

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ АДАПТАЦИОННЫХ СВОЙСТВ ТИПИЧНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* БИОВАРА *EL TOR*

Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

Цель. Исследование биологических свойств природных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара *El Tor*, влияющих на их адаптационные способности в условиях недостатка питательных веществ, при сравнительном анализе с типичными штаммами. *Материалы и методы.* Конкурентную пробу проводили путем посева смеси клеток двух сравниваемых штаммов в автоклавированную речную воду. Скорость роста штаммов определяли по значению оптической плотности. Экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР с рассчитанными праймерами и зондами. *Результаты.* Установлено, что при совместном культивировании типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара *El Tor* в условиях недостатка питательных веществ (автоклавированная речная вода) при комнатной температуре уровень выживаемости штаммов геновариантов выше, чем типичных штаммов, что указывает на их выраженные адаптационные преимущества в данных условиях. Показано, что селективные преимущества штаммов геновариантов обеспечиваются более высокой скоростью роста клеток и повышенной экспрессией гена *rpoS*. *Заключение.* Получены новые данные о способности бактерий штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара *El Tor* в отличие от типичных изолятов к быстрому росту и повышенной экспрессии глобального регулятора стрессового ответа гена *rpoS*, что, возможно, способствует их лучшей адаптации не только в условиях недостатка питательных веществ, но при действии других стрессовых факторов.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 25—30

Ключевые слова: типичные штаммы и штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара *El Tor*, конкурентная проба, скорость роста, ОТ-ПЦР, экспрессия гена *rpoS*

S.P.Zadnova, A.A.Kritsky, N.A.Plekhanov, N.B.Cheldyshova, N.I.Smirnova

COMPARATIVE ANALYSIS OF ADAPTATION PROPERTIES IN TYPICAL AND GENETICALLY ALTERED *VIBRIO CHOLERAE EL TOR* STRAINS

Russian Research Institute for Plague Control «Microbe», Saratov, Russia

Aim. Study of biological properties in natural strains of genovariants of *V. cholerae* biovar *El Tor*, affecting their adaptation capacities under nutrient deficiency while comparing them with typical strains. *Materials and methods.* Competitive sampling was carried out through plating a mixture of cells of the two strains under investigation into autoclaved river water. Growth rate was evaluated through the optic density values. Gene expression was studied applying RT-PCR with designed primers and probes. *Results.* It is established that during combined cultivation of *V. cholerae El Tor* typical strains and genovariants under the shortage of nutrient substances (autoclaved river water), at room temperature, the level of survivability in genetically altered strains is higher than in typical strains, which points to their expressed adaptation advantages over the typical ones under the stated conditions. It is demonstrated that selective benefits of genovariant strains are provided by higher cell growth rate and increased *rpoS* gene expression. *Conclusion.* Obtained have been new data on the ability of bacterial strains of *V. cholerae El Tor* genovariants to rapidly grow and better express global regulator of stress response, *rpoS* gene, which, probably, contributes to their enhanced adaptation not only under nutrient deficiency, but under the influence of other stress factors too.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2019, No. 2, P. 25—30

Key words: typical strains and strains of genovariants of *Vibrio cholerae* O1, biovar *El Tor*, competitive sampling, growth rate, RT-PCR, *rpoS* gene expression

ВВЕДЕНИЕ

В истории холеры зарегистрировано семь пандемий, которые были вызваны штаммами *Vibrio cholerae* O1 серогруппы, включающей два биовара — классический и El Tor. Чрезвычайно вирулентные штаммы классического биовара предположительно были возбудителями первых шести пандемий. С 1961 года и по настоящее время продолжается седьмая пандемия холеры, вызванная типичными штаммами *V. cholerae* O1 биовара El Tor. Несмотря на то, что классические и El Tor вибрионы относятся к одной O1 серогруппе, они имеют ряд фенотипических и генетических различий, а также отличаются по выживанию во внешней среде. Классические вибрионы продуцируют больше холерного токсина (ХТ), вызывают тяжелые формы болезни, но быстро погибают при попадании в открытые водоемы. В то же время, El Tor вибрионы синтезируют меньше ХТ, имеют легкую клинику («мягкая» холера), но способны длительное время сохраняться во внешней среде [1]. При изучении выживаемости классических и El Tor вибрионов методом конкурентной пробы было выявлено, что El Tor вибрионы лучше растут и доминируют над классическими вибрионами, которые в итоге переходят в некультивируемое состояние [10]. Однако несмотря на проводимые интенсивные молекулярно-генетические и биохимические исследования, механизмы, ответственные за широкое распространение El Tor вибрионов и вытеснения классических вибрионов, до сих пор не установлены.

В 90-х годах прошлого столетия возникли и получили широкое распространение генетически измененные штаммы (или геноварианты) *V. cholerae* биовара El Tor. Геноварианты отличаются от типичных El Tor вибрионов повышенной вирулентностью, что выражается в более тяжелых проявлениях болезни и высоких показателях смертности. Данные штаммы содержат в опероне *stxAB*, кодирующем биосинтез ХТ, ген *stxB* классических вибрионов (*stxB1*) в отличие от типичных El Tor вибрионов, имеющих аллель *stxB* El Tor (*stxB3*). Геноварианты синтезируют повышенное количество ХТ I (классического) типа, приближаясь по данному показателю к высокотоксигенным штаммам классического биовара [2,6,9,12]. Несмотря на интенсивные фенотипические и молекулярно-генетические исследования штаммов геновариантов, причины их глобального распространения и вытеснения типичных изолятов также не установлены. Высказано предположение, что селективные преимущества штаммов геновариантов обусловлены повышенной вирулентностью в совокупности с высокой способностью к выживанию и множественной устойчивостью к антибиотикам [11]. При этом данных о способности штаммов геновариантов выживать при действии различных неблагоприятных факторов внешней среды получено не достаточно.

Цель работы состояла в изучении биологических свойств природных штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor, влияющих на их адаптационные способности в условиях недостатка питательных веществ, при сравнительном анализе с типичными штаммами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были проведены на 8 штаммах *V. cholerae* биовара El Tor, полученных из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов).

Конкурентную пробу проводили по методу R. Freter с соавт. путем посева смеси клеток двух сравниваемых штаммов в автоклавированную речную воду [7]. Штаммы выращивали на LB агаре при температуре 37°C в течение ночи и готовили в физиологическом растворе суспензии одинаковой оптической плотности (ОП), контролируя её на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия). Полученные суспензии доводили до концентрации 1×10^7 КОЕ/мл и вносили по 0,5 мл в 4,5 мл стерилизованной речной воды так, чтобы конечная концентрация каждого штамма составляла 5×10^6 КОЕ/мл. Параллельно для контроля выживаемости исследуемые штаммы засеивали в автоклавированную воду по отдельности. Посевы культивирова-

ли при комнатной температуре (22-25°C), делая высевы на агар LB как из смеси, так и из контрольных проб, и подсчитывали число выросших колоний.

Скорость роста штаммов определяли по значению оптической плотности (ОП) при длине волны 600 нм на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия) через 4 часа выращивания в LB бульоне. Параллельно с определением ОП подсчитывали количество выросших колоний при высеве бактерий на пластинки LB агара.

Экспрессию гена *groS* определяли методом ОТ-ПЦР в реальном времени на термоциклере «Rotor-Gene Q 5plex» (Qiagen Inc, GmbH, Германия) с праймерами (*groS*-RT1 — GAACCAAACACGCACCATTC и *groS*-RT2 — TCATCGACAGGTCGGTCTAA) и TaqMan зондом (FAM)GCCTTGACCAGAACCTACACCAG-(BHQ1), рассчитанными авторами и синтезированными в «Синтол» (Россия). Для изучения экспрессии штаммы выращивали в течение 4 часов в LB бульоне на шейкере при 37 °C. Тотальную РНК из клеток выделяли с использованием набора реактивов «SV total RNA isolation system» (Promega, США). Определение концентрации выделенных препаратов РНК и их выравнивание проводили на спектрофотометре «Biowave DNA» (Biochrom Ltd, Англия). Синтез кДНК на матрице РНК осуществляли с помощью набора реагентов «Реверта» (InterLabServis, Россия). В качестве стандартов для построения калибровочной кривой использовали разведения плазмидной ДНК (от 10⁷ до 10³) с клонированным участком исследуемого гена. Нормирование полученных данных проводили относительно конститутивно экспрессирующегося гена *recA* методом 2^{-ΔΔC_T} [8]. Праймеры и зонд на данный ген также рассчитаны авторами (*recA*-RT1 — ACGGGTAACCTCAAGCAATC; *recA*-RT2 — TATCCAAACGAACAGAAGCG; *recA*-зонд — (FAM)CCTGGCGGTAACGCACTGA-(BHQ1). ПЦР проводили на трех независимо полученных образцах кДНК. В качестве контрольного штамма, экспрессия которого принималась за 1, использовался штамм *V. cholerae* M818.

Статистическая обработка результатов проводилась с использованием программ Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Inc) и Rotor-Gene Q Software version 2.3.1 (Qiagen).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На первом этапе работы была изучена способность штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor выживать в конкурентной пробе с типичными штаммами в условиях недостатка питательных веществ (автоклавируемая речная вода). Для постановки конкурентной пробы методом селекции на питательных средах, содержащих антибиотик, были получены мутанты, устойчивые к определенному антибиотику, что было необходимо для последующей дифференциации штаммов в конкурентной пробе. Среди полученных штаммов, несущих спонтанные мутации устойчивости к рифампицину, спектиномицину, канамицину и стрептомицину, были отобраны клоны, показавшие наибольшую стабильность наследования приобретенного признака.

Далее из произвольно взятых штаммов были сформированы четыре пары (типичный/геновариант) штаммов с разной чувствительностью к антибиотикам. Типичные штаммы (M1011, M1062, M893, M818) были изолированы в 1970-1972 гг., штаммы геновариантов (M1270, P17644, L3226, 301) — в 1993-2011 гг. (таблица). Штаммы были помещены в автоклавируемую речную воду.

В результате проведенных исследований установлено, что типичные штаммы имели более низкий уровень выживаемости по сравнению со штаммами геновариантов. Так, в конкурентной пробе M1011Km^R/M1270 Sp^R КОЕ геновариантов уже на 4 сутки превышало КОЕ типичных штаммов в 77,6 раза. На 6 сутки их совместной инкубации наблюдалось отсутствие роста типичного штамма *V. cholerae* M1011 Km^R на фоне активного роста штамма геноварианта M1270 Sp^R, популяция которого сократилась незначительно. В популяции штаммов M893Rif^R/301Sp^R на 4 сутки исследования КОЕ обоих штаммов было примерно одинаковым. Однако на 18 сутки КОЕ штамма геноварианта 301Sp^R было в 3,9 раза больше, чем у M893Rif^R, а количество бактерий штамма P17644Sp^R (проба P17644Sp^R/M1062Rif^R) превышало количество

Результаты конкурентной пробы типичных штаммов и штаммов геновариантов *V. cholerae* биовара Эль Тор в автоклавированной речной воде, анализ скорости роста и экспрессии гена *groS*

Штаммы <i>V. cholerae</i>	Место, год и источник выделения	КОЕ/мл*, определенное в водной среде через:				Скорость роста**		Относительная оценка экспрессии гена <i>groS</i> методом ОТ-ПЦР
		4 сут в смеси	6 сут в смеси	18 сут в смеси	18 сут монокультура	Количество КОЕ (x10 ⁴)	ОП при 600 нм	
M1011 Km ^R	Башкирия, 1972, больной	1,06x10 ⁴	0	0	1,7x10 ⁴	850±20	0,23±0,04	0,12±0,03
M1270 Sp ^R	Татарстан, 1993, больной	8,22x10 ⁵	6,4x10 ⁴	4,5x10 ⁴	7,2x10 ⁴	4251±29	1,1±0,01	0,88±0,03
M1062 Rif ^R	Астрахань, 1970, больной	2,0x10 ⁴	н.о.	1,05x10 ⁴	2,25x10 ⁴	2960±110	0,84±0,01	0,35±0,05
P17644 Sp ^R	Ачинск, 1997, больной	6,04x10 ⁴	н.о.	2,5x10 ⁴	7,2x10 ⁴	4736±32	1,45±0,02	2,77±0,08
M893 Rif ^R	Астрахань, 1970, больной	5,1x10 ⁵	н.о.	1,24x10 ⁴	2,5x10 ⁴	2355±11	0,6±0,015	0
301 Sp ^R	Таганрог, 2011, внеш. среда	5,3x10 ⁵	н.о.	4,0x10 ⁴	9,8x10 ⁴	4240±56	1,09±0,04	1,83±0,4
M818 Rif ^R	Саратов, 1970, больной	3,6x10 ⁴	2,5x10 ⁴	0	9,05x10 ⁴	4501±61	0,97±0,005	1 (контроль)
Л3226 Str ^R	Москва, 2010, больной	3,32x10 ⁵	2,6x10 ⁵	2,15x10 ⁵	3,78x10 ⁵	4945±22	1,16±0,03	1,26±0,06

Примечание. н.о. — не определяли; * приведены средние значения 3 опытов; ** рост в бульоне LB в течение 4 часов.

бактерий типичного штамма в данный период времени в 3,2 раза. Необходимо отметить, что, несмотря на отсутствие роста некоторых типичных штаммов (M1011 Km^R, M818 Rif^R) в конкурентной пробе, в контрольных пробирках (монокультура) указанные штаммы продолжали высеваться (таблица).

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что при совместном культивировании типичных штаммов и геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor в автоклавированной речной воде при комнатной температуре уровень адаптации последних был выше, чем у типичных штаммов.

На основании полученных сведений о доминировании штаммов геновариантов в конкурентной пробе нами было высказано предположение, что они могут отличаться от типичных изолятов более высокой скоростью роста. Действительно, в результате проведенных исследований установлено, что изученные штаммы геновариантов росли быстрее, чем типичные штаммы. Так, через 4 часа выращивания ОП штамма геноварианта M1270 Sp^R (из пары M1011 Km^R/M1270 Sp^R) превышала данный показатель типичного штамма в 4,8 раза. ОП штамма геноварианта *V. cholerae* Л3226 Str^R (M818 Rif^R /Л3226 Str^R) была в 1,2 раза, а у штаммов геновариантов P17644 Sp^R и 301 Sp^R соответственно в 1,7 и 1,8 раза больше, чем у типичных изолятов в паре. При этом данные по оптической плотности полностью согласовывались со сведениями, полученными при подсчете количества выросших на агаре колоний (таблица).

Итак, изученные штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor отличаются от типичных штаммов повышенной скоростью роста, что, возможно, способствует увеличению их адаптационных свойств при совместном нахождении с типичными штаммами.

Согласно данным литературы скорость роста бактерий является сложным процессом, зависящим от экспрессии многих генов. При этом важная роль в изменении экспрессии генов в условиях недостатка питательных веществ принадлежит альтернативным сигма-субъединицам, в том числе σ^s , кодируемой геном *groS* [5]. Учитывая данные литературы, на следующем этапе работы были проведены эксперименты по изучению экспрессии гена *groS* в анализируемых штаммах. В результате установлено, что экспрессия *groS* в штаммах геновариантов была в 1,3-7,9 раза больше, чем у типичных изолятов (таблица). Исключение составил только типичный штамм *V. cholerae* M893, у которого экспрессию гена *groS* определить не удалось. Возможно,

в данном штамме изменена структура гена *groS*, но для проверки данного предположения необходимы дополнительные исследования.

Для подтверждения полученных экспериментальных данных мы расширили выборку штаммов, взяв в анализ еще 8 штаммов геновариантов, в том числе завезенных на территорию РФ в последние годы. В результате все проверенные штаммы геновариантов также отличались от типичных изолятов повышенной скоростью роста и увеличенной экспрессией гена *groS* (данные не приводятся).

В ходе работы установлено, что штаммы геновариантов имеют конкурентные преимущества при их совместном нахождении с типичными штаммами в условиях недостатка питательных веществ (автоклавируемая речная вода). Согласно данным литературы выживание бактерий при действии различных стрессовых факторов (в том числе и при недостатке питательных веществ) зависит от скорости роста клеток непосредственно перед стрессом [5]. Действительно нами было установлено, что штаммы геновариантов в отличие от типичных изолятов растут быстрее, что, возможно, является одним из механизмов их лучшей адаптации при совместном нахождении с типичными штаммами. При этом необходимо отметить, что высокая скорость роста штаммов геновариантов могла быть обусловлена изменением процессов метаболизма, в том числе установленной нами ранее измененной способностью к ферментации глюкозы данными штаммами [4].

На основании выявленных селективных преимуществ штаммов геновариантов в условиях недостатка питательных веществ и способности к быстрому росту было высказано предположение, что в данных штаммах может быть увеличена экспрессия гена *groS*, являющегося глобальным регулятором стрессового ответа в штаммах холерного вибриона. По данным литературы ген *groS* кодирует биосинтез альтернативной сигма субъединицы σ^S , связывающейся с РНК-полимеразой и контролирующей экспрессию более 25 генов в штаммах холерного вибриона, в том числе необходимых для выживания в условиях стресса [13]. Специфическое накопление белка *RpoS* начинается в начале стационарной фазы роста бактерий, а при попадании бактерий в неблагоприятные условия (низкий pH, повышенная температура, осмотический и оксидативный стресс, недостаток питательных веществ) обеспечивает своевременную транскрипцию набора генов, необходимых для роста клеток в данных стрессовых условиях [5,13]. Действительно при изучении экспрессии гена *groS* методом ОТ-ПЦР было установлено, что в штаммах геновариантов его уровень экспрессии в 1,3-7,9 раза выше, чем у типичных штаммов. На наш взгляд, полученные сведения о повышенном уровне экспрессии гена *groS* в штаммах геновариантов будут востребованы в дальнейшей работе при изучении экологических свойств современного возбудителя холеры, а также могут объяснить некоторые ранее полученные результаты, в том числе повышенную устойчивость штаммов геновариантов по сравнению с типичными изолятами к осмотическому и оксидативному стрессу [3].

Таким образом, в результате проведенной работы установлено, что штаммы геновариантов *V. cholerae* биовара El Tor при совместном нахождении с типичными изолятами в условиях недостатка питательных веществ обладают выраженными адаптационными преимуществами. Одним из выявленных механизмов их селективного преимущества является повышенная скорость роста клеток. Важным, на наш взгляд, является установление повышенной экспрессии гена *groS* в штаммах геновариантов, что может способствовать их лучшей выживаемости при действии других стрессовых факторов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бароян О.В. Холера Эль-Тор. 2 изд. перераб. и доп. М., Медицина, 1971.
2. Заднова С.П., Шашкова А.В., Краснов Я.М., Смирнова Н.И. Фенотипический и генетический анализ измененных вариантов *Vibrio cholerae* биовара эльтор. Пробл. особо опасных инф. 2012, 1:57-61.
3. Заднова С.П., Плеханов Н.А., Крепостнова И.М., Ерохин П.С., Смирнова Н.И. Влияние осмотического и оксидативного стрессов на штаммы геновариантов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. Журн. микробиол. 2015, 6:55-62.

4. Заднова С.П., Челдышова Н.Б., Крицкий А.А., Адамов А.К., Девдариани З.Л., Кутырев В.В. Сравнительный анализ метаболизма глюкозы в штаммах *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. Молекул. генетика, микробиол. и вирусол. 2017, 2:64-69.
5. Ленгелер Й., Дреус Г., Шлегель Г. Современная микробиология: Прокариоты. М., Мир, 2005.
6. Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Кулышань Т.А., Краснов Я.М., Кутырев В.В. Микроэволюция возбудителя холеры в современный период. Вестник Российской академии медицинских наук. 2014,7-8:46-53.
7. Freter R., O'Brien P.C., Mecsai M.S. Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. Infect. Immun. 1981, 34(1):234-240.
8. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods. 2001, 25(4):402-408.
9. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A. et al. New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. J. Clin. Microbiol. 2002, 40(9):3296-3299.
10. Pradhan S., Mallick S.K., Chowdhury R. *Vibrio cholerae* classical biotype is converted to the viable non-culturable state when cultured with the El Tor biotype. PLOS ONE. 2013, 8: e53504.
11. Reimer A.R., Domselaar G.V., Stroika S. et al. Comparative Genomics of *Vibrio cholerae* from Haiti, Asia, and Africa Emerg. Infect. Dis. 2011, 17(11): 2113-2121.
12. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G. et al. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. Infect. Immun. 2011, 49:3739-49.
13. Yildiz F.H., Schoolnik G.K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. 1998, 180:773-784.

Поступила 15.07.18

Контактная информация: Заднова Светлана Петровна, д.б.н.,
410005, Саратов, Университетская, 46, р.т. (8452)26-47-23

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

В.Г.Акимкин¹, А.В.Горелов¹, А.Т.Подколзин¹, Н.Б.Денисюк²

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЙ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ОРЕНБУРГСКОМ РЕГИОНЕ В ПРЕДВАКЦИНАЛЬНЫЙ ПЕРИОД

¹Центральный НИИ эпидемиологии, Москва; ²Оренбургский государственный медицинский университет

Цель. Провести анализ эпидемиологической ситуации по ротавирусной инфекции в Оренбургской области с учетом проявлений эпидемического процесса и молекулярно-генетических характеристик ротавирусов группы А. *Материалы и методы.* Представлены результаты эпидемиологического и молекулярно генетического мониторинга ротавирусной инфекции в период 2013-2017гг. Молекулярно-генетическое типирование проведено на 232 образцах фекалий пациентов возраста до 3 лет с клиникой РВИ. Использовались методы ретроспективного эпидемиологического анализа, ИФА, ПЦР. *Результаты.* Показатели заболеваемости РВИ — высокие и имели тенденцию к росту. Наиболее поражаемым контингентом были дети возраста до 14 лет. Генетический потенциал популяции ротавирусов в регионе представлен десятью основными генотипами. Ведущее значение в эпидемическом процессе имели генотипы с наиболее высокой частотой встречаемости: G4[P]8 (56,9%), G9[P]8 (12,9%), Mixt (8,6%), G2[P]4 (7,7%), G1[P]8 (6,5%). *Заключение.* Выявлен значительный рост заболеваемости РВИ среди детского населения. Определены доминирующие генотипы ротавирусов, показано их региональное многообразие и смена в течение нескольких сезонов.

Журн. микробиол., 2019, № 2, С. 30—36

Ключевые слова: генотипы, дети, заболеваемость, ротавирусная инфекция