

Оригинальное исследование
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-640>



Анализ генов антифаговых систем нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор

Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А.[✉], Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М.

Российский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия

Аннотация

Актуальность. Наличие и структура антифаговых систем, способствующих устойчивости холерных вибрионов к литическим фагам, у нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории России и сопредельных стран, не изучена.

Цель — выявление и анализ антифаговых систем нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Материалы и методы. В работе использовали 126 нетоксигенных (*ctxAB-tcpA*⁺ и *ctxAB-tcpA*⁻) штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, изолированных с 1972 по 2018 г. Секвенирование ДНК проводили на платформе MGI DNBSEQ-G50. Для биоинформатического анализа применяли программы fastp v. 0.23, unicycler v. 0.4.7, Blast 2.16.0, MEGA X, CRISPRCastyper и CRISPRCasFinder.

Результаты. В геноме изученных штаммов не выявлены фагоиндуцируемые острова PLE, BREX и DISARM-системы. Установлено, что 80% *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов содержат систему рестрикции–модификации I типа, у *ctxAB-tcpA*⁻-изолятов данная система не обнаружена. Гены CBASS-системы выявлены у единичных штаммов обеих групп. В геноме 35 (32%) изученных *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов, выделенных в разных регионах РФ и сопредельных странах, установлено наличие CRISPR–Cas-системы 1-го класса типов I (подтипы I-E, I-F, I-C) и III (подтип III-B). Количество спейсеров в данной системе варьировало от 0 до 80, их последовательность была гомологична протоспейсерным участкам ДНК литических и умеренных фагов, транспозонов, плазмид *V. cholerae*, представителей рода *Vibrio* и неродственных бактерий. Наличие у ряда штаммов спейсеров, гомологичных генетическому материалу фага, циркулирующему на эндемичных территориях, может указывать на завозной характер данных штаммов.

Заключение. Выявлена гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor по наличию антифаговых систем, что расширяет сведения об их генетической организации. В их геноме выявлены системы рестрикции–модификации I типа (*ctxAB-tcpA*⁺), CBASS (*ctxAB-tcpA*⁺ и *ctxAB-tcpA*⁻) и CRISPR–Cas 1-го класса типов I (подтипы I-E, I-F, I-C) и III (*ctxAB-tcpA*⁻). Выявление нескольких типов и подтипов CRISPR–Cas-системы в геноме ряда *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов может указывать на её неоднократное приобретение посредством горизонтального переноса.

Ключевые слова: нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae*, антифаговые системы, CRISPR–Cas-система 1-го класса

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Заднова С.П., Плеханов Н.А., Сергутин Д.А., Челдышова Н.Б., Федоров А.В., Краснов Я.М. Анализ генов антифаговых систем нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2025;102(4):456–464.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-640>

EDN: <https://www.elibrary.ru/XNHHRX>

Original Study Article
<https://doi.org/10.36233/0372-9311-640>

Analysis of the gene structure of antiphage systems of non-toxigenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor

Svetlana P. Zadnova, Nikita A. Plekhanov, Danil A. Sergutin[✉], Nadezhda B. Cheldyshova, Andrey V. Fedorov, Yaroslav M. Krasnov

Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russia

Abstract

Introduction. The presence and structure of antiphage systems that contribute to the resistance of cholera vibrios to lytic phages in non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor isolated in the Russian Federation and neighboring countries has not been studied.

The aim of the study is the detection and analysis of antiphage systems of non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 biovar El Tor.

Materials and methods. The study involved 126 non-toxicogenic (*ctxAB-tcpA*⁺ and *ctxAB-tcpA*⁻) strains of *V. cholerae* O1 El Tor isolated from 1972 to 2018. DNA sequencing was performed on the MGI DNBSEQ-G50 platform. For bioinformatics analysis, the following programs were used: fastp v. 0.23, unicycler v. 0.4.7, Blast 2.16.0, MEGA X, CRISPRCasty-per and CRISPRCasFinder.

Results. Phage-inducible islands of the PLE, BREX and DISARM systems were not detected in the genome of the studied strains. It was found that 80% of *ctxAB-tcpA*⁺ strains contain the type I restriction-modification system, while this system was not detected in *ctxAB-tcpA*⁻ isolates. The genes of the CBASS system were detected in single strains of both groups. In the genome of 35 (32%) studied *ctxAB-tcpA*⁻ strains isolated in different regions of the Russian Federation and neighboring countries, the presence of the CRISPR–Cas system of class 1 types I (subtypes I-E, I-F, I-C) and III (subtype III-B) was established. The number of spacers in this system varied from 0 to 80 and their sequence was homologous to the protospacer regions of DNA of lytic and temperate phages, transposons, plasmids of *V. cholerae*, representatives of the genus *Vibrio* and unrelated bacteria. The presence in a number of strains of spacers homologous to the genetic material of the phage circulating in endemic territories may indicate the imported nature of these strains.

Conclusion. The heterogeneity of the studied non-toxicogenic strains of *V. cholerae* O1 El Tor in the presence of antiphage systems was revealed, which expands the information on their genetic organization. In their genome, restriction-modification systems of type I (*ctxAB-tcpA*⁺), CBASS (*ctxAB-tcpA*⁺ and *ctxAB-tcpA*⁻) and CRISPR–Cas class 1 types I (subtypes I-E, I-F, I-C) and III (*ctxAB-tcpA*⁻) were identified. The detection of several types and subtypes of the CRISPR–Cas system in the genome of a number of *ctxAB-tcpA* strains may indicate its repeated acquisition through horizontal transfer.

Keywords: non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae*, antiphage systems, CRISPR–Cas system class 1

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Sergutin D.A., Cheldyshova N.B., Fedorov A.V., Krasnov Ya.M. Analysis of the gene structure of antiphage systems of non-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2025;102(4):456–464.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-640>

EDN: <https://www.elibrary.ru/XNHHRX>

Введение

Ежегодно при проведении мониторинговых исследований водных объектов России на холеру выделяются нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor, лишённые генов *ctxAB* (*ctxAB*⁻), кодирующих биосинтез холерного токсина (основной фактор вирулентности возбудителя холеры). Иногда изолируются штаммы, содержащие ген *tcpA* (*ctxAB-tcpA*⁺), отвечающий за продукцию основной субъединицы токсин-регулируемых пилей адгезии (фактор колонизации). Как *ctxAB-tcpA*⁻, так и *ctxAB-tcpA*⁺-штаммы не вызывают холеру, но могут быть причиной острых кишечных инфекций. Установлено, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor способны длительное время сохраняться в объектах окружающей среды на территории России, образуя клональные комплексы, а также завозиться из эндемичных по холере стран [1–7]. Для выявления механизмов длительного выживания нетоксигенных штаммов во внешней среде, а также способности вызывать острые кишечные инфекции активно изучаются молекулярно-генетические особенности указанных

штаммов, проводятся различные виды типирования и филогенетический анализ. В результате в геноме нетоксигенных штаммов выявлено присутствие генов, кодирующих дополнительные факторы патогенности, а также персистенции, которые могут выполнять и роль токсических субстанций. В том числе выявлены локусы, обеспечивающие подвижность, ответственные за биосинтез дополнительных токсинов, термолabileного гемолизина, протеаз, нейраминидазы, белков системы секреции 6-го и 3-го типов, маннозочувствительных пилей адгезии, а также белков-регуляторов, контролирующих транскрипцию генов вирулентности и персистенции [3, 5, 8]. Однако причины длительного выживания нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor во внешней среде до конца не установлены.

Необходимо отметить, что, находясь в воде открытых водоёмов, нетоксигенные вибрионы *V. cholerae* O1 El Tor могут подвергаться атаке бактериофагов (фагов), также присутствующих в данной среде. Показано, что холерным фагам принадлежит важная роль в генетическом разнообразии штаммов *V. cholerae* [9]. Совместное существова-

ние *V. cholerae* и фагов и необходимость обоих выживать способствуют эволюции как *V. cholerae*, так и фагов [9, 10]. Бактерии приобретают различные механизмы устойчивости к фагам посредством горизонтального переноса генов, а фаги, в свою очередь, очень быстро развивают устойчивость ко многим бактериальным защитным системам. Выявлено, что гены, кодирующие устойчивость к фагам, могут составлять более 10% бактериального генома [11].

У токсигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor выявлено присутствие значительного количества антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах. В том числе на острове патогенности VPI-2 находится кластер генов, кодирующих систему рестрикции-модификации I типа (*vc1764–vc1769*), действие которой основано на активности двух ферментов: эндонуклеазы рестрикции (*vc1765*) и метилтрансферазы (*vc1769*) [12]. На острове пандемичности VSP-I расположена антифаговая сигнальная система CBASS (cyclic-oligonucleotide-based antiphage signaling system), включающая оперон из 4 генов: *dncV*, *capV*, *cap2*, *cap3* [13, 14]. В составе ICE SXT-элементов обнаружены BREX (Bacteriophage exclusion) и DISARM (Defence Islands System Associated with Restriction-Modification) системы [10, 15, 16].

Важная роль в защите от самого распространённого на эндемичной территории фага ICP1 принадлежит фагоиндуцируемым островам PLE (Phage inducible chromosomal island-like elements), которых в настоящее время насчитывается 10 типов [17–19]. Однако у токсигенных вибрионов El Tor отсутствует система адаптивной защиты CRISPR–Cas, выявленная в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, циркулирующих на эндемичной территории [20]. Данная система включает короткие палиндромные повторы (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats — CRISPR), спейсеры (последовательности чужеродного происхождения) и гены *cas*, кодирующие белки с различной функцией [13]. В настоящее время CRISPR–Cas-система в зависимости от механизма действия, структуры CRISPR-спейсеров и присутствия генов *cas* классифицируется на 2 класса, 6 типов и 33 подтипа.

В системе класса 1 (типы I, III, IV) с мишенью взаимодействует многокомпонентный комплекс, который состоит из нескольких белков Cas, связанных с crPHK. Системы класса 2 (типы II, V и VI) содержат только один белок (Cas9, Cas12 или Cas13), который выполняет все функции мультибелкового эффекторного комплекса.

Деление на типы основано на строении эффекторных комплексов, при этом системы одного типа включают, как правило, особый уникальный для систем этого типа белок. Типы, в свою очередь, делятся на подтипы, различающиеся особенностями в строении локуса CRISPR и, в некоторых случаях,

наличием белков Cas. Так, во многих системах I типа присутствует ген *cas3*, кодирующий хеликазу-нуклеазу Cas3, которая, благодаря хеликазной активности, разъединяет двойную чужеродную спираль ДНК, а при участии нуклеазного домена фрагментирует чужеродный генетический материал. В системах III типа нуклеазной активностью обладает белок Cas10. В состав всех типов входят белки Cas1 и Cas2, формирующие комплекс и отвечающие за этап адаптации, т. е. встраивания нового спейсера в CRISPR [20, 21].

Несмотря на активное исследование антифаговых систем *V. cholerae*, их присутствие в геноме нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных на территории России и сопредельных стран, не изучено.

Цель работы состояла в выявлении и анализе антифаговых систем нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Материалы и методы

Изучали нуклеотидные последовательности полных геномов 126 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, выделенных с 1972 по 2018 г. на территории России и сопредельных стран. Нуклеотидные последовательности 30 штаммов (12 *ctxA tcpA*⁺ и 18 *ctxA tcpA*[−]) взяты из базы данных NCBI GenBank, 96 штаммов (3 *ctxA tcpA*⁺ и 93 *ctxA tcpA*[−]) секвенированы в данной работе. Для проведения секвенирования штаммы получали из Государственной коллекции патогенных бактерий Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, где они хранились в лиофилизированном состоянии.

Подготовку геномной ДНК выполняли согласно протоколу производителя из обработанной мертиолятом натрия бактериальной суспензии с использованием коммерческого набора «Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» («Axygen Biosciences»).

Секвенирование проводили на платформе «MGI DNBSEQ-G50» («MGI»). Библиотеки готовили по стандартному протоколу с применением наборов «DNBSEQ-G50RS (FCLPE150)» и «MGI EasyFastPCR-FREEFS Library PrepSet» («MGI»). Контроль качества полученных прочтений осуществляли с помощью программы fastp v. 0.23, континги собирали с использованием unicycler v. 0.4.7.

Для биоинформатического анализа применяли алгоритм Blast 2.16.0 (<http://blast.ncbi>) и программу MEGA X (или BioEdit v. 7.0.9.0). Для выявления системы CRISPR–Cas и спейсеров использовали программы CRISPRCaster¹ и CRISPRCasFinder².

¹ <https://github.com/Russel88/CRISPRCasTyper>

² <https://github.com/dcouverin/CRISPRCasFinder>

Результаты

При изучении нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных штаммов фагоиндуцируемые острова PLE не были обнаружены ни в геноме *ctxAB-tcpA*⁻, ни *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов. Не выявлены также системы BREX и DISARM, т. к. в данных штаммах отсутствуют элементы ICE SXT.

При анализе генов системы рестрикции–модификации I типа (*vc1765*, *vc1769*) среди 15 *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов были выявлены 12 изолятов, которые по этим генам соответствовали токсигенному референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor (таблица). У *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов гены системы рестрикции–модификации I типа не обнаружены.

Присутствие генов системы CBASS (*dncV*, *capV*) установлено у 4 штаммов. У *ctxAB-tcpA*⁺-штамма *V. cholerae* 56 структура данных генов не отличалась от таковых референс-штамма *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. У *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов *V. cholerae* P-18748, 102 и M-1457 присутствовал интактный ген *capV*, а в гене *dncV* выявлены одинаковые точечные несинонимичные мутации, приводящие к замене аминокислот, влияние которых на функциональную роль белка DncV не установлено. В геноме других штаммов указанная система отсутствовала (таблица).

Далее было изучено присутствие CRISPR–Cas-системы. В геноме *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов данная система не обнаружена, в то же время среди *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов выявлены 35 изолятов, имеющих CRISPR–Cas-систему 1-го класса 2 типов — I и III. Тип I был представлен тремя подтипами: I-E, I-F, I-C, а тип III — одним (III-B). У наибольшего количества штаммов (20 изолятов) выявлена CRISPR–Cas-система подтипа I-E, среди которых 10 изолятов имели только данный подтип, в остальных присутствовали дополнительные системы. Так штамм *V. cholerae* 617, кроме I-E, имел еще 2 системы (таблица). Стоит отметить, что структура системы I-E у всех штаммов была канонической и состояла из 8 *cas* генов (*cas3*, *cas8e*, *cse2*, *cas6*, *cas7*, *cas5*, *cas1*, *cas2*) (рисунок, а).

Три штамма — *V. cholerae* M1413, M1516, M1526 — включали подтип I-C (таблица, рисунок, б). Пять штаммов (*V. cholerae* 617, 102, M1457, M1516, M1526) содержали полноценную CRISPR–Cas-систему I-F подтипа с 6 *cas* генами (*cas1*, *cas3*, *cas8f*, *cas5*, *cas7*, *cas6f*: таблица, рисунок, в). У ряда штаммов выявлена усеченная I-F система (*cas6f*, *cas7f*, *cas8f*), состоящая из 3 *cas* генов, обозначенная нами I-F mini (рисунок, г). Стоит отметить, что в дан-

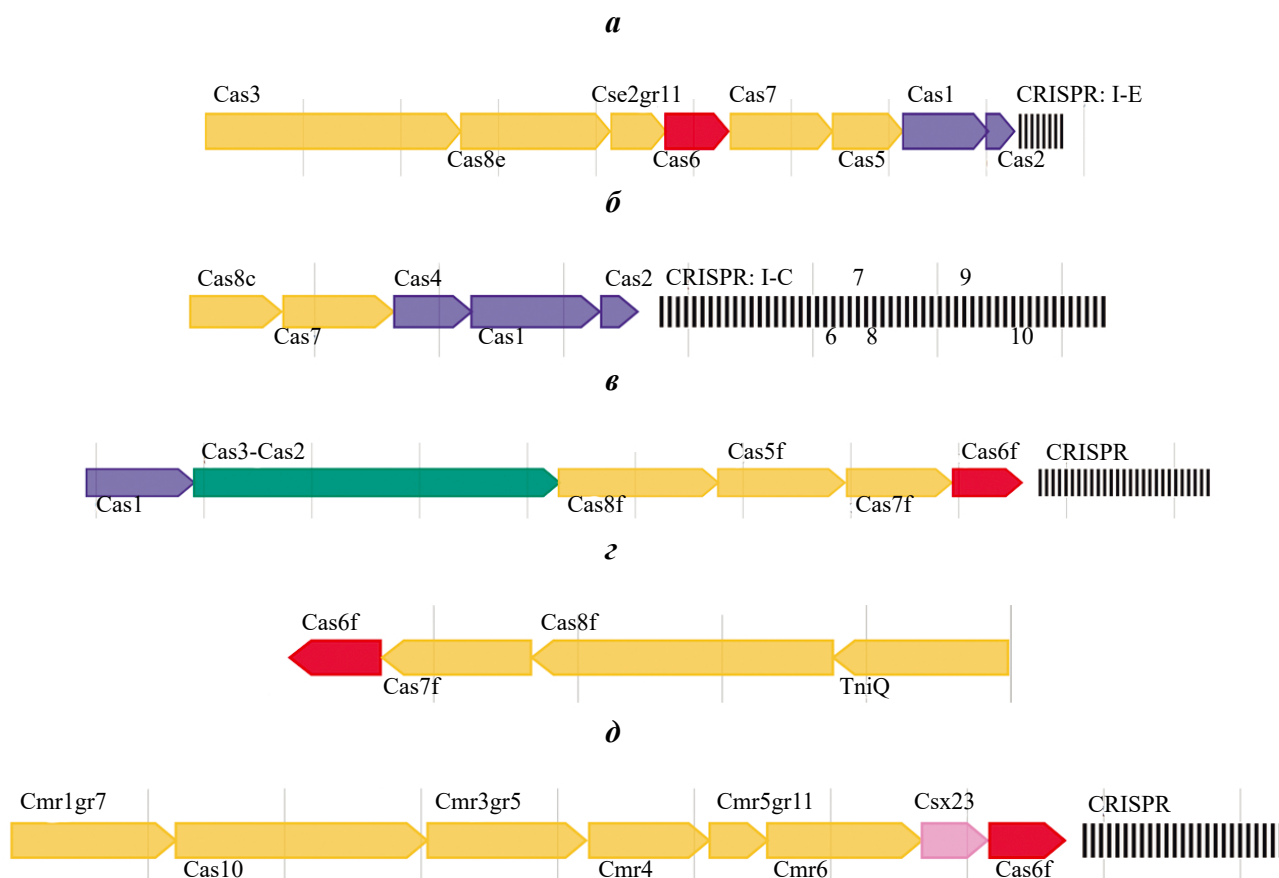
Характеристика некоторых нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и структура их антифаговых генов

Штамм	Место, год	Источник выделения	Структура генов		Тип CRISPR–Cas-системы	Количество спейсеров
			<i>vc1765/vc1769</i>	<i>vc0179 (dncV)/vc0178 (capV)</i>		
Нетоксигенные <i>ctxAB-tcpA</i> ⁺ -штаммы						
M1395 ^{LQBY01}	Россия, Астрахань, 1981	Внешняя среда	–	–	–	–
56 ^{MWRD01}	Украина, Мариуполь, 1995	Больной	int	int	–	–
866 ^{MWRF01}	Украина, Ялта, 1996	Внешняя среда	int	–	–	–
85 ^{NEDU01}	Украина, Бердянск, 1999	Больной	int	–	–	–
P18778 ^{NIFI01}	Россия, Ростов-на-Дону, 2005	Больной	–	–	–	–
M1434*, M1436*	Россия, Калмыкия, 2006	Внешняя среда	int	–	–	–
M1501 ^{LRAE01}	Россия, Калмыкия, 2011	Больной	–	–	–	–
M-1504 ^{VTLN01}	Россия, Калмыкия, 2011, 2012	Внешняя среда	int	–	–	–
M-1518 ^{LQZR01}	Россия, Калмыкия, 2011, 2012	Внешняя среда	int	–	–	–
M-1524 ^{LQZS01} , M1528*	Россия, Калмыкия, 2013	Внешняя среда	int	–	–	–
2613 ^{PYCA01} , 2687 ^{PYCB01}	Россия, Калмыкия, 2015	Внешняя среда	int	–	–	–
124 ^{PYCD01}	Россия, Калмыкия, 2017	Внешняя среда	int	–	–	–
Нетоксигенные <i>ctxAB-tcpA</i> ⁻ -штаммы						
M-988 ^{LQBX01}	Туркменистан, 1972	Внешняя среда	–	–	I-F mini	Не определено
M-658*	Россия, Уфа, 1976	Внешняя среда	–	–	I-F mini	1
M-659*	Россия, Салават, 1976	Внешняя среда	–	–	I-E	56
M-1114*	Россия, Саранск, 1977	Больной	–	–	I-E I-F mini	13 0
M-1115*	Россия, Саранск, 1977	Больной	–	–	I-E I-F mini	13 1

Окончание таблицы

Штамм	Место, год	Источник выделения	Структура генов		Тип CRISPR–Cas-системы	Количество спейсеров
			vc1765/ vc1769	vc0179 (dncV)/ vc0178 (capV)		
M-1394*	Россия, Каспийск, 1979	Внешняя среда	–	–	I-E	44
M-1222*	Россия, Астрахань, 1985	Внешняя среда	–	–	I-F mini	10
M-1320*	Россия, Саратов, 1998	Внешняя среда	–	–	III-B	24
617 ^{NCTY01}	Украина, 1999	Больной	–	–	I-F** I-E III-B	26 80 25
M1337 ^{NEEB01}	Россия, Астрахань, 2000	Больной	–	–	I-E**	1
M-1388*	Россия, Саратов, 2001	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	13 1
M-1389*	Россия, Саратов, 2001	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	13 1
M-1411*	Россия, Калмыкия, 2002	Больной	–	–	I-F mini	1
M-1413*	Россия, Калмыкия, 2002	Внешняя среда	–	–	I-C I-F mini	40 2
M-1426*	Россия, Пермский край, 2003	Внешняя среда	–	–	I-F mini	0
M-1428*	Россия, Астрахань, 2003	Внешняя среда	–	–	I-E	44
M-1431*	Россия, Калмыкия, 2005	Внешняя среда	–	–	I-E	60
P-18748 ^{NIFH01}	Россия, Сочи, 2004	Больной	–	A1003G (S335G) /int	–	–
102 ^{NDXO01}	Украина, 2006	Больной	–	A1003G (S335G) /int	I-F**	49
M-1441*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	48
M-1443*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	58
M-1444*	Россия, Калмыкия, 2007	Внешняя среда	–	–	I-E	76
M-1447*	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	–	I-F	15
M-1450*	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	–	I-F mini	1
M1457 ^{VTLH01}	Россия, Калмыкия, 2009	Внешняя среда	–	A1003G (S335G) /int	I-F	2
M-1460*	Россия, Татарстан, 2010	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	14 1
2403 ^{NEDV01}	Украина, 2011	Больной	–	–	I-E I-F mini	12 0
M-1486*	Россия, Татарстан, 2011	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	29 1
M-1487*	Россия, Татарстан, 2011	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	15 0
M1516 ^{VTZY01}	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F I-C	58 54
M1517 ^{VTZZ01}	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-E	23
M-1525*	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F mini	10
M1526 ^{VUAA01}	Россия, Калмыкия, 2012	Внешняя среда	–	–	I-F I-C	58 54
29 ^{VUAB01}	Россия, Калмыкия, 2013	Внешняя среда	–	–	I-E	7
M-1543*	Россия, Калмыкия, 2017	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	29 1
136 ^{VTLK01}	Россия, Калмыкия, 2018	Внешняя среда	–	–	I-E I-F mini	8 3

Примечание. В надстрочном индексе штаммов указан код доступа в NCBI GenBank. *Штаммы, секвенированные в данной работе. «–» — ген(ы) не обнаружен(ы); int — структура гена соответствует референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. **Присутствие CRISPR–Cas-системы установлено ранее [20].



Структура CRISPR–Cas-систем изученных *ctxAB-tcpA*-штаммов *V. cholerae* O1 El Tor.

а — канонический подтип I-E, присутствующий в штамме *V. cholerae* 29; б — подтип I-C штамма *V. cholerae* M1526; в — подтип I-F штамма *V. cholerae* 617; г — подтип I-F mini штамма *V. cholerae* M1426; д — подтип III-B штамма *V. cholerae* M1320. Чёрными вертикальными линиями справа отмечены спейсеры (CRISPR).

ной системе отсутствует ген *cas3*. Два штамма — *V. cholerae* M1320 и 617 — имели тип III, подтип III-B (*cmr1*, *cas10*, *cmr3*, *cmr4*, *cmr5*, *cmr6*, *csx23*, *cas6f*; таблица, рисунок, д).

Нетоксигенные *ctxA-tcpA*-штаммы с CRISPR–Cas-системой распространены в России достаточно широко. Данные штаммы выделялись в разные годы на территории республик Татарстан, Дагестан, Башкирия, Мордовия, Калмыкия, а также Астраханской, Саратовской областей и Пермского края (таблица).

Следующий этап работы был посвящён выявлению спейсеров. Они присутствовали практически во всех системах, их количество варьировало от 1 до 80, при этом наибольшее количество спейсеров обнаружено в системе I-E. Исключения составили 4 штамма, содержащие систему I-F mini, в которой спейсеры отсутствовали (таблица). У штамма M-988 из-за некачественной полногеномной нуклеотидной последовательности, представленной в GenBank, достоверно идентифицировать спейсеры не удалось. Выявленные спейсеры были гомологичны протоспейсерным последователь-

ностям ДНК большого количества литических и умеренных фагов, а также плазмид и транспозона *V. cholerae* (фаги: O395, VPUSM 8, K139, K491, K571, K575, VcP032, Kappa, Rostov 7, X29, phi 2, JSF1, JSF2, JSF4, JSF5, JSF6, JSF13, JSF14, JSF17, VMJ710, Rostov M3, CP-T1, 24, vB_VchM-138, vB_VchM_VP-3213, Ch457, E8498, fs1, fs2, Vb_VaM_Valp1, ICP1, VRU, VP24-2_Ke, VMJ710, VcP032, VEJphi, VSK, VSKK, ND1-fs1, KSF-1phi, VGJphi, 1.178.O_10N.286.45.E12, 1.028.O_10N.286.45.B6, 1.159.O_10N.261.46.F12, martha 12B12, jenny 12G5, vB_Vipa26, vB_Vipa10, vB_Vipa4291, vB_Vipa71, vB_VpS_PG07, Zoerhiza.4_15, 13VV501A, 6E35-1b, D481, D483, D485, D491s, D527, VaK; плазмиды: HDW18, pSA7G1, pSA7G2; транспозон Tn7005). Кроме того, обнаружены спейсеры, гомологичные нуклеотидным последовательностям фагов и плазмид представителей рода *Vibrio* (*V. alginolyticus*, *V. vulnificus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis*, *V. furnissii*, *V. nigripulchritudo*, *V. metschnikovii*), а также неродственных видов бактерий (*Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Salmonella* spp., *Shigella*, *Shewanella algae*, *Xanthomonas*, *Stenotrophomonas*). Стоит от-

метить наличие в некоторых штаммах (*V. cholerae* 102, M1428, M1431, M1443, M1444, M1457, M1460, M1486) спейсеров, идентичных участкам ДНК фага ICP1 (самый распространённый на эндемичных территориях бактериофаг), выделенного в разные годы в Демократической Республике Конго и Бангладеш.

Таким образом, в геноме изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor выявлены следующие антифаговые системы: рестрикции–модификации I типа (*ctxAB-tcpA*⁺), CBASS (*ctxAB-tcpA*⁺ и *ctxAB-tcpA*⁻) и CRISPR-Cas 1-го класса (*ctxAB-tcpA*⁻).

Обсуждение

Учитывая, что нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor циркулируют в открытых водоёмах, которые являются и местом обитания различных видов холерных фагов, ожидалось, что в их геноме будет обнаружено большое количество антифаговых систем. Однако в данных штаммах отсутствуют антифаговые острова PLE, BREX и DISARM-системы. У *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов не выявлены системы рестрикции–модификации I типа, которые обнаружены в геноме *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов. Гены системы CBASS присутствуют у единичных штаммов обеих групп. В то же время 35 изученных клинических и выделенных из водной среды на различных территориях России и сопредельных стран *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов содержат CRISPR–Cas-систему 1-го класса типов I и III, которая отсутствует в *ctxAB-tcpA*⁺-изолятах. При этом подтипы I-C и III-B выявлены в единичных штаммах. В то же время 57% штаммов имеют канонический тип системы I-E. Наши данные подтверждают ранее полученные сведения при анализе штаммов, циркулирующих на эндемичной территории, о широком распространении системы I-E среди нетоксигенных штаммов *V. cholerae* [20]. Ряд авторов высказывают предположение о том, что стабильное сохранение структуры системы I-E обусловлено тем, что она расположена на геномном острове GI-24 и перенос её в другие штаммы происходит только в составе указанного мобильного генетического элемента [20, 22]. Некоторые штаммы включали также полноценную систему I-F, которая входит в состав недавно обнаруженного острова патогенности VPI-6 (*Vibrio Pathogenicity Island*), способного, как и GI-24, целиком вырезаться из хромосомы и переноситься в другие клетки [23]. В то же время большая часть штаммов имела систему I-F mini, у которой рядом с локусами генов *cas* расположен ген *miQ*, ответственный за продукцию транспозазы. Согласно данным литературы, подобные системы ассоциированы с Tn7-транспозоном [20]. Учитывая отсутствие в данной системе гена *cas3*, кодирующего хеликазу–нуклеазу, можно предположить, что I-F mini является нефункциональной.

Поскольку новые спейсеры внедряются преимущественно в 5'-области системы, CRISPR представляет собой хронологическую запись взаимодействия бактерии с мобильными генетическими элементами. В связи с этим наличие у ряда штаммов спейсеров, гомологичных генетическому материалу фага ICP1, циркулирующему на эндемичных территориях, может указывать на завозной характер данных штаммов. Также очевидно, что, защищая *V. cholerae* от хищничества холерных фагов, а также фагов других бактерий, CRISPR–Cas-система повышает выживаемость нетоксигенных штаммов во внешней среде. Возможно, её присутствие является одним из механизмов длительной циркуляции нетоксигенных штаммов в воде открытых водоёмов.

Таким образом, изученные нетоксигенные *ctxAB-tcpA*⁺- и *ctxAB-tcpA*⁻-штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, выделяемые на территории России и сопредельных стран, лишены ряда мобильных генетических элементов с антифаговыми локусами (острова PLE, ICE SXT элементы с системами BREX и DISARM). В то же время в геноме *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов выявлена система рестрикции–модификации I типа, у одного штамма — CBASS (*ctxAB-tcpA*⁺ и *ctxAB-tcpA*⁻) и CRISPR–Cas 1-го класса (*ctxAB-tcpA*⁻).

Заключение

В результате проведённых исследований установлена гетерогенность изученных нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, циркулирующих на территории России и сопредельных стран, по наличию антифаговых систем, расположенных на мобильных генетических элементах, что расширяет сведения об их генетической организации. Установлено, что 80% изученных *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов содержат систему рестрикции–модификации I типа, которая не обнаружена у *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов. Единичные штаммы (1 *ctxAB-tcpA*⁺ и 3 *ctxAB-tcpA*⁻) имеют систему CBASS, при этом у *ctxAB-tcpA*⁺-изолята она является интактной и соответствует токсигенному референс-штамму *V. cholerae* N16961 O1 El Tor. В геноме 32% исследованных *ctxAB-tcpA*⁻-штаммов выявлена CRISPR–Cas-система 1-го класса типов I (подтипы I-E, I-F, I-F mini, I-C) и III (подтип III-B), отсутствующая у *ctxAB-tcpA*⁺-штаммов. При этом наиболее распространённой (57%) является каноническая система подтипа I-E. Присутствие нескольких типов и подтипов CRISPR–Cas-системы в геноме ряда штаммов может указывать на её неоднократное приобретение данными изолятами посредством горизонтального переноса. Анализ спейсеров в CRISPR-кассете позволяет выявлять нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 El Tor, завезённые с эндемичных по холере территорий.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю. и др. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью. *Генетика*. 2016;52(9):1029–41. DOI: <https://doi.org/10.7868/S0016675816060126> EDN: <https://elibrary.ru/wlnekj>
2. Смирнова Н.И., Кульшань Т.А., Баранихина Е.Ю., et al. Genome structure and origin of nontoxigenic strains of *Vibrio cholerae* of El Tor biovar with different epidemiological significance. *Genetics*. 2016; 52(9): 1029–41. DOI: <https://doi.org/10.1134/S1022795416060120> EDN: <https://elibrary.ru/xfheir>
3. Кругликов В.Д., Левченко Д.А., Титова С.В. и др. Холерные вибрионы в водоёмах Российской Федерации. *Гигиена и санитария*. 2019;98(4):393–9. Kruglikov V.D., Levchenko D.A., Titova S.V., et al. *Vibrio cholerae* in the waters of the Russian Federation. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2019;98(4):393–9. EDN: <https://elibrary.ru/dfqoan>
4. Левченко Д.А., Кругликов В.Д., Гаевская Н.Е. и др. Фено- и генотипические особенности нетоксигенных штаммов холерных вибрионов различного происхождения, изолированных на территории России. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2020;(3):89–96. Levchenko D.A., Kruglikov V.D., Gaevskaya N.E., et al. Phenotypic and genotypical features of non-toxicogenic strains of cholera vibrios of different origins, isolated in the territory of Russia. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(3):89–96. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-3-89-96> EDN: <https://elibrary.ru/rvjkhk>
5. Миронова Л.В., Бочалгин Н.О., Гладких А.С. и др. 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. Mironova L.V., Bochalgin N.O., Gladkikh A.S., et al. 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. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2020;(1):115–23. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2020-1-115-123> EDN: <https://elibrary.ru/uubigv>
6. Монахова Е.В., Носков А.К., Кругликов В.Д. и др. Генотипическая характеристика клональных комплексов CTX–VPI+ *Vibrio cholerae* O1, обнаруживаемых в водоемах Ростовской области. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(3):99–107. Monakhova E.V., Noskov A.K., Kruglikov V.D., et al. Genotypic characteristics of CTX–VPI+ clonal complexes of *Vibrio cholerae* O1 found in water bodies of the Rostov region. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(3):99–107. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-3-99-107>
7. Носков А.К., Кругликов В.Д., Москвитина Э.А. и др. Холера: анализ и оценка эпидемиологической обстановки в мире и России. Прогноз на 2023 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023;(1):56–66. Noskov A.K., Kruglikov V.D., Moskvitina E.A., et al. Cholera: analysis and assessment of epidemiological situation around the world and in Russia (2013–2022). Forecast for 2023. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2023;(1):56–66. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2023-1-56-66> EDN: <https://elibrary.ru/hzasbo>
8. Попова А.Ю., Носков А.К., Ежлова Е.Б. и др. Эпидемиологическая ситуация по холере в Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024;(1):76–88. Popova A.Yu., Noskov A.K., Ezhlova E.B., et al. Epidemiological situation on cholera in the Russian Federation in 2023 and forecast for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024;(1):76–88. DOI: <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-76-88> EDN: <https://elibrary.ru/ipvmuo>
9. Агафонова Е.Ю., Смирнова Н.И., Альхова Ж.В. и др. Нетоксигенные штаммы *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, выделенные на территории России: молекулярно-генетические особенности и патогенные свойства. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(2):13–24. Agafonova E.Yu., Smirnova N.I., Alkhova Zh.V., et al. On-toxicogenic strains of *Vibrio cholerae* biovar El Tor, isolated in the territory of Russia: molecular-genetic peculiarities and pathogenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology*. 2019;96(2):13–24. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-2-13-24> EDN: <https://elibrary.ru/yijsem>
10. Faruque S.M., Mekalanos J.J. Phage-bacterial interactions in the evolution of toxigenic *Vibrio cholerae*. *Virulence*. 2012;3(7):556–65. DOI: <https://doi.org/10.4161/viru.22351>
11. Angermeyer A., Hays S.G., Nguyen M.H.T., et al. Evolutionary sweeps of subviral parasites and their phage host bring unique parasite variants and disappearance of a phage CRISPR-Cas system. *mBio*. 2022;13(1):e03088-21. DOI: <https://doi.org/10.1128/mbio.03088-21>
12. Tumban E., ed. *Bacteriophages. Methods and Protocols*. New York: Humana Press; 2024.
13. Jermyn W.S., Boyd E.F. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology*. 2002;148(Pt. 11):3681–93. DOI: <https://doi.org/10.1099/00221287-148-11-3681>
14. Labrie S.J., Samson J.E., Moineau S. Bacteriophage resistance mechanisms. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010;8(5):317–27. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
15. Brenzinger S., Airolidi M., Ogunleye A.J., et al. The *Vibrio cholerae* CBASS phage defence system modulates resistance and killing by antifolate antibiotics. *Nat. Microbiol.* 2024;9(1):251–62. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41564-023-01556-y>
16. LeGault K.N., Hays S.G., Angermeyer A., et al. Temporal shifts in antibiotic resistance elements govern phage-pathogen conflicts. *Science*. 2021;373(6554):eabg2166. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.abg2166>
17. 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 – ЗНУСО*. 2023;31(11):94–100. Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Spirina A.Yu., Cheldyshova N.B. Analysis of Antiphage Systems in *Vibrio cholerae* O1 El Tor Bio-type Strains. *Public Health and Life Environment – PH&LE*. 2023;31(11):94–100. DOI: <https://doi.org/10.35627/2219-5238/2023-31-11-94-100> EDN: <https://elibrary.ru/miocic>
18. 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: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006838>
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):2348. DOI: <https://doi.org/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: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1005>
21. McDonald N.D., Regmi A., Morreale D.P., et al. CRISPR-Cas systems are present predominantly on mobile genetic elements in *Vibrio* species. *BMC Genomics*. 2019;20(1):105. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-019-5439-1>
22. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., et al. Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived

variants. *Nat. Rev. Microbiol.* 2020;18(2):67–83.

DOI: <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>

22. Chakraborty S., Waise T.M., Hassan F., et al. Assessment of the evolutionary origin and possibility of CRISPR-Cas (CASS) mediated RNA interference pathway in *Vibrio cholerae* O395. *In Silico Biol.* 2009;9(4):245–54.

Информация об авторах

Заднова Светлана Петровна — д-р биол. наук, в. н. с., зав. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Плеханов Никита Александрович — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, muscaris.sp@icloud.com, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Сергутин Данил Александрович — лаборант-исследователь лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, sergutin322@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7525-9682>

Челдышова Надежда Борисовна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. патогенных вибрионов отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Федоров Андрей Витальевич — м. н. с. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Краснов Ярослав Михайлович — канд. хим. наук, зав. лаб. геномного и протеомного анализа отдела микробиологии Российского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов, Россия, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Участие авторов: **Заднова С.П.** — формирование идеи, разработка концепции и дизайна исследования, оформление статьи, утверждение окончательного варианта; **Плеханов Н.А.** — существенный вклад в проведение исследования, анализ полученных данных, редактирование текста статьи; **Сергутин Д.А.** — проведение исследования, интерпретация полученных данных; **Челдышова Н.Б.** — проведение исследования; **Федоров А.В., Краснов Я.М.** — секвенирование, сборка и аннотация геномов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 09.06.2025;
принята к публикации 19.08.2025;
опубликована 28.08.2025

23. Carpenter M.R., Kalburge S.S., Borowski J.D., et al. CRISPR-Cas and contact-dependent secretion systems present on excisable pathogenicity islands with conserved recombination modules. *J. Bacteriol.* 2017;199(10):e00842-16.

DOI: <https://doi.org/10.1128/jb.00842-16>

Information about the authors

Svetlana P. Zadnova — Dr. Sci. (Biol.), leading researcher, Head, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, svetlanazadnova@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-4366-0562>

Nikita A. Plekhanov — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, muscaris.sp@icloud.com, <https://orcid.org/0000-0002-2355-7018>

Danil A. Sergutin — laboratory assistant, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, sergutin322@mail.ru, <https://orcid.org/0009-0003-7525-9682>

Nadezhda B. Cheldyshova — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of pathogenic vibrios, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5759-3765>

Andrey V. Fedorov — junior researcher, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", rusrapi@microbe.ru, Saratov, Russia, <https://orcid.org/0000-0001-7190-4427>

Yaroslav M. Krasnov — Cand. Sci. (Chem.), Head, Laboratory of genomic and proteomic analysis, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russia, rusrapi@microbe.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4909-2394>

Author contribution: **Zadnova S.P.** — formation of the idea, development of the concept and design of the study, preparation of the article, approval of the final version; **Plekhanov N.A.** — significant contribution to the study, analysis of the obtained data, editing the text of the article; **Sergutin D.A.** — conducting the study, interpretation of the obtained data; **Cheldyshova N.B.** — conducting the study; **Fedorov A.V., Krasnov Ya.M.** — sequencing, assembly and annotation of genomes. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 09.06.2025;
accepted for publication 19.08.2025;
published 28.08.2025