

На правах рукописи

Крицкий Андрей Александрович

**ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ
ДИАГНОСТИЧЕСКИХ И АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ГЕНЕТИЧЕСКИ
ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* O1 БИОВАРА EL TOR**

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: **Заднова Светлана Петровна**, доктор биологических наук

Официальные оппоненты: **Монахова Елена Владимировна**, доктор биологических наук, старший научный сотрудник, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Ростовский-на-Дону ордена Трудового Красного Знамени научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры

Викторов Дмитрий Викторович, доктор биологических наук, доцент, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, заместитель директора по научно-экспериментальной работе

Ведущая организация: 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

Защита диссертации состоится **«14» марта 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. С 1961 года по настоящее время продолжается седьмая пандемия холеры, возбудителем которой являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара El Tor. Предыдущие шесть пандемий предположительно были вызваны штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара (Бароян, 1971; Kaper et al., 1995; Faruque et al., 1998; Rodriguez, Whitten, 2018). Несмотря на то, что данные штаммы относятся к одной O1 серогруппе, они отличаются друг от друга по составу, структуре и экспрессии ряда генов патогенности, пандемичности и адаптации к меняющимся условиям внешней среды. Сравнительный анализ генома показал отсутствие в штаммах классического биовара более 22 генов, имеющих у El Tor вибрионов. При исследовании экспрессии генов в условиях, индуцирующих биосинтез факторов вирулентности, выявлены различия в транскрипционном профиле более 524 генов (Dziejman et al., 2002; Beyhan et al., 2006). Отличия между ними по некоторым микробиологическим и биохимическим свойствам (чувствительность к полимиксину В, диагностическим холерным фагам, способность агглютинировать куриные эритроциты и образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес – Проскауэра) используют для дифференциации биоваров (Han, Khie, 1963; Barrett, Blake, 1981; Takeya et al., 1981; Joenson et al., 1989; Biswas et al., 1992; Kovacicova et al., 2005; Yoon, Mekalanos, 2006). Следует отметить, что классические вибрионы продуцируют больше холерного токсина (ХТ) и вызывают тяжелые формы болезни, но быстро погибают при попадании в открытые водоемы. В то же время, типичные El Tor вибрионы, вызвавшие начало текущей пандемии, продуцируют значительно меньше холерного токсина, определяют развитие легких клинических изменений («мягкая» холера), но могут длительное время сохраняться во внешней среде (Бароян, 1971; Kaper et al., 1995; DiRita et al., 1996; Murley et al., 1999; Karaolis et al., 2001; Dziejman et al., 2002; Kovacicova, Skorupski, 2002; Beyhan et al., 2006; Hammer, Bassler, 2009).

Между тем, в ходе развития этой пандемии возбудитель холеры Эль Тор претерпевал различные генетические изменения. Важнейшие из них – возникновение в начале 90-х годов прошлого столетия новых генетических вариантов с повышенной вирулентностью, которые вытеснили типичные штаммы возбудителя на эндемичных по холере территориях (Смирнова с соавт., 2010; Савельев с соавт., 2012; Миронова с соавт., 2012; Ehara, 2008; Faruque et al., 2007; Nair et al., 2002, 2007; Safa et al., 2005). Генетически измененные штаммы *V. cholerae* O1 биовара El Tor или геноварианты возникли в результате приобретения типичными штаммами профага CTXφ с опероном *ctxAB1*, кодирующим биосинтез холерного токсина, от холерных классических вибрионов в процессе горизонтального переноса генов. Геном генетически измененных штаммов оказался нестабильным, что привело к возникновению новых вариантов возбудителя за счет появления различных мутаций в ключевых генах патогенности и пандемичности в ранее сформированных геновариантах. Так, в последнее десятилетие (2007-2016 гг.) появились штаммы, несущие новые аллели генов *ctxB* (*ctxB7*), *tcpA* (*tcpA^{CIRS}*), а также делецию в острове пандемичности VSP-II (Beyhan et al., 2006; Taviani et al., 2010; Reimer et al., 2011). Кроме того, в геноме измененных штаммов возбудителя возникли, видимо, мутации значимые для диагностики и их адаптации к стрессовым воздействиям внешней среды. Последствия этих генетических изменений – повышение вирулентности, изменение ряда диагностически значимых свойств (реакция Фогес–

Проскауэра, чувствительность к полимиксину В), а так же получение селективных преимуществ, вследствие чего эти геноварианты вытеснили типичные штаммы возбудителя холеры Эль Тор (Смирнова с соавт., 2010, 2011; Заднова с соавт., 2012; Nair et al., 2002; Taneja et al., 2009; Grim et al., 2010; Ghosh-Banerjee et al., 2010; Alam et al., 2010; Son et al., 2011; Carignan et al., 2016; Satchell et al., 2016; Samanta et al., 2015, 2018).

В этой связи глобальное распространение генетически измененных штаммов в эндемичных по холере странах и их периодический занос на территорию Российской Федерации указывает на необходимость изучения генетических основ изменения их диагностически значимых свойств и выяснения причин высокого уровня адаптации к меняющимся условиям окружающей среды, определившего вытеснение ими типичных штаммов.

Степень разработанности проблемы. Установлено, что холерные вибрионы биовара El Tor, в отличие от классических, способны образовывать ацетоин (ацетилметилкарбинол) из глюкозы, вследствие чего при выращивании в бульоне Кларка они дают положительную реакцию Фогес–Проскауэра, выражающуюся в малиновом окрашивании среды. Длительное время эта реакция была одним из диагностически значимых признаков для дифференциации биоваров *V. cholerae* O1 серогруппы. Однако проведенные исследования по определению биовара более 170 клинических генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, изолированных в Матлабе (Бангладеш) в 1991-1994 гг., показали, что среди них были изоляты с отрицательной реакцией Фогес–Проскауэра, характерной для классических холерных вибрионов (Nair et al., 2002; Safa et al., 2006). Это означало, что у изученных штаммов один из диагностически значимых признаков, используемых для дифференциации биоваров, был изменен. Далее, было обнаружено, что у новых геновариантов, сформировавшихся в более поздний период эволюции возбудителя и имеющих дополнительные мутации в геноме (Бангладеш, 2001-2005 гг.; Гаити, 2010 г.), реакция Фогес–Проскауэра была также изменена. Она оказалась слабоположительной, что указывало на снижение у них способности ферментировать глюкозу до ацетоина (Son et al., 2011; Brumfield et al., 2018). Несмотря на важность этих данных для диагностики холеры, генетический механизм изменения продукции ацетоина у природных геновариантов до сих пор не установлен. Все это обуславливает необходимость решения проблемы дифференциации геновариантов от классических холерных вибрионов и выяснение генетической основы изменения диагностически значимой реакции Фогес – Проскауэра, что имеет важное значение для оптимизации микробиологического мониторинга холерных вибрионов.

При изучении второго важного вопроса, связанного с выявлением адаптационных особенностей геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor, было установлено, что данные штаммы, также как и типичные изоляты, формируют биопленку, защищающую холерные вибрионы от воздействия стрессовых факторов внешней среды (Титова, Кушнарцева, 2015; Плеханов, 2017; Son et al., 2011; Satchell et al., 2016). Выявлено также, что в популяции геновариантов возбудителя холеры очень быстро образуются ругозные колонии, морфология которых обусловлена продукцией дополнительного слоя экзополисахаридов на поверхности клеток (Rahman et al., 2014). Как известно, ругозные формы отличаются повышенной устойчивостью к действию кислого pH, ультрафиолетового излучения, хлора, осмотического и оксидативного стрессов, комплемента, а также уничтожению простейшими (Rice et al., 1992; Wai et al., 1998; Yildiz, Schoolnik, 1999; Matz et al., 2005). Кроме того, эксперимен-

тально доказано, что генетически измененные штаммы *V. cholerae* O1 биовара El Tor, появившиеся в ранний период их формирования (1993-2001 гг.), в отличие от типичных штаммов, более устойчивы к температурному, осмотическому и оксидативному стрессам. Однако для полного понимания причин вытеснения типичных штаммов генетически измененными на эндемичных по холере территориях, известных данных об адаптационных особенностях последних явно недостаточно. Необходимы исследования, направленные на выяснение жизнеспособности геновариантов при их совместном нахождении с типичными штаммами в водной среде, которая является одной из экологических ниш холерного вибриона. Данные об уровне экспрессии регуляторных генов, контролирующих биосинтез факторов адаптации в типичных и генетически измененных штаммах, также были бы полезны для решения этого вопроса.

Выявление генетических причин различной экспрессии диагностически значимых генов у типичных и измененных штаммов, получение новых сведений об адаптационных особенностях последних будет способствовать расширению фундаментальных знаний об изменении структуры и функции генома возбудителя холеры Эль Тор в процессе эволюции. Кроме того, эти сведения создадут реальную основу для разработки новых диагностических методов, с целью оптимизации микробиологических мониторинговых исследований. В частности, при выявлении изменений в структуре генов, лежащих в основе разной экспрессии диагностических признаков у сравниваемых штаммов, может быть выявлен новый генетический маркер для детекции измененных штаммов возбудителя холеры Эль Тор.

Цель работы – выявление фенотипических и молекулярно-генетических особенностей генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, влияющих на их диагностически значимые и адаптационные свойства.

Задачи исследования

1. Создать набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и штаммов *E. coli*, несущих плазмиду с клонированными участками структурных и регуляторных генов холерного вибриона *alsR*, *aphA*, *ctxA*, *hapR*, *recA*, *rpoS*, *toxR*, необходимых в качестве стандартов при оценке экспрессии этих генов в клетках *V. cholerae* O1 биовара El Tor методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.
2. Исследовать способность природных генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, выделенных на территории Российской Федерации и сформированных в разные периоды 7-ой пандемии холеры, образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра.
3. Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей структурных и регуляторных генов, участвующих в биосинтезе ацетоина, у типичных и генетически измененных штаммов. Оценить уровень экспрессии регуляторных генов *alsR* и *aphA*, контролирующих его продукцию, методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.
4. Оценить способность генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor к ферментации глюкозы на разных питательных средах.
5. Провести сравнительный анализ жизнеспособности типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor в водной среде методом конкурентной пробы. Оценить скорость роста типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor на полноценной среде.

6. Выявить различия в экспрессии генов факторов адаптации (*rpoS*, *hapR*) у типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Научная новизна работы.

На основе фенотипического анализа установлено, что у 72,2% изученных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, выделенных на территории Российской Федерации в разные временные периоды (с 1993 по 2014 гг.), диагностически значимая реакция Фогес–Проскауэра слабоположительна, у 27,8% – отрицательна. Эти данные указывают на изменение способности образовывать ацетоин из глюкозы в этой реакции у всех исследуемых генетически измененных штаммов.

Впервые проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности структурных (*alsD*, *alsO*, *alsS*) и регуляторных (*alsR*, *aphA*) генов, кодирующих и контролирующих биосинтез ацетоина, у природных типичных и генетически измененных штаммов. Установлено, что причиной отсутствия или снижения биосинтеза ацетоина в реакции Фогес–Проскауэра у природных генетически измененных штаммов является делеция одного нуклеотида (Т) в их структурном гене *alsD* в позиции 315, кодирующем фермент ацетолактат декарбоксилазу. Эта мутация приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп-кодона, что обуславливает биосинтез дефектного белка. Показано, что выявленные изменения диагностически значимого признака у изученных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor связаны также с повышенным (в среднем в 2,5 раза) уровнем экспрессии регуляторного гена *aphA*, негативно влияющим на продукцию ацетоина.

Изучено влияние разных концентраций глюкозы на рост генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Установлено, что культивирование данных штаммов на богатых питательными веществами средах с высоким содержанием глюкозы (1% и выше) не влияет на их ростовые свойства. В тоже время в условиях недостатка питательных веществ добавление глюкозы (0,5% и выше) в качестве единственного источника питания ингибирует рост геновариантов возбудителя холеры в отличие от типичных штаммов. Выявленная особенность геновариантов может быть использована в качестве дополнительного дифференцирующего признака типичных и генетически измененных штаммов.

Впервые выявлено, что при совместном культивировании типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor в водной среде геноварианты обладали большей жизнеспособностью (в среднем в шесть раз на 6-е сутки совместного культивирования), что указывает на их адаптационные преимущества в условиях дефицита питательных веществ. Установлена повышенная скорость роста бактериальной популяции генетически измененных штаммов на полноценной питательной среде, а также более высокий уровень экспрессии их глобального регуляторного белка RpoS (в среднем в 3 раза), участвующего в адаптации вибрионов к стрессовым факторам окружающей среды, что может быть одним из механизмов, обусловившим вытеснение типичных штаммов геновариантами возбудителя холеры Эль Тор.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Определена распространенность на территории Российской Федерации современных штаммов возбудителя холеры Эль Тор с измененной диагностически значимой реакцией Фогес–Проскауэра. Выявлена генетическая основа различной способности типичных и ге-

нетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра, используемой для дифференциации биоваров. Показано, что отсутствие ацетоина или снижение уровня его биосинтеза у генетически измененных штаммов связано с делецией одного нуклеотида (Т) в структурном гене *alsD*, приводящей к сдвигу рамки считывания и нарушению структуры белка AlsD, а также с повышенным уровнем экспрессии регуляторного гена *aphA*, являющегося негативным регулятором биосинтеза ацетоина. Обнаружение указанной мутации в гене *alsD* в геноме всех природных исследованных штаммов свидетельствует о ее появлении в начальный период эволюции возбудителя холеры, связанной с возникновением первых геновариантов.

Показаны селективные преимущества генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, выражающиеся в более высокой их жизнеспособности в водной среде по сравнению с типичными изолятами. Обнаружено, что одним из механизмов лучшей адаптации геновариантов к меняющимся факторам окружающей среды является, видимо, повышенная скорость роста их бактериальной популяции и увеличенная экспрессия глобального регуляторного гена *rpoS*.

Полученные новые фундаментальные знания расширяют наши представления об изменении структуры и функции возбудителя холеры Эль Тор в процессе его эволюции и создают основу для разработки новых диагностических способов для дифференциации типичных и генетически измененных штаммов при проведении микробиологических мониторинговых исследований.

В международную базу данных NCBI GenBank депонированы нуклеотидные последовательности полных геномов трех штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы с разной структурой генов *als* оперона (коды доступа JFGR00000000, LAED00000000, LAEM00000000).

В Государственную коллекцию патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» депонирована авторская коллекция из 10 сконструированных штаммов *E. coli* TOP10 (pCR 2.1) с клонированными участками структурных, регуляторных и видоспецифичных генов возбудителя холеры. Эти штаммы предназначены для использования в качестве стандартов при оценке экспрессии генов *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени (справки о депонировании штаммов KM2031, KM2032, KM2033, KM2034, KM2035, KM2036, KM2037, KM2038, KM2039, KM2040).

Разработаны и одобрены Ученым советом ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» (протокол №6 от 08.12.2015 г.) методические рекомендации «Алгоритм определения уровня экспрессии генов вирулентности *Vibrio cholerae* методом двухстадийной ОТ-ПЦР в режиме реального времени», содержащие описание набора олигонуклеотидных праймеров, зондов и штаммов *E. coli* TOP 10, несущих плазмиду pCR 2.1 с клонированными участками генов холерного вибриона. Предложенный набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и штаммов *E. coli* TOP10 pCR 2.1 используется в научно-исследовательской работе лаборатории патогенных вибрионов ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» при анализе экспрессии структурных и регуляторных генов в штаммах *V. cholerae*.

Полученные новые данные о повышенных адаптационных особенностях природных генетически измененных штаммах *V. cholerae* O1 биовара El Tor включены в курс лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Методология и методы исследования.

В работе было использовано 48 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы, из них 3 штамма классического биовара и 45 штаммов биовара El Tor, из которых 12 относились к типичным штаммам El Tor, а 33 – к геновариантам. Применяли как классические, так и современные микробиологические и молекулярно–генетические методы. Штаммы выращивались на агаре и бульоне LB (pH 7,2), на бульоне АКІ (pH 7,8), на минимальной среде (pH 7,4) при температуре 37°C. Способность штаммов холерного вибриона к продукции ацетоина определяли в реакции Фогес–Проскауэра (Ф–П) по общепринятой методике. Чувствительность культур к антибактериальным препаратам определяли диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам». Продукцию ХТ изучали методом GM₁ ELISA (Svennerholm et al., 1983; Iwanaga et al., 1986). Выделение ДНК и РНК проводили согласно МУ 1.3.2569 – 09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I – IV групп патогенности» после предварительного обеззараживания культуры с применением коммерческих наборов «AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit» (Axygen Biosciences, США) и «Promega Total RNA Isolation System» (Promega, США) в соответствии с протоколами производителя. ПЦР с использованием специфических праймеров выполняли на амплификаторе «RotorGeneQ» (Qiagen, Германия). Синтез кДНК на матрице РНК в реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «Реверта» вариант 100 (Ампли-Сенс, Россия). Фрагментарное секвенирование проводили на приборе ABI Prism 3500 XL (Applied Biosystems, США). Полногеномное секвенирование штаммов *V. cholerae* осуществляли по технологии ионного полупроводникового секвенирования Ion Torrent на приборе «Ion PGM» (Thermo Fisher Scientific, США). Для сборки полногеномных последовательностей использовали программу Newbler gs Assembler V. 2.6 (454 Lifescience, США). Биоинформационный анализ нуклеотидных последовательностей генов выполняли с помощью программного пакета Lasergene DNASTAR V.11 (DNASTAR, США), Mega V. 6.0 (Megasoftware, США), а также BioEdit V. 7.0.9.0. (BioEdit, США). Пространственное моделирование структуры белка ацетолактат декарбоксилазы проводили при помощи автоматизированного сервера SWISS–MODEL. Оценку качества модели производили с использованием функции QMEAN (Benkert et al., 2011). Для статистической обработки экспериментальных данных применяли программы Microsoft Excel (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, Россия), вычисляя среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической и доверительный интервал.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Создан набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и штаммов *E. coli* TOP 10, несущих плазмиду pCR 2.1 с клонированными участками генов *alsR*, *aphA*, *ctxA*, *hapR*, *recA*, *rpoS*, *toxR*, служащих в качестве стандартов при оценке экспрессии этих генов в клетках холерных вибрионов методом ОТ-ПЦР с гибридационно – флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Разработанный набор праймеров, зондов и штаммов обеспечивает возможность определения экспрессии структурных и регуляторных генов в изучаемых штаммах *V. cholerae* O1 биовара El Tor на основе этого метода.

2. Измененная способность образовывать ацетоин из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра, используемой для дифференциации биоваров возбудителя холеры, является характерной особенностью генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, возникших как в ранние (1993 – 1994 годы), так и поздние (2010 – 2014 годы) периоды эволюции возбудителя холеры. Отсутствие биосинтеза ацетона или снижение его уровня у генетических вариантов возбудителя связано с делецией единичного нуклеотида (Т) в структурном гене *alsD* белка ацетолактат декарбоксилазы, а также с повышенной экспрессией регуляторного гена *aphA*, участвующего в негативной регуляции биосинтеза ацетона.

3. Отличительной особенностью генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor по сравнению с типичными штаммами возбудителя является зависимость их ростовых свойств на средах с недостатком питательных веществ от содержания в них глюкозы. При повышении концентрации данного углевода выше 0,5% в указанной среде рост этих штаммов прекращается.

4. Генетически измененные штаммы *V. cholerae* O1 биовара El Tor обладают более высоким уровнем адаптации к дефициту питательных веществ по сравнению с типичными штаммами. При совместном выращивании в водной среде типичных и генетически измененных штаммов выживаемость последних была выше, чем типичных. Адаптационные преимущества геновариантов обусловлены более высокой скоростью роста их бактериальной популяции на полноценной среде и повышенной экспрессией глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS* по сравнению с типичными штаммами.

Степень достоверности и апробация результатов.

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

Материалы диссертации представлены на VIII и IX Всероссийских конгрессах по инфекционным болезням с международным участием (Москва, 2016, 2017), XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года» (Саратов, 2016), Проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации «Холера и патогенные для человека вибрионы» (Ростов-на-Дону, 2016), Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2018» (Минск, 2018), ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в институте «Микроб» (Саратов, 2016, 2018).

Личный вклад автора.

Личный вклад автора состоит в анализе литературы, получении и обработке экспериментальных данных, разработке методических подходов и проведении исследований по изучению способности различных штаммов образовывать ацетоин в реакции Фогес–Проскауэра, по сравнительному анализу полногеномных последовательностей штаммов, определению жизнеспособности на различных средах и скорости роста типичных и измененных штаммов возбудителя холеры. Весь комплекс праймеров и зондов для проведения

ОТ-ПЦР в режиме реального времени сконструирован и проверен автором на большом количестве штаммов. Работа по секвенированию полных геномов штаммов *V. cholerae* или фрагментов генов была выполнена совместно с сотрудниками лаборатории геномного и протеомного анализа (с.н.с., к.б.н. Гусевой Н.П., с.н.с., к.б.н. Альховой Ж.В., н.с. Нарышкиной Е.А.). Штаммы *E. coli*, необходимые в качестве стандартов при оценке экспрессии генов, были сконструированы совместно с в.н.с. лаборатории патогенных вибрионов, к.м.н. Тучковым И.В. Отдельные этапы по определению уровня экспрессии генов методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени были проведены совместно со с.н.с. лаборатории патогенных вибрионов к.м.н. Челдышовой Н.Б. Подготовка основных публикаций осуществлена как лично автором, так и при его непосредственном участии.

Публикации и связь работы с научными программами.

По теме диссертации опубликовано 8 работ, из которых 3 статьи в рекомендованных ВАК изданиях.

Работа выполнена в отделе микробиологии ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора в рамках плановой НИР 47-4-14 «Молекулярно-генетический анализ механизмов изменения патогенных и адаптивных свойств *Vibrio cholerae* биовара эльтор в современный период 7-ой пандемии холеры» (2014-2018 гг., № гос. регистрации 012014557721).

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 253 работы, из них 31 отечественных и 222 зарубежных. Общий объем диссертации составляет 132 страницы. Текст иллюстрирован 12 таблицами и 18 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Создание набора олигонуклеотидных праймеров, зондов и конструирование штаммов *E. coli* TOP10, несущих плазмиду pCR 2.1 с клонированными участками генов, для определения уровня относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Для сравнительного анализа экспрессии регуляторных генов *alsR*, *aphA*, *hapR* и *rpoS*, контролирующих биосинтез белков, связанных с проявлением диагностических и адаптационных свойств типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, использовали метод ОТ-ПЦР с гибридационно – флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Проведение такой работы требовало создания набора праймеров и зондов на исследуемые гены, а также на выбранный ген домашнего хозяйства *recA*. Предварительно из международной базы данных GenBank были взяты нуклеотидные последовательности этих генов, в которых были выбраны участки небольшой протяженности. Последующая работа по дизайну праймеров и зондов проводилась при помощи интернет сервисов PrimerQuest и GenScript с учетом требований, предъявляемых к дизайну олигонуклеотидов в системе TaqMan®. В результате был создан набор олигонуклеотидных последовательностей – праймеров и зондов, необходимых для определения относительной экспрессии генов *V. cholerae* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

Эффективность созданного набора праймеров и зондов проверялась путем постановки ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени на тотальной ДНК, выделенной из 48 штаммов *V. cholerae*, изолированных в различные годы. Специфичность набора составила 99%, а чувствительность – 1×10^3 копий/мкл. Параллельно путем серии экспериментов проводили оптимизацию программы амплификации и условий постановки ПЦР.

Далее были сконструированы штаммы *E. coli*, несущие коммерческую плазмиду pCR 2.1 (Ap^R) с клонированными фрагментами генов *alsR*, *aphA*, *hapR*, *rpoS*, а также *recA*, предназначенные для применения их в качестве ПЦР-стандартов в ОТ-ПЦР. С этой целью, предварительно полученные ПЦР-ампликоны указанных генов лигировали в плазмиду pCR 2.1 (размером 3931 п.н.), маркированную геном устойчивости к ампициллину, которую затем трансформировали в клетки штамма *E. coli* TOP 10. Из полученных трансформантов выделяли плазмидную ДНК, которую использовали для подготовки серийных разведений и построения стандартной кривой, для оценки качества реакции амплификации каждого исследуемого гена.

Для оценки эффективности применения ОТ-ПЦР при определении экспрессии генов возбудителя холеры, была также проведена работа по изучению активности структурного и регуляторного генов *ctxA* и *toxR*, участвующих в биосинтезе ХТ, у 11 токсигенных штаммов *V. cholerae*. Выбор данных генов был обусловлен возможностью сравнения показателей их экспрессии в ОТ-ПЦР с количествами продуцируемого токсина, определенного при помощи иммуноферментного метода GM₁ELISA. Оценка уровня экспрессии этих генов осуществлялась относительно штамма гиперпродуцента ХТ *V. cholerae* 569В, экспрессия генов-мишеней которого была принята за единицу. Все эксперименты проводились в трехкратном повторении. Для осуществления данной работы были также рассчитаны праймеры и зонды на гены *ctxA* и *toxR* и сконструированы штаммы *E. coli* TOP 10, несущие в составе плазмиды pCR 2.1 фрагменты этих генов. В результате было показано, что уровни экспрессии генов *ctxA* и *toxR* у взятых в анализ штаммов, определенные при помощи ОТ-ПЦР, были соотносимы с продукцией ХТ, определенной иммуноферментным методом. Так, самый высокий уровень экспрессии указанных генов был отмечен у штамма *V. cholerae* M29 O1 классического биовара, у которого была наибольшей и продукция ХТ. Типичные El Tor вибрионы имели наиболее низкие значения биосинтеза ХТ и экспрессии генов *ctxA* и *toxR*. Вместе с тем, геноварианты продуцировали в среднем в 36 раз больше ХТ, чем типичные штаммы. Уровень экспрессии их гена *ctxA* по результатам ОТ-ПЦР был в среднем повышен в 17 раз, *toxR* – в 2,8 раза.

Таким образом, создан набор олигонуклеотидных праймеров и зондов, а также сконструированы штаммы *E. coli* TOP10, несущие фрагменты клонированных генов, необходимые для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae* методом двухстадийной ОТ-ПЦР с гибридационно – флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

2. Анализ способности генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor образовывать ацетон из глюкозы в реакции Фогес–Проскауэра и выяснение генетических основ изменения его продукции

В работе было использовано 18 природных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, выделенных в период с 1993 по 2014 гг. В качестве контрольных было взято четыре типичных штамма биовара El Tor, изолированных в 1970 и 1972 гг., а также 3 штамма классического биовара. Следует отметить, что использованные в работе геноварианты были завезены на территорию Российской Федерации в разные периоды седьмой пандемии и были генетически разнородными. Штаммы, выделенные в начальный период их возникновения (1993-1994 гг.), отличались от новых вариантов, завезенных в последующие годы (2010-2014 гг.), по структуре генов патогенности, пандемичности и адаптации (Смирнова с соавт., 2011, 2014; Савельев с соавт., 2012; Шашкова, 2012; Агафонов, 2014; Плеханов, Заднова, 2016; Монахова с соавт., 2017; Kuleshov et al., 2016).

При постановке реакции Фогес–Проскауэра было установлено, что все типичные штаммы биовара El Tor давали положительную реакцию Ф – П, что проявлялось в окрашивании среды в ярко малиновый цвет. Штаммы классического биовара, не способные к образованию ацетона, давали отрицательную реакцию Ф–П, среда оставалась светло-желтого цвета (Рис. 1).

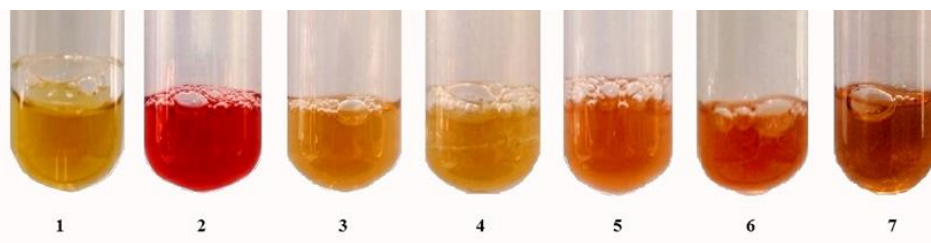


Рисунок 1. Образование ацетона штаммами *V. cholerae* в реакции Фогес–Проскауэра.

1 – штамм классического биовара 569В (отрицательный контроль); 2 – типичный штамм *V. cholerae* M818 биовара El Tor (положительный контроль); 3 – 7 – генетически измененные штаммы *V. cholerae* M1299, 147, M1429, Л3226, M1266 биовара El Tor.

Анализируемые генетически измененные штаммы образовывали две группы. Штаммы первой группы, включавшие 5 изолятов (27,8%), так же как и классические вибрионы, давали отрицательную реакцию Ф–П. Для второй наиболее многочисленной группы (13 штаммов, 72,2%) была характерна слабopоложительная реакция. При этом цвет среды варьировал от светло-розового до темно-розового (Рис. 1).

Таким образом, установлено, что все изученные генетически измененные штаммы, завезенные как в первые годы их появления на эндемичной территории (1993-1994), так и новые варианты, несущие в геноме различные дополнительные мутации, дают слабopоложительную и отрицательную реакцию Ф–П в результате биосинтеза незначительного количества (или отсутствия) ацетона в среде выращивания.

Для выяснения генетических основ изменения продукции ацетоина генетически измененными штаммами был проведен анализ нуклеотидной последовательности генов *als* оперона (*alsR*, *alsD*, *alsS*, *alsO*), участвующих в его биосинтезе. В результате показано, что последовательность указанных генов типичных штаммов идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара El Tor. При анализе нуклеотидной последовательности *als* оперона геновариантов было выявлено, что они содержат интактную последовательность регуляторного гена *alsR*, структура генов *alsO* и *alsS*, кодирующих соответственно оксидоредуктазу и α -ацетолактат синтазу, также была идентична референс-штамму. Однако у всех изученных штаммов в последовательности гена *alsD*, кодирующего фермент ацетолактат декарбоксилазу, была выявлена делеция тиминового нуклеотида (Т) в позиции 315. Наличие указанной делеции было подтверждено при фрагментарном секвенировании данного гена. Указанная делеция была выявлена нами и в нуклеотидной последовательности генетически измененного штамма *V. cholerae* ВАА-2163 биовара El Tor (2010El – 1786, код доступа GenBank AELH 00000000.1), слабоположительная реакция Фогес–Проскауэра которого была описана в работах M.S. Son с соавт. (2011) и K.D. Brumfield с соавт. (2018).

Делеция в гене *alsD* приводит к сдвигу рамки считывания и образованию стоп – кодона. Проведенное компьютерное моделирование пространственной структуры белка AlsD взятого в качестве модельного генетически измененного штамма *V. cholerae* M1293 биовара El Tor (Дагестан, 1994) показало наличие существенных различий в белковой молекуле (сниженное количество аминокислот, отсутствие четвертичной структуры) по сравнению с данным белком референс-штамма (Рис. 2). Однако согласно данным литературы в отсутствие ацетолактат декарбоксилазы возможен альтернативный (не ферментативный) путь – спонтанное декарбоксилирование ацетолактата в ацетоин, что фенотипически проявляется в слабоположительной реакции Ф–П (Kovacikova et al., 2005). Таким образом, возможно, что одной из причин, сниженной продукции ацетоина генетически измененными штаммами, является биосинтез неактивного фермента ацетолактат декарбоксилазы.

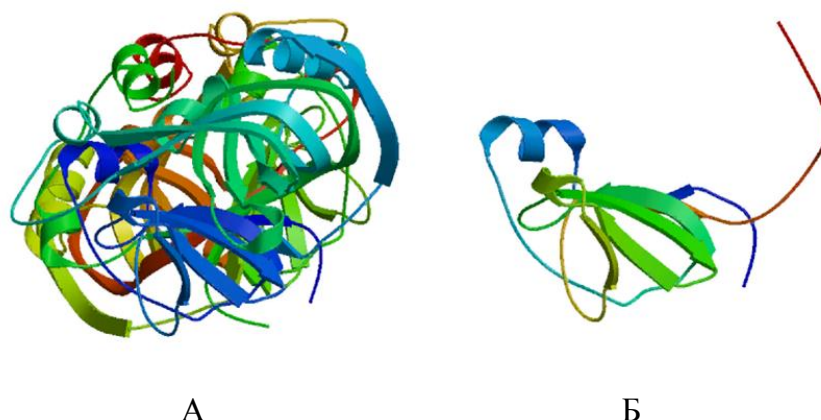


Рисунок 2. Моделирование пространственной структуры белка AlsD у референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара El Tor (А) и геноварианта M1293 (Б).

Далее нами были проведены исследования по изучению уровня экспрессии регуляторного гена *alsR*, контролирующего экспрессию структурных генов *als* оперона, а также гена

aphA, являющегося одним из важных регуляторных генов, участвующих в каскадной регуляции биосинтеза факторов вирулентности – холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии, а также контролирующего экспрессию гена *alsR*, сайт связывания с которым расположен в *als* опероне (Kovacicova et al., 2005).

В работе было использовано 9 генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, изолированных в 1993-2011 гг., а также 4 типичных штамма (Табл. 1).

Таблица 1. Уровень относительной экспрессии регуляторных генов, контролирующих продукцию ацетоина, а также биосинтез факторов адаптации в штаммах *V. cholerae* биовара El Tor.

Штамм <i>V. cholerae</i> биовара El Tor	Год и место вы- деления	Относительная экспрессия генов*			
		<i>alsR</i>	<i>aphA</i>	<i>rpoS</i>	<i>hapR</i>
М818 типичный	1970, Балаково	1	1	1	1
М893 типичный	1970, Астрахань	2,14±0,10	1,32±0,06	н/о**	0,61±0,03
М1062 типичный	1970, Астрахань	1,53±0,06	0,93±0,04	0,62±0,03	1,18±0,05
М1011 типичный	1972, Башкирия	1,79±0,07	0,90±0,04	0,42±0,02	0,84±0,04
М1270 геновариант	1993, Татарстан	0,85±0,04	1,52±0,07	1,77±0,08	0,40±0,02
М1299 геновариант	1993, Краснодар	1,13±0,05	1,74±0,07	1,12±0,05	0,66±0,03
М1266 геновариант	1994, Пермь	1,08±0,05	2,46±0,11	1,60±0,07	2,06±0,09
Р17644 геновариант	1997, Ачинск	2,60±0,12	2,06±0,10	2,19±0,10	0,90±0,04
М1345 геновариант	2001, Казань	3,05±0,15	2,31±0,11	3,00±0,14	5,12±0,24
147 геновариант	2010, Ялта	1,13±0,05	5,09±0,24	1,22±0,05	0,46±0,02
Л3226 геновариант	2010, Москва	1,97±0,08	2,04±0,10	2,04±0,09	0,89±0,04
39 геновариант	2011, Мариуполь	2,77±0,13	3,92±0,19	3,31±0,15	0,97±0,04
301 геновариант	2011, Таганрог	1,93±0,09	2,28±0,11	1,83±0,09	1,14±0,05

Примечания: * – среднее значение относительного уровня экспрессии рассчитано по результатам трех независимых измерений (P < 0,05), ** – не определено.

Предварительно был проведен сравнительный анализ нуклеотидной последовательности гена *aphA* у взятых в анализ штаммов *V. cholerae* и показано, что последовательность данного гена у всех изученных штаммов является интактной и совпадает с нуклеотидной последовательностью гена *aphA* референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара El Tor.

В качестве референсного штамма, экспрессия генов которого была взята за 1, произвольно был выбран типичный штамм *V. cholerae* М818 биовара El Tor. При анализе экспрессии гена *aphA* у типичных штаммов выявлено, что уровень экспрессии данного гена ниже, чем уровень экспрессии гена *alsR* (Табл. 1). Возможно, в типичных штаммах белок AphA не оказывает значительного ингибирующего влияния на биосинтез регуляторного белка AlsR и продукцию ацетоина.

При изучении экспрессии данных генов у геновариантов было установлено, что уровень экспрессии гена *alsR* сопоставим с уровнем экспрессии данного гена у типичных штаммов (Табл. 1). В то же время экспрессия гена *aphA* у геновариантов превышает данный показатель типичных штаммов в среднем в 2,5 раза. Увеличенная продукция белка AphA, являющегося одним из центральных регуляторов экспрессии генов вирулентности, у генетически измененных штаммов вполне объяснима. Как известно, указанные штаммы отличаются повышенной продукцией данных факторов вирулентности (Смирнова с соавт., 2011;

2012; Nair et al., 2002; Taneja et al., 2009; Grim et al., 2010; Ghosh-Banerjee et al., 2010; Alam et al., 2010; Son et al., 2011; Carignan et al., 2016; Satchell et al., 2016). Возможно, повышение уровня экспрессии гена *aphA*, являющегося негативным регулятором биосинтеза ацетоина, также может обуславливать понижение или отсутствие продукции ацетоина у генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor.

Таким образом, установлено, что все изученные генетически измененные штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, независимо от времени выделения и генетической организации, дают слабоположительную, а в ряде случаев и отрицательную реакцию Фогес–Проскауэра. При сравнительном анализе *als* оперона, содержащего структурные и регуляторный гены, участвующие в биосинтезе ацетоина, а также исследовании экспрессии генов установлено, что слабоположительная (или отрицательная) реакция Фогес–Проскауэра у данных штаммов (т.е. сниженная способность или отсутствие биосинтеза ацетоина из глюкозы) обусловлена однонуклеотидной делецией в гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, ответственную за декарбоксилирование ацетолактата в ацетоин, а также повышенной экспрессией регуляторного гена *aphA*, участвующего в негативной регуляции биосинтеза ацетоина.

3. Изучение влияния разных концентраций глюкозы на рост генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor на полноценных и голодных средах

Учитывая полученные данные, об измененной способности геновариантов *V. cholerae* ферментировать глюкозу до ацетоина в реакции Фогес–Проскауэра, далее был изучен их рост на питательных средах, содержащих разное количество данного углевода. Как известно, глюкоза является основным субстратом, который используется в качестве источника питания и получения энергии у большинства микроорганизмов, в том числе и у холерного вибриона. Согласно данным литературы типичные El Tor вибрионы в результате образования ацетоина хорошо растут в присутствии высоких концентраций глюкозы (до 3%). В то же время штаммы классических вибрионов чувствительны к содержанию глюкозы и на средах, содержащих 1% данного углевода, их рост прекращается (Yoon, Mekalanos, 2006). Сведения о влиянии глюкозы на рост генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor в литературе отсутствуют.

В работе использовали 19 природных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor, а также 6 типичных штаммов и 3 штамма классического биовара. Штаммы выращивали на минимальной среде с разным содержанием глюкозы (0,4; 0,5; 1,0; 3,0 %) в качестве единственного источника питания. В результате установлено, что при культивировании на среде с добавлением 0,4% глюкозы все штаммы давали хороший рост. При увеличении концентрации содержания данного углевода до 0,5% рост геновариантов замедлялся (вырастали единичные колонии), а при повышении концентрации глюкозы до 1% колонии формировали только типичные штаммы El Tor вибрионов. Геноварианты, как и классические вибрионы, не росли в данных условиях. Однако культивирование геновариантов на богатой питательными веществами среде (агар и бульон LB) с добавлением 1% глюкозы и выше (3%) не оказывало ингибирующего влияния на их рост.

Для установления механизма такой дифференцированной способности к ферментации глюкозы генетически измененными штаммами мы провели анализ нуклеотидных последовательностей генов, необходимых для первого этапа ферментации глюкозы – образовании пирувата в реакции гликолиза. В результате проведенного анализа установлено, что у изученных геновариантов последовательность 11 генов, участвующих в гликолизе (глюкозо-6-фосфат изомеразы (vc0374), 6-фосфофруктокиназы (vc2689), фруктозо-бифосфат альдолазы (vc0478), триозфосфат изомеразы (vc2670), глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (vc2000); фосфоглицераткиназы (vc0477); 2,3-бифосфоглицерат независимой фосфоглицерат мутаза (vc0336); ено фосфопируват гидратазы (vc2447); пируват киназы II (vc2008); дигидролипоамид ацетилтрансферазы (vc2413); дигидролипоамид дегидрогеназы (vc2412), идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара El Tor.

Таким образом, установлено, что все изученные генетически измененные штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, завезенные как в первые годы их появления на эндемичной территории (1993-1994), так и современные изоляты, имеющие разную структуру генов патогенности, пандемичности, адаптации, отличаются от типичных штаммов по способности ферментировать глюкозу. Фенотипически данные различия выражаются в отсутствии роста на минимальной среде с добавлением глюкозы (0,5% и выше) в качестве единственного источника питания. Можно высказать предположение, что приобретение геновариантами возбудителя холеры биовара El Tor генов классических вибрионов привело не только к повышению их вирулентности, но и изменению процессов метаболизма, в том числе ферментации глюкозы. Однако для установления механизма измененной ферментации глюкозы генетически измененными штаммами необходимы дополнительные исследования.

4. Выявление биологических особенностей генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара El Tor, определяющих их высокий уровень адаптации к внешним факторам окружающей среды

Следующий этап работы посвящен выявлению жизнеспособности типичных и генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor в водной среде. В качестве среды культивирования была использована фильтрованная автоклавированная речная вода (р. Волга). Все эксперименты проводились в закрытой системе. В работе было использовано 7 типичных штаммов и 22 генетически измененных штамма, выделенных в разные годы на территории Российской Федерации.

Поскольку при постановке конкурентной пробы необходима дифференциация высеваемых штаммов, предварительно нами была изучена чувствительность взятых в анализ штаммов к различным антибактериальным препаратам и далее методом селекции получены изоляты, устойчивые к канамицину, рифампицину, спектиномицину и стрептомицину.

Далее из произвольно взятых штаммов были сформированы четыре пары (типичный/геновариант) штаммов с разной чувствительностью к антибиотикам: M1011Km^R/M1270Sp^R; M1062Rif^R/P17644Sp^R; M893Rif^R/301Sp^R; M818Rif^R/Л3226Str^R. Типичные штаммы (M1011, M1062, M893, M818) были выделены от больных в период 1970-1972 гг., геноварианты (M1270, P17644, Л3226, 301) были изолированы в 1993-2011 гг. Исследуемые пары штаммов были помещены в автоклавированную речную воду при комнат-

ной температуре. Периодически проводили высевы на питательный агар и подсчитывали количество выросших колоний. В результате установлено, что геноварианты демонстрировали более высокий уровень выживаемости по сравнению с типичными изолятами, что проявлялось в большем количестве высеваемых бактерий. Так, количество бактерий штамма M1270Sp^R на 4-е сутки совместного нахождения с типичным штаммом M1011Km^R превышало КОЕ последнего в 77,6 раз. На 6-е сутки было отмечено отсутствие роста типичного штамма M1011Km^R, при сохранении роста штамма M1270Sp^R. Возможно, данный типичный штамм погиб или перешел в некультивируемое состояние. В популяции штаммов M893Rif^R/301Sp^R на 4-е сутки исследования количество клеток обоих штаммов было примерно одинаковым. Однако на 18 сутки КОЕ геноварианта 301Sp^R было в 3,9 раза больше, чем у M893Rif^R. В паре штаммов P17644Sp^R/M1062Rif^R на 4-е сутки инкубации число бактерий геноварианта превышало данный показатель типичного штамма в 2,8 раза, а на 18 сутки – в 3,2 раза. В паре штаммов M818Rif^R/Л3226Str^R также показано конкурентное преимущество генетически измененного штамма. На 4-е сутки количество бактерий геноварианта превышало КОЕ типичного в 9,2 раза, на 6-е – в 10,4 раза. На 18-е сутки жизнеспособные бактерии типичного штамма отсутствовали. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие роста некоторых типичных штаммов в конкурентной пробе (M1011Km^R, M818Rif^R), в монокультуре популяция данных штаммов сохранялась, демонстрируя высокие показатели высеваемости.

Таким образом, показано, что при совместном культивировании в условиях недостатка питательных веществ природные генетически измененные штаммы лучше адаптируются и доминируют над типичными изолятами. Возможно, что одна из причин повышения конкурентных свойств геновариантов может быть обусловлена увеличенной скоростью роста бактериальной популяции. Для подтверждения данного предположения далее были проведены опыты по оценке скорости роста штаммов *V. cholerae* биовара El Tor.

Для получения сравнительных данных по скорости роста исследуемые штаммы в одинаковой концентрации помещали в бульон LB. Через 4 часа культивирования (начало стационарной фазы роста) определяли оптическую плотность подросшей культуры. Параллельно проводили высеив штаммов на LB агар с последующим подсчетом выросших колоний. В результате установлено, что геноварианты в отличие от типичных изолятов обладают повышенным ростом. Так ОП среды культивирования геноварианта M1270Sp^R превышала аналогичный показатель типичного штамма M1011Km^R в 4,8 раз, а ОП геноварианта Л3226Str^R была больше, чем у M818Rif^R в 1,2 раза. Подобная картина наблюдалась и у других штаммов: ОП геноварианта P17644Sp^R была в 1,7 раз больше, чем ОП типичного штамма M1062Rif^R, а в паре 301 Sp^R/893Rif^R разница была в 1,8 раз (Табл. 2).

Далее мы расширили выборку анализируемых штаммов, взяв в анализ еще два типичных токсигенных штамма и 10 генетически измененных штаммов, в том числе завезенных в современный период (2012-2014 гг.). В результате анализа данных штаммов также выявлена повышенная скорость роста геновариантов.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что скорость роста генетически измененных штаммов выше, чем типичных изолятов (ОП среды культивирования в среднем больше в 1,7 раз), что, возможно, явилось одной из причин их селективного преимущества в конкурентной пробе.

Таблица 2. Сравнительные показатели скорости роста штаммов *V. cholerae* биовара El Tor при выращивании в LB бульоне в течение 4 часов.

Штамм <i>V. cholerae</i>	Количество КОЕ ($\times 10^4$)	ОП при 600 нм	Во сколько раз ОП генова- рианта отличается от ОП типичного штамма
M1011Km ^R	850±35	0,23 ± 0,01	> в 4,8 раз
M1270Sp ^R	4251±200	1,1 ± 0,05	
M1062Rif ^R	2960±140	0,84 ± 0,04	> в 1,7 раза
P17644Sp _R	4736±230	1,45 ± 0,07	
M893Rif _R	2355±100	0,6 ± 0,03	> в 1,8 раз
301Sp ^R	4240±180	1,09 ± 0,05	
M818Rif ^R	4501±210	0,97 ± 0,004	> в 1,2 раза
Л3226Str ^R	4945±220	1,16 ± 0,05	
Примечание: приведены средние значения трех опытов (P < 0,05).			

Учитывая данные литературы о важной роли белка RpoS в адаптации холерного вибриона в условиях дефицита питательных веществ (Yildiz, Schoolnik, 1998), нами были проведены эксперименты по определению экспрессии гена *rpoS* у взятых в исследование штаммов. На первом этапе мы провели анализ нуклеотидной последовательности гена *rpoS*. По результатам биоинформационного анализа была выявлена полная идентичность нуклеотидной последовательности гена *rpoS* у взятых в анализ штаммов последовательности указанного гена референс-штамма *V. cholerae* N16961. Исключение составил генетически измененный штамм *V. cholerae* 301 (Таганрог, 2011), несущий вставку СТТАС в позиции 219 от начала гена.

На следующем этапе работы мы определили уровень экспрессии гена *rpoS* в типичных и генетически измененных штаммах. В результате установлено, что экспрессия гена *rpoS* у геновариантов в среднем в 3 раза выше, чем у типичных изолятов (Табл. 1). Исключение составил типичный штамм *V. cholerae* M893, у которого экспрессию гена *rpoS* определить не удалось. Возможно, в данном штамме экспрессия гена *rpoS* начинается на более поздней стадии выращивания, но для проверки данного предположения необходимы дополнительные исследования. Необходимо отметить, что наличие в штамме *V. cholerae* 301 вставки в гене *rpoS* не повлияло на экспрессию данного гена.

Учитывая, что RpoS позитивно регулирует транскрипцию гена *hapR* (Yildiz et al., 2004), далее была изучена экспрессия данного гена. В результате установлено, что исследованные генетически измененные штаммы *V. cholerae* O1 биовара El Tor не отличаются от типичных изолятов по экспрессии гена *hapR*. Исключение составил геновариант *V. cholerae* M1345, уровень экспрессии гена *hapR* которого превышал средние показатели типичных штаммов и геновариантов соответственно в 5,4 – 5,6 раз (Табл. 1).

Итак, в результате проведенной работы создан набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и сконструированы штаммы *E. coli* TOP10, несущие клонированные участки фрагментов генов холерного вибриона, для определения относительной экспрессии структурных и регуляторных генов *V. cholerae* O1 методом двухстадийной ОТ–ПЦР с гибридационно – флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. Проведенный анализ диагностически значимых свойств природных генетически измененных штаммов

V. cholerae биовара El Tor показал, что 72,2% изученных изолятов, завезенных как в первые годы их появления на эндемичной территории (1993-1994), так и современные штаммы, независимо от генетической организации генома, синтезируют незначительное количество ацетоина из глюкозы, что фенотипически проявляется в слабopоложительной реакции Фогес–Проскауэра. Остальные изученные штаммы (27,8%) не синтезируют ацетонин, вследствие чего реакция Фогес–Проскауэра у них – отрицательна. Выявленные различия в ферментации глюкозы у геновариантов и типичных изолятов могут быть использованы при разработке новых методических подходов для их дифференциации. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности генов *als* оперона, а также уровня экспрессии регуляторных генов *alsR* и *aphA*, контролирующих биосинтез ацетоина, выявил, что утрата или снижение продукции ацетоина генетически измененными штаммами обусловлена однонуклеотидной делецией в структурном гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, ответственную за декарбоксилирование ацетолактата в ацетонин, а также высоким уровнем экспрессии гена *aphA*. Важным результатом работы является выявление повышенных адаптационных способностей геновариантов при совместном нахождении с типичными штаммами в условиях дефицита питательных веществ. Селективные преимущества генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor обусловлены повышенной скоростью роста бактериальной популяции, а также увеличенной экспрессией глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS*, участвующего в контроле биосинтеза факторов адаптации в штаммах холерного вибриона.

ВЫВОДЫ

1. Создан набор олигонуклеотидных праймеров, зондов и сконструированных штаммов *E. coli* TOP 10, несущих плазмиду pCR 2.1. с клонированными участками генов холерного вибриона *alsR*, *aphA*, *ctxA*, *hapR*, *recA*, *rpoS*, *toxR*. Доказана эффективность использования этого комплекса для определения экспрессии структурных и регуляторных генов в различных штаммах *V. cholerae* O1 методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

2. Диагностически значимый признак – реакция Фогес–Проскауэра, используемая для дифференциации биоваров *V. cholerae* O1, изменен у всех изученных природных генетически измененных штаммов возбудителя холеры, выделенных на территории Российской Федерации в разные периоды 7-ой пандемии холеры (1993-2014 гг.). Показано, что в отличие от типичных изолятов, у 72,2% исследованных геновариантов возбудителя холеры, реакция Фогес–Проскауэра является слабopоложительной, у 27,8% – отрицательной, что указывает на снижение либо отсутствие их способности образовывать ацетонин из глюкозы.

3. Измененная способность к образованию ацетоина у геновариантов возбудителя холеры Эль Тор является следствием делеции единичного нуклеотида (Т в позиции 315) в структурном гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, а также высокого уровня экспрессии гена *aphA*, негативного регулятора биосинтеза ацетоина, превышающего таковой у типичных штаммов в среднем в 2,5 раза.

4. Выявлена зависимость ростовых свойств генетически измененных штаммов от содержания глюкозы при культивировании их на средах в условиях дефицита питательных веществ. В отличие от типичных штаммов добавление в эти среды глюкозы в концентрации

0,5% и выше оказывает ингибирующее влияние на их рост. В то же время в богатой питательными веществами среде (LB бульон) высокое содержание данного углевода (1% и выше) не влияет на ростовые свойства исследованных геновариантов.

5. В модельных экспериментах впервые установлено, что при совместном культивировании типичных и генетически измененных штаммов холерного вибриона в речной воде, выживаемость последних была в среднем в шесть раз выше (на шестые сутки выращивания). Эти данные указывают на более высокий уровень адаптации геновариантов возбудителя холеры, в сравнении с типичными изолятами, к действию таких неблагоприятных факторов окружающей среды, как дефицит питательных веществ.

6. Адаптационные преимущества генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара El Tor по сравнению с типичными изолятами обусловлены повышенной скоростью роста бактериальной популяции, а также увеличенной экспрессией глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. Заднова С.П. Сравнительный анализ выживаемости типичных штаммов и геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор in vitro и in vivo / С.П. Заднова, Т.А. Кульшань, Н.Б. Челдышова, **А.А. Крицкий**, Н.А. Плеханов, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып.4. – С. 65-69. (журнал из Перечня ВАК)

2. **Крицкий А.А.** Оценка выживаемости природных типичных и генетически измененных штаммов возбудителя холеры в различных условиях окружающей среды /**А.А. Крицкий**, Н.А. Плеханов // Материалы VIII Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – М., 2016. – Т.14. Приложение 1. – С. 150-151.

3. Заднова С.П., Челдышова Н.Б., **Крицкий А.А.** Сравнительный анализ биосинтеза ацетоина и кластера генов, участвующего в его образовании, в штаммах *Vibrio cholerae* O1 серогруппы Эль Тор биовара / С.П. Заднова, Н.Б. Челдышова, **А.А. Крицкий** // Материалы XIII Межгосударственной научно-практической конференции «Достижения в области обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия в государствах-участниках СНГ в рамках реализации стратегии ВОЗ по внедрению ММСП (2005 г.) до 2016 года». – Саратов, 2016. – С. 85-87.

4. **Крицкий А.А.** Изучение конкурентной способности типичных и генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор в модельных экспериментах / **А.А. Крицкий**, Н.Б. Челдышова, Н.А. Плеханов, С.П. Заднова // Сборник статей Проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации «Холера и патогенные для человека вибрионы». – Ростов-на-Дону, 2016. – С. 75-77.

5. **Крицкий А.А.** Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени / **А.А. Крицкий**, Н.Б. Челдышова, И.В. Тучков, Н.И. Смирнова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2017. – №3. – С. 53-57. (**журнал из Перечня ВАК**)

6. Заднова С.П. Сравнительный анализ метаболизма глюкозы в штаммах *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / С.П. Заднова, Н.Б. Челдышова, **А.А. Крицкий**, А.К. Адамов, З.Л. Девдариани, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология – 2017. – №2. – С. 64-68. (**журнал из Перечня ВАК**)

7. **Крицкий А.А.** Создание алгоритма оценки уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* холерного вибриона методом ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени / **А.А. Крицкий**, Н.Б. Челдышова, И.В. Тучков, Н.И. Смирнова // Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – М., 2017. – С.146.

8. **Крицкий А.А.**, Заднова С.П., Плеханов Н.А., Челдышова Н.Б., Смирнова Н.И. Адаптационные свойства типичных и генетических измененных штаммов *Vibrio cholerae* биовара El Tor в условиях недостатка питательных веществ / **А.А. Крицкий**, С.П. Заднова, Н.А. Плеханов, Н.Б. Челдышова, Н.И. Смирнова // Сборник трудов международной научно – практической конференции «Молекулярная диагностика 2018». – Минск, 2018. – С. 448-449.

СПИСОК ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

кДНК – комплементарная ДНК; ОП – оптическая плотность; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; Ф-П – реакция Фогес-Проскауэра; ХТ – холерный токсин; АКІ – среда для выращивания холерных вибрионов при изучении продукции холерного токсина; ELISA – иммуноферментный анализ; Km – канамицин; QMEAN – анализ качества модели (от Qualitative Model Energy Analysis); Rif – рифампицин; Sp – спектиномицин; Str – стрептомицин.