

**Анализ антифаговых систем в штаммах *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор**

С.П. Заднова, Н.А. Плеханов, А.Ю. Спирина, Н.Б. Челдышова

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”» Роспотребнадзора,
ул. Университетская, д. 46, г. Саратов, 410005, Российская Федерация**Резюме**

Введение. Холерные литические фаги способствуют генетическому разнообразию и эволюции *Vibrio cholerae*. Для защиты от фагов патоген приобрел различные механизмы устойчивости.

Цель исследования: выявление антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах, в штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор.

Материалы и методы. Использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 77 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, завезенных с 1970 по 2014 г. на территорию РФ и сопредельных стран. Для анализа применяли алгоритм Blast NCBI GenBank. Филогенетический анализ проводили с использованием сервера REALPHY.

Результаты. Показано, что изученные штаммы в составе 5-й «горячей точки» ICE SXT элемента содержат два типа антифаговых систем – BREX, характерную для ICE VchBan9, и BREX с *abi*, специфичные для ICE VchInd5. Установлена прямая связь между наличием антифагового острова PLE4 и фага каппа. Штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, содержащие PLE4, за исключением одного изолята, имеют BREX ICE VchBan9 и при филогенетическом анализе группируются в отдельный кластер. Штаммы с ICE VchInd5, лишенные PLE4 и каппа фага, также образуют отдельную группу.

Заключение. Получены данные о присутствии антифаговых систем в ранее завезенных штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, что расширяет сведения об их генетической организации. Изучение структуры антифаговых генов 5-й «горячей точки» ICE SXT элемента позволяет выявлять генетические различия между близкородственными штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, а также определять тип ICE SXT элемента.

Ключевые слова: токсигенные штаммы *V. cholerae*, антифаговые системы 5-й «горячей» точки ICE SXT элемента, PLE остров, филогенетический анализ.

Для цитирования: 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. Т. 31. № 11. С. 94–100. doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100

Analysis of Antiphage Systems in *Vibrio Cholerae* O1 El Tor Biotype Strains

Svetlana P. Zadnova, Nikita A. Plekhanov, Alina Yu. Spirina, Nadezhda B. Cheldyshova

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, 46 Universitetskaya Street, Saratov, 410005, Russian Federation

Summary

Introduction: Cholera lytic phages contribute to the genetic diversity and evolution of *Vibrio cholerae*. To protect against the phages, the pathogen has acquired various resistance mechanisms.

Objective: To identify antiphage systems located on mobile genetic elements in *V. cholerae* serogroup O1 El Tor biotype strains.

Materials and methods: Nucleotide sequences of complete genomes of 77 toxigenic *V. cholerae* O1 El Tor strains imported to the Russian Federation and neighboring countries in 1970–2014 were analyzed using the Blast NCBI GenBank algorithm and REALPHY online tool.

Results: We observed that the examined strains contained two types of anti-phage systems in hotspot 5 of the ICE SXT element: BREX, common for ICE VchBan9, and BREX with *Abi* typical of ICE VchInd5. We established a direct relationship between the presence of the PLE4 antiphage island and the kappa phage. *V. cholerae* O1 El Tor strains containing PLE4, except for one isolate, have BREX ICE VchBan9 and are grouped into a separate cluster in phylogenetic analysis. Strains with ICE VchInd5 lacking PLE4 and kappa phage also form a separate group.

Conclusions: The data obtained on the presence of antiphage systems in previously imported strains of *V. cholerae* O1 biotype El Tor expand knowledge of their genetic organization. The study of the structure of antiphage genes of hotspot 5 of the ICE SXT element makes it possible to reveal genetic differences between closely related strains of *V. cholerae* O1 biotype El Tor and to determine the type of ICE SXT element.

Keywords: toxigenic *V. cholerae* strains, anti-phage systems, hotspot 5, ICE SXT element, phage-inducible chromosomal island-like element (PLE), phylogenetic analysis.

For citation: Zadnova SP, Plekhanov NA, Spirina AY, Cheldyshova NB. Analysis of antiphage systems in *Vibrio Cholerae* O1 El Tor biotype strains. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2023;31(11):94–100. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100

Введение. Токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 (классического и Эль Тор биоваров) и O139 серогрупп вызывают острую инфекционную болезнь – холеру. Пандемии этой болезни преследуют человечество уже более двух столетий. Начиная с 1961 года и до сих пор продолжается 7-я пандемия, вызванная токсигенными типичными штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор. В 90-х годах прошлого столетия типичные Эль Тор вибрионы были вытеснены более вирулентными генетически измененными штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (геновариантами). Геноварианты содержат аллели гена В-субъединицы холерного токсина *ctxB1* или *ctxB7* и отличаются от типичных штаммов не только повышенной вирулентностью, но

и высоким адаптационным потенциалом и множественной устойчивостью к антибиотикам. Геном геновариантов продолжает изменяться, появляются замены, вставки, делеции в генах вирулентности, пандемичности, адаптации [1, 2]. Показано, что важная роль в генетическом разнообразии штаммов *V. cholerae*, а также эволюции патогена принадлежит холерным бактериофагам (фагам). Считается, что ряд мобильных генетических элементов (МГЭ) (профаг CTXφ, RS1φ, TLC элемент, гены системы секреции 6-го типа), непосредственно связанные с проявлением вирулентных свойств, имеют фаговое происхождение [3, 4].

Холерные литические фаги распространены очень широко. Их обнаруживают в водной среде,

а также вместе с вибрионами в стуле больных холерой. Высказывается предположение, что холерные фаги действуют как фактор, ослабляющий сезонные вспышки холеры [5, 6]. Установлено, что возникающие в результате фаговой инфекции устойчивые изоляты лучше выживают во внешней среде по сравнению с чувствительными штаммами [4]. Однако у них могут изменяться вирулентные свойства, в том числе снижаться способность к колонизации, так как одним из механизмов фагоустойчивости является изменение структуры рецепторов, в качестве которых часто выступают белки внешней мембраны, O1 антиген, выполняющие роль адгезинов [2]. Стоит отметить, что холерные фаги широко используются в практической работе, их применяют для типирования и определения биовара вновь выделяемых штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы [7]. Для дифференциации биоваров применяют два фага – классический и эльтор¹. Однако в последние годы все чаще выделяются штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (особенно из внешней среды), устойчивые к литическому действию фага эльтор, что затрудняет его использование в диагностических целях и диктует необходимость поиска новых фагов [8, 9]. Необходимо также отметить, что в связи с появлением штаммов *V. cholerae* с множественной устойчивостью к антибиотикам активно развивается направление по использованию фагов в лечебных и профилактических целях [2, 10–12]. Однако для получения эффекта при использовании фаговых препаратов, а также с целью выявления механизмов появления фагоустойчивых изолятов необходимо исследовать присутствие и структуру антифаговых систем в штаммах *V. cholerae*.

Для защиты от фагов *V. cholerae* выработал различные способы сопротивления [7, 11, 13]. Так недавно обнаруженные фагоиндуцируемые PLE (Phage-inducible Chromosomal Island-like Elements) острова способствуют устойчивости патогена к действию фага ICP1, являющегося самым распространенным литическим фагом на территории эндемичных стран [13]. PLE острова, расположенные на второй хромосоме (большинство входит в состав суперинтегрона), включают около 26 открытых рамок считывая, большинство из которых кодирует белки с неизвестной функцией. В настоящее время выявлено 10 типов PLE островов. Установлено, что каждый тип присутствовал в штаммах *V. cholerae*, циркулировавших в определенное время. Показано, что при контакте клеток с фагом ICP1 происходит образование репликативных форм PLE элемента и последующее образование фаговых частиц, несущих генетический PLE материал. Зараженные фагом клетки в итоге лизируются, но предотвращается заражение других бактерий, что способствует сохранению популяции [13, 14]. В ранее проведенных работах показано, что в токсигенных штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, завезенных на территорию РФ и сопредельных стран, присутствует остров PLE4 (таблица) [14, 15].

В хромосоме ряда штаммов возбудителя холеры обнаружено присутствие еще одного МГЭ с антифаговыми генами – острова GI, включающего геном умеренного каппа фага (или фага Kappa) [16–18].

Одна из главных функций данного фага – защита патогена от действия других фагов (в результате его внедрения изменяется структура рецепторов). Стоит отметить, что присутствие каппа фага влияет на экспрессию резидентных генов бактерии-хозяина, а также способствует появлению изолятов, устойчивых к действию неблагоприятных факторов внешней среды [16].

Недавно было установлено, что антифаговые гены входят в состав МГЭ *V. cholerae*, ранее не рассматриваемых как связанных с фаговой защитой. В том числе они обнаружены в ICE SXT элементах, участвующих в распространении генов, кодирующих множественную устойчивость к антибиотикам [19]. ICE SXT элементы имеют мозаичную структуру, состоят из основных генов (52), необходимых для их интеграции/исключения, регуляции, передачи при конъюгативном переносе, и дополнительных, которые расположены в переменных регионах (VR1–VR3) и «горячих точках» (hotspot) интеграции (HS1–HS5). Гены, обеспечивающие устойчивость патогена одновременно к нескольким антибиотикам, находятся в VR3 и HS3. Гены, обеспечивающие резистентность к фагам, сгруппированы в HS5. Выявлено, что при делеции генов HS5 штаммы становятся чувствительными к фагам. Также показано, что эволюция ICE SXT элементов в различных штаммах *V. cholerae* происходит в результате генетического обмена между этими переменными участками [19, 20]. Анализ структуры HS5 выявил, что во всех типах ICE SXT присутствует ген *orf1*, кодирующий регуляторный белок с WYL-доменом, предположительно выполняющего роль репрессора; гены, кодирующие белки с неустановленной функцией, а также одна или две системы защиты от фагов. Так, в HS5 ICE *VchInd6* обнаружены системы рестрикции-модификации I и IV типов, продукты которых фрагментируют ДНК фага при его попадании в клетки. В ICE *VchInd4* (также известным как ICE *VchBan11*), ICE *VchInd5* и ICE *VchBan9* (или ICE *VchMoz10*) присутствует BREX (bacteriophage exclusion) система, структура и состав генов которой уникален для каждого типа ICE SXT элемента. Гены BREX системы кодируют белки, уничтожающие фаги по невыясненному пока механизму. В HS5 ICE *VchInd5* и ICE *VchInd4* кроме BREX дополнительно присутствует ген *abi* (abortive infection), кодирующий белок, ускоряющий лизис зараженных фагом клеток. Таким образом, присутствие ICE SXT элемента способствует устойчивости штаммов одновременно к антибиотикам и фагам [19]. Наличие генов антибиотикорезистентности, расположенных на ICE SXT элементе, в штаммах *V. cholerae* O1 Эль Тор биовара, завезенных на территорию РФ и некоторых сопредельных стран, изучено ранее другими исследователями [16, 17, 21]. В то же время структура HS5 в данных штаммах, а также присутствие каппа фага исследованы не в полной мере [16, 17, 19].

Цель исследования – выявление антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах, в штаммах *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор.

Материалы и методы. В работе использовали нуклеотидные последовательности полных геномов 77 токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара

¹ МУК 4.2.3745–22 «Методы лабораторной диагностики холеры». М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2022. 70 с.

Эль Тор, завезенных с 1970 по 2014 г. на территорию РФ и сопредельных стран, полученные в ФКУН Российский противочумный институт «Микроб» или представленные в свободном доступе в NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (таблица).

Генетическая структура ряда использованных в работе штаммов, в том числе аллель гена *ctxB*, была установлена ранее другими исследователями [16, 17, 22, 23]. Для выявления каппа фага и антифаговых систем в ICE SXT элементах применяли алгоритм Blast NCBI GenBank (<http://blast.ncbi>) и программу BioEdit V.7. В качестве референсных использовали штаммы *V. cholerae* и нуклеотидные последовательности, приведенные в работе [19]. Филогенетический анализ проводили с использованием сервера REALPHY (Reference sequence Alignment-based Phylogeny builder), в котором нуклеотидные последовательности геномов (или фрагментов) изучаемых штаммов сравниваются с наиболее близкими аналогами (дивергенция

< 5 %), представленными в NCBI GenBank, что позволяет получить точные данные по филогении (<http://realphy.unibas.ch>) [24]. Визуализацию результатов проводили с помощью программы FigTree v1.4. Вывод о наличии связи между присутствием в геноме двух различных МГЭ подтверждали с помощью chi-square test (при $\alpha = 0,05$, $df = 1$) в программе Rstudio.

Результаты. На первом этапе работы у взятых в анализ штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор исследовали присутствие умеренного каппа фага. В результате установлено, что, за исключением штамма *V. cholerae* C-347, у остальных типичных штаммов данный фаг отсутствует. В то же время его наличие установлено в геноме 34 генетически измененных штаммов (57 % от изученных). При этом выявлена прямая связь между присутствием каппа фага и островом PLE4 (таблица).

На следующем этапе работы был проведен анализ антифаговых генов HS5 ICE SXT элементов. Предварительно у взятых в исследование штаммов

Таблица. Характеристика штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, использованных в работе
Table. Description of *V. cholerae* O1 El Tor biotype strains used in the study

Штамм <i>V. cholerae</i> / <i>V. cholerae</i> strain	Год и место выделения / Year and site of isolation	Тип антифаговой системы в HS5 / Type of antiphage system in HS5	Тип ICE SXT элемента согласно структуре HS5 / ICE SXT element type according to HS5 structure	Наличие/отсутствие PLE4 / Presence/absence of PLE4**	Каппа фаг / Каппа phage
1	2	3	4	5	6
Типичные штаммы, содержащие аллель <i>ctxB3</i> / Typical strains containing the <i>ctxB3</i> allele					
M1062 ^{SSAB01}	1970, Astrakhan	—	—	—	—
M888 ^{LRBH01}	1970, Astrakhan	—	—	—	—
M818 ^{LAHM01}	1970, Balakovo	—	—	—	—
180D ^{SMZA01}	1970, Dagestan	—	—	—	—
5879 ^{POBO01}	1972, Taganrog	—	—	—	—
M1011 ^{SSAC01}	1972, Ufa	—	—	—	—
M1030 ^{NEDX01}	1972, Iolotan	—	—	—	—
C-191 ^{WNZT01}	1973, Stavropol'	—	—	—	—
M642	1975, Astrakhan	—	—	—	—
123AZ ^{SMZB01}	1977, Azerbaijan	—	—	—	—
C-347 ^{WNZU01}	1980, Stavropol'	—	—	—	+
A219 ^{CWP001}	1986, Georgia	—	—	—	—
2278 ^{WNZM01}	1987, Krasnodar	—*	—*	—	—
3097Az ^{WNZN01}	1989, Azerbaijan	—*	—*	—	—
C-402	1990, Stavropol'	—	—	—	—
M1261	1990, Permian	—	—	—	—
5765Az ^{WNZP01}	1991, Azerbaijan	—*	—*	—	—
Генетически измененные штаммы, содержащие аллель <i>ctxB1</i> / Genetically altered strains containing the <i>ctxB1</i> allele					
P13762 ^{LOYD001}	1988, Tashkent	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
M1283	1993, Tajikistan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
M1270 ^{VXCC01}	1993, Naberezhnye Chelny	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
M1275 ^{LRAF01}	1993, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+***
157D ^{SMZC01}	1993, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
169D ^{OFKZ01}	1993, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
S-618 ^{JAEEFZ01}	1993, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
S-619 ^{JACTG001}	1993, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
10213D ^{QFGC01}	1994, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
17332 ^{WNZR01}	1994, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	—
M1293 ^{JFFW01}	1994, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+***
16241D ^{QFLB01}	1994, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
4 ^{WNZH01}	1994, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	—

Продолжение таблицы

EPIDEMIOLOGY

1	2	3	4	5	6
S-616 ^{JACTG001}	1994, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
S-617 ^{JACTG001}	1994, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
752 ^{JACTGLD1}	1994, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
8048 ^{WNZ001}	1994, Kislovodsk	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
286 ^{SMZD01}	1994, Krasnodar	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
I-1181 ^{LUCN01}	1994, Novosibirsk	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+***
I-1187 ^{LYXT01}	1994, Barnaul	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
M1266	1994, Permian	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
M1268	1994, Magnitogorsk	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
155 ^{NDXT01}	1994, Mariupol	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
28 ^{NDXN01}	1994, Krivoy Rog	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
43 ^{LJFH01}	1994, Mariupol	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
56 ^{LJFH01}	1994, Mariupol	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
80K ^{JACTG001}	1994, Mariupol	BREX	ICE VchBan9	PLE4	–
20-a-11 ^{PYAR01}	1995, Nikolaev	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
676 ^{JAEFY01}	1996, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
P17644 ^{JRTW01}	1997, Achinsk	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
P17645	1997, Irkutsk	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–
I-1263 ^{JPLT01}	1997, Irkutsk	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–***
410 ^{QFKY01}	1998, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
M1327 ^{LRFD01}	1998, Dagestan	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
S-567 ^{JACTGN01}	1998, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
I-1298 ^{RHDN01}	1999, Yuzhno-Sakhalinsk	BREX*	ICE VchBan9*	PLE4	+
I-1300 ^{JZCC01}	1999, Yuzhno-Sakhalinsk	DISARM*	ICE VchCHN956*	–	–***
I-1316 ^{RHDM01}	1999, Yuzhno-Sakhalinsk	DISARM*	ICE VchCHN956*	–	–***
I-1330 ^{RHDL01}	1999, Vladivostok	DISARM*	ICE VchCHN956*	–	+***
I-1334 ^{RHDK01}	1999, Vladivostok	DISARM*	ICE VchCHN956*	–	+***
I-1344 ^{RHDJ01}	1999, Vladivostok	DISARM*	ICE VchCHN956*	–	+***
M1344 ^{NEDY01}	2001, Kazan	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–
M1429 ^{LAEM01}	2004, Beloretsk	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–
RND18826 ^{AYOM01}	2005, Tver	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–***
P-18899 ^{LAKM01}	2006, Murmansk	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–
147 ^{NDXQ01}	2010, Yalta	BREX	ICE VchBan9	PLE4	–
89 ^{NDXR01}	2010, Yalta	BREX	ICE VchBan9	–	+
2011EL-301 ^{AJFN01}	2011, Taganrog	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–***
81 ^{JROM01}	2014, Rostov	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–***
77N ^{WNZJ01}	no data, Dagestan	BREX	ICE VchBan9	PLE4	+
Генетически измененные штаммы с аллелем <i>ctxB7</i> / Genetically altered strains containing the <i>ctxB7</i> allele					
L3226 ^{JDVX01}	2010, Moscow	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
RND19187 ^{AYNM01}	2010, Moscow	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–***
RND19188 ^{JNGU01}	2010, Moscow	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–***
RND19191 ^{JNGT01}	2010, Moscow	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–***
76 ^{MPVL01}	2011, Mariupol	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
153 ^{MWRE01}	2011, Mariupol	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
186 ^{PYB001}	2011, Mariupol	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
RND6878 ^{AYNL01}	2012, Moscow	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–
M1509 ^{NEDZ01}	2012, Moscow	BREX, <i>abi</i>	ICE Vchlnd5	–	–
3265/80 ^{JRDL01}	2014, Moscow	BREX, <i>abi</i> *	ICE Vchlnd5*	–	–

Примечания: в надстрочном индексе штаммов указан сокращенный код доступа в GenBank; * – структура hotspot 5 и тип ICE SXT приведены согласно данным K.N. LeGault и соавт. (2021) [19]; ** – тип PLE или его отсутствие (–) установлены в работах [14, 15]; *** – наличие/отсутствие капса фага изучено в ранее проведенных работах [16, 17].

Notes: in the superscript, the abbreviated access code to GenBank is specified; hotspot 5 structure and ICE SXT type are given according to LeGault et al. (2021) [19]; ** – PLE type and/or its absence (–) has been described in [14, 15]; *** – the presence/absence of the kappa phage has been studied elsewhere [16, 17].

V. cholerae O1 биовара Эль Тор было изучено наличие ICE SXT элементов с использованием ранее рассчитанных праймеры [25]. В результате установлено, что, за исключением типичных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор, остальные содержали данный мобильный элемент (таблица), что подтверждает ранее полученные сведения об отсутствии ICE SXT элемента в штаммах *V. cholerae* O1 Эль Тор биовара, завезенных в 1970–1991 гг. [16, 21, 26]. В ранее проведенной работе у некоторых штаммов, завезенных в РФ и сопредельные страны, был установлен тип антифаговых систем в HS5 [19]. Мы продолжили исследования и выявили, что геноварианты *V. cholerae* O1 Эль Тор, занесенные в последние годы и имеющие аллель *ctxB7*, включают BREX систему с геном *abi*, что характерно для ICE *VchInd5*. В то же время у геновариантов с аллелем *ctxB1* присутствует как BREX с *abi*, так и BREX, типичная для ICE *VchBan9* (таблица).

Необходимо отметить, что PLE4 присутствует только в штаммах *V. cholerae* O1 Эль Тор, содержащих ICE SXT ICE *VchBan9*. Исключение составил штамм *V. cholerae* 89, включающий ICE *VchBan9*, но не имеющий PLE4 (таблица). Учитывая, что указанный штамм изолирован из внешней среды [21], можно высказать предположение, что PLE4 был утерян при нахождении штамма в водной среде.

Таким образом, все изученные геноварианты *V. cholerae* O1 Эль Тор биовара, завезенные на территорию РФ и сопредельных стран, содержат в составе HS5 три вида антифаговых систем – BREX, характерную для ICE *VchBan9*, BREX с геном *abi*, специфичные для ICE *VchInd5* и систему DISARM, характерную для ICE *VchCHN956*.

На заключительном этапе для выявления эволюционных взаимоотношений между изученными штаммами был проведен филогенетический анализ. В работу не были взяты типичные штаммы, так как в ранее проведенных работах уже было показано, что они формируют отдельную группу [21, 26]. В итоге установлено, что все изученные геноварианты четко разделились на три кластера.

В первый (I) вошли 5 изолятов, завезенных в 1999 году в Южно-Сахалинск и Владивосток, имеющих ICE *VchCHN956* с DISARM системой и не содержащих PLE островов. В геноме трех штаммов выявлено присутствие каппа фага (таблица). Вторую группу (II) составили штаммы с ICE *VchInd5*, лишенные PLE4 и каппа фага. Отдельную подгруппу в данном кластере образовали геноварианты с аллелем *ctxB7*, завезенные в последние годы. Третья клада (III) включала штаммы с PLE4 и ICE *VchBan9*, среди которых большинство имели каппа фаг. Стоит отметить, что в данную группу вошли штаммы, вызвавшие вспышку холеры в Дагестане в 1994 году, которые распределились по разным подгруппам, что соответствует ранее полученным данным [16]. Таким образом, можно высказать предположение, что особое сочетание антифаговых систем на определенном этапе эволюции возбудителя холеры способствует появлению эпидемически значимых штаммов, которые становятся доминирующими, но в последние годы они могут заменяться изолятами с другой структурой антифаговых генов.

Обсуждение. При исследовании антифаговых систем в ICE SXT установлено, что изученные штаммы

содержат в HS5 три вида антифаговых систем – BREX, характерную для ICE *VchBan9*, и BREX с геном *abi*, входящих в состав ICE *VchInd5*, а также систему DISARM, ассоциированную с ICE *VchCHN956*. Установленные на основе изучения структуры HS5 типы ICE SXT элемента у ряда штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор совпали со сведениями других авторов, полученными при анализе генов антибиотикорезистентности [21, 26]. Выявленные нами данные указывают на возможность определения типа ICE SXT элемента на основе изучения структуры HS5. Стоит отметить, что среди исследованных штаммов геновариантов отсутствуют изоляты, лишенные HS5, которые встречаются на эндемичной территории. Также на территорию нашей страны и в сопредельные государства не завозились штаммы, имеющие ICE *VchInd5* с делецией (около 17 т.п.н.), затрагивающей большую часть HS5 (с сохранением только генов *brxL*, *orf8* и *abi*). Ранее данные изоляты были обнаружены в Непале (2010), Мексике (2013), Республике Гаити (2012–2017 гг.) [19].

Показано, что 88 % штаммов геновариантов (30 штаммов), имеющих антифаговый остров PLE4, содержат также каппа фаг (таблица). Присутствие нескольких МГЭ с антифаговыми системами (PLE4, каппа фаг, ICE *VchBan9*) в ряде изученных штаммов может указывать на их существование в условиях активного воздействия литических фагов.

Установлено, что штаммы с PLE4 и ICE *VchBan9*, большинство из которых содержит также каппа фаг, независимо от места и года выделения группируются в филогенетически отдельный кластер. Штаммы с ICE *VchInd5*, лишенные PLE4 и каппа фага, также формируют свою обособленную группу. Полученные нами данные подтверждают сведения А. Angermeyer и соавт., также показавших корреляцию присутствия определенного вида PLE островов с типом ICE SXT элементов при филогенетическом анализе штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в Бангладеш в 2016–2019 гг. [14]. В заключение можно сделать вывод об очевидной связи между различными структурами, участвующими в процессе реализации устойчивости к фагам. Имея фундаментально общую цель – защитить клетку от негативного влияния фагов, эти системы, вероятно, развивались связано, что выражается в формировании отдельных групп штаммов с определенными сочетаниями этих элементов. Благодаря этому анализ антифаговых генов позволяет выявлять генетические различия между штаммами холерного вибриона, имеющими одинаковый набор генов устойчивости к антибиотикам [19]. Так, например, в ранее проведенном исследовании показано, что клинические штаммы *V. cholerae* I-1298 и I-1300 (Южно-Сахалинск, 1999) имеют одинаковую структуру генов вирулентности и содержат идентичный состав генов антибиотикорезистентности [17]. Однако указанные штаммы отличаются как по содержанию PLE4, так и по структуре HS5 ICE SXT элемента (таблица). В штамме *V. cholerae* I-1298 присутствует PLE4, а в HS5 содержатся гены BREX системы, характерные для ICE *VchBan9*. В то же время у *V. cholerae* I-1300 остров PLE4 отсутствует, а в HS5 выявлена DISARM (Defence Island System Assisted with Restriction Modification) система с рестрикционно-модификационными генами, ранее

<https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100>
Original Research Article

обнаруженная в штаммах *V. cholerae*, циркулирующих в Китае [14, 19]. На основе выявленных различий можно высказать предположение, что данные штаммы не являются родственными.

Таким образом, не вызывает сомнений важность изучения механизмов антифаговой защиты штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, которое может помочь в понимании эволюции возбудителя, его адаптации к изменяющимся условиям окружающей среды, определении связи между разными группами штаммов, а также разработке альтернативных методов борьбы с данной бактериальной инфекцией.

Заключение. Получены данные о присутствии систем защиты от фагов в геноме ранее завезенных на территорию РФ и сопредельных стран токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, что расширяет сведения об их генетической организации. Учитывая активное развитие направления по использованию фагов в качестве лечебных и профилактических препаратов, понимание механизмов взаимной адаптации между возбудителем и высокоспецифичными фагами может внести вклад в повышение эффективности назначаемой фаговой терапии. Изучение структуры антифаговых генов в «горячей точки 5» ICE SXT элемента позволяет выявлять генетические различия между штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, содержащими идентичный набор генов патогенности, пандемичности и антибиотикорезистентности. Полученные данные также указывают на возможность быстрого и точного определения присутствия и типа ICE SXT элемента в штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор на основе тестирования антифаговых генов в пятой «горячей точке».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bhandari M, Jennison AV, Rathnayake IU, Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104726. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104726
- Almagro-Moreno S, Pukatzki S, eds. *Vibrio spp. Infections*. Cham, Switzerland: Springer; 2023. doi: 10.1007/978-3-031-22997-8
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15508–15513. doi: 10.1073/pnas.0706532104
- Faruque SM, Mekalanos JJ. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence.* 2012;3(7):556–565. doi: 10.4161/viru.22351
- Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(5):1702–1707. doi: 10.1073/pnas.0408992102
- Seed KD, Bodi KL, Kropinski AM, et al. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio.* 2011;2(1):e00334–10. doi: 10.1128/mbio.00334-10
- Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, et al. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science.* 2020;369(6507):1077–1084. doi: 10.1126/science.aba0372
- Погожова М.П., Гаевская Н.Е., Водопьянов А.С. и др. Поглощающие свойства и генетическая характеристика экспериментальных диагностических бактериофагов *Vibrio cholerae* // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2021. Т. 98. № 3. С. 290–297. doi: 10.36233/0372-9311-39
- Гумаюнова К.С., Зинина О.С., Овчинникова М.В., Гаевская Н.Е., Синягина Ю.В., Никифоров А.К. Оценка результатов испытаний экспериментального фага для диагностики холеры эльтор // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии им. Ю.А. Овчинникова. 2021. Т. 17. № 4. С. 34–40.
- Yen M, Camilli A. Mechanisms of the evolutionary arms race between *Vibrio cholerae* and *Vibriophage* clinical isolates. *Int Microbiol.* 2017;20(3):116–120. doi: 10.2436/20.1501.01.292

- Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses.* 2018;10(7):351. doi: 10.3390/v10070351
- Аноприенко А.О., Тюрина А.В., Гаевская Н.Е., Погожова М.П. Создание экспериментального профилактического препарата на основе холерных бактериофагов // Вестник биотехнологии и физико-химической биологии имени Ю.А. Овчинникова. 2020. Т. 16. № 3. С. 10–13.
- O'Hara BJ, Barth ZK, McKitterick AC, Seed KD. 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
- Angermeyer A, Hays SG, Nguyen MHT, et al. 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):e03088–21. doi: 10.1128/mbio.03088-21
- 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 Эль Тор биовара. Проблемы особо опасных инфекций. 2023. № 2. С. 112–119. doi: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119
- Онищенко Г.Г., Москвитина Э.А., Водопьянов А.С. и др. Ретроспективный молекулярно-эпидемиологический анализ эпидемии холеры в Республике Дагестан в 1994 г. // Проблемы особо опасных инфекций. 2016. № 4. С. 33–41. doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41
- Gladikh AS, Feranchuk SI, Ponomareva AS, Bocharin NO, Mironova LV. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect Genet Evol.* 2020;78:104096. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104096
- Kapfhammer D, Blass J, Evers S, Reidl J. *Vibrio cholerae* phage K139: complete genome sequence and comparative genomics of related phages. *J Bacteriol.* 2002;184(23):6592–6601. doi: 10.1128/JB.184.23.6592-6601.2002
- LeGault KN, Hays SG, Angermeyer A, et al. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science.* 2021;373(6554):eabg2166. doi: 10.1126/science.abg2166
- Wozniak RAF, Fouts DE, Spagnoletti M, et al. 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
- Смирнова Н.И., Рыбальченко Д.А., Щелканова Е.Ю., Лозовский Ю.В., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Вариативность множественной резистентности к антибиотикам возбудителя холеры, связанная с разными типами мобильного SXT элемента и спонтанными хромосомными мутациями // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2022. Т. 40. № 2. С. 28–36. doi: 10.17116/molgen20224002128
- Смирнова Н.И., Заднова С.П., Агафонов Д.А., Шашкова А.В., Челдышова Н.Б., Черкасов А.В. Сравнительный молекулярно-генетический анализ мобильных элементов природных штаммов возбудителя холеры // Генетика. 2013. Т. 49. № 9. С. 1036–1047. doi: 10.7868/S0016675813090087
- Савельев В.Н., Ковалев Д.А., Савельева И.В. и др. 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 (333). С. 56–61. doi: 10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61
- Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol.* 2014;31(5):1077–1088. doi: 10.1093/molbev/msu088
- Заднова С.П., Смирнова Н.И. Выявление генов антибиотикостойчивости в штаммах *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 3. С. 3–10.
- Водопьянов С.О., Водопьянов А.С., Олейников И.П., Титова С.В. Распространенность ICE элементов различных типов у *V. cholerae* // Здоровье населения и среда обитания. 2018. № 1 (298). С. 33–35. doi: 10.35627/2219-5238/2018-298-1-33-35

REFERENCES

- Bhandari M, Jennison AV, Rathnayake IU, Huygens F. Evolution, distribution and genetics of atypical *Vibrio cholerae* – A review. *Infect Genet Evol.* 2021;89:104726. doi: 10.1016/j.meegid.2021.104726
- Almagro-Moreno S, Pukatzki S, eds. *Vibrio spp. Infections*. Cham, Switzerland: Springer; 2023. doi: 10.1007/978-3-031-22997-8
- Pukatzki S, Ma AT, Revel AT, Sturtevant D, Mekalanos JJ. Type VI secretion system translocates a phage tail spike-like protein into target cells where it cross-links actin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(39):15508–15513. doi: 10.1073/pnas.0706532104

4. Faruque SM, Mekalanos JJ. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012;3(7):556-565. doi: 10.4161/viru.22351
5. Faruque SM, Naser IB, Islam MJ, et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1702-1707. doi: 10.1073/pnas.0408992102
6. Seed KD, Bodi KL, Kropinski AM, et al. Evidence of a dominant lineage of *Vibrio cholerae*-specific lytic bacteriophages shed by cholera patients over a 10-year period in Dhaka, Bangladesh. *mBio*. 2011;2(1):e00334-10. doi: 10.1128/mbio.00334-10
7. Gao L, Altae-Tran H, Böhning F, et al. Diverse enzymatic activities mediate antiviral immunity in prokaryotes. *Science*. 2020;369(6507):1077-1084. doi: 10.1126/science.aba0372
8. Pogozhova MP, Gayevskaya NE, Vodopyanov AS, et al. Biological properties and genetic characteristics of experimental diagnostic *Vibrio cholerae* bacteriophages. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2021;98(3):290-297. (In Russ.) doi: 10.36233/0372-9311-39
9. Gumayunova KS, Zinina OS, Ovchinnikova MV, Gaevskaya NE, Sinyagina YuV, Nikiforov AK. Evaluation of the test results of an experimental phage for the diagnosis of cholera El Tor. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova*. 2021;17(4):34-40. (In Russ.)
10. Yen M, Camilli A. Mechanisms of the evolutionary arms race between *Vibrio cholerae* and *Vibriophage* clinical isolates. *Int Microbiol*. 2017;20(3):116-120. doi: 10.2436/20.1501.01.292
11. Oechslin F. Resistance development to bacteriophages occurring during bacteriophage therapy. *Viruses*. 2018;10(7):351. doi: 10.3390/v10070351
12. Anoprienko AO, Tyurina AV, Gaevskaya NE, Pogozhova MP. Creation of an experimental preventive preparation based on cholera bacteriophages. *Vestnik Biotekhnologii i Fiziko-Khimicheskoy Biologii im. Yu.A. Ovchinnikova*. 2020;16(3):10-13. (In Russ.)
13. O'Hara BJ, Barth ZK, McKittrick AC, Seed KD. 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
14. Angermeyer A, Hays SG, Nguyen MHT, et al. 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):e03088-21. doi: 10.1128/mbio.03088-21
15. Zadnova SP, Plekhanov NA, Spirina AY, Shvidenko IG, Savel'ev VN. Detection of phage-induced mobile genetic elements in strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2023;(2):112-119. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2023-2-112-119
16. Onishchenko GG, Moskvitina EA, Vodop'yanov AS, et al. Retrospective molecular-epidemiological analysis of cholera epidemic in the Republic of Dagestan in 1994. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy*. 2016;(4):33-41. (In Russ.) doi: 10.21055/0370-1069-2016-4-33-41
17. Gladikh AS, Feranchuk SI, Ponomareva AS, Bochalgin NO, Mironova LV. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect Genet Evol*. 2020;78:104096. doi: 10.1016/j.meegid.2019.104096
18. Kapfhammer D, Blass J, Evers S, Reidl J. *Vibrio cholerae* phage K139: complete genome sequence and comparative genomics of related phages. *J Bacteriol*. 2002;184(23):6592-6601. doi: 10.1128/JB.184.23.6592-6601.2002
19. LeGault KN, Hays SG, Angermeyer A, et al. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021;373(6554):eabg2166. doi: 10.1126/science.abg2166
20. Wozniak RAF, Fouts DE, Spagnoletti M, et al. 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
21. Smirnova NI, Rybal'chenko DA, Shchelkanova EYu, Lozovsky YuV, Krasnov YaM, Kuttyrev VV. Variability of multiple resistance to antibiotics in cholera agent associated with different types of SXT element and spontaneous chromosome mutations. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya*. 2022;40(2):28-36. (In Russ.) doi: 10.17116/molgen20224002128
22. Smirnova NI, Zadnova SP, Agafonov DA, Shashkova AV, Cheldyshova NB, Cherkasov AV. Comparative molecular-genetic analysis of mobile elements in natural strains of cholera agent. *Genetika*. 2013;49(9):1036-1047. (In Russ.) doi: 10.7868/S0016675813090087
23. Savelyev VN, Kovalev DA, Savelyeva IV, et al. 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*. 2020;(12(333)):56-61. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2020-333-12-56-61
24. Bertels F, Silander OK, Pachkov M, Rainey PB, van Nimwegen E. Automated reconstruction of whole-genome phylogenies from short-sequence reads. *Mol Biol Evol*. 2014;31(5):1077-1088. doi: 10.1093/molbev/msu088
25. Zadnova SP, Smirnova NI. Isolation of antibiotics resistance genes in *Vibrio cholerae* O1 and O139 serogroup strains. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii*. 2015;(3):3-10. (In Russ.)
26. Vodop'yanov SO, Vodop'yanov AS, Oleynikov IP, Titova SV. Prevalence of ice elements of different types in *V. cholerae*. *Zdorov'e Naseleniya i Sreda Obitaniya*. 2018;(1(298)):33-35. (In Russ.) doi: 10.35627/2219-5238/2018-298-1-33-35

Сведения об авторах:

✉ **Заднова** Светлана Петровна – д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов; e-mail: svetlanazadnova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Плекханов Никита Александрович – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов; e-mail: muscari.sp@icloud.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.

Спирина Алина Юрьевна – младший научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов; e-mail: rusrapi@microbe.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>.

Челдышова Надежда Борисовна – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенных вибрионов; e-mail: rusrapi@microbe.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>.

Информация о вкладе авторов: концепция и дизайн исследования: *Заднова С.П.*; сбор и обработка материала: *Плекханов Н.А., Спирина А.Ю., Челдышова Н.Б.*; написание текста: *Заднова С.П., Плекханов Н.А.*; редактирование: *Заднова С.П., Плекханов Н.А.*; обзор публикаций по теме статьи: *Спирина А.Ю., Челдышова Н.Б.* Все авторы ознакомились с результатами работы и одобрили окончательный вариант рукописи.

Соблюдение этических стандартов: данное исследование не требует представления заключения комитета по биомедицинской этике или иных документов.

Финансирование: исследование проведено без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов: авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Статья получена: 20.06.23 / Принята к публикации: 10.11.23 / Опубликовано: 30.11.23

Author information:

✉ Svetlana P. Zadnova, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Pathogenic Vibrios; e-mail: svetlanazadnova@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>.

Nikita A. Plekhanov, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Pathogenic Vibrios; e-mail: muscari.sp@icloud.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>.

Alina Yu. Spirina, Junior Researcher, Laboratory of Pathogenic Vibrios; e-mail: rusrapi@microbe.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9779-166X>.

Nadezhda B. Cheldyshova, Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Pathogenic Vibrios; e-mail: rusrapi@microbe.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>.

Author contributions: study conception and design: *Zadnova S.P.*, data collection, analysis and interpretation of results: *Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B.*; literature review: *Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B.*; draft manuscript preparation: *Zadnova S.P., Plekhanov N.A.* All authors reviewed the results and approved the final version of the manuscript.

Compliance with ethical standards: Not applicable.

Funding: The authors received no financial support for the research, authorship, and/or publication of this article.

Conflict of interest: The authors have no conflicts of interest to declare

Received: June 20, 2023 / Accepted: November 10, 2023 / Published: November 30, 2023