

На правах рукописи

Плеханов Никита Александрович

**АНАЛИЗ СТРУКТУРЫ И ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ ФАКТОРОВ
АДАПТАЦИИ У ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ
VIBRIO CHOLERAЕ БИОВАРА ЭЛЬ ТОР**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Саратов – 2017

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 РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора)

Научный руководитель:

Заднова Светлана Петровна – доктор биологических наук, Федеральное казенное учреждение здравоохранения «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ведущий научный сотрудник

Официальные оппоненты:

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

Шелудько Андрей Вячеславович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов Российской академии наук, ведущий научный сотрудник лаборатории генетики микроорганизмов

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 « 24 » мая 2017 г. в 13.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.078.02 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека» по адресу: 410005, г. Саратов, ул. Университетская, 46. Тел. (8452) 26-21-31, факс (8452) 51-52-12.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке и на сайте <http://www.microbe.ru/disser/dissert/> Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб».

Автореферат разослан «__» _____ 2017 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук, старший научный сотрудник

А.А. Слудский

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Возбудителями текущей, 7-ой, пандемии холеры, начавшейся в 1961 году и продолжающейся до сих пор, являются токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Вызывая легкие (часто бессимптомные) формы болезни, но отличаясь высокой выживаемостью во внешней среде, штаммы Эль Тор вибрионов быстро распространились по всему миру, полностью заменив на эндемичной территории возбудителя предыдущей, 6-ой, пандемии – *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара (Бароян, 1971; Тудор, Страти, 1981; Huq et al., 1983; Colwell et al., 1985; Islam et al., 1994; Schoolnik, Yildiz, 2000).

Однако в 90-х годах прошлого столетия было зарегистрировано появление генетически измененных штаммов (геновариантов) *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (Nair et al., 2002). Геноварианты содержат в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез холерного токсина, ген *ctxB* классических вибрионов (*ctxB^{Class}* или *ctxB1*) и синтезируют повышенное количество холерного токсина, приближаясь по данному показателю к штаммам *V. cholerae* классического биовара. С появлением геновариантов, вызывающих тяжелую форму болезни с высокой летальностью, холера стала более значимой мировой проблемой для здоровья человека, чем несколько десятилетий назад (Nair et al., 2002; Cottingham et al., 2003; Satchell et al., 2016). В связи с интенсивным и широкомасштабным распространением холеры, вызванной штаммами геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, в странах Азии, Африки, Карибского бассейна, прогноз по холере остается неблагоприятным и существует возможность завоза инфекции в любую страну мира (Смирнова с соавт., 2014; Москвитина с соавт., 2015; Титова с соавт., 2016; Reimer et al., 2011; Satchell et al., 2016). В Российской Федерации штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, занесенные с эндемичной территории, вызвали как вспышки (Дагестан, 1994, Татарстан, 2001), так и единичные случаи холеры (Ачинск, Иркутск, 1997; Башкортостан, 2004, 2008; Тверь, 2005; Мурманская область, 2006; Москва, 2010, 2012, 2014) (Смирнова с соавт., 2010; 2014; Савельев с соавт., 2010, Миронова с соавт., 2012, 2016; Москвитина с соавт., 2015; Титова с соавт., 2016; Kuleshov et al., 2016).

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время структура генома штаммов геновариантов, циркулирующих на эндемичной территории и завезенных в различные страны, изучена достаточно детально. Проведено полногеномное секвенирование значительного количества штаммов. Выявлено, что геном геновариантов подвержен дальнейшим эволюционным изменениям, что выражается в появлении как точковых мутаций, так и делеций протяженных участков. Показана вариабельность структуры генов вирулентности, кодирующих продукцию холерного токсина и токсин-корегулируемых пилей адгезии, пандемичности, некоторых регуляторных генов. В современный период глобальное распространение по-

лучили «гипервирулентные» штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, одной из генетических особенностей которых является наличие обширной делеции в острове пандемичности VSP-II (Смирнова с соавт., 2014; Taviani et al., 2010; Chin et al., 2011; Reimer et al., 2011; Son et al., 2011; Satchell et al., 2016; Kuleshov et al., 2016).

Однако механизмы адаптации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор исследованы не достаточно. Как известно, *V. cholerae* относится к группе патогенов, которые могут существовать в двух разных экологических нишах (кишечник человека и открытые водоемы). При смене среды обитания возбудитель холеры попадает в условия, отличающиеся по температуре, наличию питательных веществ, осмолярности, поэтому в водных условиях начинают экспрессироваться гены факторов адаптации, способствующие выживанию *V. cholerae* в данной среде обитания. При этом большинство имеющихся сведений о выживаемости и адаптации возбудителя холеры во внешней среде получены на модели типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор (Бароян, 1971; Хайтович, Михайлова, 2002; Смирнова с соавт., 2007; Куликалова, 2010; Faruque, Nair, 2008; Lutz et al., 2013). Относительно штаммов геновариантов показано, что они способны продуцировать биопленку, но в отличие от типичных штаммов более подвижны (Шашкова, 2012, Титова, Кушнарева, 2015; Son et al., 2011; Rahman et al., 2014; Satchell et al., 2016). В то же время данные о выживаемости штаммов геновариантов после действия стрессовых факторов и их влиянии на структуру генов практически отсутствуют. Фрагментарно представлены сведения о структуре и экспрессии генов, необходимых для формирования биопленки и устойчивости к различным стрессовым воздействиям. Высказано предположение, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор обладают большей экологической устойчивостью и лучше приспосабливаются к изменениям окружающей среды (Grim et al., 2010; Reimer et al., 2011), но экспериментальные данные, подтверждающие это предположение, отсутствуют. Более детальное исследование процессов адаптации штаммов геновариантов к действию различных неблагоприятных факторов внешней среды позволит установить причины их широкого распространения в современный период.

Цель работы – выявление особенностей в структуре и экспрессии генов, кодирующих факторы адаптации к неблагоприятным воздействиям внешней среды, у штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных в разные годы на территорию Российской Федерации, и анализ их устойчивости к действию стрессовых факторов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей структурных и регуляторных генов, необходимых для формирования биопленки и устойчивости к стрессовым факторам у штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных на территорию Российской Федерации в 1993-2012 гг.

2. Выявить изменения в экспрессии генов, участвующих в формировании биопленки, у штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, занесенных в разные годы на территорию Российской Федерации и имеющих разную структуру острова пандемичности VSP-II.

3. Исследовать устойчивость штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с разной структурой острова пандемичности VSP-II к действию неблагоприятных факторов внешней среды (недостаток питательных веществ, высокая и низкая температура, осмотический и оксидативный стрессы).

4. Провести фенотипический анализ и установить присутствие генов, входящих в состав профагов CTX и RS1, островов патогенности VPI-1 и VPI-2, островов пандемичности VSP-I и VSP-II, в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, подвергшихся действию стрессовых факторов.

5. Сконструировать мультилокусную ПЦР для одновременного выявления токсигенных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и дифференциации их по эпидемическому потенциалу на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II.

Научная новизна работы.

Установлено, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации в 1993-2012 гг., имеют идентичную референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор структуру генов, обеспечивающих подвижность, биосинтез экзополисахарида, поддерживающих архитектуру биопленки, глобального стрессового регулятора *rpoS* и ключевых регуляторных генов системы Quorum Sensing – *hapR*, *luxO*.

Анализ нуклеотидной последовательности *msh* оперона выявил стабильное сохранение структуры гена *mshA*, кодирующего основную субъединицу маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии (MSHA) во всех исследованных штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор. При этом в штаммах геновариантов, изолированных в 1993-1994 гг., структура остальных генов *msh* оперона идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, занесенных с 1997 года, в последовательности генов *mshE* и *mshJ*, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, выявлены однонуклеотидные замены (SNPs), которые не оказывают влияние на биосинтез данных пилей, но могут служить в качестве генетической метки изолятов, появившихся после 1997 года.

Показано, что исследованные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации в 1993-2012 гг. и имеющие разную структуру острова пандемичности VSP-II (интактный, с небольшой делецией, с протяженной делецией), не отличаются от типичных Эль Тор вибрионов по способности формировать биопленку *in vitro*.

Установлено, что исследованные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в отличие от типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор более устой-

чивы к температурному стрессу (42 °С и 5 °С). В результате адаптации к повышенной температуре (42 °С) в клетках геновариантов увеличивается биосинтез белков-поринов внешней мембраны OmpU/OmpT, а при ее понижении (5 °С) – экзополисахарида. При этом штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации в 1993-2001 гг., также отличаются повышенной устойчивостью к осмотическому (3 моль раствор NaCl) и оксидативному (20 ммоль раствор перекиси водорода) стрессам. Один из выявленных механизмов их устойчивости к осмотическому стрессу обусловлен синтезом экзополисахарида в более ранние сроки, чем у типичных штаммов.

Показано, что после действия 20 ммоль перекиси водорода штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор могут утрачивать остров пандемичности VSP-I или профаг RS1. Частота образования VSP-IΔ и RS1Δ клонов составляла соответственно 20 и 30 %.

Предложен способ одновременного определения серогруппы, биовара, токсигенности исследуемого штамма *V. cholerae*, идентификации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и определения их эпидемического потенциала (высокий или низкий) на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II. Приоритетность разработанного способа подтверждена получением патента на изобретение (Патент РФ №2560280, приоритет от 23.09.2014 г.).

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость исследований заключается в получении знаний, расширяющих представления об экологии недавно появившихся штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор с повышенной вирулентностью. Приведены экспериментальные доказательства лучшей адаптации штаммов геновариантов по сравнению с типичными изолятами к действию ряда неблагоприятных факторов внешней среды. Выявлены стрессовые воздействия, приводящие к реорганизации генома штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор. На основе мультилокусной ПЦР с электрофоретическим учетом результатов разработан способ идентификации штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и дифференциации их по эпидемическому потенциалу на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II.

В GenBank депонированы нуклеотидные последовательности полных генов изогенных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор M1275 (код доступа LRAF00000000) и M1275D (код доступа LLAG00000000) соответственно с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I.

В Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» депонированы изогенные штаммы геновариантов *V. cholerae* M1275 и M1275 ΔVSP-I с интактным и делетированным островом пандемичности VSP-I (KM277 1-2). Полученные изогенные штаммы могут быть использованы для изуче-

ния влияния VSP-I на биологические свойства штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Одобрены Ученым советом (протокол №5 от 24.06.2014 г.) и утверждены директором ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» методические рекомендации «Способ идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу».

Полученные новые сведения о выживаемости штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор после действия неблагоприятных факторов внешней среды используются при чтении лекций «Микробиология и генетика возбудителя холеры» на курсах профессиональной переподготовки по особо опасным инфекциям при ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб».

Методология и методы исследования.

В работе использовано 53 штамма *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп и 6 штаммов других бактерий. Применяли традиционные и современные микробиологические, биохимические и молекулярно-генетические методы. Продукцию холерного токсина (ХТ) изучали методом GM₁ ELISA (Svennerholm et al., 1983; Iwanaga M. et al., 1986). Биосинтез MSHA пилей устанавливали по методике L.F. Hanne и R.A. Finkelstein (1982). Наличие растворимой гемагглютинин протеазы (НАР), фосфолипазы, гемолизина определяли согласно ранее описанным способам (Tan, Tan, 1988; Finkelstein et al., 1992; Singh et al., 2001). Подвижность исследовали на полужидком (0,4 %) LB агаре. Способность штаммов *V. cholerae* формировать биопленку анализировали согласно методике J. Nesper с соавт. (2001). Выживаемость штаммов изучали в 0,14 моль растворе NaCl и фильтрованной автоклавированной речной воде (р. Волга), после действия высокой (42 °C) и низкой (5 °C) температуры, осмотического и оксидативного стрессов (Wai et al., 1998). Электрофорез в присутствии SDS осуществляли по известному методу (Laemmli, 1970), окрашивая белки после электрофореза раствором кумаси R-250, полисахариды – азотнокислым серебром (Hitchcock, Brown, 1983). Сравнительную оценку содержания экзополисахарида в образцах проводили методом денситометрии с помощью «Универсальной компьютерной программы для количественного учета биохимических реакций», разработанной в РосНИПЧИ «Микроб» (Бойко с соавт., 2015). Атомно-силовую микроскопию проводили на сканирующем зондовом микроскопе «Solver P47-PRO» (NT-MDT, Россия). ПЦР с использованием специфических праймеров выполняли на термоциклере «Терцик» (ДНК-технология, Россия). Полногеномное секвенирование штаммов *V. cholerae* осуществлялось по технологии ионного полупроводникового секвенирования Ion Torrent на приборе «Ion PGM» (Thermo Fisher Scientific, США). Нуклеотидные последовательности генов анализировали с помощью программного пакета Lasergene DNASTAR SeqMan pro, а также freeware-программы BioEdit. Статистическую обработку полученных экспериментальных данных проводили с помощью программ Microsoft Excel (Microsoft Office 2003) и

Statistica 6.0 (StatSoft), вычисляя среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической и доверительный интервал.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Нуклеотидные последовательности структурных и регуляторных генов, обеспечивающих подвижность, биосинтез экзополисахарида, формирование биопленки, устойчивость к стрессовым факторам консервативны у штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных в разные годы на территорию Российской Федерации. В генах, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, присутствуют SNPs, которые могут служить генетической меткой штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенных после 1997 года.

2. Штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в отличие от типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор устойчивы к температурному (42 °C и 5 °C) стрессу. Геноварианты, выделенные в Российской Федерации в 1993–2001 гг., также устойчивы к осмотическому (3 моль раствор NaCl) и оксидативному (20 ммоль раствор H₂O₂) стрессам. Повышенная выживаемость штаммов геновариантов в условиях низкой температуры (5 °C) и высокой осмолярности (3 моль раствор NaCl) обеспечивается продукцией экзополисахарида на поверхности клеток. Одним из факторов, оказывающих влияние на структуру генома штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор является 20 ммоль раствор перекиси водорода.

3. Созданная мультиплексная ПЦР с электрофоретическим учетом результатов позволяет определять серогруппу, биовар, токсигенность исследуемого штамма *V. cholerae*, выявлять штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и дифференцировать их на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II на штаммы с низким и высоким эпидемическим потенциалом.

Степень достоверности и апробация результатов.

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

Материалы диссертации представлены на Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины» (Ставрополь, 2014), совещании специалистов Роспотребнадзора по вопросам совершенствования эпидемического надзора за холерой (Ростов-на-Дону, 2014), VII Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2015), 19-ой международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015), ежегодных научно-практических конференциях «Итоги и перспективы фундаментальных и прикладных исследований в РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов, 2014-2016).

Личный вклад автора

Автор непосредственно проводил анализ литературы, участвовал в обсуждении цели и задач исследования, планировании экспериментов, получении и обработке экспериментальных данных. Работа по определению устойчивости штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор к действию неблагоприятных факторов внешней среды проводилась совместно с вед. науч. сотр., к.м.н. И.М. Крепостновой. Подготовка основных публикаций осуществлена как лично автором, так и при его непосредственном участии.

Публикации и связь работы с научными программами.

По теме диссертации опубликовано 10 работ, из которых 5 статей в рекомендованных ВАК изданиях и один патент.

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 №0120.0850501), а также Федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации» 2009-2014 гг.

Структура и объем диссертации.

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, четырех глав собственных исследований, заключения, выводов и списка использованных источников, включающего 195 работ, из них 44 отечественных и 151 зарубежных авторов. Общий объем диссертации составляет 130 страниц. Текст иллюстрирован 9 таблицами и 18 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Сравнительный анализ структуры и экспрессии генов, необходимых для формирования биопленки, в штаммах геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор

На первом этапе работы был проведен сравнительный анализ структуры генов, обеспечивающих подвижность (*motX*, *flaA*, *flaC*), биосинтез MSHA пилей (*mshA-Q*), экзополисахарида (*vpsR*, *vpsT*), регулирующих архитектуру биопленки (*rbmA*, *rbmC*, *bap1*), а также ключевых регуляторов системы Quorum Sensing (*hapR*, *luxO*). Исследования были проведены на семи штаммах геновариантов, завезенных на территорию России с 1993 по 2012 годы, нуклеотидные последовательности полных геномов которых депонированы в GenBank: M1275 (Дагестан, 1993), M1293 (Дагестан, 1994), P17644 (Ачинск, 1997), M1429 (Башкирия, 2004), P18899 (Мурманск, 2006), L3226 (Москва, 2010). Секвенированная последовательность полного генома штамма *V. cholerae* M1509 (Москва, 2012) была предоставлена зав. лаб. геномного и протеомного анализа, к.х.н. Я.М. Красновым. В результате анали-

за у исследуемых штаммов не обнаружено различий в структуре генов *motX*, *flaA*, *flaC*, *vpsT*, *vpsR*, *rbmA*, *rbmC*, *bap1*, *hapR* и *luxO*. Структура указанных генов идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

При анализе нуклеотидной последовательности 17 генов, входящих в *msh* оперон, у всех исследованных штаммов геновариантов установлено стабильное сохранение структуры гена *mshA*, кодирующего основную субъединицу пилей, и его идентичность референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор. У штаммов геновариантов *V. cholerae* M1275 и M1293, изолированных в 1993-1994 гг., структура остальных генов *msh* оперона также полностью совпала с референс-штаммом. В то же время у штаммов, завезенных в 1997 и позже, включая и современные изоляты, обнаружены несинонимичные SNPs в генах *mshJ* (замена А на Г в позиции 560, приводящая к замене гистидина на аргинин в позиции 187) и *mshE* (замена Г на А в позиции 1219, замена валина на изолейцин в позиции 407). Белок MshJ является белком-порином внешней мембраны, а MshE – АТФ-азой. Необходимо отметить, что идентичные замены были обнаружены зарубежными авторами у штаммов, выделенных во время эпидемии на острове Гаити в 2010 году (Sealfon et al., 2012). Однако нами установлено, что указанные SNPs уже присутствовали в штаммах геновариантов, изолированных в 1997 году.

Кроме того, в штамме P17644 обнаружена делеция одного нуклеотида в гене *mshN* (кодирует белок цитоплазматической мембраны) в позиции 249 от начала гена, приводящая к сдвигу рамки считывания и появлению стоп-кодонов. У штамма M1429 в гене *mshH* (участвует в работе системы Quorum Sensing) обнаружен сдвиг рамки считывания, вызванный инсерцией (вставкой единичного G в позиции 1384). Указанные SNPs не влияют на биосинтез MSHA пилей (Jones et al., 2015).

Далее были проведены сравнительные исследования биосинтеза MSHA пилей, экзополисахарида (ЭПС) и способности образовывать биопленку у 7 типичных штаммов и 18 штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных в Россию в 1993-2010 гг. Штаммы геновариантов имели разную структуру острова пандемичности VSP-II, играющего важную роль в адаптации возбудителя к неблагоприятным факторам (Faruque et al., 2003; O'Shea et al., 2004). Штаммы геновариантов, изолированные в 1993-1994 гг. (M1264, M1298, M1299, M1270, M1275, M1297, M1266, M1268, M1293) и 1998-2001 гг. (M1326, M1344, M1345) так же как и типичные штаммы, содержали интактный VSP-II. Штамм *V. cholerae* P17644 (1997 г.) включал VSP-II с короткой делецией (отсутствует 4 гена), штаммы M1429, M1430, P18899, L3226, L4150, изолированные в 2004-2010 гг., имели VSP-II с протяженной делецией (отсутствует 21 ген). Структура VSP-II данных штаммов была изучена ранее (Смирнова с соавт., 2014; Агафонов с соавт., 2014).

В результате установлено, что исследуемые штаммы геновариантов не отличались между собой и от типичных изолятов по продукции MSHA пилей.

При сравнительном анализе способности формировать биопленку на различных средах (автоклавированная речная вода, бульон LB, искусственно приготовленная морская вода, физиологический раствор) и при различной температуре (7 °С, 22-25 °С, 28 °С, 37 °С) было выявлено, что биопленку геноварианты формировали через 18-24 ч только на богатой питательной среде (бульон LB). При этом повышение температуры культивирования увеличивало способность к формированию биопленки (рис. 1). Отличия по способности формировать биопленку между штаммами геновариантов, завезенными в разные годы и имеющими разную структуру VSP-II, а также в сравнении с типичными штаммами, не выявлены.

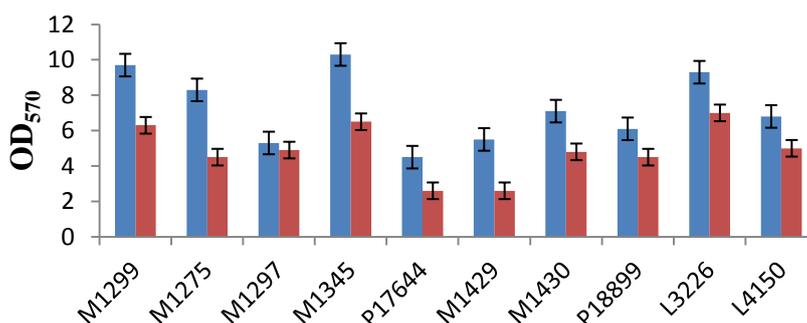


Рисунок 1. Образование биопленки некоторыми штаммами геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в бульоне LB при температуре 37 °С (левый столбик) и 28 °С (правый столбик).

Таким образом, анализ нуклеотидной последовательности *msh* оперона в штаммах геновариантов, показал стабильное сохранение структуры гена *mshA*, кодирующего основную субъединицу MSHA пилей, во всех исследованных штаммах геновариантов. При этом в штаммах геновариантов, изолированных в 1993-1994 гг., структура остальных генов *msh* оперона также идентична типичным Эль Тор вибрионам. В то же время в штаммах геновариантов, завезенных с 1997 года, выявлены SNPs в генах, участвующих в сборке и секреции MSHA пилей, которые не оказывают влияние на биосинтез данных пилей адгезии, но могут служить в качестве генетической метки данных изолятов. В результате проведенных исследований показано, что исследованные штаммы геновариантов, как и типичные изоляты, формируют биопленку, при этом отличия по способности формировать биопленку между штаммами геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, имеющими разную структуру VSP-II, не выявлены.

2. Влияние стрессовых факторов на штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор

В данном разделе работы представлены данные о выживаемости штаммов геновариантов при нахождении в условиях дефицита питательных веществ (0,14 моль раствор NaCl, автоклавированная речная вода), при изменении температуры и после действия осмотического и оксидативного стрессов. Выбор указанных стрес-

совых факторов был обусловлен их влиянием на возбудителя при нахождении в водных экосистемах и кишечнике человека (Colwell, Huq, 1994; Lutz et al., 2013).

Учитывая важную роль в адаптации к неблагоприятным воздействиям глобального регулятора стрессового ответа *rpoS*, на первом этапе работы была исследована его структура у семи вышеуказанных штаммов геновариантов, завезенных в разные годы на территорию России (см. раздел 1). В результате установлено, что структура данного гена у всех штаммов одинакова и идентична референс-штамму *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор.

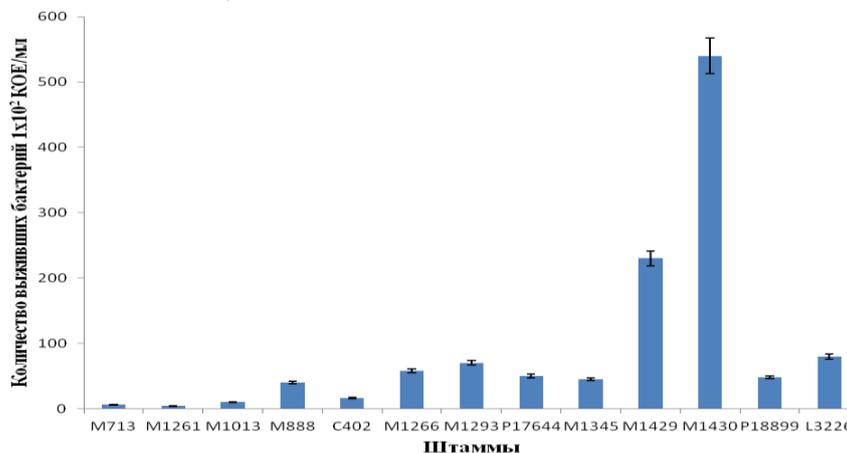
В работе использовали штаммы геновариантов, завезенные в 2004-2011 гг. и имеющие разную структуру VSP-II: *V. cholerae* M1264, M1270, M1275, M1266, M1293, M1345 – с интактным, P17644 – с незначительной делецией, M1429, M1430, P18899, L4150, L3226, 301 – с протяженной делецией. У полученных в конце эксперимента клонов исследовали экспрессию ХТ, ферментов патогенности (НАР, фосфолипаза), гемолизина, белков внешней мембраны OmpT/OmpU, экзополисахарида, а также подвижность. Кроме того, изолированные клоны проверяли на наличие структурных и регуляторных генов, входящих в состав 6 мобильных генетических элементов: профагов СТХ (*ctxA*, *cep*, *zot*, *ace*) и RS1 (*rstC*), островов патогенности VPI-1 (*tcpA*, *toxT*) и VPI-2 (*nanH*), островов пандемичности VSP-I (*vc0180*, *vc0181*) и VSP-II (*vc0492*, *vc0496*, *vc0502*, *vc0514*).

При культивировании штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в условиях недостатка питательных веществ при комнатной температуре выявлено, что исследуемые штаммы способны длительное время (от 2 до 6-11 месяцев) выживать в данных условиях. После пребывания в автоклавированной речной воде у всех изученных штаммов геновариантов снизилась продукция ХТ (в среднем в 10 раз), у 70 % уменьшился биосинтез гемолизина (в 1,5-2,0 раза), а также подвижность. В то же время у 50 % изолятов возросла протеазная активность (в среднем в 1,5 раза). Понижение ХТ и повышение биосинтеза НАР, возможно, связано с увеличением экспрессии белка NapR, положительно регулирующего продукцию НАР, но угнетающего биосинтез ХТ в условиях дефицита питательных веществ (Joelsson et al., 2007).

При нахождении в условиях недостатка питательных веществ все штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор стабильно сохраняли структуру генома. Исключение составил штамм *V. cholerae* P18899 (Мурманск, 2006), в популяции которого при нахождении в автоклавированной речной воде были выявлены атоксигенные клоны, утратившие профаг СТХ.

Далее исследовали влияние температурного стресса (автоклавированная речная вода, температура 5 °С и 42 °С) на штаммы геновариантов. В результате установлено, что все изученные штаммы геновариантов характеризовались большей выживаемостью по сравнению с типичными штаммами. Так на 10 сут нахождения при температуре 5 °С количество бактерий геновариантов превышало КОЕ типич-

ных штаммов в 11,3-13,5 раз (в зависимости от штамма) (рис. 2). Исключение составил только типичный штамм *V. cholerae* M888 (Астрахань, 1970), выживаемость которого была сопоставима со штаммами геновариантов. Возможно, одной из причин его повышенной выживаемости является быстрое формирование атоксигенных клонов, для которых характерен более высокий уровень выживаемости в данной среде (Смирнова с соавт., 2007).



M713, M1261, M1013, M888, C402 – типичные штаммы.

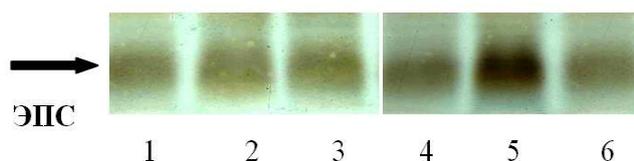
M1266, M1293, P17644, M1345 – штаммы геновариантов, завезенные в 1993-2001 гг. и имеющие интактный (или с незначительной делецией) VSP-II.

M1429, M1430, P18899, L3226 – штаммы геновариантов, занесенные в 2004-2010 гг. и содержащие VSP-II с протяженной делецией.

Рисунок 2. Выживаемость штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор на 10 день культивирования в автоклавированной речной воде при температуре 5 °С.

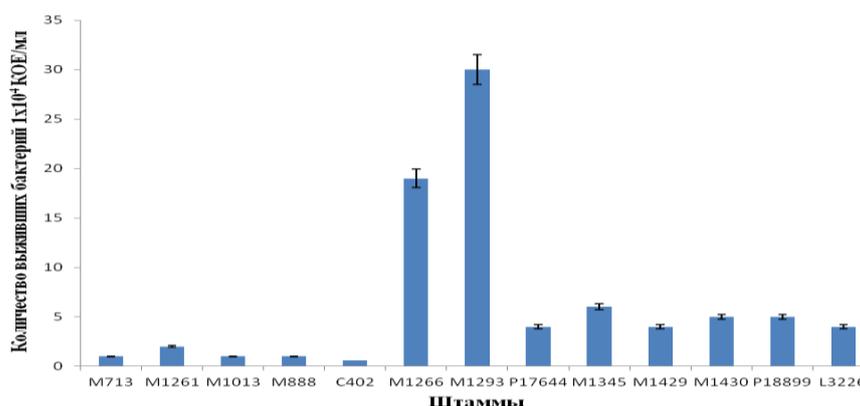
Культивирование штаммов геновариантов при низкой температуре не привело к изменению биосинтеза ферментов патогенности, гемолизина, а также подвижности. Не выявлены отличия и в белковом профиле. Однако было отмечено, что популяция 63 % исследованных штаммов геновариантов состояла из мутных колоний. Как было установлено ранее, изменение морфологии данных колоний обусловлено биосинтезом экзополисахарида (Заднова, 2009). Действительно при исследовании полученных колоний методом электрофореза и последующей окраской полиакриламидных пластин азотнокислым серебром у данных клонов выявлено наличие ЭПС (рис. 3, дорожки 4-5).

Геноварианты также отличались и повышенной устойчивостью к действию высокой температуры. Через 21 день инкубации при температуре 42 °С количество выживших бактерий геновариантов в 6,7-15,0 раз (в зависимости от штамма) превышало КОЕ типичных штаммов (рис. 4). К концу эксперимента (3 месяца) все штаммы геновариантов сохраняли жизнеспособность, в то время как типичные штаммы уже не высевались.



1–3 – типичный штамм M1261; 4–6 – геновариант L3226. Дорожки 1,4 – исходные штаммы; 2,5 – штаммы, выращенные при температуре 5 °С; 3,6 – при температуре 42 °С.

Рисунок 3. Продукция экзополисахарида штаммами *V. cholerae* биовара Эль Тор до (дорожки 1, 4) и после действия температурного стресса (дорожки 2-3, 5-6).



M713, M1261, M1013, M888, C402 – типичные штаммы.

M1266, M1293, P17644, M1345 – штаммы геновариантов, завезенные в 1993-2001 гг. и имеющие интактный (или с незначительной делецией) VSP-II.

M1429, M1430, P18899, L3226 – штаммы геновариантов, завезенные в 2004-2010 гг. и содержащие VSP-II с протяженной делецией.

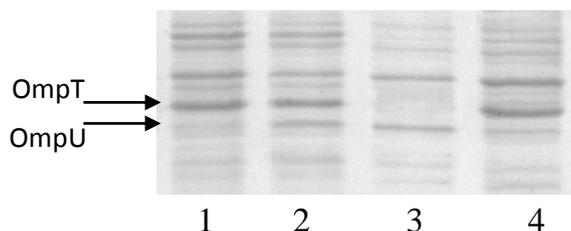
Рисунок 4. Выживаемость штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор на 21 день культивирования в автоклавированной речной воде при температуре 42 °С.

При этом у всех изученных штаммов геновариантов, культивируемых при температуре 42 °С, не было выявлено изменений в продукции ферментов патогенности, гемолизина, а также подвижности. Не увеличился и биосинтез ЭПС (рис. 3, дорожки 4,6), но отмечалось повышение продукции белков-поринов внешней мембраны – OmpT и (или) OmpU с молекулярной массой соответственно 40 и 38 кДа (рис. 5, дорожка 2).

ПЦР-анализ изолятов, полученных после действия температурного стресса, показал стабильное сохранение всех тестируемых мобильных генетических элементов.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что геноварианты *V. cholerae* биовара Эль Тор способны лучше адаптироваться к изменению температуры, чем типичные штаммы. Один из выявленных механизмов устойчивости штаммов геновариантов к высокой температуре связан с увеличением

биосинтеза белков-поринов внешней мембраны OmpT/OmpU, а при низкой – экзополисахарида.



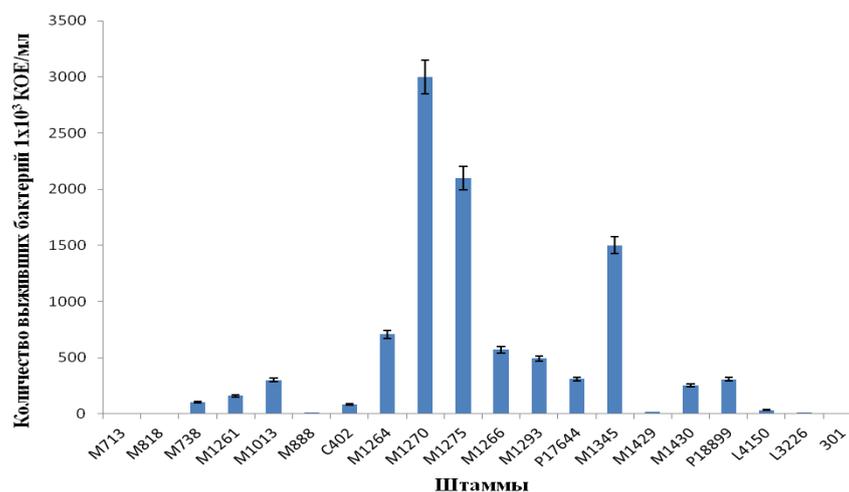
1– исходный штамм *V. cholerae* M1270; 2 – штамм *V. cholerae* M1270, выращенный при температуре 42 °С; 3-4 – Tox- и Tox+ клоны *V. cholerae* Дакка 35 классического биовара, взятого в качестве контроля по продукции белков OmpT/OmpU.

Стрелками отмечены белки OmpT и OmpU.

Рисунок 5. Влияние высокой температуры (42 °С) на белковый профиль штамма геноварианта *V. cholerae* M1270.

На следующем этапе работы было проведено сравнительное изучение выживаемости штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор после действия осмотического (3 моль раствор NaCl) и оксидативного (20 ммоль раствор перекиси водорода) стрессов. В результате выявлено, что через 40 мин инкубации в солевом растворе количество выросших клеток типичных штаммов и геновариантов было практически одинаковым. Однако через 60 мин исследуемые штаммы были разделены на две группы штаммов. В первую группу вошли изоляты (M1264, M1270, M1275, M1266, M1293, P17644, M1345), отличающиеся повышенной выживаемостью (рис.6). Данная группа включала штаммы, занесенные в Российскую Федерацию в 1993-2001 гг. и содержащие интактный (или с незначительной делецией) VSP-II. Выживаемость второй группы была намного ниже. Данная группа включала типичные штаммы (M713, M818, M738, M1261, M1013, M888, C402) и штаммы геновариантов (M1429, M1430, P18899, L4150, L3226, 301), изолированные в современный период (2004-2011 гг.) и содержащие VSP-II с протяженной делецией. К концу эксперимента (через 120 мин) только у первой группы штаммов оставались жизнеспособные клетки.

С целью изучения механизма повышенной устойчивости первой группы штаммов геновариантов к осмотическому стрессу было исследовано наличие экзополисахарида, который согласно данным литературы увеличивает устойчивость штаммов к данному стрессовому фактору (Wai et al., 1998). В результате установлено, что ЭПС присутствует как у типичных штаммов, так и геновариантов. Однако у штаммов геновариантов он начинает синтезироваться в более ранние сроки (через 40 мин инкубации) (рис. 7). В то же время у типичных штаммов ЭПС был выявлен только спустя 90 мин инкубации, когда в популяции жизнеспособными оставались единичные бактерии.



M713, M818, M738, M1261, M1013, M888, C402 – типичные штаммы. M1264, M1270, M1275, M1266, M1293, P17644, M1345 – геноварианты, завезенные в 1993-2001 гг. и имеющие интактный или с незначительной делецией VSP-II. M1429, M1430, P18899, L4150, L3226, 301 – геноварианты, занесенные в 2004-2011 гг. и содержащие VSP-II с протяженной делецией.

Рисунок 6. Выживаемость штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор через 60 мин после действия осмотического стресса (3 моль раствор NaCl).

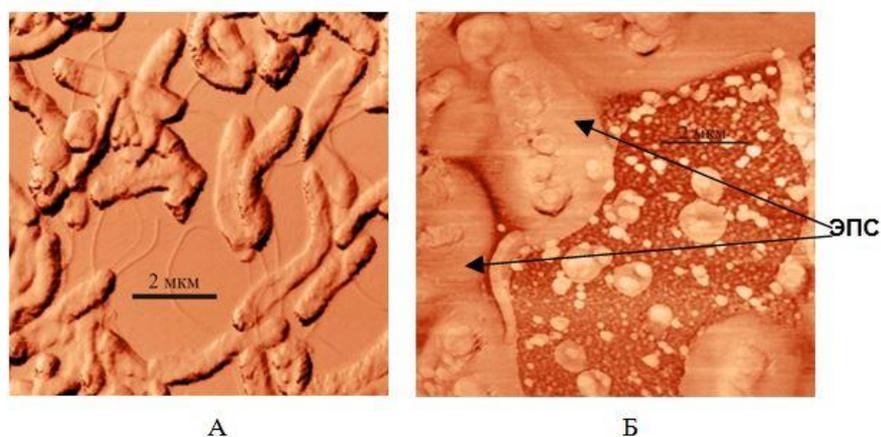
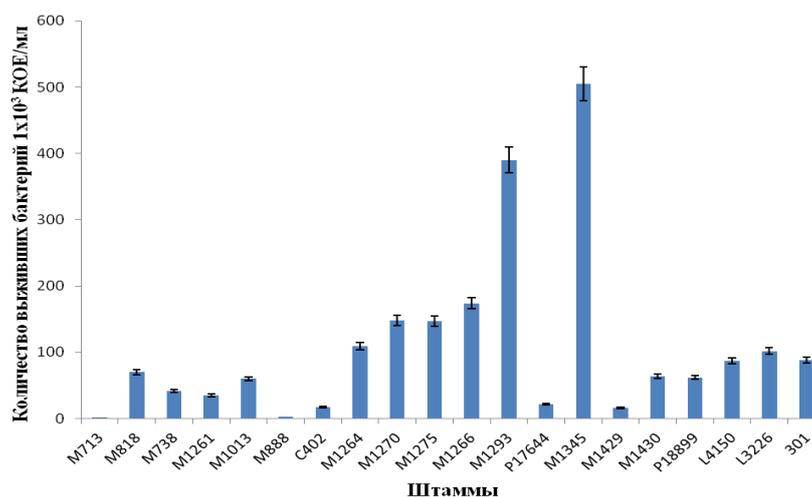


Рисунок 7. Изображение клеток типичного штамма *V. cholerae* M1261 (А) и геноварианта M1293 (Б), полученных после действия осмотического стресса через 40 мин инкубации. ЭПС – экзополисахарид.

Анализ выживаемости штаммов *V. cholerae* после действия оксидативного стресса также показал большую устойчивость штаммов геновариантов, выделенных в 1993-2001 гг., к данному стрессовому фактору. Исключение составил штамм *V. cholerae* P17644, который был чувствителен к перекиси водорода (рис. 8).



M713, M818, M738, M1261, M1013, M888, C402 – типичные штаммы.
 M1264, M1270, M1275, M1266, M1293, P17644, M1345 – штаммы геновариантов, имеющие интактный (или с незначительной делецией) VSP-II (1993-2001 гг.).
 M1429, M1430, P18899, L4150, L3226, 301 – штаммы геновариантов, содержащие VSP-II с протяженной делецией (2004-2011 гг.).

Рисунок 8. Выживаемость штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор через 6 мин после действия оксидативного стресса (20 ммоль раствор перекиси водорода).

Далее было изучено влияние осмотического и оксидативного стрессов на фенотипические свойства штаммов. В результате выявлено, что после действия осмотического стресса у штаммов геновариантов снижалась подвижность, возможно, в результате уменьшения биосинтеза Na⁺-транспортирующей NADH-убихинон редуктазы, регулирующей работу жгутика холерного вибриона, продукция которой уменьшается в условиях осмотического стресса (Häse, Mekalanos, 1999; Kojima et al., 1999). В то же время у выживших после действия оксидативного стресса клонов изменений в биосинтезе ХТ, гемолизина, ферментов патогенности, экзополисахарида, белков внешней мембраны, а также подвижности обнаружено не было.

При анализе структуры генома штаммов геновариантов, подвергшихся действию стрессовых факторов, в популяции штаммов *V. cholerae* M1264 и M1275, полученных после действия 20 ммоль раствора перекиси водорода, было выявлено три вида клонов: сохранившие все тестируемые МГЭ, утратившие профаг RS1 (штамм M1264) или лишенные острова пандемичности VSP-I (штамм M1275).

Фенотипический анализ полученных изогенных клонов показал, что утрата профага RS1 в штамме *V. cholerae* M1264 ΔRS1 приводит к уменьшению продукции гемолизина (в 1,8 раз), но повышению биосинтеза НАР (в 4,5 раз), фосфолипазы (в 2,3 раза), а также подвижности (в 3,8 раз). В то же время потеря острова пандемичности VSP-I в штамме *V. cholerae* M1275 ΔVSP-I влечет снижение гемолитической и ферментативной активности, а также подвижности.

Таким образом, в результате проведенных исследований установлено, что изученные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор способны длитель-

ное время выживать в условиях дефицита питательных веществ. Показано, что геноварианты лучше адаптируются к изменению температуры по сравнению с типичными штаммами. Один из механизмов устойчивости штаммов геновариантов к высокой температуре связан с увеличением биосинтеза белков-поринов внешней мембраны OmpT/OmpU, а при низкой – экзополисахарида. Штаммы геновариантов, выделенные в период с 1993 по 2001 годы, в результате продукции экзополисахарида в более ранние сроки, также устойчивы к осмотическому стрессу. После действия 20 ммоль раствора перекиси водорода в популяции штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор появляются клоны, утратившие профаг вирулентности RS1 или остров пандемичности VSP-I.

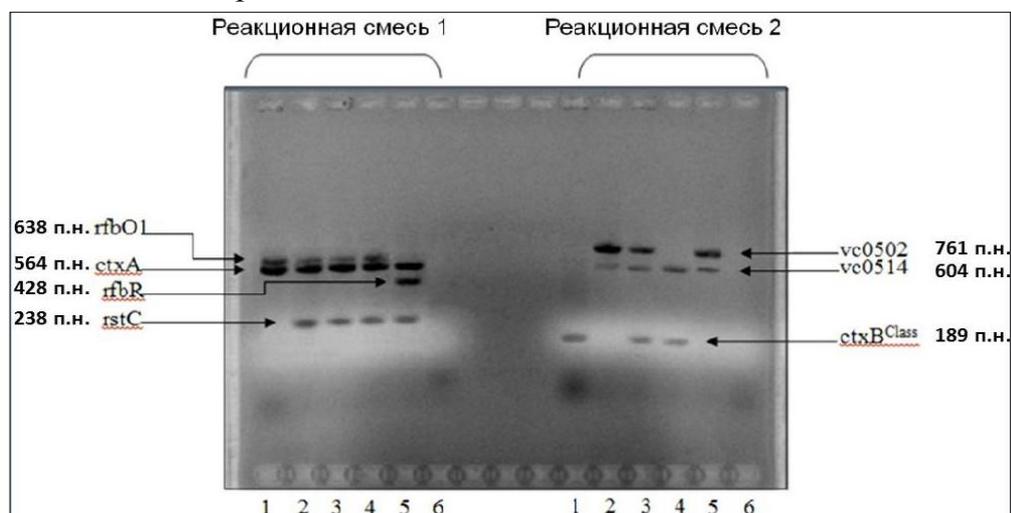
В дальнейшем планируется проведение исследований по изучению влияния других стрессовых факторов на штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, а также изучение механизмов их адаптации *in vivo*.

3. Разработка мультиплексной ПЦР для одновременной идентификации штаммов геновариантов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор и определения их эпидемического потенциала

Отдельный интерес представляли исследования по разработке способа, позволяющего одновременно идентифицировать штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор и определять их эпидемический потенциал на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II. Исходя из поставленной задачи, были выбраны гены-мишени для определения серогруппы, токсигенности, биовара исследуемого штамма, выявления геновариантов и анализа структуры острова пандемичности VSP-II. Для выявления штаммов O1 серогруппы были использованы фрагменты генов *rfbE* (*vc0244*) и *rfbG* (*vc0245*), находящиеся в локусе *rfbO*, который отвечает за биосинтез O1-антигена (Goel et al., 2007; Kumar et al., 2009), для детекции O139 антигена – фрагмент гена *rfbR*, входящий в состав генов, кодирующих O139 антиген (Sozhamannan et al., 1999; Заднова с соавт., 2010). Токсигенность штаммов устанавливали по наличию фрагмента гена *ctxA*, кодирующего эффекторную А-субъединицу холерного токсина (Fields et al., 1992). Ген *rstC* из профага RS1 был выбран в качестве метки, указывающей на биовар исследуемого штамма (Waldor et al., 1997). Геноварианты выявляли по присутствию классического аллеля гена *ctxB* (*ctxB^{Class}*) в токсигенных штаммах *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (Morita et al., 2008). Дифференциацию геновариантов по эпидемическому потенциалу проводили на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II по двум генам – *vc0514* (праймеры VSP-IIchem-F-R) и *vc0502* (праймеры VSP-IIpilin-F-R), расположенных соответственно в краевой и центральной части VSP-II.

Учитывая необходимость выявления семи генов, мультиплексная ПЦР была разделена на две реакционные смеси (рис. 9). ПЦР проводили в объеме 25 мкл реакционной смеси на 1 пробу ДНК (10 мкл). Первая и вторая реакционная смесь содержали 2,5 мкл 10хПЦР буфера (рН 8,8); 2,5 мкл смеси дНТФ; 1 мкл MgCl₂, 0,26

мкл Taq-полимеразы. Первая смесь включала также 6,14 мкл деионизованной воды и 2,6 мкл смеси праймеров *rfbO1-F-R*, *rfbR-F-R*, *ctxA-F-R*, *rstC-F-R* соответственно в концентрации 1,9; 7,6; 1,74; 8,0 п/моль каждого, а вторая – 6,74 мкл деионизованной воды и 2 мкл смеси праймеров *ctxB^{Class}-F-R*, *VSP^{II}pilin-F-R*, *VSP^{II}chem-F-R* соответственно в концентрации 6,9; 3,7; 4,9 п/моль каждого.



1. – токсигенный штамм *V. cholerae* 569В O1 классического биовара; 2. – М738 типичный токсигенный штамм O1 Эль Тор биовара; 3 – токсигенный геновариант *V. cholerae* M1266 O1 биовара Эль Тор с интактным VSP-II и низким эпидемическим потенциалом; 4 – токсигенный геновариант *V. cholerae* M1509 O1 биовара Эль Тор с высоким эпидемическим потенциалом, несущий VSP-II с протяженной делецией; 5 – токсигенный штамм *V. cholerae* P16064 O139 серогруппы.

Дорожка 6 – отрицательный контроль (деионизованная вода).

Рисунок 9. Определение фрагментов генов *rfbO1*, *rfbR*, *rstC*, *ctxA* в первой реакционной смеси (А) и *ctxB^{Class}*, *vc0502*, *vc0514* во второй реакционной смеси (Б) у контрольных штаммов *V. cholerae*.

ПЦР проводили на программируемом термостате «Терцик» (ДНК-Технология, Россия). Программа включала 25 циклов амплификации с температурой отжига праймеров 58 °С. На рисунке 9 приведена электрофореграмма ампликонов, полученных при проведении мультиплексной ПЦР с контрольными штаммами *V. cholerae*.

Учет результатов проводили в соответствии с идентификационной таблицей (табл. 1). Результаты оценивали путем сравнения полученных в ПЦР ампликонов с маркерными фрагментами контрольных штаммов *V. cholerae*.

Для определения специфичности разработанной ПЦР были использованы штаммы рода *Vibrio* (*V. mimicus* ATCC 33653, *V. anguillarum* ATCC 19264, *V. parahaemolyticus* 745) и энтеробактерии (*S. enteritidis* BO3, *S. flexneri* «С», *E. coli* M17). Результаты ПЦР-тестирования этих штаммов были отрицательными.

Эффективность разработанной ПЦР была изучена на 46 штаммах *V. cholerae*, выделенных на территории Российской Федерации и за рубежом.

Таблица 1. Результаты идентификации и дифференциации штаммов *V. cholerae*.

Реакционная смесь №1				Реакционная смесь №2			Результаты идентификации и дифференциации
<i>rfbO1</i>	<i>rfbR</i>	<i>rstC</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB^{Class}</i>	<i>vc0502</i>	<i>vc0514</i>	
638 п.н.	428 п.н.	238 п.н.	564 п.н.	189 п.н.	761 п.н.	604 п.н.	
+	-	+	+	+	+	+	Токсигенный геновариант <i>V. cholerae</i> O1 Эль Тор биовара с низким эпидемическим потенциалом
+	-	+	+	+	-	+	Токсигенный геновариант <i>V. cholerae</i> O1 Эль Тор биовара с высоким эпидемическим потенциалом
+	-	+	+	-	+	+	Типичный токсигенный штамм <i>V. cholerae</i> O1 Эль Тор биовара
+	-	-	+	+	-	-	Токсигенный штамм <i>V. cholerae</i> O1 классического биовара
-	+	+	+	-	+	+	Токсигенный штамм O139 серогруппы

В настоящее время сконструированная ПЦР используется для анализа хранящихся и вновь поступающих в Государственную коллекцию патогенных бактерий штаммов *V. cholerae*.

Выводы

1. Установлено, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации в 1993-2012 гг., не отличаются от типичных изолятов по структуре генов адаптации, обеспечивающих подвижность, биосинтез экзополисахарида, регулирующих архитектуру биопленки, кодирующих регуляторные белки RpoS, LuxO и HarR.

2. Выявлено присутствие консервативного кластера генов *mshA-Q*, кодирующего биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии, у штаммов геновариантов, занесенных в Российскую Федерацию в период появления данных изолятов на эндемичной территории (1993–1994 гг.). В то же время штаммы геновариантов, изолированные после 1997 года, наряду с различными SNPs в структурных генах, имеют идентичные однонуклеотидные замены в генах *mshE* и *mshJ*, кодирующих белки, участвующие в сборке и секреции MSHA пилей. Выявленные SNPs не оказывают влияния на биосинтез указанных пилей, но могут служить генетической меткой изолятов, выделенных после 1997 года.

3. Показано, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, выделенные в разные годы на территории Российской Федерации и имеющие раз-

ную структуру острова пандемичности VSP-II (интактный, с небольшой делецией, с протяженной делецией), не отличаются от типичных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор по способности формировать биопленку *in vitro*.

4. Установлено, что изученные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации в 1993-2001 гг. и содержащие интактный остров пандемичности VSP-II, в отличие от типичных Эль Тор вибрионов более устойчивы к действию температурного (5 °С и 42 °С), осмотического (3 моль раствор хлорида натрия) и оксидативного (20 ммоль раствор перекиси водорода) стрессов. Один из выявленных механизмов их устойчивости к высокой температуре связан с увеличением биосинтеза белков-поринов внешней мембраны OmpT/OmpU, а к низкой температуре и осмотическому стрессу – с продукцией экзополисахарида.

5. Показано, что в условиях оксидативного стресса (20 ммоль раствор перекиси водорода) штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор могут утрачивать остров пандемичности VSP-I или профаг RS1.

6. На основе мультиплексной ПЦР разработан способ, позволяющий одновременно определять серогруппу (O1 или O139), биовар (классический или Эль Тор), токсигенность анализируемого штамма, выявлять геноварианты *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор и дифференцировать их на основе анализа структуры острова пандемичности VSP-II на изоляты с низким и высоким эпидемическим потенциалом. Установлена эффективность и специфичность разработанной мультиплексной ПЦР.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Плеханов Н.А.** Конструирование мультиплексной ПЦР для идентификации токсигенных штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу / **Н.А. Плеханов**, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова // Биотехнология. – 2015. – №2. – С. 82-90. **(журнал из Перечня ВАК)**
2. 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)**
3. Заднова С.П. Влияние осмотического и оксидативного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / С.П. Заднова, **Н.А. Плеханов**, И.М. Крепостнова, П.С. Ерохин, Н.И. Смирнова // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол. – 2015. – №6. – С. 55-62. **(журнал из Перечня ВАК)**
4. Заднова С.П. Механизмы выживания возбудителя холеры в условиях различной осмолярности / С.П. Заднова, **Н.А. Плеханов**, Н.И. Смирнова //

Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. – №4. – С. 43-51. (журнал из Перечня ВАК)

5. Плеханов Н.А. Структурно-функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у различных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / Н.А. Плеханов, С.П. Заднова // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – Вып.4. – С. 75-78.

(журнал из Перечня ВАК)

6. Заднова С.П. Способ одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов возбудителя холеры Эль Тор и их дифференциации по эпидемическому потенциалу методом мультиплексной полимеразной цепной реакции: пат. №2560280 / С.П. Заднова, Н.А. Плеханов, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова; заявл. 23.09.2014; опубл. 20.08.2015 г. Бюл. №23.

7. Заднова С.П. Устойчивость штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор к действию неблагоприятных факторов внешней среды / С.П. Заднова, Н.А. Плеханов, И.М. Крепостнова, Н.И. Смирнова // Материалы совещания специалистов Роспотребнадзора «Холера и патогенные для человека вибрионы», Ростов-на-Дону. – 2014. – №. 27. – С. 76-79.

8. Плеханов Н.А. Сравнительный структурный и функциональный анализ маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии в штаммах геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор / Н.А. Плеханов // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы эпидемиологии и профилактической медицины», Ставрополь. – 2014. – Т.1. – С. 97-98.

9. Плеханов Н.А. Разработка способа одновременной идентификации токсигенных штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор и определения их эпидемического потенциала методом мультиплексной ПЦР / Н.А. Плеханов, С.П. Заднова, Д.А. Агафонов, Н.И. Смирнова // Материалы VII Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, Москва. – 2015. – С. 268-269.

10. Плеханов Н.А. Исследование устойчивости штаммов геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор к действию осмотического и оксидативного стрессов / Н.А. Плеханов, С.П. Заднова, И.М. Крепостнова, П.С. Ерохин, Н.И. Смирнова // Сборник тезисов 19-ой международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», Пущино. 2015. – С. 192-193.

СПИСОК ПРИНЯТЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

МГЭ – мобильный генетический элемент; ХТ – холерный токсин; ЭПС – экзополисахарид; СТХ – профаг СТХ; НАР – растворимая гемагглютинин протеаза; MSHA – маннозочувствительные гемагглютинирующие пили адгезии; OD – оптическая плотность; RS1 – профаг RS1; SNPs – единичные нуклеотидные замены (от Single Nucleotide Polymorphism); VSP – остров пандемичности (от *Vibrio seventh pandemic island*).