

DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-73-79

УДК 616.932:579.222

О.В. Дуванова, Е.С. Шипко, Р.В. Писанов, О.А. Подойницына, А.С. Водопьянов, О.А. Цырулина, В.В. Евдокимова, М.В. Полеева, М.Г. Мелоян, С.О. Водопьянов, В.Д. Кругликов, Н.Е. Гаевская

Сравнительный анализ композиционного состава препаратов везикул *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп

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

Цель работы – сравнительное изучение композиционного состава препаратов мембранных везикул (outer membrane vesicles – OMV) токсигенного и атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп. **Материалы и методы.** В работе использовали токсигенный и атоксигенные штаммы *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, из которых были получены препараты OMV. Методом трансмиссионной электронной микроскопии изучали строение препаратов OMV. Полногеномное секвенирование ДНК проводили на платформе MiSeq и DNB-Seq-g50. Компьютерный анализ полученных данных осуществляли с помощью программы SeqAnalayser версии 2.1. Для биоинформационного анализа использовали программы Exonerate версии 2.4.0 и SnapGene Viewer. Белковое профилирование проводили с помощью MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Определение антигенных детерминант: холерного токсина и белков наружной мембраны (OmpT, OmpU) – методом иммуноферментного анализа. Ферментативные активности детектировали с использованием соответствующих сред и субстратов. Жирные кислоты детектировали методом газовой хромато-масс-спектрометрии. **Результаты и обсуждение.** Проведен сравнительный анализ композиционного состава препаратов OMV, полученных из токсигенного и атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139. Выявлено отличие/сходство в композиционном составе препаратов OMV. По данным полногеномного секвенирования и биоинформационного анализа установлено наличие в составе препаратов OMV, полученных из штаммов с разным генотипом, фрагментов хромосом, содержащих различный набор генов и мобильных генетических элементов. OMV *V. cholerae* серогрупп O1 и O139 способны участвовать в сортинге и докинге содержимого клетки, в везикуляции, способствуя эволюционным преобразованиям генома. OMV могут являться дополнительным фактором патогенности/адаптации/персистенции/конкурентоспособности возбудителя холеры.

Ключевые слова: холерный вибрион, везикулы (OMV), композиционный состав.

Корреспондирующий автор: Дуванова Ольга Викторовна, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Для цитирования: Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Подойницына О.А., Водопьянов А.С., Цырулина О.А., Евдокимова В.В., Полеева М.В., Мелоян М.Г., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е. Сравнительный анализ композиционного состава препаратов везикул *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2026; 1:73–79. DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-73-79

Поступила 16.04.2025. Принята к публикации 10.12.2025.

O.V. Duvanova, E.S. Shipko, R.V. Pisanov, O.A. Podoinitsyna, A.S. Vodop'yanov, O.A. Tsyurulina, V.V. Evdokimova, M.V. Poleeva, M.G. Meloyan, S.O. Vodop'yanov, V.D. Kruglikov, N.E. Gaevskaya

Comparative Analysis of the Composition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Vesicle Preparations

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

Abstract. The aim of the work was to conduct a comparative study of the composition of preparations made of outer membrane vesicles (OMV) of toxigenic and atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 serogroups. **Materials and methods.** The work used toxigenic and atoxigenic strains of *V. cholerae* O1 and O139 serogroups, from which OMV preparations were obtained. The structure of OMV preparations was investigated applying transmission electron microscopy. Genome-wide DNA sequencing was performed using the MiSeq and DNB-Seq-g50 platforms. The computer analysis of the obtained data was carried out using the SeqAnalayser 2.1 software. To conduct bioinformatic analysis, the following programs were used: Exonerate version 2.4.0 and SnapGene Viewer. Protein profiling was performed using MALDI-TOF mass spectrometry. The identification of antigenic determinants: cholera toxin and outer membrane proteins (OmpT, OmpU) was carried out by enzyme immunoassay (ELISA). Enzymatic activity was detected using appropriate media and substrates. Fatty acids were indicated through gas chromatography-mass spectrometry. **Results and discussion.** A comparative analysis of the composition of OMV preparations obtained from toxigenic and atoxigenic *V. cholerae* O1 and O139 strains has been carried out. The difference/similarity in the composition of OMV preparations has been revealed. According to the data of genome-wide sequencing and bioinformatics analysis, fragments of chromosomes containing a different set of genes and mobile genetic elements were found in OMV preparations obtained from strains with different genotypes. *V. cholerae* O1 and O139 OMV are able to participate in sorting and docking of cell contents, in vesiculation, contributing to the evolutionary transformations of the genome. OMV may be an additional factor in the pathogenicity/adaptation/persistence/competitiveness of the cholera pathogen.

Key words: cholera vibrio, vesicles (OMV), composition.

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

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

Corresponding author: Olga V. Duvanova, e-mail: olga_duvanova@mail.ru.

Citation: Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Tsyurulina O.A., Evdokimova V.V., Poleeva M.V., Meloyan M.G., Vodop'yanov S.O., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E. Comparative Analysis of the Composition of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 Vesicle Preparations. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2026; 1:73–79. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2026-1-73-79
Received 16.04.2025. Accepted 10.12.2025.

Duvanova O.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1702-1620>
Shipko E.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8517-2789>
Pisanov R.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7178-8021>
Podoinitsyna O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9996-4189>
Vodop'yanov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9056-3231>
Tsyurulina O.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6176-2605>

Evdokimova V.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5522-9097>
Poleeva M.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8086-376X>
Meloyan M.G., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7268-9298>
Vodop'yanov S.O., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4336-0439>
Kruglikov V.D., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6540-2778>
Gaevskaya N.E., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0762-3628>

В течение более 60 лет учеными всего мира проводятся исследования везикул наружной мембраны (outer membrane vesicles – OMV) у различных микроорганизмов, включая холерный вибрион. В последние годы возрастает интерес к изучению биогенеза, состава и свойств OMV, их роли в физиологии, пато- и иммуногенезе, адаптации, персистенции и в других важных для прокариот процессах [1–5]. Проведенные на моделях различных микроорганизмов протеомный, метаболомный и липидомный анализы позволили выявить уникальность сортировки OMV, содержащих различные токсины, белки, пептиды, ферменты, коферменты, липиды, метаболиты, эффекторные, сигнальные и другие молекулы, в максимально защищенной форме, используя их в альтернативных метаболических путях для биохимической адаптации и реализации микроорганизмами своего биологического потенциала [6–8].

С использованием методов молекулярной биологии и биоинформационного анализа в настоящее время выявлено, что у прокариот OMV могут быть задействованы в механизме везикуляции, с помощью которой осуществляется горизонтальный перенос и обмен генетической информацией: ДНК (плазмидной и хромосомной), РНК (мРНК, rРНК, sРНК, tРНК) и др., – способствуя появлению новых, более вирулентных штаммов благодаря приобретению с помощью OMV генов вирулентности/антибиотикорезистентности [9, 10].

Биологическая роль OMV разнообразна и зависит от их композиционного состава, на который могут оказывать влияние различные биотические и абиотические факторы/стрессоры. Актуальным в настоящее время является поиск дополнительных факторов патогенности/адаптации/персистенции/конкурентоспособности у возбудителя холеры, к числу которых могут быть отнесены OMV. В связи с этим целесообразно проводить изучение композиционного состава препаратов OMV, полученных из токсигенных и атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* серогрупп O1 и O139, сведения о котором в литературе фрагментарны.

Цель исследования заключалась в сравнительном изучении композиционного состава препаратов OMV токсигенного и атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп.

Материалы и методы

В работе использовали четыре типичных штамма *V. cholerae* O1 биовара El Tor и один штамм *V. cholerae* O139-серогруппы, полученных из лабо-

ратории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Препараты OMV возбудителя холеры получали по методу P. Langlete et al. в модификации [11, 12]. Анализы методом трансмиссионной электронной микроскопии (ТЭМ), белкового профилирования, детекцию белка, выявление ферментативных активностей, антигенных детерминант, спектра жирных кислот (ЖК), результатов полногеномного секвенирования и статистическую обработку полученных данных проводили согласно описанным ранее методикам [12–14].

Для проведения биоинформационного анализа глобальное выравнивание транслированных последовательностей выполнялось с использованием программы Exonerate версии 2.4.0 [15]. Визуализация данных проводилась с помощью скриптов на языке Python, пакетов pyGenomeViz, Biopython, а также с использованием программы SnapGene Viewer [<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer>]. Для сравнения транслированных аминокислотных последовательностей ICE-элементов использовали *V. cholerae* Mex1 integrating conjugative element ICEVchmex1 (Sequence ID: GQ463143.1) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GQ463143.1report=genbank&to=83194>], *V. cholerae* Ind5 integrating conjugative element ICEVchind5 (Sequence ID: GQ463142.1) [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/GQ463142.1report=genbank&to=97952>]. Для поиска генов антибиотикорезистентности использовали программу Abricate v1.0.1 (база данных NCBI) [16].

Результаты и обсуждение

По результатам полногеномного секвенирования и компьютерного анализа установлено, что в препарате OMV, полученном из штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 19191 (*ctxAB⁺tcpA⁺*), обнаружены фрагменты хромосом *V. cholerae* O1 исходного штамма, на которых присутствовали следующие гены: *wbe*, определяющий принадлежность к O1-серогруппе; гены дополнительных факторов патогенности – *hlyA* гемолизина типа El Tor, *hapA* (гемагглютинин/протеазы), *prtV* протеазы, *cef* (CHO cell elongating factor); *mshA* (маннозочувствительных пилей адгезии), *ompT*, *ompU* и *ompW*, кодирующие белки наружной мембраны; а также хитиназы (VC0769), внеклеточных хитиназ – *chiA1* (VC1952) и *chiA2* (VCA0027), хитопорина (VCA0972), хитодекстриназы (VCA0700), хитин-связывающего спиндолинподобного белка (VCA0140), (GlcNAc)-связывающий белок *glpA*

(VCA0811), *shiS* – хитинчувствительной гистидинкиназы (VC0622), *chiRP* – хитин-регулируемых пилей *plA* (VC2324), N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы (VC2217), фосфатазы (VC1070). Выявлены регуляторные гены *toxR* и *toxS*, продуктом которых являются интегральные мембранные белки, участвующие в активации транскрипции генов вирулентности у холерного вибриона, что не исключает реализацию подобного механизма и с помощью OMV холерных вибрионов. Выявлен кластер RTX с генами: *rtx toxin RtxA* (VC1451), *rtxC* (VC1450), *RTX toxin transporter* (VC1447); кластер MSHA с генами: *mshA* (VC0409), regulatory protein *CsrD* (VC0398), MSHA pilin protrin *MshD* (VC0411); кластер генов системы секреции 6-го типа (T6SS) с генами: *vasA* (VCA0110), *vasF* (VCA0115), *vasK* (VC0120), *vgrG3* (VCA0123), *hcp* (VC1415); Tol-кластер с генами: *tolQ* (VC1839), *tolA* (VC1837), *tolR* (VC1838), *vpsA* (VC0917), *vpsL* (VCL0934). Обнаруженный ген *rtxA* в составе препарата OMV, полученного из штамма *V. cholerae* O1 № 19191, не исключает возможного участия продукта этого гена в механизме колонизации клеток тонкого кишечника. OMV, являясь полифункциональными структурами, могут представлять важную с биологической точки зрения форму транслокации биологически активных соединений, включая токсины, в частности холерный токсин (СТ), который способен с помощью кавеолин-опосредованного эндоцитоза длительно находиться в клетках кишечника в биологически активной форме, усиливая патогенетический потенциал возбудителя холеры [17].

Известно, что значительная часть генов вирулентности локализована на первой или большой хромосоме холерного вибриона и входит в состав различных мобильных генетических элементов (МГЭ): профагов (СТХφ и RS1φ), островов патогенности (VPI-1, VPI-2) и пандемичности (VSP-I, VSP-II) [18]. В составе OMV, полученных из токсигенного штамма *V. cholerae* O1-серогруппы, обнаружен профаг СТХφ, содержащий гены *cep* (VC1461), *orfU* (VC1460), *ace* (VC1459), *zot* (VC1458), *ctxA* (VC1457), *ctxB7*, и профаг RS1φ. Доказано, что штаммы холерного вибриона в результате появления аллеля *ctxB7* отличались повышенным патогенным потенциалом за счет усиления вирулентности, что выражалось в 4–5-кратном увеличении продукции СТ по сравнению со штаммами, содержащими аллель *ctxB1* [19, 20]. Не исключено, что продукт гена *ctxB7* в составе OMV может способствовать большей

патогенности возбудителя и повышенной продукции холерного токсина в организме «хозяина».

Обнаруженные в препарате OMV острова патогенности VPI-1 с генами *aldA* (VC0819), *top* (VC0823), *tcpA* (VC0828), *toxT* (VC0838), *acfB* (VC0840) и VPI-2: VC1757, VC1810, хеликаза (VC1760), *nanH* (VC1784), VC1803; остров пандемичности VSP-I, содержащий гены VC0175, VC0175, VC0178, VC0180, VC0183, (VC0185), и один ген VC0490 острова пандемичности VSP-II, вероятно, могут вносить определенный вклад в патогенность возбудителя холеры и склонность к эпидемическому распространению благодаря везикуляции.

Выявлено ранее, что сателлитный фаг/плазмида TLCφ, находящийся рядом с СТХφ и RS1φ на первой хромосоме токсигенных штаммов холерных вибрионов, может участвовать в появлении эпидемически значимых штаммов [21], выполняя важную роль в восстановлении функционального сайта dif, необходимого для интеграции профага СТХφ в геном «хозяина». Небезынтересно отметить, что в составе OMV, полученных из токсигенного штамма холерного вибриона, обнаружен TLCφ, присутствующий и в исходном штамме. Геном TLCφ кодирует белки, необходимые для упаковки его ДНК, но не содержит генов, необходимых для самостоятельной репликации. В составе обнаруженного TLCφ выявлены гены: VC1465 family Xer recombination activator factor (играет ключевую роль в интеграции генома фага в хромосому бактерии), VC1466 хеликаза, VC1467 helix-turn-helix transcriptional regulator (осуществляет контроль экспрессии генов), VC1468 hypothetical protein, VC1469 phage/plasmid rep/pro, II/X family (участвует в репликации генетического материала у бактериофагов), VC1470 *tlcR* (кодирует белок TlcR, который является репрессором и играет важную роль в регуляции генов, связанных с TLCφ) (рис. 1). Нельзя исключить участие TLCφ, входящего в состав OMV токсигенных штаммов, в формировании эпидемически значимых вариантов холерных вибрионов.

В препарате OMV токсигенного штамма выявлен ICE-элемент (ICEVchInd5). Следует отметить, что в геноме исходного штамма *V. cholerae* № 19191 выявлен ICE-элемент (ICEVchInd5) с генами устойчивости к антимикробным препаратам: хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strA* и *strB*), сульфаметоксазолу (*sul2*) и триметаприму (*dfpA1*). Этот набор генов устойчивости к АМП не выявлялся в препарате OMV в связи с тем, что ряд участков после-

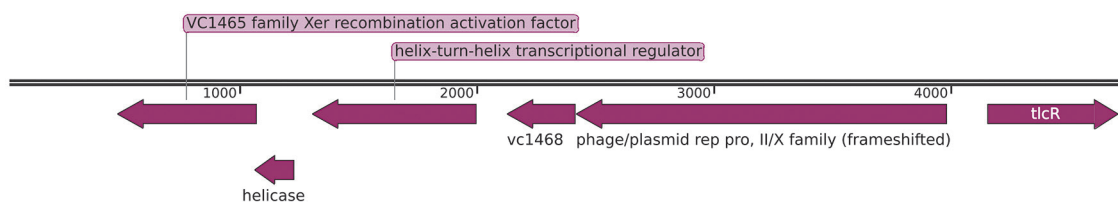


Рис. 1. Фаг/плазмида TLCφ в составе препарата OMV *V. cholerae* O1 № 19191 (*ctxAB⁺tcpA⁺*)

Fig. 1. TLCφ phage/plasmid in OMV *V. cholerae* O1 No. 19191 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) preparation

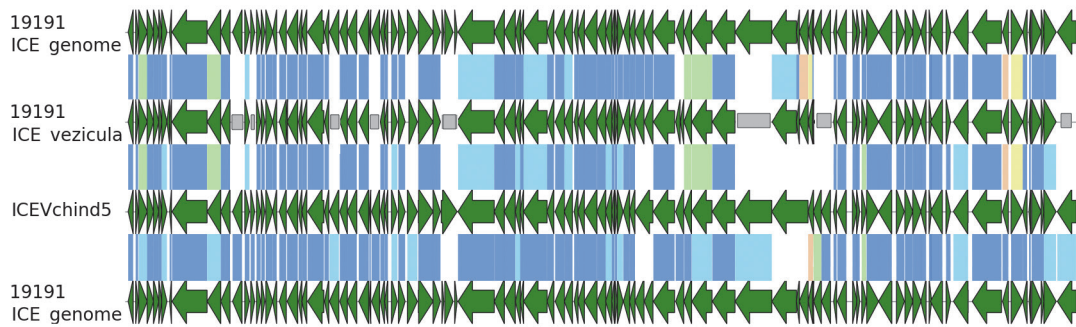


Рис. 2. Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей ICE-элемента *V. cholerae* O1 El Tor № 19191 (геном), *V. cholerae* O1 El Tor № 19191 (препарат OMV) и референсной последовательности ICEVchInd5. ICE-элемент, представленный в геноме *V. cholerae* O1 El Tor № 19191, приводится дважды для сравнения с каждой из последовательностей:

Соединительные линии синего цвета – 100 % идентичность между белковыми последовательностями; голубого цвета – идентичность в интервале 95,0–99,9 %; зеленого – 90,0–94,9 %; желтого – 85,0–89,9 %; оранжевого – 80,0–84,9 %. Параметр покрытия для попарно сравниваемых белков – 75 %. Между последовательностями, для которых процент покрытия ниже 75 %, сравнение не проводилось – соединительные линии отсутствуют

Fig. 2. Comparison of translated amino acid sequences of the ICE element of *V. cholerae* O1 El Tor No. 19191 (genome), *V. cholerae* O1 El Tor No. 19191 (OMV preparation), and the reference sequence, ICEVchInd5. The ICE element present in the genome of *V. cholerae* O1 El Tor No. 19191 is shown twice for comparison with each of the sequences:

Blue connecting lines – 100 % identity between protein sequences; light blue connecting lines – identity in the range of 95.0–99.9 %; green – identity in the range of 90.0–94.9 %; yellow – 85.0–89.9 %; orange – 80.0–84.9 %. The coverage parameter for pair-wise protein comparisons is 75 %. No comparison was made between sequences with coverage below 75 % – connecting lines are absent

довательности ICE-элемента отсутствовал (рис. 2). В структуре ICE-элемента OMV, полученного из токсигенного штамма, обнаружены различия аминокислотных последовательностей по сравнению с геномом исходного штамма, что, возможно, связано с селективной упаковкой ДНК и ее фрагментацией, а также возможными рекомбинациями при образовании OMV.

Выявленные МГЭ в препарате OMV *V. cholerae* O1 (*ctxAB⁺tcpA⁺*) могут являться доказательством возможного участия OMV токсигенных штаммов холерных вибрионов в экспортировании и направленном докинге (в клетки микро/макроорганизма) различных генов в результате везикуляции, возможно, способствуя появлению новых геновариантов холерных вибрионов, обладающих повышенным эпидемическим/адаптационным/персистентным/конкурентоспособным потенциалом, участвуя в процессах эволюции/коэволюции возбудителя холеры.

В препарате OMV, полученном из штамма № 18780 (*ctxAB⁺tcpA⁺*), обнаружены VPI-1, содержащий гены *toxT* и *tcpA*, *aldA*, *top*, *acfB* (VC 0840), и VPI-2, у которого отсутствовали гены хеликазы и VC1803. VSP-I и VSP-II, профаги CTXφ, RS1φ и TLCφ не выявлены. Таким образом, обнаружено отличие/сходство по данным полногеномного секвенирования в представленности генов и МГЭ на фрагментах хромосом у препаратов OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* O1 с генотипами *ctxAB⁺tcpA⁺* и *ctxAB⁺tcpA⁺*. Препарат OMV, полученный из штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 18950 (*ctxAB⁺tcpA⁺*), содержал фрагменты хромосом с некоторыми генами, детектированными в препаратах OMV, полученных из штаммов с генотипами *ctxAB⁺cpA⁺* и *ctxAB⁺cpA⁺*: *wbe*, *ompT*, *ompU*, *ompW*, *hlyA*, *hapA* (гемагглютинин/протеазы), *prtV* протеазы, *cef*, *mshA*, гены хитинолитического комплекса, фосфатазы. Также в составе препарата OMV обнаружен ген холододового шока

(*cshI*). Детектированы гены *toxR* и *toxS*; кластер RTX; MSHA; кластер генов системы секреции T3SS и T6SS, а также Tol-кластер. Не обнаружены профаги CTXφ, RS1φ, TLCφ, VPI-1, VSP-I, VSP-II, SXT, ICE, островок RND и VcB. Полученные данные позволили выявить отличие/сходство в представленности генов и МГЭ в фрагментах хромосом препарата OMV, полученного из штамма *V. cholerae* O1-серогруппы с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺*, и препаратов OMV с генотипами *ctxAB⁺cpA⁺* и *ctxAB⁺tcpA⁺*.

Интересными оказались данные по изучению препарата OMV, полученного из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 с генотипом *ctxAB⁺tcpA⁺*, в котором обнаружены по данным полногеномного секвенирования фрагменты хромосомы *V. cholerae* O139, на которой присутствовали следующие гены: *wbfO139*, *hlyA*, *ΔompT*, *ompU* и *ompW*, N-ацетил-β-D-глюкозаминидазы, фосфатазы регуляторные гены *toxR* и *toxS*, кластер генов (T6SS), Tol-кластер.

ICE-элемент, обнаруженный у *V. cholerae* O139 № 17786, демонстрирует высокое сходство с ICEVchMex1, который был выявлен у штамма *V. cholerae*, обнаруженного в Мексике в сточных водах в 2001 г. ICEVchMex1 относится к семейству SXT/R391, которое включает мобильные генетические элементы, способные к горизонтальному переносу между бактериями. Гены, составляющие функциональное ядро ICEVchMex1, демонстрируют высокую степень сходства с соответствующими генами в SXTMO10 [22]. Размер ICE-элемента, обнаруженного у *V. cholerae* O139 № 17786, составляет около 84 т.п.н. Сходство с ICEVchMex1 не является полным. Сравнение, проведенное по транслированным аминокислотным последовательностям (рис. 3), позволяет сделать вывод, что идентичность последовательностей на протяжении большей части элемента составляет от 90,0 до 100 %. Вместе с тем в составе ICE-элемента присутствуют участки,

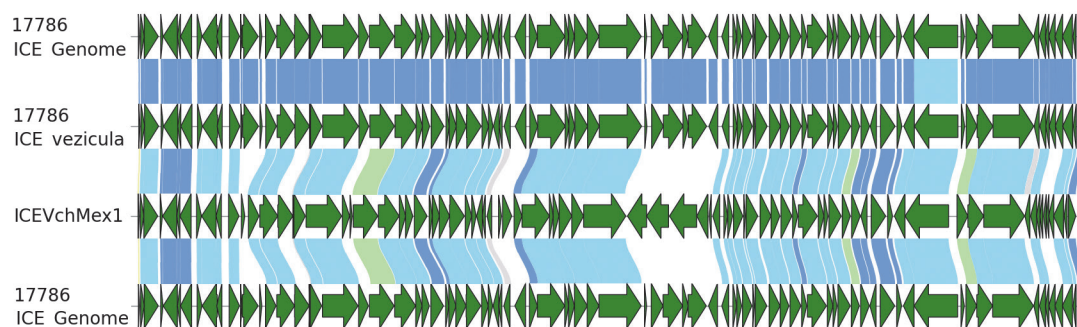


Рис. 3. Сравнение транслированных аминокислотных последовательностей ICE-элемента *V. cholerae* O139 № 17786 (геном), *V. cholerae* O139 № 17786 (препарат OMV) и референсной последовательности ICEVchMex1. ICE-элемент, представленный в геноме *V. cholerae* O139 № 17786, приводится дважды для сравнения с каждой из последовательностей:

Соединительные линии синего цвета – 100 % идентичность между белковыми последовательностями; голубого цвета – идентичность в интервале 95,0–99,9 %; зеленого – 90,0–94,9 %; серого – 75,0–79,9 %. Параметр покрытия для попарно сравниваемых белков – 75 %. Между последовательностями, для которых процент покрытия ниже 75 %, сравнение не проводилось – соединительные линии отсутствуют

Fig. 3. Comparison of the translated amino acid sequences of the ICE element in *V. cholerae* O139 No. 17786 (genome), *V. cholerae* O139 No. 17786 (OMV preparation) and the reference sequence, ICEVchMex1. The ICE element represented in the genome of *V. cholerae* O139 No. 17786 is shown twice for comparison with each of the sequences:

Connecting lines of blue color – 100 % identity between protein sequences; light-blue color – identity in the range of 95.0–99.9 %; green color – 90.0–94.9 %; gray color – 75.0–79.9 %. The coverage parameter for the pair-wise compared proteins is 75 %. There is no comparison between sequences for which the coverage percentage was below 75 % – no connecting lines

отличающиеся от ICEVchMex1. В препарате OMV выявлен полноразмерный ICE-элемент, соответствовавший обнаруженному в геноме *V. cholerae* O139 № 17786 полностью, за исключением одного участка, где сходство составило 95,5–99,9 %, что может быть следствием мутационных изменений в геноме и требует дальнейшего изучения. Генов устойчивости к антимикробным препаратам на ICE-эlemente OMV не обнаружено.

Следует отметить, что некоторые гены, детектированные в препаратах OMV, полученных из токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1, отсутствовали в препарате OMV из штамма *V. cholerae* серогруппы O139. Так, например, из комплекса генов хитиноподобного комплекса отсутствовали гены *chiA1* и (GlcNAc)-связывающий белок *glpA*. Гены, обнаруженные в препаратах OMV, содержались и в хромосомах исходных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139.

Таким образом, анализ данных полногеномного секвенирования препаратов OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 (*ctxAB⁺tcpA⁺*; *ctxAB⁻tcpA⁺*; *ctxAB⁻tcpA⁻*) и O139 (*ctxAB⁻tcpA⁻*), выявил отличие/сходство представленности некоторых генов и МГЭ, что может наделять OMV различными биологическими свойствами, патогенетическим/адаптационным/персистентным/конкурентоспособным потенциалом, способностью к горизонтальной передаче генетического материала.

Установлено, что в изучаемых препаратах OMV содержание белка составило 0,5–0,76 мг/мл. Методом ТЭМ выявлено, что все полученные препараты OMV представлены структурами сферической формы. Размер OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* O1-серогруппы (№ 19191, 18950, 18780), составил 80–200 нм, а из штамма *V. cholerae* O139 № 17786 – 40–80 нм, что соответствовало данным литературы [11]. Выявленные вариации в размере OMV, по-

лученных из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, возможно, могут являться свидетельством различного сортирования белков и фрагментов генетического материала, входящих в их состав, что подтверждено данными полногеномного секвенирования, компьютерного анализа и исследованиями некоторых фенотипических характеристик, полученных препаратов OMV. СТ был детектирован только в OMV, полученных от клинического штамма *V. cholerae* O1 № 19191, и составил по ОП (оптическая плотность) 0,780±0,017. В препаратах OMV детектированы некоторые поверхностные антигенные детерминанты: липополисахарид (ЛПС), белки наружной мембраны семейства ompтинов – OmpT и OmpU. ЛПС обнаружен в составе всех исследуемых препаратов OMV и в исходных штаммах. Содержание ЛПС по ОП в препаратах OMV составило для *V. cholerae* O1 № 19191 – 1,088±0,016; № 18950 – 0,981±0,01; № 18780 – 1,081±0,016; *V. cholerae* O139 № 17786 – 0,949±0,007. Белок OmpU присутствовал в препаратах OMV штаммов холерных вибрионов *V. cholerae* O1 № 19191 – 1,331±0,015; № 18780 – 1,431±0,015 и *V. cholerae* O139 № 17786 – 0,579±0,012 и в мембранах исходных штаммов, но не выявлялся в OMV из штамма № 18950. Содержание белка OmpT в препаратах OMV, полученных из штаммов холерных вибрионов O1-серогруппы, по ОП составило: № 19191 – 1,294±0,020; № 8950 – 1,447±0,015 и № 18780 – 1,394±0,020. Белок OmpT в препарате OMV из штамма O139-серогруппы не выявлен. Результаты проведенного исследования позволили установить, что наличие/отсутствие белков наружной мембраны в препаратах OMV зависит от того, из какого штамма они были выделены.

Присутствие в препаратах OMV, полученных из штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, поверхностных антигенов (OmpT, OmpU и ЛПС) может как обеспечивать определенное преимущество вибрио-

нам в поддержании жизненного цикла (life style), так и обуславливать их участие в формировании специфического антибактериального иммунитета, доказательством чему являются полученные ранее данные, свидетельствующие о целесообразности и эффективности использования OMV нетоксигенных штаммов холерных вибрионов для специфической профилактики холеры [23].

В полученных препаратах OMV выявлены как общие, так и специфические для каждого из препаратов везикул белковые масс-пики от 2000 до 8484 Да. Детектированы отличия в профилях препаратов OMV, полученных из токсигенного *V. cholerae* O1 (4000–8484 Да) и атоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 и O139 (2000–4000 Да).

У всех изученных препаратов OMV и в исходных штаммах холерных вибрионов выявлены ферменты N-ацетил-β-D-глюкозаминидаза и ДНК-аза, наличие которых в препаратах OMV, полученных из токсигенного и атоксигенных штаммов, может усиливать адаптационный/персистентный/конкурентоспособный потенциал холерных вибрионов в различных экологических нишах.

Анализ спектра ЖК в препарате OMV, полученного из токсигенного штамма, выявил сходные закономерности изменений жирнокислотного состава (увеличение мононенасыщенных ЖК, *trans*-изомеров и *iso*-разветвленных ЖК), характерные для атоксигенных штаммов холерных вибрионов O1-серогруппы, выявленные нами ранее [12], по сравнению с исходными клетками. Не исключено, что обнаруженные изменения также могут способствовать реализации механизмов, связанных с повышением патогенности/адаптации/персистенции/конкурентоспособности холерных вибрионов, при этом способствуя сохранению содержимого OMV, особенно при воздействии стрессоров.

В результате проведенных исследований выявлено, что OMV токсигенных и атоксигенных штаммов *V. cholerae* серогрупп O1 и O139, являясь частью бактериального секрета, вовлечены в универсальный способ сортировки и докинга биологически активных веществ: СТ, ферментов, ЛПС, белков наружной мембраны и фрагментов хромосом.

Выявлено отличие/сходство в композиционном составе изученных препаратов OMV. Мобилом, представленный в составе препаратов OMV холерных вибрионов, может способствовать эволюционному/коэволюционному преобразованию генома холерных вибрионов.

Обнаруженное наличие в составе OMV генов исходных штаммов и МГЭ позволяет рассматривать их как фактор горизонтального переноса генов, что способствует более полному пониманию динамики эволюционных изменений возбудителя холеры. Не исключено, что некоторые гены, входящие в состав OMV, могут принимать участие в активации транскрипции генов вирулентности. Кроме того, наличие ДНК исходных штаммов в составе OMV может объяснять положительный результат ПЦР при анализе

материала из объектов окружающей среды при отсутствии жизнеспособных клеток вибрионов.

Полученные результаты показывают, что OMV можно рассматривать в качестве одного из факторов патогенности/адаптации/персистенции/конкурентоспособности у холерных вибрионов. Эти данные могут быть использованы при решении ряда приоритетных задач, направленных на разработку в Российской Федерации платформы для производства современных вакцинных препаратов с использованием OMV, объяснение возникновения новых генетических вариантов возбудителя холеры с более высоким патогенным и эпидемическим потенциалом.

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. Луста К.А. Бактериальные мембранные внеклеточные нановезикулы: строение, биогенез, функции, использование в биотехнологии и медицине (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*. 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.24411/2075-4094-16306.
2. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.
3. Луста К.А., Кондашевская М.В. Участие внеклеточных мембранных нановезикул бактерий в патологических процессах (обзор литературы). *Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание*. 2019; (2):148–57. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.
4. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.
5. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.
6. Ellen A.F., Albers S.-V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F.V., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J.M. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome-sorting complex components. *Extremophiles*. 2009; 13(1):67–79. DOI: 10.1007/s00792-008-0199-x.
7. Elhenawy W., Debelyy M.O., Feldman M.F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into *Bacteroides* outer membrane vesicles. *mBio*. 2014; 5(2):e00909-14. DOI: 10.1128/mBio.00909-14.
8. Шендеров Б.А., Синеца А.В., Захарченко М.М., Ткаченко Е.И. Внеклеточные везикулы (экзосомы) и их роль в биологии бактерий и реализации их патогенного потенциала. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2020; 179(7):118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.
9. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading)*. 2004; 150(Pt. 7):2161–9. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0.
10. Soler N., Forterre P. Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(7):2457–60. DOI: 10.1111/1462-2920.15056.
11. Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C. Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2708. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02708.
12. Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Цырулина О.А., Чемисова О.С., Евдокимова В.В., Волопьянов А.С., Круликов В.Д., Иванова И.А., Омелченко Н.Д., Филипенко А.В., Носков А.К. Композиционный состав везикул атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 El Tor и O139 серогрупп. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; (4):70–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77.
13. 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.

14. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.

15. Slater G.S., Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics.* 2005; 6:31. DOI: 10.1186/1471-2105-6-31.

16. Feldgarden M., Brover V., Haft D.H., Prasad A.B., Slotta D.J., Tolstoy I., Tyson G.H., Zhao S., Hsu C.H., McDermott P.F., Tadesse D.A., Morales C., Simmons M., Tillman G., Wasilenko J., Folster J.P., Klimke W. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(11):e00483-19. DOI: 10.1128/AAC.00483-19.

17. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio.* 2021; 12(3):e0053421. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.

18. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2008; (3):5–11.

19. Naha A., Mandal R.S., Samanta P., Saha R.N., Shaw S., Ghosh A., Chatterjee N.S., Dutta P., Okamoto K., Dutta S., Mukhopadhyay A.K. Deciphering the possible role of ctxB7 allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(4):e0008128. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008128.

20. Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Плеханов Н.А., Лозовский Ю.В., Федоров А.В., Кутырев В.В. Новые генетические варианты возбудителя холеры и их распространение в эндемичных странах и России. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2023; 41(1):10–7. DOI: 10.17116/molgen20234101110.

21. Miele S., Provan J.I., Vergne J., Possoz C., Ochsenbein F., Barre F.-X. The Xer activation factor of TLCΦ expands the possibilities for Xer recombination. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(11):6368–83. DOI: 10.1093/nar/gkac429.

22. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J., Waldor M.K. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4):3054–7. DOI: 10.1128/AEM.72.4.3054-3057.2006.

23. Филиппенко А.В., Омельченко Н.Д., Дуванова О.В., Шипко Е.С., Труфанова А.А., Иванова И.А., Евдокимова В.В. Профилактическая эффективность препаратов везикул наружных мембран атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы. *Медицинский вестник Юга России.* 2023; 14(3):66–72. DOI: 10.21886/2219-8075-2023-14-3-66-72.

References

1. Lusta K.A. [Bacterial membrane extracellular nanovesicles: structure, biogenesis, functions, use in biotechnology and medicine (review)]. *Prikladnaya Biokhimiya i Mikrobiologiya [Applied Biochemistry and Microbiology].* 2015; 51(5):443–52. DOI: 10.24411/2075-4094-16306.

2. Jan A.T. Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Front. Microbiol.* 2017; 8:1053. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01053.

3. Lusta K.A., Kondashevskaya M.V. [Participation of extracellular membrane nanovesicles of bacteria in pathological processes (literature review)]. *Vestnik Novykh Meditsinskikh Tekhnologij. Elektronnoe Izdanie [Bulletin of New Medical Technologies. Electronic Edition].* 2019; (2):148–57. DOI: 10.24411/2075-4094-2019-16306.

4. Kuehn M.J., Kesty N.C. Bacterial outer membrane vesicles and the host-pathogen interaction. *Genes Dev.* 2005; 19(22):2645–55. DOI: 10.1101/gad.1299905.

5. Zingl F.G., Kohl P., Cakar F., Leitner D.R., Mitterer F., Bonnington K.E., Rechberger G.N., Kuehn M.J., Guan Z., Reidl J., Schild S. Outer membrane vesiculation facilitates surface exchange and *in vivo* adaptation of *Vibrio cholerae*. *Cell Host Microbe.* 2020; 27(2):225–37.e8. DOI: 10.1016/j.chom.2019.12.002.

6. Ellen A.F., Albers S.-V., Huibers W., Pitcher A., Hobel C.F.V., Schwarz H., Folea M., Schouten S., Boekema E.J., Poolman B., Driessen A.J.M. Proteomic analysis of secreted membrane vesicles of archaeal *Sulfolobus* species reveals the presence of endosome-sorting complex components. *Extremophiles.* 2009; 13(1):67–79. DOI: 10.1007/s00792-008-0199-x.

7. Elhenawy W., Debelyy M.O., Feldman M.F. Preferential packing of acidic glycosidases and proteases into Bacteroides outer membrane vesicles. *mBio.* 2014; 5(2):e00909-14. DOI: 10.1128/mBio.00909-14.

8. Shenderov B.A., Sinita A.V., Zakharchenko M.M., Tkachenko E.I. [Extracellular vesicles (exosomes) and their role in bacterial biology and realization of their pathogenic potential]. *Ekspieriment'naya i Klinicheskaya Gastroenterologiya*

[*Experimental and Clinical Gastroenterology*]. 2020; 179(7):118–30. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-179-7-118-130.

9. Renelli M., Matias V., Lo R.Y., Beveridge T.J. DNA-containing membrane vesicles of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 and their genetic transformation potential. *Microbiology (Reading).* 2004; 150(Pt. 7):2161–9. DOI: 10.1099/mic.0.26841-0.

10. Soler N., Forterre P. Vesiduction: the fourth way of HGT. *Environ. Microbiol.* 2020; 22(7):2457–60. DOI: 10.1111/1462-2920.15056.

11. Langlete P., Krabberød A.K., Winther-Larsen H.C. Vesicles from *Vibrio cholerae* contain AT-rich DNA and shorter mRNAs that do not correlate with their protein products. *Front. Microbiol.* 2019; 10:2708. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02708.

12. Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V., Cyrulina O.A., Chemisova O.S., Evdokimova V.V., Vodop'yanov A.S., Kruglikov V.D., Ivanova I.A., Omel'chenko N.D., Filippenko A.V., Noskov A.K. [The composite composition of vesicles of atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 El Tor and O139 serogroups]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2024; (4):70–7. DOI: 10.21055/0370-1069-2024-4-70-77.

13. 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.

14. Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(14):3059–66. DOI: 10.1093/nar/gkf436.

15. Slater G.S., Birney E. Automated generation of heuristics for biological sequence comparison. *BMC Bioinformatics.* 2005; 6:31. DOI: 10.1186/1471-2105-6-31.

16. Feldgarden M., Brover V., Haft D.H., Prasad A.B., Slotta D.J., Tolstoy I., Tyson G.H., Zhao S., Hsu C.H., McDermott P.F., Tadesse D.A., Morales C., Simmons M., Tillman G., Wasilenko J., Folster J.P., Klimke W. Validating the AMRFinder tool and resistance gene database by using antimicrobial resistance genotype-phenotype correlations in a collection of isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2019; 63(11):e00483-19. DOI: 10.1128/AAC.00483-19.

17. Zingl F.G., Thapa H.B., Scharf M., Kohl P., Müller A.M., Schild S. Outer membrane vesicles of *Vibrio cholerae* protect and deliver active cholera toxin to host cells via porin-dependent uptake. *mBio.* 2021; 12(3):e0053421. DOI: 10.1128/mBio.00534-21.

18. Smirnova N.I., Cheldyshova N.B., Goryaev A.A., Lozovskij Yu.V., Kutyrev V.V. [Evolution of the *Vibrio cholerae* genome: ways of forming atypical strains]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2008; (3):5–11.

19. Naha A., Mandal R.S., Samanta P., Saha R.N., Shaw S., Ghosh A., Chatterjee N.S., Dutta P., Okamoto K., Dutta S., Mukhopadhyay A.K. Deciphering the possible role of ctxB7 allele on higher production of cholera toxin by Haitian variant *Vibrio cholerae* O1. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020; 14(4):e0008128. DOI: 10.1371/journal.pntd.0008128.

20. Smirnova N.I., Rybal'chenko D.A., Plekhanov N.A., Lozovskij Yu.V., Fedorov A.V., Kutyrev V.V. [New genetic variants of the cholera pathogen and their spread in endemic countries and Russia]. *Moekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology and Virology].* 2023; 41(1):10–7. DOI: 10.17116/molgen20234101110.

21. Miele S., Provan J.I., Vergne J., Possoz C., Ochsenbein F., Barre F.-X. The Xer activation factor of TLCΦ expands the possibilities for Xer recombination. *Nucleic Acids Res.* 2022; 50(11):6368–83. DOI: 10.1093/nar/gkac429.

22. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J., Waldor M.K. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006; 72(4):3054–7. DOI: 10.1128/AEM.72.4.3054-3057.2006.

23. Filippenko A.V., Omel'chenko N.D., Duvanova O.V., Shipko E.S., Trufanova A.A., Ivanova I.A., Evdokimova V.V. [Preventive efficacy of preparations of vesicles of the external membranes of atoxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 serogroup]. *Meditsinskij Vestnik Yuga Rossii [Medical Bulletin of the South of Russia].* 2023; 14(3):66–72. DOI: 10.21886/2219-8075-2023-14-3-66-72.

Authors:

Duvanova O.V., Shipko E.S., Pisanov R.V., Podoinitsyna O.A., Vodop'yanov A.S., Tsyurulina O.A., Evdokimova V.V., Poleeva M.V., Meloyan M.G., Vodop'yanov S.O., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E. 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:

Дуванова О.В., Шипко Е.С., Писанов Р.В., Подоиницына О.А., Водопьянов А.С., Цырулина О.А., Евдокимова В.В., Полеева М.В., Мелоян М.Г., Водопьянов С.О., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е. Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт. Российская Федерация, 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40. E-mail: plague@aaanet.ru.