

На правах рукописи

Агафонова Елена Юрьевна

**ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ГЕНОМА НЕТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ
VIBRIO CHOLERAЕ O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Саратов – 2019

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель: **Смирнова Нина Ивановна**, доктор биологических наук, профессор

Официальные оппоненты: **Миронова Лилия Валерьевна**, доктор медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Иркутский ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией холеры

Ткаченко Галина Александровна, кандидат медицинских наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заведующая лабораторией генодиагностики

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится **«30» мая 2019 г.** в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук на базе Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46)

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert> Федерального казенного учреждения здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб»» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук

Микшис Наталья Ивановна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В различных регионах Российской Федерации (РФ) в поверхностных водоемах и от людей ежегодно выделяют нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, не имеющие профага СТХф с генами холерного токсина. Среди них выявляют изоляты, лишенные острова патогенности VPI-1 ($ctxA^-tcpA^-$) и содержащие этот участок ДНК ($ctxA^-tcpA^+$) с генами токсин-корегулируемых пилей (ТСП), обеспечивающих колонизацию тонкого кишечника (Костромитина Е.А., 2003; Осина с соавт., 2013; Зубкова с соавт., 2014; Левченко, 2018). Если штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^-$ относят к эпидемически безопасным, способным вызывать в ряде случаев лишь острые кишечные инфекции, то эпидемическая значимость штаммов $ctxA^-tcpA^+$, циркулирующих на территории РФ, остается не совсем ясной. До последнего времени многие исследователи считали, что штаммы с таким генотипом могут представлять потенциальную эпидемическую опасность, обусловленную возможностью их реверсии в токсигенные за счет приобретения профага СТХф с генами холерного токсина. Такое событие вполне возможно при их совместном обитании с токсигенными вибрионами, поскольку ТСП служат рецептором для фага СТХф (Faruque et al., 1998; Онищенко с соавт., 2007; Гриднева с соавт., 2014, Миронова, 2017). Однако, в отличие от эндемичных по холере регионов, в природных условиях РФ токсигенные штаммы не могут сохраняться во внешней среде длительное время. Отсутствие до сих пор единой оценки эпидемической значимости штаммов $ctxA^-tcpA^+$ является, видимо, следствием неполных сведений о структуре их геномов. Более того, происхождение различных групп нетоксигенных изолятов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор до сих пор остается неизвестным. Между тем, большое генетическое разнообразие нетоксигенных штаммов требует изучения состава и структурных особенностей участков их генома, связанных с патогенностью, персистентностью и эпидемичностью, на основе анализа полных геномов. Такие сведения необходимы для более полного понимания современной популяционной структуры нетоксигенных холерных вибрионов, циркулирующих на территории РФ и сопредельных стран, что может быть использовано для разработки новых молекулярно-генетических способов их дифференциации по эпидемической значимости, происхождения и путей заноса.

Представляет также интерес сравнительный анализ полногеномных последовательностей различных групп нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+$, выделенных на эндемичных и неэндемичных по холере территориях, и определение их филогенетических связей с токсигенными штаммами на основе SNP-типирования, что открывает возможность для получения более полных и объективных данных об их происхождении. Накопленная информация о структуре генома различных штаммов также может позволить разработать новый генодиагностический способ дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, имеющих разную эпидемическую значимость. Кроме того, получение экспериментальных нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+$ из токсигенных, а также сведений о структуре их генома создает возможность получения на их основе штамма, продуцирующего иммуногенную В-субъединицу холерного токсина. Все изложенное выше определяет

актуальность диссертационной работы, направленной на решение фундаментальных и прикладных задач.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время установлено, что у более 90% изученных нетоксигенных штаммов отсутствовали ключевые гены патогенности *ctxAB* и *tcpA-F* (*ctxA⁻tcpA⁻*), но имелся различный набор дополнительных генов: гены термолабильного гемолизина (*hlyA*), растворимой гемагглютинин/протеазы (*hapA*), цитотоксина RTX (*rtxA*) (Зубкова с соавт., 2014; Миронова, 2017; Левченко, 2018). Также из водных объектов окружающей среды и от людей за последние два десятилетия выделяли нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*, содержащие в геноме остров патогенности VPI-1 с генами *tcpA-F* (Онищенко с соавт, 2007; Осина с соавт, 2013; Зубкова с соавт., 2014; Гриднева с соавт., 2014; Миронова, 2017). Оценка эпидемической значимости таких штаммов была основана на выявлении только двух генов *ctxA* и *tcpA*, продукты которых определяли развитие лишь инфекционного процесса, но не учитывали гены, связанные с эпидемическим потенциалом и размещенные на островах пандемичности VSP-I и VSP-II. В настоящее время разработана схема расширенного ПЦР-типирования нетоксигенных штаммов на основе определения в геноме 14 генов, связанных с вирулентностью, персистенцией и системами секреции T6SS и T3SS (*rstA*, *tcpA*, *int*, *nanH*, *vce*, *rtxC*, *acd-rtx*, *acd-vgrG1*, *pbd-vgrG3*, *vasK*, *vcsN2*, *vspD*, *mshA*, *stn/sto*) для установления их генотипа (Левченко, 2018). Нашли широкое применение VNTR-, ПЦР- и INDEL-типирование различных нетоксигенных штаммов для определения их генетического сходства друг с другом (Водопьянов с соавт., 2017). Полногеномное секвенирование штаммов с генотипом *ctxA⁻tcpA⁺*, выделенных на Алтае (2011 г.) и в Ростове-на-Дону (2005 г.) (Миронова, 2018; Kuleshov et al., 2013), а также с генотипом *ctxA⁻tcpA⁻*, выделенных в Сочи (1975 г., 1980-1981 гг., 2007 г., 2015 г.), Ростове-на-Дону, Астраханской области и Республике Калмыкия (2008-2014 гг.) позволили провести SNP-типирование и установить их филогенетические связи между собой (Титова с соавт., 2016). Предложена также концепция о взаимозаменяемости факторов патогенности, которая позволяет нетоксигенным штаммам восстанавливать и поддерживать их патогенный потенциал за счет процессов горизонтального переноса генов (Монахова, 2013). Однако этих исследований явно недостаточно для более полного понимания variability генома различных популяций нетоксигенных штаммов, что необходимо для решения вопроса эпидемической значимости их различных групп, отличающихся друг от друга по составу, структуре и функции ключевых и дополнительных генов патогенности, персистенции и эпидемичности. Такие данные могут быть использованы для совершенствования микробиологического мониторинга вибриофлоры водоемов РФ и сопредельных государств.

Цель работы – выявление особенностей структуры генома нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на территории Российской Федерации и сопредельных стран, и их филогенетический анализ.

Задачи исследования:

1. Сравнительный анализ полногеномных последовательностей нетоксигенных $ctxA^-tcpA^-$ и $ctxA^-tcpA^+$ штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных на неэндемичных и эндемичных по холере территориях.

2. Определение методом SNP-типирования филогенетических связей нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разным генотипом ($ctxA^-tcpA^-VSP^-$, $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^+$) с токсигенными штаммами, выделенными в разные временные периоды 7-ой пандемии холеры.

3. Разработка способа дифференциации штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с различной эпидемической значимостью методом мультиплексной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов.

4. Использование нетоксигенного генетически измененного изолята *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ для получения штамма, продуцирующего иммуногенную В-субъединицу холерного токсина.

Научная новизна работы. По данным проведенного анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов 37 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных в неэндемичных (РФ, Украина, Грузия, Туркменистан) и эндемичных (страны Юго-Восточной Азии) по холере регионах, установлено их значительное генетическое разнообразие. Определено, что нетоксигенные штаммы на неэндемичной по холере территории (изучено 29 штаммов) представлены двумя генетически различными группами $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$, отличающимися друг от друга по составу мобильных элементов, определяющих их патогенный потенциал. Характерной особенностью штаммов первой группы ($ctxA^-tcpA^-VSP^-$) является отсутствие всех профагов вирулентности (СТХф, RS1ф, TLCф), острова патогенности VPI-1 и островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Впервые обнаружена нестабильность генетической структуры острова патогенности VPI-2, которая проявлялась в наличии делеций различной протяженности (от 33887-38081 п.н. до 47120-49986 п.н.) у всех исследованных штаммов. Получены новые данные о высоком уровне варибельности 16 генов кластера *msh* острова персистенции EPI, участвующих в образовании биопленки. Количество однонуклеотидных замен в них достигало 54-252 в зависимости от штамма. Многочисленные несинонимичные и синонимичные замены обнаружено также в генах коровой области *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Полученные данные позволили на генетическом уровне подтвердить эпидемическую безопасность этих штаммов.

Геном второй группы вибрионов ($ctxA^-tcpA^+VSP^-$) отличался от первой наличием у всех изолятов острова патогенности VPI-1 с геном $tcpA^{ET}$. Обнаружена нестабильность VPI-2, которая, в отличие от вибрионов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, выражалась в делеции участка ДНК протяженностью 33965-34352 п.н. лишь у 33,3% изученных штаммов. Однако в сохранившемся гене *nanH* этих штаммов выявили множество однонуклеотидных замен – 17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных. Варибельность генов *msh*, а также генов *hlyA*, *hapA* и *rtxA* была относительно невелика (число однонуклеотидных замен в них составляло 0-43 в зависимости от штамма). Приоритетными являются данные об

отсутствии островов пандемичности среди всех изученных штаммов $ctxA^-tcpA^+$, циркулирующих на территории РФ и в других неэндемичных по холере регионах. Полученные сведения приводят к заключению о том, что такие штаммы не могут нести потенциальную эпидемическую опасность.

На основе анализа нуклеотидных последовательностей восьми нетоксигенных штаммов с генотипом $ctxA^-tcpA^+$ из эндемичных по холере территорий (взяты из базы данных NCBI GenBank) установлено, что такие штаммы относились к третьей группе и отличались от первых двух присутствием островов пандемичности VSP-I и VSP-II. Более того, эти штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ имели значительное сходство с токсигенными изолятами. Отсутствие только профага СТХф при наличии в геноме всех других ключевых мобильных элементов с генами патогенности, эпидемичности и персистенции служит указанием на возможность их реверсии в токсигенные, вследствие чего они могут представлять потенциальную эпидемическую опасность.

Новые данные получены при SNP-типировании 47 токсигенных и нетоксигенных штаммов. Показано, что нетоксигенные штаммы с генотипом $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ имеют общее происхождение с токсигенными, тогда как нетоксигенные штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ относятся к двум отдельным филогенетически обособленным группам.

Один из итогов работы - разработка на основе полученных фундаментальных данных нового способа дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с разной эпидемической значимостью на основе метода ПЦР-ЭФ. В качестве ДНК-мишеней выбраны гены *ctxA*, *tcpA*, входящие в состав профага вирулентности СТХф и острова патогенности VPI-1, а также гены *vc0180* и *vc0514*, локализованные на островах пандемичности VSP-I и VSP-II, соответственно. Подтверждает новизну данного способа полученный патент на изобретение (Патент №2671412 от 31.10.2018 г., бюл. №31).

Получение нетоксигенного генетически измененного штамма с установленной структурой генома позволило также на его основе впервые сконструировать авирулентный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, продуцирующий иммуногенную В-субъединицу СТ, путем введения в его клетки клонированного гена *ctxB1* в составе рекомбинантной плазмиды.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные данные расширяют знания о геномном разнообразии нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих на территории РФ, способствуют пониманию их филогенетической истории и открывают перспективу для дальнейшего исследования преобразований генома возбудителя холеры, связанных с адаптацией к водной среде. На основе анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов определена современная структура популяций нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор из эндемичных и неэндемичных по холере территорий. Выявлены три основные группы с генотипом $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^+$, различающиеся организацией их геномов. Определены на основе полногеномного SNP-анализа филогенетические связи между различными группами нетоксигенных штаммов,

изолированными в разное время на территории различных регионов РФ и сопредельных стран. Подтверждено предположение о заносе штаммов $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ на территорию РФ.

В Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» депонированы сконструированные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с измененной продукцией термолабильного гемолизина (KM2041) и иммуногенной В-субъединицей холерного токсина (KM2042).

По материалам диссертации составлены методические рекомендации «Дифференциация нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^+$ по их эпидемической значимости методом мультиплексной ПЦР», одобрены Ученым советом (протокол №4 от 24.11.2017 г.) и утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

В международной базе данных NCBI GenBank депонированы 30 нуклеотидных последовательностей полных геномов нетоксигенных и 11 токсигенных штаммов холерного вибриона, выделенных на территории РФ, Украины, Туркменистана (1970-2017 гг.).

Полученные данные включены в лекции курсов «Бактериология. Основы безопасности работы с патогенными биологическими агентами I-II группы патогенности».

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нетоксигенные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующие на территории РФ и других исследованных неэндемичных по холере стран (Грузия, Туркменистан, Украина,) относятся к генотипам $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и различаются между собой по составу и структуре мобильных элементов с генами патогенности и персистенции. Отличительная особенность нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+$ из эндемичных по холере регионов состоит в присутствии в их геноме островов пандемичности VSP-I и VSP-II.

2. Вариабельность генома нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ определяется различными типами мутаций в генах острова патогенности VPI-2, острова персистенции EPI, а также генах коровой области *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности. В основе выявленной генетической гетерогенности нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ лежит присутствие разных аллелей гена *tcpA* из острова патогенности VPI-1 и генов *mshE*, *mshJ* из острова персистенции EPI, характерных для типичных или генетически измененных штаммов возбудителя холеры Эль Тор.

3. Нетоксигенные штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ с эндемичных по холере территорий (по данным полногеномного SNP-анализа) относятся к филогенетической линии, включающей токсигенные эпидемически опасные штаммы. Нетоксигенные штаммы $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ из неэндемичных регионов принадлежат к двум отдельным филогенетически обособленным группам, удаленным как от токсигенных изолятов, так и друг от друга.

4. Выбранные ДНК-мишени (*ctxA*, *tcpA*, *vc0180* и *vc0514*) и разработанный способ для дифференциации холерных вибрионов O1 биовара Эль Тор на основе мультиплексной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов обеспечивает определение эпидемической значимости нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор по выявлению в их геноме ключевых генов патогенности и эпидемичности.

5. На основе нетоксигенного генетически измененного штамма с установленной структурой генома сконструирован авирулентный штамм *V. cholerae* биовара Эль Тор E99 с нарушенным биосинтезом термолабильного гемолизина, который стабильно наследует рекомбинантную плазмиду рСТА27 с клонированным геном В-субъединицы холерного токсина и продуцирует в среду выращивания 6 мкг/мл этого иммуногенного белка.

Степень достоверности и апробации результатов. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании. В серии экспериментов показана воспроизводимость результатов. Сделанные выводы основываются на значительном объеме обработанных экспериментальных данных.

Материалы диссертации представлены на Проблемной комиссии (48.04): Холера и патогенные для человека вибрионы (Ростов-на-Дону, 2015, 2016), VII и VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены» (Санкт-Петербург, 2015; Москва, 2016), Международной конференции «Молекулярная диагностика – 2017» (Москва, 2017), IX Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2017), XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ» (Саратов, 2018), Международной конференции «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций», посвященной 110-летию со дня основания Санкт-Петербургского института эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и 95-летию со дня присвоения Институту имени Пастера (Санкт-Петербург, 2018), ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2016-2018).

Личный вклад автора состоит в непосредственном проведении сбора и анализа литературных данных по проблеме, участии в обсуждении цели и задач исследования, планировании экспериментов, получении и обработке экспериментальных данных. Выполнение отдельных этапов работы проведено совместно с сотрудниками лаборатории патогенных вибрионов (с.н.с. Щелкановой Е.Ю. и в.н.с. Тучковым И.В. – конъюгационные скрещивания, ненаправленный транспозонный мутагенез *V. cholerae* и рестрикционный анализ), лаборатории геномного и протеомного анализа (в.н.с. Красновым Я.М. и с.н.с. Альховой Ж.В., м.н.с. Баданиным Д.В. – полногеномное секвенирование). Подготовка основных публикаций осуществлена как лично автором, так и при его непосредственном участии.

Публикации и связь работы с научными программами. По теме диссертации опубликовано 13 работ, из которых 3 статьи в периодических изданиях из «Перечня ведущих рецензируемых научных журналов», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки России и 1 патент.

Работа выполнена в лаборатории патогенных вибрионов отдела микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках двух плановых научных тем: 47-4-14 «Молекулярно-генетический анализ механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор в современный период 7-ой пандемии холеры», 2014-2018 гг. (№ гос. регистрации 0120.0850501) и 76-4-19 «Комплексный геномно-протеомный анализ вариабельности эпидемически значимых свойств *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории Российской Федерации», 2019-2022 гг. (№ гос. регистрации АААА-А19-119011090022-8).

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, трех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 214 работ, их которых 80 отечественных и 134 зарубежных. Общий объем диссертации составляет 135 страниц. Текст иллюстрирован 8 таблицами и 19 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методология и методы исследования. Методологию работы определяли в соответствии с поставленной целью и задачами исследования.

Работа выполнена с использованием 190 штаммов микроорганизмов: 174 – *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, 6 – *V. cholerae* неO1/неO139, 5 штаммов близкородственных видов рода *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. albensis*, *V. vulnificus*, *V. anguillarum*, *V. alginolyticus*) и 5 штамма энтеробактерий (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Shigella sonnei*). Культивирование штаммов осуществляли на агаре и бульоне LB при 37°C с аэрацией и без нее. Применяли традиционные и современные микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы. Проводили конъюгационные скрещивания донорных и реципиентных штаммов, а также ненаправленный транспозонный мутагенез и рестрикционный анализ (Bradley et al., 1980; Журавлева, 1991; Маниатис с соавт., 1984). Продукцию холерного токсина оценивали с помощью РПИГ на плотной среде (Bramucei, Holmes, 1978) и иммуноферментным методом GM₁ELISA (Svennerholm et al., 1983; Iwanaga et al., 1986). Выделение ДНК проводили после предварительного обеззараживания культуры с применением коммерческих наборов «ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit» (Invitrogen, США). Полимеразную цепную реакцию проводили с использованием специфических праймеров и зондов на амплификаторах Mastercycler Gradient (Eppendorf, Германия) и Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen Inc, Германия). Полногеномное секвенирование проводили по технологии ионного полупроводникового секвенирования Ion Torrent на приборе «Ion PGM» (Thermo Fisher Scientific, США). Нуклеотидные последовательности полных геномов анализировали с использованием информационных ресурсов международной базы данных NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), а также с помощью

программного пакета Lasergene DNASTAR SeqMan pro, BEAST 2.4.0., а также freeware-программы BioEdit, MEGA 7, Mauve v.2.4.0, Figtree v. 1.4.3. Конструирование праймеров осуществляли с помощью программ Integrated DNA Technologies (<https://eu.idtdna.com/pages/home>) и Oligo 6.0.

1. Вариабельность генома нетоксигенных штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор, изолированных на территории Российской Федерации и сопредельных стран.

Для решения поставленной задачи было проведено секвенирование полных геномов 29 нетоксигенных штаммов, выделенных в РФ и сопредельных странах (Туркменистан, Украина) и взятых для сравнения 7 токсигенных изолятов, занесенных из эндемичных по холере регионов. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей показал, что в геномах токсигенных штаммов присутствовал полный набор мобильных элементов, несущих основные гены, обеспечивающие их патогенный (СТХф, RS1ф, TLCф, VPI-1, VPI-2), эпидемический (VSP-I и VSP-II) персистентный потенциал (EPI) (рисунок 1). Исследование генома 29 нетоксигенных штаммов позволило разделить их на две группы. В первую вошли 14 штаммов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, геномы которых отличались от токсигенных вибрионов отсутствием всех участков, несущих основные гены вирулентности (профаг СТХф и остров патогенности VPI-1) и эпидемичности (острова пандемичности VSP-I и VSP-II). Вместе с тем в хромосоме всех штаммов был обнаружен делетированный остров патогенности VPI-2. При этом структура VPI-2 оказалась гетерогенной (рисунок 1). Три штамма (617, 433 и M1332) утратили весь этот участок ДНК, сохранив только единичные краевые гены. Протяженность делеции их VPI-2 составила 47120-49986 п.н. У 11 других штаммов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ этот мобильный элемент нес также делеции, но их протяженность была меньше – 33887-38081 п.н вследствие полного или частичного отсутствия двух больших участков ДНК, содержащих гены рестрикции-модификации и гены, подобные генам фага Mu. Вместе с тем в геноме всех штаммов присутствовал остров персистенции EPI, включающий 16 генов *msh*, основная функция которых состоит в участии формирования вибрионами биопленки. Однако у 14 штаммов во всех генах *msh* были синонимичные или несинонимичные замены (от 54 до 252). Помимо измененных мобильных элементов нуклеотидная последовательность коровых генов *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности, также отличалась от таковой референсного токсигенного штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор N16961 многочисленными однонуклеотидными заменами. Так, в гене *hlyA* общее количество замен достигало 17-45, в гене *hapA* их было от 1 до 33 в зависимости от изолята, а наиболее высокий уровень вариабельности нуклеотидной последовательности был характерен для гена *rtxA* – 11-74 несинонимичных и 19-196 синонимичных замен. Кроме того, в гене *rtxA* штамма M1522 была обнаружена вставка из шести нуклеотидов в позиции 4130-4135.

Таким образом, представленные данные свидетельствуют о значительном геномном разнообразии нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ по составу и структуре мобильных элементов, а также структуре генов коровой области генома.

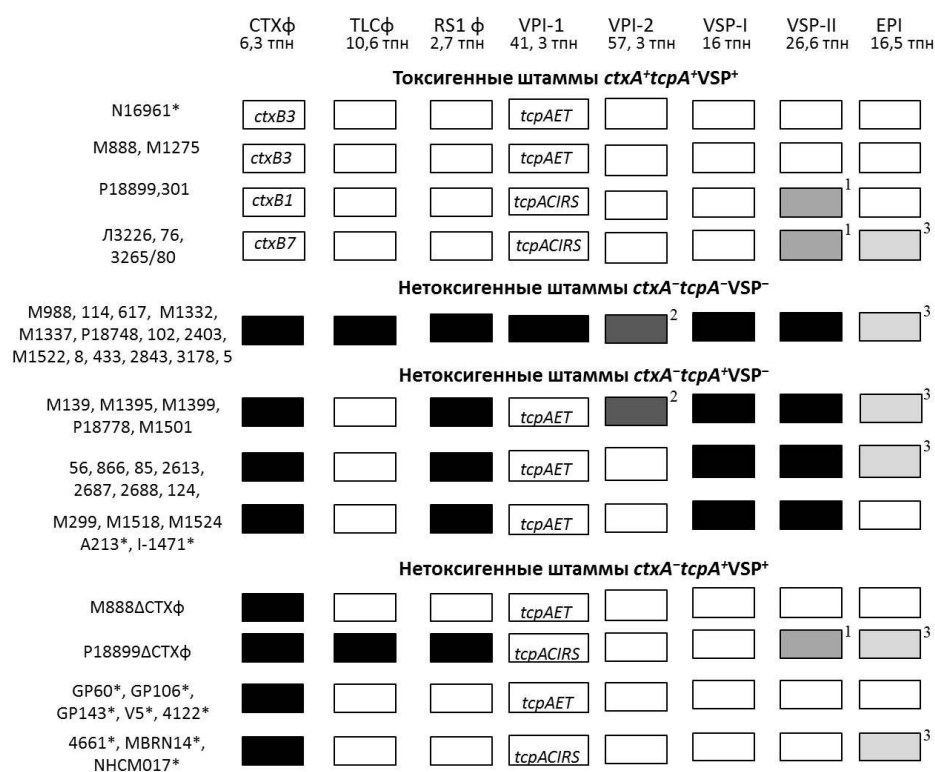


Рисунок 1. Схема структуры генома токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор по данным полногеномного секвенирования. Белым цветом обозначены мобильные элементы, структура которых идентична таковой референсного штамма N16961; серым цветом – с измененной структурой; черным цветом – их отсутствие в геноме; *нуклеотидные последовательности геномов, включая референсный штамм N16961, взятые из NCBI GenBank; 1 – VSP-II с протяженной делецией (13,1 т.п.н.); 2 – VPI-2 с делециями разной протяженности; 3 – EPI с нуклеотидными заменами.

Вторая группа нетоксигенных штаммов состояла из 15 изолятов *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VSP*⁻, выделенных (1965-2017 гг.) в различных регионах РФ, Украине и Туркменистане. В отличие от первой группы в их геноме присутствовали три мобильных элемента, несущих гены, связанные с вирулентностью: профаг TLCφ и два острова патогенности – VPI-1 и VPI-2 (рисунок 1). Тем не менее, нуклеотидная последовательность VPI-1 этих изолятов отличалась от таковой референсного штамма наличием мутаций в разных генах: одиночных нуклеотидных замен, а также вставок и делеций разной протяженности (от 1 до 31 п.н.). Вместе с тем у всех изученных штаммов, за исключением одного, основной структурный ген вирулентности *tcpA* был идентичен таковому типичных штаммов возбудителя холеры Эль Тор.

Результаты сравнительного анализа нуклеотидной последовательности острова патогенности VPI-2 показали также на гетерогенность его структуры у этих вибрионов, хотя уровень варибельности был ниже по сравнению со штаммами первой группы. Среди 15 изолятов *ctxA*⁻*tcpA*⁺*VSP*⁻ у 10 (66,8%) этот ОП был идентичен по структуре таковому токсигенных штаммов. В то же время пять штаммов (33,3%) утратили

значительную его часть размером 33965-34352 п.н., включающую практически все гены рестрикции – модификации и гены, подобные генам фага Mu. Сохранился только центральный район, содержащий ген *nanH* и прилежащую к нему область *nan-nag*. Однако в их гене *nanH* были обнаружены многочисленные однонуклеотидные замены – 17-19 несинонимичных и 46-47 синонимичных в зависимости от штамма.

Помимо островов патогенности в геноме указанных штаммов присутствовал остров персистенции в окружающей среде – EPI. В отличие от нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* в генах *msh* этой группы вибрионов было выявлено незначительное число однонуклеотидных замен. При этом все структурные гены (*mshFBACDOPQ*) были интактными, а в генах секреторного аппарата (*mshIJKLMNEG*) их число колебалось от 0 до 43. Что касается генов коровой области *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, то замены были обнаружены лишь у двух из них – *hlyA* и *rtxA*. Все штаммы в гене *hlyA* несли единственную несинонимичную замену тимина (Т) на цитозин (С) в позиции 1358. В гене *rtxA* были также две несинонимичные замены G/A и A/G в позициях 6901 и 8731 соответственно, которые и по данным Dolores J., Satchell K.J.F. (2013) являлись маркерными для этой группы холерных вибрионов. Следует отметить, что эти штаммы, также как и изоляты *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻*, были лишены двух островов пандемичности VSP-I и VSP-II.

Наличие гена *tcpA*, входящего в состав VPI-1, у холерных вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻* ранее давало основание полагать, что данные штаммы могут представлять потенциальную эпидемическую опасность за счет возможной реверсии их в токсигенные в результате фаговой конверсии. Но полученные нами новые данные об отсутствии у них островов пандемичности VSP-I и VSP-II говорят, что образование из них эпидемически опасных штаммов за счет одновременного приобретения не только профага СТХф с генами СТ, но и других протяженных участков ДНК (VSP-I и VSP-II) практически невозможно в природных условиях. Такие штаммы, циркулирующие на неэндемичных по холере территориях (РФ, Грузии, Туркменистане, Украине), также являются эпидемически безопасными. Таким образом, установлено, что нетоксигенные штаммы с генотипом *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* и *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻*, выделенные на неэндемичных по холере территориях, различались между собой не только по составу мобильных элементов, связанных с патогенностью. Выявлены значительные отличия сравниваемых групп по количеству различного типа мутаций (однонуклеотидные замены, вставки и делеции разной протяженности) как в общих мобильных элементах, так и в изученных коровых генах. Таких мутаций было значительно больше в геноме штаммов *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* по сравнению с изолятами *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻*.

Наряду с природными изолятами из неэндемичных по холере территорий провели анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей восьми нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* из эндемичных по этой инфекции регионов, представленных в базе данных NCBI GenBank. В результате установили, что генотип изученных штаммов был иной (*ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺*), поскольку они были лишены лишь профага СТХф, но содержали все другие мобильные элементы с генами вирулентности и эпидемичности (рисунок 1). Выявленные штаммы, в отличие от изолятов второй группы с генотипом

ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻, несли разные аллельные варианты гена *tcpA*: *tcpA^{ET}* или *tcpA^{CIRS}*, характерные как для типичных штаммов возбудителя, так и для их геновариантов (рисунок 1). Такую же картину наблюдали и в отношении структуры кластера генов *msh*, входящих состав острова EPI. Ряд штаммов (GP60, GP106, GP143, V5) имели EPI, идентичный по структуре таковому типичных токсигенных штаммов, тогда как у других (4661, MBRN14, NHCM017, 4122) в генах *mshE* и *mshJ* присутствовали однонуклеотидные замены (G/A в позиции 1219 и A/G в позиции 560 соответственно), характерные для природных генетически измененных штаммов. Более того, у всех изученных штаммов структура острова патогенности VPI-2 была идентична таковой токсигенных штаммов и в геноме сохранились острова пандемичности VSP-I и VSP-II. Совокупность приведенных данных может означать, что такие нетоксигенные штаммы могли быть производными различных токсигенных штаммов (типичные и генетически измененные), обитающих в открытых водоемах в эндемичных по холере странах. Присутствие в их геноме почти 92% генов патогенности и эпидемичности, имеющих у референсного штамма N16961 свидетельствует о том, что только эта группа нетоксигенных штаммов, сохранивших эпидемический потенциал, действительно может представлять потенциальную эпидемическую опасность. Это связано возможностью приобретения ими генов СТ в составе профага СТХф посредством фаговой конверсии и, как следствие, формирования токсигенных эпидемически опасных штаммов.

Таким образом, проведенный геномный анализ показал, что нетоксигенные штаммы холерного вибриона Эль Тор из эндемичных и неэндемичных по холере регионов представлены тремя основными генетически различными группами, отличающимися друг от друга по составу мобильных элементов, определяющих их патогенный и эпидемический потенциал. Значительная часть нетоксигенных штаммов, обитающих в природных условиях РФ и других неэндемичных по холере стран, представлена изолятами *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻*. Впервые обнаружили штаммы *ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻* с делетированным VPI-2, сохранившим участок этого острова, связанный с продукцией фермента патогенности и персистенции нейраминидазы. Помимо указанной группы на территории РФ и сопредельных стран циркулировали нетоксигенные вибрионы *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻*, геномы которых отличались от изолятов первой группы наличием VPI-1 и интактного VPI-2 у 66,7% изученных штаммов. В то же время было обнаружено, что у 33,3% штаммов VPI-2 был делетирован. Сохранение гена *tcpA* в составе острова патогенности VPI-1 дает основание предполагать, что такие вибрионы способны колонизировать кишечник человека без развития инфекционного процесса, характерного для холеры. Что касается третьей группы (*ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺*), то она состоит из нетоксигенных вибрионов, не имеющих только профага СТХф и являющихся, видимо, производными токсигенных штаммов. Такие штаммы не были обнаружены в открытых водоемах РФ и других неэндемичных по холере регионах. Однако нельзя исключить возможность их заноса в нашу страну из эндемичных по холере стран.. Важный на наш взгляд результат геномного анализа - установление отсутствия островов пандемичности не только у штаммов *ctxA⁻tcpA⁻*, но и у холерных вибрионов *ctxA⁻tcpA⁺*,

циркулирующих на территории РФ и в других эндемичных по холере регионах. Это означает, что такие штаммы не представляют потенциальной эпидемической опасности.

Выявленные геномные различия между сравниваемыми генотипами нетоксигенных штаммов ставят вопрос об их филогенетических связях, а также о филогенетической близости с токсигенными штаммами. В этой связи был проведен SNP-анализ секвенированных полных геномов 47 изолятов, из которых 41 относились к нетоксигенным штаммам и шесть к токсигенным. При сравнении полных геномов исследуемых штаммов с референсной последовательностью штамма *V. cholerae* биовара Эль Тор N16961 выявили 76438 однонуклеотидных полиморфизмов или SNPs. На основе байесовского анализа нуклеотидных последовательностей SNPs геномов указанных штаммов было построено филогенетическое дерево, на котором четко видно деление штаммов на три больших кластера (рисунок 2). Все токсигенные штаммы (шесть изолятов) входили в один кластер, обозначенный как второй, который содержал и референсный штамм N16961 (Бангладеш, 1975 г.), являющийся типичным штаммом возбудителя холеры. Особый интерес представляло присутствие в этом кластере всех исследованных нетоксигенных штаммов, лишенных только профага CTXφ (GP60, GP106, GP143, V5, 4661, MBRN14, NHCM017, 4122) и выделенных на эндемичных по холере территориях. В их геноме присутствовали VSP-I и VSP-II. Такие результаты свидетельствуют о том, что эти изоляты могут являться производными токсигенных, в геноме которых произошла делеция профага вирулентности CTXφ при нахождении их в водной среде. В целом относительно небольшие различия между штаммами внутри этого кластера (от 9 до 116 SNPs) указывают на их филогенетическую близость.

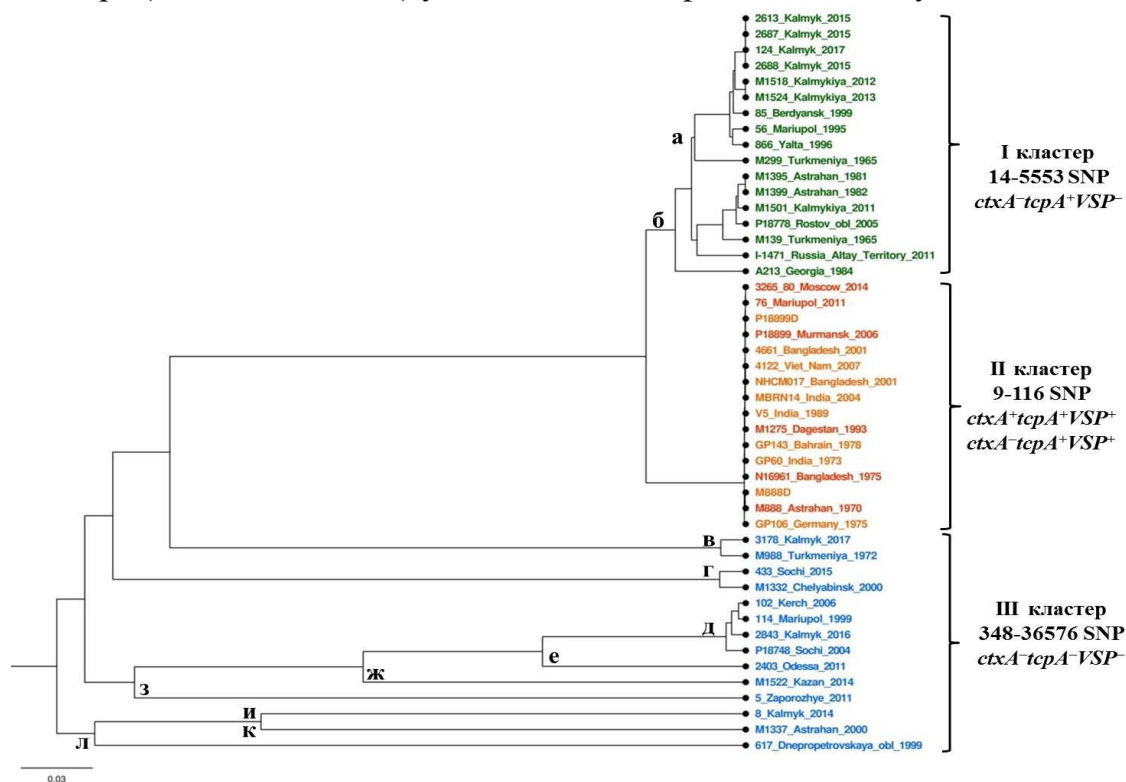


Рисунок 2. Филогенетические связи токсигенных и нетоксигенных штаммов на основе байесовского анализа (пакет программ «BEAST» 2.3.0; байесовский анализ проведен с использованием модели General Time Reversible).

Нетоксигенные штаммы, не имеющие островов пандемичности VSP-I и VSP-II, а также других мобильных элементов с генами вирулентности, вошли в состав отдельных кластеров (первый и третий), отличия которых от токсигенного референсного штамма, а также между собой были весьма существенны. Первый кластер образовали штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ (17 изолятов) (рисунок 2, кластер I), выделенные на неэндемичных по холере территориях (РФ, Грузия, Украина, Туркменистан), которые имели аллель гена $tcpA^{ET}$, характерный для типичных штаммов *V. cholerae* Эль Тор, но были лишены островов пандемичности (рисунок 2). Различия между штаммами второго кластера были больше таковых в сравнении с изолятами первого кластера и составляли 14-5553 SNPs, что указывает на их гетерогенность. Выявлены, по крайней мере, две подгруппы (рисунок 2, кластер II, подгруппы «а», «б»), среди которых в подгруппу «а» вошли шесть штаммов (124, 2613, 2687, 2688, M1518, M1524), изолированных в Калмыкии в 2013-2017 гг., что может указывать на циркуляцию в этом регионе одной и той же популяции. Вместе с тем штамм M1501, выделенный также на этой территории в 2011 г., но вошедший в подгруппу «б», являлся, видимо, представителем другой обособленной популяции холерных вибрионов, независимо занесенных на территорию Калмыкии. В целом кластер I, состоящий из нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+VSP^-$, отличался от кластера токсигенных штаммов в среднем на 5708 SNPs. Третий кластер был образован нетоксигенными $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ штаммами (14 изолятов) (рисунок 2). На филогенетическом дереве четко видна обособленность изолятов этой группы, как от первого, так и второго кластеров. Об этом свидетельствуют огромные различия между штаммами данного кластера и изолятами из кластеров I и II, достигающие 23350 SNPs и 24812 SNPs соответственно. Выраженные различия между штаммами этого кластера (348-36576 SNPs) указывают на очень высокий уровень их генетической разнородности. В эту группу штаммов включено девять различных подгрупп («в», «г», «д», «е», «ж», «з», «и», «к», «л») (рисунок 2, кластер III).

Таким образом, на основании данных полногеномного SNP-анализа 47 штаммов холерных вибрионов биовара Эль Тор показано, что нетоксигенные штаммы разных генотипов представляют собой три филогенетически обособленные группы.

2. Разработка способа дифференциации нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с различной эпидемической значимостью методом мультиплексной полимеразной цепной реакции.

Проведенный выше анализ геномного разнообразия нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, циркулирующих на неэндемичных и эндемичных по холере территориях, показал необходимость разработки способа их дифференциации по эпидемической значимости, основанного на выявлении генов патогенности и эпидемичности методом ПЦР. Для детекции штаммов с разным набором этих генов были выбраны четыре мишени. В качестве первой мишени был взят ген $ctxA$, кодирующий А-субъединицу СТ и размещенный на профаге СТХф. Второй мишенью служил ген $tcpA$, ответственный за синтез основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии и локализованный на острове патогенности VPI-1. В качестве третьей и четвертой мишеней были выбраны гены $vc0180$, кодирующий

гипотетический белок, и *vc0514*, кодирующий метил-акцепторный белок хемотаксиса, которые входили в состав островов пандемичности VSP-I и VSP-II соответственно. Праймеры на гены *vc0180*, *vc0514*, *ctxA* и *tcpA* обеспечивают образование фрагментов размером 719 п.н., 604 п.н., 525 п.н. и 456 п.н. соответственно. Мультиплексную ПЦР проводили в один прием в двух реакционных смесях. В реакционную смесь №1 вошли праймеры к генам *vc0180* и *vc0514*, а в реакционную смесь №2 – *ctxA* и *tcpA*. Была подобрана оптимальная программа амплификации: предварительная денатурация при 95°C – 5 мин, далее 32 цикла, включающих денатурацию при 95°C – 30 с, отжиг праймеров при 56,7°C – 30 сек, синтез комплементарной цепи – 72°C в течение 1 мин. Заключительным этапом амплификации является достройка цепи при 72°C – 3 мин. Учет результатов проводили в соответствии с идентификационной таблицей 1.

Таблица 1. Учет результатов мультиплексной ПЦР для дифференциации штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор с различной эпидемической значимостью

Пробы	Реакционная смесь №1		Реакционная смесь №2		Результаты
	<i>vc0180</i> *719 п.н.	<i>vc0514</i> *604 п.н.	<i>ctxA</i> *525 п.н.	<i>tcpA</i> *456 п.н.	
ОКО	–	–	–	–	Результаты анализа подлежат учету.
	Наличие хотя бы одного ампликона				Результаты анализа не подлежат учету.
ПКО	+	+	+	+	Результаты подлежат учету
Исследуемые пробы	+	+	+	+	Токсигенный эпидемически опасный штамм <i>V.cholerae ctxA⁺tcpA⁺VSP⁺</i>
	+	+	–	+	Нетоксигенный потенциально эпидемически опасный штамм <i>V. cholerae ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺</i>
	–	–	–	+	Нетоксигенный эпидемически безопасный штамм <i>V. cholerae ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻</i>
	–	–	–	–	Нетоксигенный эпидемически безопасный штамм <i>V. cholerae ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻</i>

Примечание: ОКО – отрицательный контрольный образец, ПКО – положительный контрольный образец.*- указаны размеры образуемых в ПЦР фрагментов ДНК.

Специфичность разработанной мультиплексной ПЦР была подтверждена с использованием штаммов *V. cholerae* неO1/неO139, штаммов близкородственных видов рода *Vibrio* (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. anguillarum*, *V. albensis*, *V. vulnificus*),

а также штаммов энтеробактерий (*E. coli*, *S. enteritidis*, *Sh. sonnei*). При проведении ПЦР-тестирования указанных штаммов был получен отрицательный результат, что указывает на 100 % специфичность мультиплексной ПЦР.

Эффективность разработанной мультиплексной ПЦР подтверждена исследованием 25 токсигенных и 142 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. В результате выявлено 4 группы штаммов. К первой были отнесены все токсигенные штаммы, у которых происходило образование четырех фрагментов размерами 719 п.н., 604 п.н., 525 п.н., 456 п.н., соответствующих генам *vc0180*, *vc0514*, *ctxA* и *tcpA*. Во вторую группу вошли 9 нетоксигенных штаммов, для которой характерно образование трех фрагментов, соответствующих по размерам генам *vc0180*, *vc0514* и *tcpA*, т.е. генотип штаммов *ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺* (рисунок 3, дорожка 2). Третья (30 изолятов) и четвертая (103 изолят) группы состояли из нетоксигенных штаммов (*ctxA⁻tcpA⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻*). Для третьей группы характерно образование только одного фрагмента (рисунок 3, дорожка 3), соответствующего гену *tcpA*, а у штаммов четвертой группы не происходит образование ни одного фрагмента (рисунок 3, дорожка 4) детектируемых генов ввиду отсутствия таковых в их геноме.

Таким образом, впервые разработан способ на основе мультиплексной ПЦР-ЭФ, позволяющий дифференцировать штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор на токсигенные эпидемически опасные, нетоксигенные потенциально эпидемически опасные и нетоксигенные эпидемически безопасные. Созданный способ специфичен, эффективен и может быть использован при проведении расширенного генодиагностического анализа штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, изолированных при мониторинговых исследованиях объектов окружающей среды.

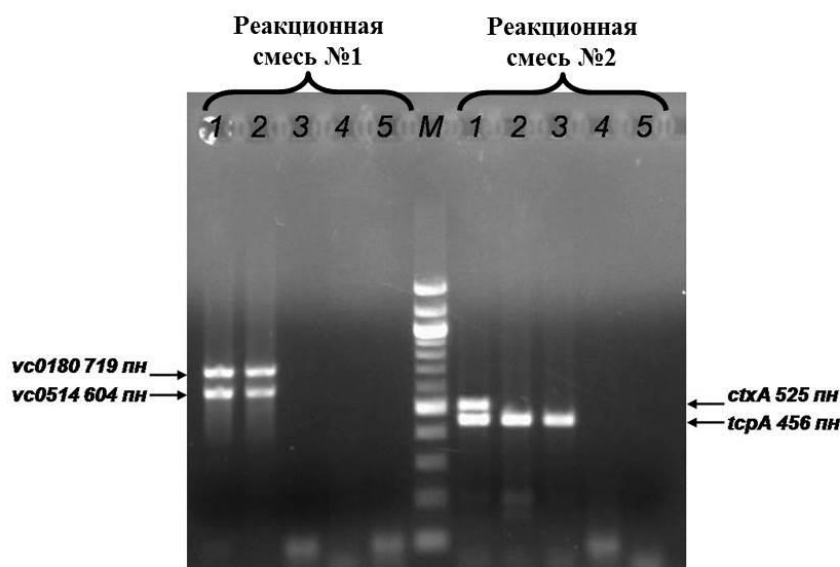


Рисунок 3. Электрофореграмма штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемической значимостью. Дорожка 1 – *V. cholerae ctxA⁺tcpA⁺VSP⁺*, дорожка 2 – *V. cholerae ctxA⁻tcpA⁺VSP⁺*, дорожка 3 – *V. cholerae ctxA⁻tcpA⁺VSP⁻*, дорожка 4 – *V. cholerae ctxA⁻tcpA⁻VSP⁻*, дорожка 5 – отрицательный контроль (дистиллированная вода).

3. Использование нетоксигенного штамма *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор для получения авирулентного штамма, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина.

Получение сведений о структуре генома нетоксигенных штаммов разных генотипов, включая генетически измененные, определило возможность использования одного из них для создания нового авирулентного штамма, продуцирующего В-субъединицу холерного токсина – протективного антигена, обеспечивающего формирование антитоксического иммунитета при холере. Для решения этой задачи использовали прототрофный нетоксигенный мутант генетически измененного штамма с изученной структурой генома, полученный нами в результате спонтанной утраты профага СТХф с генами *ctxAB1*, кодирующими СТ, из токсигенного штамма *V. cholerae* P18899СТХфТох⁺Нly⁺Str^R, продуцирующего 0,8 мкг/мл В-субъединицы в составе холерного токсина. Нетоксигенный штамм P18899ΔСТХфТох⁻Нly⁺Str^R секретировал в среду культивирования термолabileмный гемолизин, что затруднило бы анализ большого количества клонов с клонированным геном *ctxB* на их способность к продукции В-субъединицы простым методом РПИГ на плотной среде. В этой связи на первом этапе работы для повреждения одного из генов *hly*, определяющих биосинтез гемолизина, использовали метод ненаправленного транспозонного мутагенеза, применив транспозон (Km^R). Вектором для введения Tnp_hoA в холерные вибрионы служила суицидная плазмида pRT733 (Ap^RKm^R). Перенос плазмиды из донорного штамма *E. coli* SM10 (Tnp_hoA) Km^RAp^R в клетки штамма-реципиента *V. cholerae* P18899ΔСТХфТох⁻Нly⁺Str^R проводили методом конъюгации. Селектируемым классом были трансконъюганты с фенотипом Str^RKm^RAp^S. В итоге было отобрано 1200 Km^RAp^S-клонов P18899ΔСТХф, несущих в хромосоме транспозон. Среди них было найдено три Km^R-мутанта, которые не продуцировали гемолизин.

Для конструирования штамма с продукцией В-субъединицы на основе полученного штамма P18899ΔСТХфТох⁻Нly⁻Km^R была использована рекомбинантная коинтегративная конъюгативная плазмида pIEM3, которая образована за счет объединения двух плазмид – конъюгативной pIEM1 и неконъюгативной pСТА27 (Ильина с соавт., 1989). Плазмида pIEM1 несла маркер устойчивости к канамицину (Km^R). Плазмида pСТА27 содержала ген резистентности к тетрациклину и клонированный *Pst*I-фрагмент профага СТХф токсигенного штамма *V. cholerae* RV79 биовара Эль Тор с интактным геном *ctxB1*. Методом конъюгации в реципиентный штамм P18899ΔСТХфТох⁻Нly⁻Km^R вводили плазмиду pIEM3 (Km^RTc^R) из донорного штамма *E. coli* KS164 *thy polA* (pIEM3). Селективной средой служил агар с добавлением тетрациклина и канамицина. Взятые для изучения 30 Km^RTc^R трансконъюгантов содержали плазмиду pIEM3 с клонированным геном *ctxB1*, что было установлено методом ПЦР, и эффективно продуцировали В-субъединицу, определенную методом РПИГ. Последующий рестрикционный анализ плазмидной ДНК одного произвольно выбранного Km^RTc^R-клона *V. cholerae* с помощью эндонуклеаз рестрикции *Pst*I и *Xho*I, имеющих разные сайты узнавания в pСТА27 и pIEM1, показал, что в клетках исследованного клона произошло разъединение плазмидного коинтеграта при

сохранении лишь неконъюгативной многокопийной плазмиды pCTΔ27. Далее, методом ELISA установили, что клоны с фенотипом Km^RTc^R продуцировали 5-6 мкг/мл данного белка. Один из клонов с наиболее высокой продукцией В-субъединицы (6 мкг/мл) был выбран для дальнейшей работы и обозначен как E99. Стабильность наследования плазмиды pCTΔ27 в клетках трансконъюгантов в отсутствие селективного давления составила 95%. Итак в результате двух этапов работы на основе нетоксигенного генетически измененного штамма *V. cholerae* P18899ΔCTXφTox⁻Nly⁺ O1 биовара Эль Тор создан новый штамм, продуцирующий В-субъединицу СТ. Преимущества нового штамма в сравнении с ранее созданными в РФ продуцентами (*E. coli* KS3045 и *V. cholerae* неO1/неO139 KM93 ade⁻) состоят в быстром росте на среде культивирования (за счет прототрофных свойств) и способности к секреции В-субъединицы из клетки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАБОТЫ

Таким образом, в результате секвенирования и анализа полногеномных последовательностей нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, изолированных на территории РФ и других неэндемичных и эндемичных по холере стран, получены новые сведения о вариабельности их геномов, эпидемической значимости и филогенетических связях с токсигенными изолятами. Впервые разработан способ для дифференциации нетоксигенных штаммов по эпидемической значимости. На основе одного из них с установленной структурой генома сконструирован новый штамм, продуцирующий В-субъединицу холерного токсина. Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего изучения функциональной вариабельности генома *V. cholerae* O1 в меняющихся условиях внешней среды, поиска новых генетических маркеров нетоксигенных вибрионов с разным генотипом и усовершенствования лабораторной диагностики холерных вибрионов за счет создания коммерческих тест-систем для дифференциации штаммов с различной эпидемической значимостью. Кроме того эффективная экспрессия гена *ctxB1* в клетках штамма E99 (превышающая в 7 раз уровень продукции В-субъединицы в составе СТ у исходного токсигенного генетически измененного штамма P18899) дает возможность использовать его для получения В-субъединицы СТ. К тому же сконструированный на основе геноварианта *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор этот штамм, в перспективе может быть использован для повышения эффективности вакцины холерной бивалентной химической, для приготовления которой используются лишь штаммы холерного вибриона классического биовара.

ВЫВОДЫ

1. На основе анализа нуклеотидных последовательностей полных геномов 37 нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор установлено отсутствие островов пандемичности VSP-I и VSP-II у штаммов с генотипами *ctxA⁻tcpA⁺* и *ctxA⁻tcpA⁻*, выделенных в Российской Федерации и других свободных от холеры стран (Грузия, Украина, Туркменистан). В геноме нетоксигенных штаммов *ctxA⁻tcpA⁺* из эндемичных по холере регионов VSP-I и VSP-II присутствуют. Выявление разных

генотипов нетоксигенных штаммов, характерных для неэндемичных ($ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^+VSP^-$) и эндемичных ($ctxA^-tcpA^+VSP^+$) по холере стран, определяет возможность оценки их эпидемической значимости.

2. Выявлена большая вариабельность генома нетоксигенных штаммов $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, что обусловлено различными типами мутаций (делеций, однонуклеотидных замен, вставок) в генах острова патогенности VPI-2, острова персистенции EPI, а также в генах коровой области генома *hlyA*, *hapA* и *rtxA*, кодирующих дополнительные факторы патогенности. Наиболее вариабельными были геномы штаммов $ctxA^-tcpA^-VSP^-$, что выразалось в наличии протяженных делеций (от 33887-38081 до 47120-49986 п.н.) в VPI-2, многочисленных однонуклеотидных замен в генах *msh* из EPI (от 54 до 252), а также в коровых генах *hlyA*, *hapA* и *rtxA*.

3. При полногеномном SNP анализе 47 токсигенных и нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 Эль Тор выделено три филогенетически обособленные группы нетоксигенных изолятов. Установлена тесная филогенетическая связь холерных вибрионов $ctxA^-tcpA^+VSP^+$ из эндемичных по холере регионов с токсигенными штаммами. Нетоксигенные штаммы $ctxA^-tcpA^+VSP^-$ и $ctxA^-tcpA^-VSP^-$ принадлежат к двум отдельным ветвям эволюции, удаленным как друг от друга, так и от токсигенных.

4. Разработан способ на основе мультиплексной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов, обеспечивающий оценку эпидемической значимости нетоксигенных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор по выявлению в их геноме ключевых генов патогенности и эпидемичности.

5. На основе нетоксигенного генетически измененного штамма с установленной структурой генома сконструирован авирулентный штамм *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор E99ΔСТХфрСТА27Hly⁻, продуцирующий В-субъединицу холерного токсина. Штамм стабильно наследует рекомбинантную плазмиду рСТА27 с клонированным геном холерного токсина *ctxB1* и характеризуется высоким уровнем продукции этого протективного антигена (6 мкг/мл).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Смирнова Н.И. Структура генома и происхождение нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью / Н.И. Смирнова, Т.А. Кульшань, **Е.Ю. Баранихина***, Я.М. Краснов, Д.А. Агафонов, В.В. Кутырев // Генетика. – 2016. – 52(9). – С. 1029-1041. (журнал из Перечня ВАК)
2. Смирнова Н.И. Конструирование и изучение свойств авирулентного генетически измененного штамма *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с инактивированными генами термолабильного гемолизина и эффективной экспрессией клонированного гена В-субъединицы холерного токсина / Н.И. Смирнова, Е.Ю. Щелканова, **Е.Ю. Баранихина***, Д.А. Агафонов, И.В. Тучков, Я.М. Краснов, В.В. Кутырев // Биотехнология. – 2017. – 33(1). – С. 30-41. (журнал из Перечня ВАК)
3. Smirnova N.I. Whole-Genome Sequencing of *Vibrio cholerae* O1 El Tor Strains Isolated in Ukraine (2011) and Russia (2014) / N.I. Smirnova, Y.M. Krasnov, **Е.У.**

Agafonova, E.Y. Shchelkanova, Z.V. Alkhova, V.V. Kutyrev // Genome Announcements. – 2017. – 5:e01640-16 (Scopus).

4. Смирнова Н.И. Геномное разнообразие нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1, выделенных на территории России и сопредельных стран / Н.И. Смирнова, **Е.Ю. Агафонова**, Е.Ю. Щелканова, Д.А. Агафонов, Я.М. Краснов, Л.Ф. Ливанова, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2018. – №2. – С. 76-86. (журнал из Перечня ВАК)

5. **Агафонова Е.Ю.** Способ дифференциации штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью методом мультиплексной полимеразной цепной реакцией: пат.№ 2671412 / Агафонова Е.Ю., Агафонов Д.А., Смирнова Н.И.; заявка № 2018100692; опубл. 31.10.2018 г. Бюл. №31.

6. Кульшань Т.А. Потенциально эпидемически опасные штаммы холерного вибриона: механизм возникновения и структура генома / Т.А. Кульшань, **Е.Ю. Баранихина***, Д.А. Агафонов, Я.М. Краснов, Н.И. Смирнова // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации. Ростов-на-Дону. – 2015. – №28. – С. 113-116.

7. Кульшань Т.А. Особенности геномов штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью / Т.А. Кульшань, Д.А. Агафонов, **Е.Ю. Баранихина***, Я.М. Краснов, Н.И. Смирнова // Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», Санкт-Петербург. – 2015. – С. 150-151.

8. **Баранихина Е.Ю.*.** Разработка способа дифференциации нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор с различной эпидемиологической значимостью методом мультиплексной ПЦР / **Е.Ю. Баранихина***, Т.А. Кульшань, Н.И. Смирнова // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации, Ростов-на-Дону. – 2016. – №29. – С. 199-202.

9. **Агафонова Е.Ю.** Дифференциация нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор $ctxAB^-tcpA^+$ с различной эпидемиологической значимостью / **Е.Ю. Агафонова**, Т.А. Кульшань // Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии и гигиены», Москва. – 2016. – С. 14-16.

10. **Агафонова Е.Ю.** Изучение структуры генома и происхождение различных нетоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор $ctxA^-tcpA^+$ методом SNP-типирования и оценка их эпидемиологической значимости с помощью сконструированной ПЦР-тест-системы / **Е.Ю. Агафонова**, Я.М. Краснов, Е.Ю. Щелканова, Н.И. Смирнова // Сборник трудов конференции «Молекулярная диагностика-2017», Москва. – 2017. – С. 337-339.

11. Агафонов Д.А. Изменение экспрессии структурных и регуляторных генов вирулентности и биопленкообразования у штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор, утративших профаг СТХф / Д.А. Агафонов, Е.Ю. Щелканова, **Е.Ю. Агафонова** // Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва. – 2017. – С. 7.
12. Агафонова Е.Ю. Баданин Д.В. Молекулярно-генетический анализ островов патогенности VPI-1 и VPI-2 различных групп нетоксигенных штаммов холерных вибрионов, выделенных на территории России и сопредельных стран / Е.Ю. Агафонова, Д.В. Баданин // Обеспечение санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ: Материалы XIV Межгосударственной научно-практической конференции, посвященной 100-летию ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб», Саратов. – 2018. – С. 23-25.
13. **Agafonova E.Yu.** Genomic diversity of non-toxigenic *Vibrio cholerae* El Tor strains and method for differentiation of cholera vibrios with different epidemic significance, using PCR / **Agafonova E.Yu.** // Инфекция и иммунитет, 2018. – №4. – С. 511.

* - фамилия автора Баранихина Е.Ю. изменена на Агафонову Е.Ю.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

ПЦР – полимеразная цепная реакция; ПЦР-ЭФ - полимеразная цепная реакция с электрофоретическим учетом результатов; РПИГ – реакция пассивного иммунного гемолиза; СТ – холерный токсин (от англ. cholera toxin); EPI – остров персистенции в окружающей среде (от англ. environmental persistence island); SNP – полиморфизм единичных нуклеотидов (от англ. single nucleotide polymorphism); ТСП – токсин-корегулируемые пили (от англ. toxin-coregulated pili); VPI – остров патогенности (от англ. *Vibrio* pathogenicity island); VSP – остров пандемичности (от англ. *Vibrio* seventh pandemic island).