

DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-167-175

УДК 579:616.932

Д.А. Сергутин, Н.А. Плеханов, Н.Б. Челдышова, А.В. Осин, Е.Ю. Щелканова, А.В. Федоров,
Я.М. Краснов, С.П. Заднова

Изучение устойчивости нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, с разной структурой антифаговых систем, к литическому действию холерного диагностического бактериофага эльтор

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – изучить присутствие антифаговых систем в геноме нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор и определить устойчивость штаммов с разной структурой данных систем к холерному диагностическому бактериофагу эльтор. **Материалы и методы.** В работе использовали 126 нетоксигенных (*ctxA-tcpA*⁺ и *ctxA-tcpA*⁻) штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации и сопредельных стран из внешней среды и от больных острыми кишечными инфекциями с 1972 по 2018 г. Секвенирование проводили на платформе MGI DNBSEQ-G50. Для биоинформационного анализа использовали программы fastp v0.23, unicycler v0.4.7, Blast 2.16.0 и MEGA X. Взаимодействие холерного диагностического бактериофага эльтор с поверхностью бактерий исследовали методом атомно-силовой микроскопии. **Результаты и обсуждение.** В геноме изученных штаммов не выявлены фагоиндуцируемые острова PLE и BREX-системы. В то же время 75 % *ctxA-tcpA*⁺ штаммов содержат гены рестрикции-модификации I типа, у *ctxA-tcpA*⁻ штаммов данные гены не обнаружены. Гены CBASS-системы присутствуют у единичных штаммов обеих групп. Установлено наличие системы CRISPR-Cas I типа в геноме 36 (33 %) *ctxA-tcpA*⁻ штаммов, выделенных в разных регионах нашей страны. При этом 78 % штаммов, содержащих данную систему, резистентны к холерному диагностическому бактериофагу эльтор. Таким образом, установлена гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор по наличию антифаговых систем, что расширяет сведения об их генетической организации. Нетоксигенные *ctxAB-tcpA*⁻ штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор более устойчивы к литическому действию холерного диагностического бактериофага эльтор, чем *ctxAB-tcpA*⁺. Одной из причин их резистентности может быть присутствие системы CRISPR-Cas I типа.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, нетоксигенные штаммы, гены антифаговых систем, система CRISPR-Cas I типа, устойчивость к бактериофагу эльтор.

Корреспондирующий автор: Сергутин Данил Александрович, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Для цитирования: Сергутин Д.А., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Осин А.В., Щелканова Е.Ю., Федоров А.В., Краснов Я.М., Заднова С.П. Изучение устойчивости нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, с разной структурой антифаговых систем, к литическому действию холерного диагностического бактериофага эльтор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; 2:167–175. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-167-175
Поступила 26.03.2025. Принята к публикации 04.05.2025.

D.A. Sergutin, N.A. Plekhanov, N.B. Cheldyshova, A.V. Osin, E.Yu. Shchelkanova, A.V. Fedorov,
Ya.M. Krasnov, S.P. Zadnova

Assessment of Resistance to Lytic Effect of Diagnostic Cholera Bacteriophage El Tor in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor Strains with Different Structure of Anti-Phage Systems

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to study the presence of anti-phage systems in the genome of non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor strains and to determine the resistance of strains with different structures of these systems to the cholera diagnostic bacteriophage El Tor. **Materials and methods.** The work used 126 non-toxigenic (*ctxA-tcpA*⁺ and *ctxA-tcpA*⁻) strains of *V. cholerae* O1 El Tor, isolated from the external environment and from patients with acute intestinal infections in the territory of the Russian Federation and neighboring countries between 1972 and 2018. Sequencing was performed on the MGI DNBSEQ-G50 platform. The following programs were used for bioinformatics analysis: fastp v0.23, unicycler v0.4.7, Blast 2.16.0 and MEGA X. The interaction of the cholera diagnostic bacteriophage El Tor with the surface of bacteria was studied using atomic force microscopy. **Results and discussion.** Phage-induced PLE islands and BREX systems were not detected in the genome of the studied strains. At the same time, 75 % of *ctxA-tcpA*⁺ strains contain type I restriction-modification genes, while those genes were not detected in *ctxA-tcpA*⁻ strains. The CBASS-system genes are present in single strains of both groups. The presence of type I CRISPR-Cas system was established in the genome of 36 (33 %) *ctxA-tcpA*⁻ strains isolated in different regions of our country. Moreover, 78 % of strains containing this system are resistant to the cholera diagnostic bacteriophage El Tor. Thus, heterogeneity of the studied non-toxigenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor in regard to the presence of anti-phage systems has been established, which expands the knowledge on their genetic organization. Non-toxigenic *ctxAB-tcpA*⁻ strains of *V. cholerae* O1 El Tor are more resistant to the lytic action of the diagnostic cholera bacteriophage El Tor than *ctxAB-tcpA*⁺ strains. One of the reasons for such resistance may be the presence of the type I CRISPR-Cas system.

Key words: *Vibrio cholerae*, non-toxigenic strains, genes of anti-phage systems, type I CRISPR-Cas system, resistance to bacteriophage El Tor.

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

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

Acknowledgements: We express our gratitude to P.S. Erokhin, the employee of the Laboratory of diagnostic technologies at the FSSI "Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" of the Rosпотребнадзор, for conducting atomic force microscopy.

Corresponding author: Danil A. Sergutin, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Sergutin D.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Osin A.V., Shchelkanova E.Yu., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., Zadnova S.P. Assessment of Resistance to Lytic Effect of Diagnostic Cholera Bacteriophage El Tor in Non-Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 Biovar El Tor Strains with Different Structure of Anti-Phage Systems. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2025; 2:167–175. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2025-2-167-175

Received 26.03.2025. Accepted 04.05.2025.

Sergutin D.A., ORCID: <https://orcid.org/0009-0003-7525-9682>
Plekhanov N.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>
Cheldyshova N.B., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>
Osin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5308-0022>

Shchelkanova E.Yu., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0672-8820>
Fedorov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>
Krasnov Ya.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>
Zadnova S.P., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Холера – особо опасная инфекционная болезнь, вызываемая в настоящее время токсигенными геновариантами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Данные штаммы продуцируют основные факторы вирулентности – холерный токсин и токсин-корегулируемые пили адгезии, кодируемые соответственно генами *ctxAB* и *tcpA-F* [1]. Геноварианты из эндемичных по холере стран периодически завозятся на территорию Российской Федерации. В то же время ежегодно из водных объектов нашей страны изолируются нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор, лишенные генов *ctxAB* (*ctxAB*⁻). Изредка регистрируются изоляты, содержащие ген *tcpA* (*ctxAB*⁻*tcpA*⁺). Нетоксигенные штаммы не способны вызывать холеру, но могут быть причиной единичных и групповых случаев острых кишечных инфекций (ОКИ). Показано, что нетоксигенные штаммы длительное время выживают в объектах окружающей среды на территории РФ, образуя клональные комплексы, а также завозятся из эндемичных по холере стран. Генетическая структура и механизмы их многолетнего сохранения в открытых водоемах активно изучаются [2–7]. При проведении анализа нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор установлена их высокая резистентность к литическому действию холерного диагностического бактериофага эльтор, используемого для определения биовара. Показано, что в отдельные годы число устойчивых изолятов достигало 83 % [3, 4]. Обнаружение большего количества нетоксигенных штаммов, устойчивых к холерному диагностическому бактериофагу эльтор, способствовало формированию направления по поиску новых рас бактериофагов для создания диагностических препаратов [8, 9]. При этом причины резистентности нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор к данному бактериофагу не установлены.

Необходимо отметить, что, обитая в воде открытых водоемов, нетоксигенные вибрионы подвергаются атаке различных бактериофагов (фагов), также присутствующих в данной среде. Показано, что холерные фаги являются важным фактором, способствующим генетическому разнообразию штаммов *V. cholerae* [10]. Совместное существование холерных вибрионов и фагов и необходимость обоих выживать способствуют эволюции как холерного вибриона, так и фагов [10, 11]. Бактерии используют разные

механизмы защиты от фагов, а фаги, в свою очередь, очень быстро развивают устойчивость ко многим бактериальным антифаговым системам. Показано, что гены, кодирующие устойчивость к фагам, могут составлять более 10 % бактериального генома [12]. Холерные вибрионы имеют в своем арсенале механизмы, направленные на все этапы фаговой инфекции: изменение рецепторов на поверхности клеток, синтез дополнительного экзополисахаридного слоя, приобретение антифаговых систем, уничтожающих генетический материал проникшего в клетку фага (рестрикция-модификация (PM), CRISPR-Cas) или блокирующих процесс формирования частиц фага (острова PLE, BREX-системы, абортинная инфекция – Abi) [13]. У *V. cholerae* O1 Эль Тор система PM I типа (*vcI764* – *vcI769*) расположена на острове патогенности VPI-2 и включает эндонуклеазу рестрикции (*vcI765*), которая фрагментирует ДНК, а также метилтрансферазу (*vcI769*), модифицирующую собственную ДНК бактерий для предотвращения неизбежного действия эндонуклеазы [14]. Системы CRISPR-Cas состоят из кластеризованных регулярно расположенных коротких палиндромных повторов (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats – CRISPR), спейсеров и генов *cas*, кодирующих белки-нуклеазы. Системы CRISPR-Cas обеспечивают иммунитет к заражению фагами посредством приобретения генетического материала ранее проникавших фагов (спейсеры) [13, 15]. Самым распространенным на эндемичной территории холерным фагом является ICP1, для защиты от которого штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор используют приобретенные в результате генетического переноса фагоиндуцируемые острова PLE (Phage inducible chromosomal island-like elements) [16]. Ранее выявлено, что указанные мобильные генетические элементы присутствуют в токсигенных штаммах *V. cholerae* O1 Эль Тор, занесенных и выделенных на территории РФ [11, 17, 18]. При проникновении в клетки холерного вибриона фага ICP1 происходит вырезание PLE-элемента из хромосомы и формирование фаговых частиц, содержащих геном PLE. В итоге зараженные фагом ICP1 холерные вибрионы лизируются и погибают, но популяция сохраняется [19, 20]. Действие недавно обнаруженной системы BREX (Bacteriophage exclusion), придающей устой-

чивость к широкому кругу вирулентных и умеренных фагов, основано на блокировании репликации ДНК фага по не изученному до конца механизму. Данная система обнаружена в геноме токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор в составе ICE SXT-элементов. ICE SXT-элементы имеют мозаичную структуру и состоят из основных генов, необходимых для его регуляции и передачи при конъюгативном переносе, а также дополнительных, которые сгруппированы в пяти вариабельных областях или «горячих точках» интеграции (hotspot). Гены, обеспечивающие устойчивость патогена одновременно к нескольким антибиотикам, расположены в третьей «горячей точке», а гены, необходимые для резистентности к фагам, выявлены в пятой (hotspot 5) [21, 22]. Аби-инфекция – одна из стратегий защиты, в которой инфицированные фагом бактерии самоуничтожаются, что способствует сохранению других клеток в популяции. У *V. cholerae* O1 Эль Тор Аби-инфекция происходит с использованием системы CBASS (Cyclic oligonucleotide based anti-phage signaling system), расположенной на острове пандемичности VSP-I. Данная система включает оперон из четырех генов (*dncV*, *capV*, *cap2*, *cap3*), среди которых *dncV* (*vc0179*) кодирует синтазу, которая при попадании фага в клетку запускает биосинтез сигнальных молекул – циклических олигонуклеотидов (сGAMP). Продуцируемые сGAMP активируют транскрипцию гена *capV* (*vc0178*), ответственного за биосинтез фосфолипазы, вызывающей лизис инфицированных фагом клеток. Гены *cap2* (*vc0180*) и *cap3* (*vc0181*) кодируют белки, соответственно активирующие и репрессирующие продукцию DncV и синтез сGAMP [13, 23]. Несмотря на обнаружение у холерного вибриона значительного количества антифаговых систем, их присутствие в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории РФ и сопредельных стран, не изучено, а также не установлена роль в защите от фагов.

Цель работы – изучить присутствие антифаговых систем в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и определить устойчивость штаммов с разной структурой данных систем к холерному диагностическому бактериофагу эльтор.

Материалы и методы

В работе использовано 126 нетоксигенных (12 *ctxA-tcpA*⁺ и 114 *ctxA-tcpA*⁻) штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории РФ и сопредельных стран (Украина, Туркменистан) из внешней среды и от больных ОКИ с 1972 по 2018 г. Штаммы хранятся в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора в лиофилизированном состоянии. Культивирование бактерий осуществляли на агаре Хоттингера (pH 7,6) и LB-бульоне (pH 7,6).

Секвенирование ДНК штаммов проводили на платформе MGI DNBSEQ-G50 (MGI Tech Co., Ltd, Китай). Библиотеки готовили с использованием наборов реагентов DNBSEQ-G50RS FCLPE150 и MGI EasyFastPCR-FREEFS Library PrepSet (MGI Tech Co., Ltd, Китай) по стандартному протоколу. Контроль качества полученных прочтений осуществляли с применением программы fastp v0.23, сборку контигов – с помощью unicycler v0.4.7. Для биоинформационного анализа использовали алгоритм Blast 2.16.0 (<http://blast.ncbi>) и программу MEGA X (или BioEdit v7.0.9.0). Сопоставление нуклеотидных последовательностей генов проводили относительно генома референсного штамма *V. cholerae* N16961 O1 биовара Эль Тор.

Для изучения чувствительности штаммов к холерному диагностическому бактериофагу эльтор (ХДБЭ) использовали коммерческий набор «Бактериофаги диагностические холерные классический и эльтор, лиофилизат для диагностических целей» (Российский противочумный институт «Микроб», Россия). Для работы лиофилизированный бактериофаг эльтор разводили согласно инструкции до концентрации 10⁻³, что соответствовало его диагностическому рабочему титру (ДРТ), который используется для определения биовара штаммов.

Изучение взаимодействия ХДБЭ со штаммами *V. cholerae* O1 Эль Тор методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) выполняли по ранее описанной методике [24]. К 1 мл ночной бульонной культуры *V. cholerae* прибавляли 200 мкл бактериофага эльтор в разведении 10⁻³. Через равные промежутки времени (30, 60, 120 мин) отбирали 100 мкл образца и добавляли глутаровый альдегид (Applichem, Германия) до конечной концентрации 2,5 %, выдерживали в течение 2 ч при температуре 4 °С. Затем пробы центрифугировали в течение 20 мин при 6000 об/мин с использованием центрифуги MR23i (Thermo Scientific, США). Надосадочную жидкость удаляли, осадок осторожно ресуспендировали в 100 мкл биодистиллированной воды. Суспензию объемом 4 мкл наносили на покровные стекла размером 18×18 мм и высушивали на воздухе. Исследования проводили на атомно-силовом микроскопе SolverP47-PRO (НТ-МДТ, Россия) прерывисто-контактным способом (метод рассогласования) с использованием кремниевых кантилеверов, напыленных золотом NSG01 (НТ-МДТ, Россия). Резонансная частота кантилевера составляла 120 кГц, константа жесткости – 5,5 Н/м. Обработка изображений выполнялась с использованием программы Image Analysis (НТ-МДТ, Россия).

Результаты и обсуждение

Анализ наличия и структуры генов антифаговых систем. При изучении нуклеотидных последовательностей полных геномов 12 *ctxAB-tcpA*⁺ и 18 *ctxAB-tcpA*⁻ штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, представленных в базе данных NCBI GenBank, фагоинду-

цируемые острова PLE не обнаружены. В результате отсутствия в данных штаммах ICE SXT-элементов не выявлены также и гены BREX-систем. При изучении генов системы рестрикции-модификации I типа (*vc1765*, *vc1769*) среди *ctxAB-tcpA*⁺ штаммов выявлено 9 изолятов (75 %), структура указанных генов которых соответствовала референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор. У *ctxAB-tcpA*⁻ штаммов гены системы PM I типа отсутствовали. В геноме большинства штаммов не установлено наличия CBASS-системы. Исключение составил штамм *V. cholerae* 56 (*ctxAB-tcpA*⁺), у которого присутствовали гены *dncV*, *capV*, соответствующие по структуре данным генам референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор. У трех *ctxAB-tcpA*⁻ штаммов (*V. cholerae* P-18748, 102, M-1457), выделенных в разные годы и на разных территориях (Россия, Украина), присутствовал интактный ген *capV*, а в гене *dncV* выявлена одинаковая несинонимичная SNP (A1003G), приводящая к смене (S335G) аминокислот (табл. 1). Сведения о влиянии указанной замены аминокислот на функциональные свойства белка DncV нами в литературе не обнаружены.

Исследование наличия гена *cas3*, кодирующего хеликазу/нуклеазу Cas3 и входящего в состав системы CRISPR-Cas I типа, показало, что в геноме *ctxAB-tcpA*⁺ штаммов данный ген отсутствует. В то же время среди *ctxAB-tcpA*⁻ выявлено 11 (61 %) штаммов, имеющих ген *cas3* (табл. 1). Таким образом, изученные нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 Эль Тор лишены ряда мобильных генетических элементов с антифаговыми генами, присутствующими в геноме токсигенных штаммов.

Определение чувствительности штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор к холерному диагностическому бактериофагу эльтор и проведение атомно-силовой микроскопии. На данном этапе работы изучена чувствительность взятых в исследование штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор к ХДБЭ. В результате установлено, что все анализируемые *ctxA-tcpA*⁺ штаммы, несмотря на присутствие генов PM I типа, лизировались бактериофагом ХДБЭ до ДРТ. Среди нетоксигенных *ctxA-tcpA*⁻ выявлено всего 5 (28 %) чувствительных к ХДБЭ изолятов (табл. 1). При этом из 13 штаммов, резистентных к данному бактериофагу, 9 (69 %) содержали систему CRISPR-Cas.

Таблица 1 / Table 1

Характеристика штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, использованных в работе, структура антифаговых генов в их геноме и устойчивость к холерному диагностическому бактериофагу эльтор
Characteristics of *V. cholerae* O1 El Tor strains used in the work, the structure of anti-phage genes in their genome and resistance to the diagnostic cholera bacteriophage El Tor

Штамм Strains	Место, год, источник выделения The site, year, source of isolation	Чувствительность к ХДБЭ Sensitivity to diagnostic cholera bacteriophage El Tor	Структура генов (замена аминокислот) Gene structure (amino acid substitution)		
			<i>vc1765</i> / <i>vc1769</i>	<i>dncV</i> / <i>capV</i>	<i>cas3</i>
1	2	3	4	5	6
Нетоксигенные <i>ctxA-tcpA</i> ⁺ штаммы / Non-toxigenic <i>ctxA-tcpA</i> ⁺ strains					
M1395 ^{LQBY01}	РФ, Астрахань, 1981, в.с. RF, Astrakhan, 1981, env.	ДРТ DWT	—	—	—
56 ^{MWRD01}	Украина, Мариуполь, 1995, чел. Ukraine, Mariupol, 1995, pat.	ДРТ DWT	int	int	—
866 ^{MWRFO1}	Украина, Ялта, 1996, в.с. Ukraine, Yalta, 1996, env.	ДРТ DWT	int	—	—
85 ^{NEDU01}	Украина, Бердянск, 1999, чел. Ukraine, Berdyansk, 1999, pat.	ДРТ DWT	int	—	—
P18778 ^{NIFIO1}	РФ, Ростов-на-Дону, 2005, чел. RF, Rostov-on-Don, 2005, pat.	ДРТ DWT	—	—	—
M1501 ^{LRAE01}	РФ, Элиста, 2011, чел. RF, Elista, 2011, pat.	ДРТ DWT	—	—	—
M1504 ^{VTLN01} , M1518 ^{LQZR01} , M1524 ^{LQZS01}	РФ, Элиста, 2011, 2012, 2013, в.с. RF, Elista, 2011, 2012, 2013, env.	ДРТ DWT	int	—	—
2613 ^{PYCA01} , 2687 ^{PYCB01}	РФ, Элиста, 2015, в.с. RF, Elista, 2015, env.	ДРТ DWT	int	—	—
124 ^{PYCD01}	РФ, Элиста, 2017, в.с. RF, Elista, 2017, env.	ДРТ DWT	int	—	—
Нетоксигенные <i>ctxA-tcpA</i> ⁻ штаммы / Non-toxigenic <i>ctxA-tcpA</i> ⁻ strains					
M988 ^{LQBX01}	Туркменистан, 1972, в.с. Turkmenistan, 1972, env.	ДРТ DWT	—	—	+
617 ^{NCTY01}	Украина, 1999, чел. Ukraine, 1999, pat.	не лиз. not lys.	—	—	+*

Окончание табл. 1 / Ending of table 1

1	2	3	4	5	6
M1332 ^{PYCE01}	РФ, Челябинск, 2000, чел. RF, Chelyabinsk, 2000, pat.	не лиз. not lys.	–	–	–
M1337 ^{NEEB01}	РФ, Астрахань, 2000, чел. RF, Astrakhan, 2000, pat.	не лиз. not lys.	–	–	+*
P-18748 ^{NIFH01}	РФ, Сочи, 2004, чел. RF, Sochi, 2004, pat.	не лиз. not lys.	–	A1003G (S335G)/int	–
102 ^{NDX001}	Украина, 2006, чел. Ukraine, 2006, pat.	не лиз. not lys.	–	A1003G (S335G)/int	+*
M1457 ^{VTLH01}	РФ, Элиста, 2009, в.с. RF, Elista, 2009, env.	не лиз. not lys.	–	A1003G (S335G)/int	+
2403 ^{NEDV01}	Украина, 2011, чел. Ukraine, 2011, pat.	не лиз. not lys.	–	–	+
M1506 ^{VTZX01}	РФ, Элиста, 2011, в.с. RF, Elista, 2011, env.	не лиз. not lys.	–	–	–
M1516 ^{VTZY01}	РФ, Элиста, 2012, в.с. RF, Elista, 2012, env.	не лиз. not lys.	–	–	+
M1517 ^{VTZZ01}	РФ, Элиста, 2012, в.с. RF, Elista, 2012, env.	ДРТ DWT	–	–	+
M1526 ^{VUAA01} , 29 ^{VUAB01}	РФ, Элиста, 2012, 2013, в.с. RF, Elista, 2012, 2013, env.	не лиз. not lys.	–	–	+
132 ^{VUAC01}	РФ, Элиста, 2013, в.с. RF, Elista, 2013, env.	ДРТ DWT	–	–	–
M1522 ^{LQCA01}	РФ, Казань, 2014, в.с. RF, Kazan, 2014, env.	ДРТ DWT	–	–	–
433 ^{NEDW01}	РФ, Сочи, 2015, в.с. RF, Sochi, 2015, env.	ДРТ DWT	–	–	–
3178 ^{PYCH01}	РФ, Элиста, 2017, в.с. RF, Elista, 2017, env.	не лиз. not lys.	–	–	–
136 ^{VTLK01}	РФ, Элиста, 2018, в.с. RF, Elista, 2018, env.	не лиз. not lys.	–	–	+

Примечания : в надстрочном индексе штаммов указан код доступа в NCBI GenBank; в.с. – внешняя среда; ХДБЭ – холерный диагностический бактериофаг эльтор, ДРТ (диагностический рабочий титр) составляет 10⁻³; «не лиз.» – не лизируется; «–» – ген(ы) не обнаружен(ы); int – структура гена соответствует референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор; * присутствие системы CRISPR-Cas установлено ранее [15].

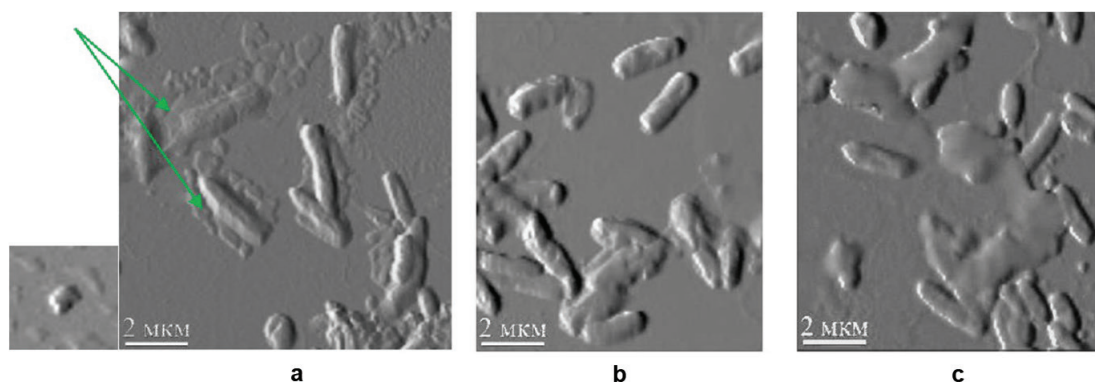
Notes: The superscript index of the strains indicates the access code in NCBI GenBank; env. – environment; pat. – patient; cholera diagnostic bacteriophage El Tor, DWT (diagnostic working titer) is 10⁻³; “not lys.” – not lysed; “–” – gene(s) not detected; int – the gene structure corresponds to the reference strain *V. cholerae* N16961 O1 El Tor; * the presence of the CRISPR-Cas system was previously established [15].

Можно высказать предположение об участии данной системы в обеспечении устойчивости *ctxA-tcpA*-штаммов к ХДБЭ.

При этом два штамма – *V. cholerae* M1517 (Элиста, 2012) и M988 (Турменистан, 1972) – составили исключение. Они содержали ген *cas3*, но лизировались фагом ХДБЭ. Возможно, в данных штаммах система CRISPR-Cas является нефункциональной, но для подтверждения данного предположения требуется более детальное изучение ее структуры.

Далее проведено исследование взаимодействия двух *ctxA-tcpA*-штаммов, выделенных из воды открытых водоемов в Республике Калмыкия (Элиста, 2013), методом АСМ. Взяты устойчивый к данному бактериофагу штамм *V. cholerae* 29, содержащий систему CRISPR-Cas, и чувствительный *V. cholerae* 132, в котором данная система отсутствовала. Системы рестрикции-модификации I типа и CBASS в данных штаммах не выявлены (табл. 1). В результате через 30 мин инкубации наблюдали взаимодействие бак-

териофага как с клетками чувствительного штамма *V. cholerae* 132, так и устойчивого – *V. cholerae* 29 (рисунок, а). Через 60 мин инкубации частицы бактериофага не были обнаружены ни в препарате с чувствительным штаммом, ни с устойчивым. Однако в образце с чувствительным штаммом выявлены поврежденные бактерии (с разорванной оболочкой, неправильной формы и т.д.). В то же время в препарате с устойчивым штаммом присутствовали неповрежденные бактерии (рисунок, б, с). Полученные данные позволили высказать предположение, что на поверхности штамма *V. cholerae* 29, так же как и штамма *V. cholerae* 132, находятся интактные рецепторы для ХДБЭ, что позволяет ему прикрепляться к поверхности бактерий. Возможно, впоследствии генетический материал бактериофага проникает в клетки обоих штаммов, но в случае *V. cholerae* 29 уничтожается системой CRISPR-Cas, присутствующей в данном штамме. Однако несомненно, что для окончательного определения роли данной системы в



АСМ изображения клеток устойчивого (*V. cholerae* 29) и чувствительного (*V. cholerae* 132) к диагностическому холерному бактериофагу эльтор штаммов при взаимодействии с данным бактериофагом в ЛБ-бульоне через разные промежутки времени:

a – через 30 мин инкубации *V. cholerae* 29 с бактериофагом эльтор. Выявлено присутствие частиц бактериофага на поверхности бактерий (отмечены стрелками). Внизу слева показано увеличенное изображение частицы бактериофага; *b* – через 60 мин инкубации *V. cholerae* 29 с бактериофагом эльтор. Бактериофаг не обнаруживается, видны неповрежденные бактерии; *c* – через 60 мин инкубации *V. cholerae* 132 с бактериофагом эльтор. Бактериофаг не обнаруживается, видны поврежденные бактерии

AFM images of cells of resistant (*V. cholerae* 29) and sensitive (*V. cholerae* 132) to the diagnostic cholera bacteriophage El Tor strains during interaction with the bacteriophage in LB broth at different time intervals:

a – after 30 min of incubation of *V. cholerae* 29 with bacteriophage El Tor. The presence of bacteriophage particles on the surface of bacteria is revealed (marked with arrows). A magnified image of a bacteriophage particle is shown at the bottom to the left; *b* – after 60 min of incubation of *V. cholerae* 29 with bacteriophage El Tor. The bacteriophage is not detected, intact bacteria are visible; *c* – after 60 min of incubation of *V. cholerae* 132 with bacteriophage El Tor. The bacteriophage is not detected, damaged bacteria are visible

устойчивости штаммов к ХДБЭ необходимо проведение дополнительных исследований на изогенных штаммах *V. cholerae*.

Изучение распространенности CRISPR-Cas системы *I* типа в геноме *ctxA*⁺*tcpA*⁺ штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор. Обнаружение системы CRISPR-Cas I типа в геноме *ctxA*⁺*tcpA*⁺ изолятов указывает на необходимость изучения присутствия данной системы среди нетоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделяемых на территории РФ. С этой целью проведено секвенирование 96 нетоксигенных *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных из открытых водоемов и от больных ОКИ в разных регионах нашей страны. При биоинформационном анализе присутствие гена *cas3* выявлено в геноме 25 штаммов, которые депонированы нами в базу данных VGARus (табл. 2). Показано, что нетоксигенные *ctxA*⁺*tcpA*⁺ штаммы с системой CRISPR-Cas I типа распространены достаточно широко. Данные штаммы выделялись в разные годы на территории республик Татарстан, Дагестан, Башкирия, Мордовия, Калмыкия, а также в Астраханской, Саратовской областях и Пермском крае (табл. 2). Стоит отметить, что система CRISPR-Cas идентифицирована в геноме как клинических, так и выделенных из водной среды *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов.

При изучении чувствительности выявленных штаммов, содержащих систему CRISPR-Cas I типа, к ХДБЭ установлено наличие 19 (76 %) резистентных к данному бактериофагу изолятов (табл. 2).

Таким образом, в результате проведенного исследования среди 114 изученных *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор обнаружено 36 (32 %) изолятов, содержащих систему CRISPR-Cas I типа, среди которых 28 (78 %) устойчивы к ХДБЭ.

Утрата хромосомных локусов вирулентности, но сохранение или приобретение генов, входящих в со-

став антифаговых систем, могут отражать приоритет выживания нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор во внешней среде, где они подвержены фаговой инфекции. Однако у изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор отсутствует ряд антифаговых систем (острова PLE, BREX-системы), обнаруженных у токсигенных штаммов [17, 18]. Также в геноме *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов не выявлены гены системы РМ I типа, наличие которых установлено в геноме 9 (75 %) *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ изолятов, лизирующихся, однако, ХДБЭ. CBASS-система присутствует у 3 (16,7 %) устойчивых к ХДБЭ *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ изолятов, но присутствие данной системы у чувствительного *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штамма ставит под сомнение ее участие в устойчивости к ХДБЭ. В то же время показана возможная роль в фагорезистентности к ХДБЭ системы CRISPR-Cas I типа, обнаруженной в геноме 36 (33 %) *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов, среди которых 28 (78 %) изолятов являются устойчивыми к литическому действию данного бактериофага. Согласно данным литературы, включение системы CRISPR-Cas I типа в геном чувствительного к холерному фагу ICP1 токсигенного штамма *V. cholerae* N16961 O1 Эль Тор обеспечивало его устойчивость к фаговой инфекции [25]. Можно высказать предположение, что присутствие системы CRISPR-Cas в геноме *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов будет способствовать устойчивости не только к ХДБЭ, но и к другим видам фагов, что необходимо учитывать при разработке новых диагностических фаговых препаратов.

Стоит также отметить, что отсутствие генов системы CRISPR-Cas I типа в геноме *ctxAB*⁺*tcpA*⁺ штаммов, а также их чувствительность к ХДБЭ могут служить еще одним подтверждением выказанного ранее предположения о происхождении указанных штаммов от токсигенных *V. cholerae* O1 Эль Тор [26–28], среди которых резистентные к дан-

Таблица 2 / Table 2

Характеристика *ctxAB-tcpA* штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, содержащих систему CRISPR-Cas I типа, и их чувствительность к холерному диагностическому бактериофагу эльтор

Characterization of *ctxAB-tcpA* strains of *V. cholerae* O1 El Tor containing the type I CRISPR-Cas system and their sensitivity to the cholera diagnostic bacteriophage El Tor

Штамм Strains	Место, год, источник выделения The site, year, source of isolation	Чувствительность к холерному диагностическому бактериофагу эльтор Sensitivity to diagnostic cholera bacteriophage El Tor
M-658 ^{micro28246}	РФ, Уфа, 1976, в.с. / RF, Ufa, 1976, env.	не лиз. / not lys.
M-659 ^{micro28247}	РФ, Салават, 1976, в.с. / RF, Salavat, 1976, env.	не лиз. / not lys.
M-1114 ^{micro28248}	РФ, Саранск, 1977, чел. / RF, Saransk, 1977, pat.	не лиз. / not lys.
M-1115 ^{micro28249}	РФ, Саранск, 1977, чел. / RF, Saransk, 1977, pat.	ДПТ / DWT
M-1394 ^{micro28254}	РФ, Каспийск, 1979, в.с. / RF, Caspian, 1979, env.	не лиз. / not lys.
M-1222 ^{micro28250}	РФ, Астрахань, 1985, в.с. / RF, Astrakhan, 1985, env.	ДПТ / DWT
M-1320 ^{micro28251}	РФ, Саратов, 1998, в.с. / RF, Saratov, 1998, env.	не лиз. / not lys.
M-1388 ^{micro28252}	РФ, Саратовская обл., с. Хмелевка, 2001, в.с. RF, Saratov Region, vil. Khmelevka, 2001, env.	ДПТ / DWT
M-1389 ^{micro28253}	РФ, Саратовская обл., п. Красный Текстильщик, 2001, в.с. RF, Saratov Region, set. Krasny Tekstilshchik, 2001, env.	ДПТ / DWT
M-1411 ^{micro28255}	РФ, Калмыкия, с. Яшкуль, 2002, чел. RF, Kalmykia, vil. Yashkul, 2002, pat.	ДПТ / DWT
M-1413 ^{micro28256}	РФ, Элиста, 2002, в.с. / RF, Elista, env.	не лиз. / not lys.
M-1426 ^{micro28257}	РФ, Пермская обл., с. Сыевенск, 2003, в.с. RF, Perm Region, vil. Syuavensk, 2003, env.	ДПТ / DWT
M-1428 ^{micro28258}	РФ, Астрахань, 2003, в.с. / RF, Astrakhan, 2003, env.	не лиз. / not lys.
M-1431 ^{micro28259}	РФ, Элиста, 2005, в.с. / RF, Elista, 2005, env.	не лиз. / not lys.
M-1441 ^{micro28260} , M-1443 ^{micro28261} , M-1444 ^{micro28262}	РФ, Элиста, 2007, в.с. / RF, Elista, 2007, env.	не лиз. / not lys.
M-1447 ^{micro28263} , M-1450 ^{micro28264} , M-1457 ^{micro28265}	РФ, Элиста, 2009, в.с. / RF, Elista, 2009, env.	не лиз. / not lys.
M-1460 ^{micro28266}	РФ, Татарстан, д. Качелино, 2010, в.с. RF, Tatarstan, vil. Kacelino, 2010, env.	не лиз. / not lys.
M-1486 ^{micro28267} , M-1487 ^{micro28268}	РФ, Татарстан, с. Пестрецы, 2011, в.с. RF, Tatarstan, vil. Pestrels, 2011, env.	не лиз. / not lys.
M-1525 ^{micro28273} , M-1543 ^{micro28272}	РФ, Элиста, 2012, 2017, в.с. / RF, Elista, 2012, 2017, env.	не лиз. / not lys.

Примечания: в надстрочном индексе штаммов указан код доступа в VGARus; в.с. – внешняя среда; ДПТ – диагностический рабочий титр (10⁻³); «не лиз.» – не лизируется.

Notes: The superscript index of strains contains the access code to VGARus; env. – environment; pat. – patient; DWT – diagnostic working titer (10⁻³); “not lys.” – not lysed.

ному бактериофагу изоляты встречаются нечасто [17, 29].

Таким образом, полученные данные о присутствии антифаговых систем в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, выделенных на территории РФ и сопредельных стран, расширяют сведения об их генетической организации, а также указывают на необходимость более детального изучения структуры и функциональной активности системы CRISPR-Cas *ctxAB-tcpA* штаммов.

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

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

Благодарность. Выражаем благодарность сотруднику лаборатории диагностических технологий

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора П.С. Ерохину за проведение атомно-силовой микроскопии.

Список литературы

1. Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect. Genet. Evol.* 2021; 89:e104726. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104726.
2. Смирнова Н.И., Кулышань Т.А., Баранихина Е.Ю., Краснов Я.М., Агафонов Д.А., Кутырев В.В. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.
3. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В., Москвитина Э.А., Архангельская И.В., Гаевская Н.Е., Ежова М.И. Холерные вибрионы в водоёмах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019; 98(4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.
4. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С., Непомнящая Н.Б. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России. *Проблемы*

особо опасных инфекций. 2020; (3):89–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96.

5. Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С., Феранчук С.И., Пономарева А.С., Балахонcov С.В. Филогенетическое положение и особенности структуры геномов *ctxAB tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* из поверхностных водоемов на эндемичной по холере территории. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020; (1):115–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

6. Монахова Е.В., Носков А.К., Кругликов В.Д., Водопьянов А.С., Селянская Н.А., Меньшикова Е.А., Ежова М.И., Непомнящая Н.Б., Швиденко И.Г., Подойницына О.А., Писанов Р.В. Генотипическая характеристика клональных комплексов STX-VPI⁺ *Vibrio cholerae* O1, обнаруживаемых в водоемах Ростовской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (3):99–107. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-99-107.

7. Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б., Кругликов В.Д., Монахова Е.В., Чемисова О.С., Лопатин А.А., Иванова С.М., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Левченко Д.А., Савина И.В. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (1):76–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-76-88.

8. Гаевская Н.Е., Македонova Л.Д. Использование бактериофагов в лабораторной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2016; 61(12):849–52. DOI: 10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852.

9. 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.

10. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012; 3(7):556–65. DOI: 10.4161/viru.22351.

11. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., Johura F.T., Sultana M., Alam M., Seed K.D. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio*. 2021; 13(1):e0308821. DOI: 10.1128/mbio.03088-21.

12. Tumban E., editor. Bacteriophages. Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2024. 429 p.

13. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.

14. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt. 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.

15. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., Borowski J.D., Boyd E.F. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics*. 2019; 20(1):105. DOI: 10.1186/s12864-019-5439-1.

16. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genet.* 2017; 13(6):e1006838. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006838.

17. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Швиденко И.Г., Савельев В.Н. Выявление фагоиндуцируемых мобильных генетических элементов в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; (2):112–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.

18. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Спирина А.Ю., Челдышова Н.Б. Анализ антифаговых систем в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Здоровье населения и среда обитания*. 2023; 31(11):94–100. DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100.

19. McKitterick A.C., Seed K.D. Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread. *Nat. Commun.* 2018; 9(1):e2348. DOI: 10.1038/s41467-018-04786-5.

20. Barth Z.K., Silvas T.V., Angermeyer A., Seed K.D. Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(1):249–63. DOI: 10.1093/nar/gkz1005.

21. Wozniak R.A.F., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G., Dery C., Burrus V., Waldor M.K. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5(12):e1000786. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000786.

22. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., McKitterick A.C., Johura F.T., Sultana M., Ahmed T., Alam M., Seed K.D. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021; 373(6554):eabg2166. DOI: 10.1126/science.abg2166.

23. Brenzinger S., Airoidi M., Ogunleye A.J., Jugovic K., Amstalden M.K., Brochado A.R. The *Vibrio cholerae* CBASS phage defence system modulates resistance and killing by antifolate anti-

biotics. *Nat. Microbiol.* 2024; 9(1):251–62. DOI: 10.1038/s41564-023-01556-y.

24. Уткин Д.В., Ерохин П.С., Осина Н.А., Коннов Н.П. Оценка фаголизальности штаммов холерных вибрионов с использованием атомно-силовой микроскопии. *Известия Саратовского университета. Новая сер. Сер. Химия. Биология. Экология*. 2013; 13(3):81–4.

25. Chun J., Grim C.J., Hasan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J., Taviani E., Jeon Y.S., Kim D.W., Lee J.H., Brettin T.S., Bruce D.C., Challacombe J.F., Detter J.C., Han C.S., Munk A.C., Chertkov O., Meincke L., Saunders E., Walters R.A., Huq A., Nairn G.B., Colwell R.R. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009; 106(36):15442–7. DOI: 10.1073/pnas.0907787106.

26. Смирнова Н.И., Кулышань Т.А., Челдышова Н.Б., Осин А.В. Структурные и функциональные изменения генома возбудителя холеры в водной среде. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2007; (5):22–8.

27. Титова С.В., Монахова Е.В. О потенциальной опасности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, содержащих гены токсин-корегулируемых пилей адгезии. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2016; (5):65–72.

28. Крицкий А.А., Смирнова Н.И., Каляева Т.Б., Оброткина Н.Ф., Грачева И.В., Катышев А.Д., Кутырев В.В. Сравнительный анализ молекулярно-генетических свойств нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в России и на эндемичных по холере территориях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; (3):72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

29. Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Савельева И.В., Таран Т.В., Подопригора Е.И., Васильева О.В., Шапаков Н.А., Алехина Ю.А., Куличенко А.Н. Эволюция фенотипических свойств и молекулярно-генетической организации геномов штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных от больных и из объектов окружающей среды на Кавказе с 1970 по 1998 год. *Здоровье населения и среда обитания*. 2020; (12):56–61. DOI: 10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61.

References

1. Bhandari M., Jennison A.V., Rathnayake I.U., Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect. Genet. Evol.* 2021; 89:e104726. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104726.

2. Smirnova N.I., Kul'shan' T.A., Baranikhina E.Y., Krasnov Y.M., Agafonov D.A., Kutyrev V.V. [Genome structure and origin of nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance]. *Genetika [Russian Journal of Genetics]*. 2016; 52(9):1029–41. DOI: 10.7868/S0016675816060126.

3. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., Moskvitina E.A., Arkhangelskaya I.V., Gaevskaya N.E., Ezhova M.I. [*Vibrio cholerae* in the waters of the Russian Federation]. *Gigiena i Sanitariya [Hygiene and Sanitation]*. 2019; 98(4):393–9. DOI: 10.18821/0016-9900-2019-98-4-393-399.

4. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., Vodop'yanov A.S., Nepomnyashchaya N.B. [Pheno- and genotypical features of non-toxicogenic strains of cholera vibrios of different origins, isolated in the territory of Russia]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (3):89–96. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-3-89-96.

5. Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Balakhonov S.V. [Phylogenetic affinity and genome structure features of *ctxAB tcpA*⁺ *Vibrio cholerae* from the surface water bodies in the territory that is non-endemic as regards cholera]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2020; (1):115–23. DOI: 10.21055/0370-1069-2020-1-115-123.

6. Monakhova E.V., Noskov A.K., Kruglikov V.D., Vodop'yanov A.S., Selyanskaya N.A., Men'shikova E.A., Ezhova M.I., Nepomnyashchaya N.B., Shvidenko I.G., Podoinitsyna O.A., Pisanov R.V. [Genotypic characteristics of CTX-VPI⁺ clonal complexes of *Vibrio cholerae* O1 found in water bodies of the Rostov region]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; (3):99–107. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-3-99-107.

7. Popova A.Yu., Noskov A.K., Ezhlova E.B., Kruglikov V.D., Monakhova E.V., Chemisova O.S., Lopatin A.A., Ivanova S.M., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Levchenko D.A., Savina I.V. [Epidemiological situation on cholera in the Russian Federation in 2023 and forecast for 2024]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2024; (1):76–88. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-1-76-88.

8. Gaevskaya N.E., Makedonova L.D. [The application of bacteriophages in laboratory diagnostic of cholera]. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika [Clinical Laboratory Diagnos-*

tics]. 2016; 61(12):849–52. DOI: 10.1882/0869-2084-2016-61-12-849-852.

9. Pogozhova M.P., Gaevskaya N.E., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Anoprienko A.O., Romanova L.V., Tyurina A.V. [Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic *Vibrio cholerae* bacteriophages]. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii* [Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology]. 2021; 98(3):290–7. DOI: 10.36233/0372-9311-39.

10. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012; 3(7):556–65. DOI: 10.4161/viru.22351.

11. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., Johura F.T., Sultana M., Alam M., Seed K.D. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio*. 2021; 13(1):e0308821. DOI: 10.1128/mbio.03088-21.

12. Tumban E., editor. Bacteriophages. Methods and Protocols. New York: Humana Press; 2024. 429 p.

13. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8(5):317–27. DOI: 10.1038/nrmicro2315.

14. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology (Reading)*. 2002; 148(Pt. 11):3681–93. DOI: 10.1099/00221287-148-11-3681.

15. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., Borowski J.D., Boyd E.F. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics*. 2019; 20(1):105. DOI: 10.1186/s12864-019-5439-1.

16. O'Hara B.J., Barth Z.K., McKitterick A.C., Seed K.D. A highly specific phage defense system is a conserved feature of the *Vibrio cholerae* mobilome. *PLoS Genet.* 2017; 13(6):e1006838. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006838.

17. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Shvidenko I.G., Savel'ev V.N. [Detection of phage-induced mobile genetic elements in strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2023; (2):112–9. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119.

18. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B. [Analysis of antiphage systems in *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype strains]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya* [Public Health and Life Environment]. 2023; 31(11):94–100. DOI: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100.

19. McKitterick A.C., Seed K.D. Anti-phage islands force their target phage to directly mediate island excision and spread. *Nat. Commun.* 2018; 9(1):e2348. DOI: 10.1038/s41467-018-04786-5.

20. Barth Z.K., Silvas T.V., Angermeyer A., Seed K.D. Genome replication dynamics of a bacteriophage and its satellite reveal strategies for parasitism and viral restriction. *Nucleic Acids Res.* 2020; 48(1):249–63. DOI: 10.1093/nar/gkz1005.

21. Wozniak R.A.F., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G., Déry C., Burrus V., Waldor M.K. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5(12):e1000786. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000786.

22. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., McKitterick A.C., Johura F.T., Sultana M., Ahmed T., Alam M., Seed K.D. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021; 373(6554):eabg2166. DOI: 10.1126/science.abg2166.

23. Brenzinger S., Airoidi M., Ogunleye A.J., Jugovic K., Amstalden M.K., Brochado A.R. The *Vibrio cholerae* CBASS phage defence system modulates resistance and killing by antifolate antibiotics. *Nat. Microbiol.* 2024; 9(1):251–62. DOI: 10.1038/s41564-023-01556-y.

24. Utkin D.V., Erokhin P.S., Osina N.A., Konnov N.P. [Assessment of phage lysis of cholera vibrios strains using atomic force microscopy]. *Izvestiya Saratovskogo un-ta. Novaya ser. Ser. Khimiya. Biologiya. Ekologiya. Izvestiya Saratovskogo Universiteta. Novaya seriya. Ser. Khimiya. Biologiya. Ekologiya* [Bulletin of the Saratov University. New series. Series Chemistry. Biology. Ecology]. 2013; 13(3):8–4.

25. Chun J., Grim C.J., Hasan N.A., Lee J.H., Choi S.Y., Haley B.J., Taviani E., Jeon Y.S., Kim D.W., Lee J.H., Brettin T.S., Bruce D.C., Challacombe J.F., Detter J.C., Han C.S., Munk A.C., Chertkov O., Meincke L., Saunders E., Walters R.A., Huq A., Nairn G.B., Colwell R.R. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2009; 106(36):15442–7. DOI: 10.1073/pnas.0907787106.

26. Smirnova N.I., Kulshan T.A., Cheldyshova N.B., Osin A.V. [Structural and functional changes in the genome of the cholera agent in the aquatic environment]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni* [Epidemiological and Infectious Diseases]. 2007; (5):22–8.

27. Titova S.V., Monakhova E.V. [Potential danger of nontoxigenic *Vibrio cholerae* strains containing genes for toxin-coregulated pili adhesion]. *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni. Aktual'nye Voprosy* [Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items]. 2016; (5):65–72.

28. Kritsky A.A., Smirnova N.I., Kalyaeva T.B., Obrotkina N.F., Gracheva I.V., Katyshev A.D., Kutryev V.V. [Comparative analysis of molecular-genetic properties in non-toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains biovar El Tor, isolated in Russia and on cholera endemic territories]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii* [Problems of Particularly Dangerous Infections]. 2021; (3):72–82. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-3-72-82.

29. Savelyev V.N., Kovalev D.A., Savelyeva I.V., Taran T.V., Podoprigora E.I., Vasil'eva O.V., Shapakov N.A., Alekhina Yu.A., Kulichenko A.N. [The evolution of phenotypic properties and molecular-genetic organization of genomes of *Vibrio cholerae* O1 El Tor variant strains isolated from patients and environmental objects in the Caucasus in 1970–1998]. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya* [Public Health and Life Environment]. 2020; (12):56–61. DOI: 10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61.

Authors:

Sergutin D.A., Plekhanov N.A., Cheldyshova N.B., Osin A.V., Shchelkanova E.Yu., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M., Zadnova S.P. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Сергу́тин Д.А., Плекханов Н.А., Челдышова Н.Б., Осин А.В., Щелканова Е.Ю., Федоров А.В., Краснов Я.М., Заднова С.П. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.