16, 17]. Из таблицы видно 100 % покрытие и 99,99 % идентичность с ранее депонированными в GenBank фагами Saratov-12 (GenBank: MT066160.1) и Saratov-15 (GenBank: MT767883.1). Данные вирулентные фаги были выделены из воды в Индии. В настоящее время хранятся в производственной коллекции лаборатории диагностических препаратов

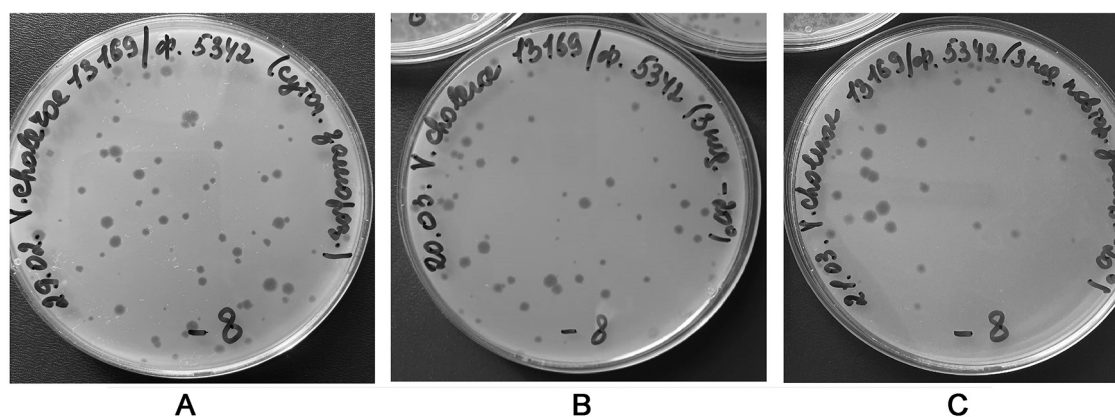


Рис. 2. Влияние низкой температуры на бактериофаг 5342:

А – через сутки при –20 °C; В – через 3 недели при –20 °C; С – через 3 недели при –20 °C и повторном замораживании

Fig. 2. The effect of low temperature on bacteriophage 5342:

А – after a day at –20 °C; В – after 3 weeks at –20 °C; С – after 3 weeks at –20 °C and repeated freezing

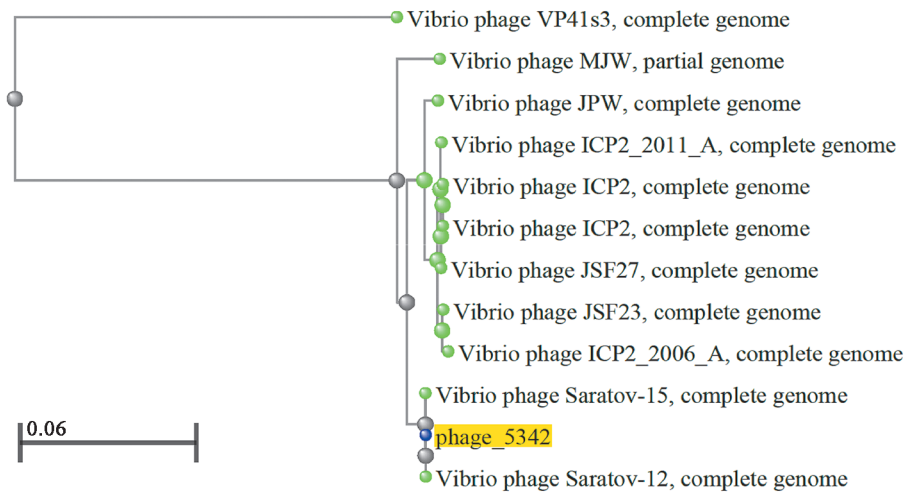


Рис. 3. Дендрограмма бактериофага 5342 в алгоритме BLAST

Fig. 3. Dendrogram of bacteriophage 5342 in the BLAST algorithm

Данные о гомологичных представителях *Vibrio phage*, предоставленные в системах BLASTN и PubMed

Data on homologous representatives of *Vibrio phage* contained in the BLASTN and PubMed systems

№ п/п No.	Название фага (№ GenBank) Name of the phage	Значимые детерминанты Significant determinants	Тип фага Phage type	Место, источник выделения Site, source of isolation	Хозяин Host	% покрытия и гомологии с фагом 5342 % coverage and homology with phage 5342
1	Saratov-12 (MT066160.1)	porphyrin biosynthesis – YP_004251213.1	Вирулентный Virulent	Индия, окружающая среда India, environment	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	100 и/and 99,99
2	Saratov-15 (MT767883.1)	porphyrin biosynthesis – YP_004251213.1	Вирулентный Virulent	Индия, окружающая среда India, environment	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	100 и/and 99,99
3	JPW (OR039881.1)	porphyrin biosynthesis – WJJ54310.1	Вирулентный Virulent	Индия, окружающая среда India, environment	<i>V. cholerae</i>	96 и/and 98,22
4	ICP2_2011_A (KM224878.1)	Нет / No	Вирулентный Virulent	Бангладеш, стул больного холерой Bangladesh, cholera patient's feces	<i>V. cholerae</i> O1 и/and O139	96 и/and 97,83
5	JSF23 (KY883657.1)	aerobic cobaltochelatase CobT subunit – ASV43738.1; aerobic cobaltochelatase CobS subunit – ASV43739.1	Вирулентный Virulent	Бангладеш, окружающая среда Bangladesh, environment	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	96 и/and 97,76
6	ICP2 (NC_015158.1)	CobS, porphyrin biosynthesis – YP_004251213.1; aerobic cobaltochelatase CobT subunit – YP_004251212.1	Вирулентный Virulent	Бангладеш, стул больного холерой Bangladesh, cholera patient's feces	<i>V. cholerae</i> O1 и/and O139	92 и/and 97,83
7	ICP2_2013_A_Haiti (NC_024791.1)	aerobic cobaltochelatase CobT subunit – YP_009056252.1; porphyrin biosynthesis – YP_009056253.1	Вирулентный Virulent	Гаити, стул больного холерой Haiti, cholera patient's feces	<i>V. cholerae</i> O1 и/and O139	92 и/and 84,90
8	JSF27 (KY883658.1)	aerobic cobaltochelatase CobT subunit – ASV43834.1; aerobic cobaltochelatase CobS subunit – ASV43835.1	Вирулентный Virulent	Бангладеш, окружающая среда Bangladesh, environment	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor	91 и/and 97,94
9	ICP2_2006-A (HQ641346.1)	putative cobalamin biosynthesis protein CobT – ADX87791.1; putative cobalamin biosynthesis protein CobS – ADX87792.1	Вирулентный Virulent	Бангладеш, стул больного холерой Bangladesh, cholera patient's feces	<i>V. cholerae</i> O1 и O139	91 и/and 97,73

ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора и входят в состав коммерческого диагностического препарата бактериофага холерного эльтор. Высокая степень гомологии *Vibrio phage*, представленных в таблице, и фага 5342 объяснима тем, что они имеют общее происхождение, поскольку циркулировали в одном географическом регионе, хоть и в разные промежутки времени.

Особенностью генома фага 5342 является заложенная в нем информация, в том числе кодирующая предполагаемый белок, который принимает участие в биосинтезе кобаламина (витамина B12), представляющего собой структурно сложный кофактор, синтезируемый бактериями и необходимый для выработки ферментов бактерий, простейших и животных [18], с номером доступа GenBank: ADX87791.1, а также субъединицу кобальт-хелатазы CobT (aerobic cobaltochelatase CobT subunit, GenBank: YP_004251212.1) с гомологией 99 %.

Предположительно, эти метаболические ферменты улучшают метаболизм инфицированной бактериальной клетки, тем самым способствуя увеличению пролиферации фага. Также в геноме фага 5342 идентифицирован с гомологией 100 % вирионный белок pb (porphyrin biosynthesis, GenBank: YP_004251213.1), отвечающий за распознавание и связывание с клеточными рецепторами внешней мембраны энтеробактерий, представленными крупными трансмембранными белками-транспортерами, участвующими в переносе ионов металлов (железа, кобальта) в составе белковых и порфириновых комплексов [16, 19]. Детерминанты CobS/CobT и pb взаимосвязаны и способствуют успешному прикреплению фага к клетке-мишени. Они обнаружены практически у всех фагов, гомологичных 5342, независимо от времени и источника выделения (стул больного холерой или окружающая среда).

В результате биоинформационного анализа при помощи программы PhageAnalyzer и алгоритма BLASTX установлено, что выделенный бактериофаг является вирулентным, как и холерные бактериофаги, гомологичные ему, поражающие преимущественно клинические изоляты *V. cholerae*, выделенные от пациентов [16, 17], что является общим биологическим свойством.

Таким образом, в рамках поиска альтернативных антимикробных агентов для лечения и профилактики холеры выделен новый вирулентный бактериофаг, проведены оценка его биологических свойств и генетическая характеристика.

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

1. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А., Миронова Л.В., Монахова Е.В., Соболева Е.Г., Чемисова О.С.,

Водопьянов А.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Меньшикова Е.А., Подойницына О.А., Ежова М.И., Евтеев А.В. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 1:56–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66.

2. Вспыхнет ли эпидемия? Журналист пула МИД РФ заразился холерой и привез ее в Москву. [Электронный ресурс]. URL: <https://msk1.ru/text/health/2023/09/22/72733892/?ysclid=lt8j7kdcx5532579309> (дата обращения 03.06.2024).

3. Д'Эрелль Ф. Бактериофаг и феномен выздоровления. Тифлис: Изд-во Тифлис. гос. ун-та; 1935. 262 с.

4. Faruque S.M. Role of phages in the epidemiology of cholera. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:165–80. DOI: 10.1007/82_2013_358.

5. Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Аноприенко А.О. Аспекты конструирования экспериментальных профилактических препаратов на основе холерных бактериофагов. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2021; 17(3):60–8.

6. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Аноприенко А.О., Романова Л.В., Тюрина А.В. Биологические свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae*. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021; 98(3):290–7. DOI: 10.36233/0372-9311-39.

7. Адамс М. Бактериофаги. М.: Изд-во иностр. лит-ры; 1961. 527 с.

8. Рациональное применение бактериофагов в лечебной и противоэпидемической практике. Методические рекомендации. М.; 2014. 32 с.

9. Кудрякова Т.А., Евтеева Е.И., Македонова Л.Д., Саямов С.Р., Дудкина О.В., Смирнова Е.В. Изучение биологических свойств холерных фагов и штаммов вибрионов Эль-Тор, выделенных из внешней среды Донецка. *Гигиена и санитария*. 1993; 12:14–7.

10. Гаевская Н.Е., Кудрякова Т.А., Македонова Л.Д., Качкина Г.В. Идентификация и дифференциация бактериофагов патогенных для человека вибрионов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2015; 4:62–4.

11. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. Пер. с англ. под ред. А.А. Баева, К.Г. Скрыбина. М.: Мир; 1984. 479 с.

12. Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. 2010. [Электронный ресурс]. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

13. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski 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.

14. 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.

15. Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Аноприенко А.О. Создание коллекции фагов патогенных вибрионов и ее применение в диагностических и профилактических целях. *Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова*. 2023; 19(3):37–45.

16. Seed K.D., Bodi K.L., Kropinski A.M., Ackermann H.W., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2011; 2(1):e00334-10. DOI: 10.1128/mBio.00334-10.

17. Seed K.D., Yen M., Shapiro B.J., Hilaire I.J., Charles R.C., Teng J.E., Ivers L.C., Boncy J., Harris J.B., Camilli A. Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *Elife*. 2014; 3:e03497. DOI: 10.7554/eLife.03497.

18. Rodionov D.A., Vitreschak A.G., Mironov A.A., Gelfand M.S. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(42):41148–59. DOI: 10.1074/jbc.M305837200.

19. Flayhan A., Wien F., Paternostre M., Boulanger P., Breyton C. New insights into pb5, the receptor binding protein of bacteriophage T5, and its interaction with its *Escherichia coli* receptor FhuA. *Biochimie*. 2012; 94(9):1982–9. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.05.021.

References

1. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., Mironova L.V., Monakhova E.V., Soboлева E.G., Chemisova O.S., Vodop'yanov A.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Men'shikova E.A., Podoyitsyna O.A., Ezhova M.I., Evteev A.V. [Cholera: analysis and assessment of the epidemiological situation in the world and Russia. Forecast for 2023]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (1):56–66. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-56-66.

2. Will an Epidemic Break Out? A Russian Foreign Ministry Pool Journalist Contracted Cholera and Brought It to Moscow. (Cited 03 June 2024). [Internet]. Available from: <https://mskl.ru/text/health/2023/09/22/72733892/?ysclid=lt8j7kdcxs532579309>.
3. D'Herelle F. [Bacteriophage and the Phenomenon of Recovery]. Tiflis: Publishing house of Tiflis State University; 1935. 262 p.
4. Faruque S.M. Role of phages in the epidemiology of cholera. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2014; 379:165–80. DOI: 10.1007/82_2013_358.
5. Tyurina A.V., Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Anoprienko A.O. [Aspects of designing experimental prophylactic drugs based on cholera bacteriophages]. *Vestnik Biotehnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physicochemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2021; 17(3):60–8.
6. Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Pisanov R.V., Anoprienko A.O., Romanova L.V., Tyurina A.V. [Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic bacteriophages of *Vibrio cholerae*]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]*. 2021; 98(3):290–7. DOI: 10.36233/0372-9311-39.
7. Adams M. [Bacteriophages]. Moscow: Publishing House of Foreign Literature; 1961. 527 p.
8. [Rational Use of Bacteriophages in Medical and Anti-Epidemic Practice. Methodological Recommendations]. Moscow; 2014. 32 p.
9. Kudryakova T.A., Evteeva E.I., Makedonova L.D., Sayamov S.R., Dudkina O.V., Smirnova E.V. [Study of biological properties of cholera phages and El Tor vibrio strains isolated from the external environment of Donetsk]. *Gigiena i Sanitariya [Hygiene and Sanitation]*. 1993; (12):14–7.
10. Gaevskaya N.E., Kudryakova T.A., Makedonova L.D., Kachkina G.V. [Identification and differentiation of bacteriophages of vibrios pathogenic for humans]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnostics]*. 2015; (4):62–4.
11. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. [Methods of Genetic Engineering: Molecular Cloning]. Translated from English, edited by Baev A.A., Skryabin K.G. Moscow: "Mir"; 1984. 479 p.
12. Andrews S. [FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data]. 2010. [Internet]. Available from: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
13. 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.
14. 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.
15. Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Anoprienko A.O. [Creation of a collection of pathogenic vibrio phages and its use for diagnostic and prophylactic purposes]. *Vestnik Biotehnologii i Fiziko-Khimicheskoi Biologii imeni Yu.A. Ovchinnikova [Bulletin of Biotechnology and Physical-Chemical Biology named after Yu.A. Ovchinnikov]*. 2023; 19(3):37–45.
16. Seed K.D., Bodi K.L., Kropinski A.M., Ackermann H.W., Calderwood S.B., Qadri F., Camilli A. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2011; 2(1):e00334–10. DOI: 10.1128/mBio.00334–10.
17. Seed K.D., Yen M., Shapiro B.J., Hilaire I.J., Charles R.C., Teng J.E., Ivers L.C., Boncy J., Harris J.B., Camilli A. Evolutionary consequences of intra-patient phage predation on microbial populations. *Elife.* 2014; 3:e03497. DOI: 10.7554/eLife.03497.
18. Rodionov D.A., Vitreschak A.G., Mironov A.A., Gelfand M.S. Comparative genomics of the vitamin B12 metabolism and regulation in prokaryotes. *J. Biol. Chem.* 2003; 278(42):41148–59. DOI: 10.1074/jbc.M305837200.
19. Flayhan A., Wien F., Paternostre M., Boulanger P., Breyton C. New insights into pb5, the receptor binding protein of bacteriophage T5, and its interaction with its *Escherichia coli* receptor FhuA. *Biochimie.* 2012; 94(9):1982–9. DOI: 10.1016/j.biochi.2012.05.021.

Authors:

Sizova Yu.V., Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Tyurina A.V., Vodop'yanov A.S. Rostov-on-Don Research Anti-Plague Institute. 117/40, M. Gor'kogo St., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation. E-mail: plague@aaanet.ru.

Об авторах:

Сизова Ю.В., Погужова М.П., Гаевская Н.Е., Тюрина А.В., Водопьянов А.С. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.