

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИОФАГОВ

Баннов В.А. *, тел. 8(4967) 36-00-79, bannov@online.stack.net;

Фурсова Н.К. *, кандидат биологических наук,

тел. 8(4967) 31-19-11, fursova@obolensk.org;

Воложанцев Н.В. *, кандидат биологических наук,

тел. 7-4967-36-01-47; nikvol@obolensk.org

Коровкин С.А. **, доктор медицинских наук, профессор,

тел. 8(495) 917-41-49, korovkin09@mail.ru;

Светоч Э.А. *, доктор ветеринарных наук, профессор,

тел. 8(4967) 36-00-79, svetoch@obolensk.org

*ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии»

Роспотребнадзора

**Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток

им. И.И. Мечникова РАМН

Ключевые слова: бактериофаги, горизонтальный перенос генов, гены вирулентности

Представлены данные литературы о роли бактериофагов в горизонтальном и вертикальном переносе генетических детерминант вирулентности у патогенных бактерий и результаты собственных исследований по выявлению генов токсинов в геномах бактериофагов.

Введение. Бактериофаги, в качестве мобильных генетических элементов (МГЭ), играют чрезвычайную роль в эволюции бактерий. Профаги зачастую содержат генетические детерминанты факторов вирулентности, например: пирогенные и апиогенные токсические суперантигены стрептококков группы А [1]; фитнес-факторы *Salmonella enterica* серовара Typhimurium; остров патогенности *Vibrio cholerae*; шига-токсин *Escherichia coli* серотипа O157:H7; бактериоцины *Pseudomonas aeruginosa*; нейротоксин *Clostridium botulinum*; фитнес-факторы *Streptococcus pyogenes*, дифтерийный токсин *Corynebacterium diphtheriae* и др. [2]. Наличие в геноме большого количества профагов привносит в бактериальную клетку ряд эволюционных преимуществ: (i) повышенную генетическую мобильность и большую степень представленности факторов вирулентности в популяции бактерий; (ii) эпистатическое взаимодействие между генами вирулентности и генами бактериофага; (iii) амплификацию генов вирулентности в экосистеме за счет их переноса в бактерии-комменсалы, находящиеся в одном сайте инфекции с патогеном; (iv) повышение дарвиновского фитнеса бактерий в результате проявления свойств, модифицирующих экосистему [3]. Таким образом, взаимодействие между умеренными фагами и бактериями-хозяевами характеризуется как симбиотическая ассоциация [4].

Показано, что профаги встречаются в геномах бактерий не равномерно, а локализуются в «горячих точках», в соответствии со статистически достоверно установленной адаптацией к хромосомному генетическому окружению [5]. Именно встраивание профагов, несущих гены вирулентности, является основным механизмом конверсии свободноживущих бактерий в патогены у представителей разных таксонов: *Gamma*proteobacteria (*Escherichia* и *Pseudomonas*), *Beta*proteobacteria (*Burkholderia*) и *Firmicutes* (*Bacillus*) [6].

Ярким примером ключевой роли бактериофагов в горизонтальном переносе генов и

возникновении новых штаммов является эволюция *E. coli*. Геномный анализ показал, что в ДНК эпидемического штамма *E. coli* O157 Sakai присутствует множество мобильных генетических элементов (98 копий IS-элементов), большое число генов, кодирующих факторы вирулентности (энтерогемолизин, EspP протеазу и большой клостридиально-подобный токсин), 18 профагов или следов профагов, шесть больших хромосомных сегментов, которые представляют собой профаго-подобные генетические элементы [7]. Кроме того, бактериофаги играют очень важную роль в контроле бактериальной плотности природных популяций, на основе постоянно протекающей коэволюции фагов и бактерий-хозяев. Например, фаги играют ключевую роль в остановке эпидемий холеры [8].

В последние годы все более реальной становится возможная перспектива использования бактериофагов в качестве средств контроля инфекционных заболеваний. Предполагается, что фаговая терапия будет основана на использовании безопасных (только литических), хорошо охарактеризованных (на геномном и протеомном уровнях) и наработанных в соответствии с требованиями производства конвенциональных медицинских продуктов [9].

Целью данной работы является детекция генов вирулентности в препаратах ДНК литических бактериофагов.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований явились 24 препарата ДНК литических бактериофагов, специфичных к *Salmonella* Enteritidis (n = 3), *Salmonella* Choleraesuis (n = 3), *Salmonella* Infantis (n = 3), *Shigella* spp. (n = 2), *Yersinia pseudotuberculosis* (n = 2), *Escherichia coli* (n = 11), в том числе серотипов O157:H7 (n = 4) и O104:H4 (n = 7).

С целью удаления бактериальной ДНК фаголизаты, полученные при размножении бактериофагов на культуре чувствительных бактерий, подвергали обработке ДНКазой и РНКазой в течение 2 ч при температуре 37 °С. Затем в фаголизат вносили хлористый натрий до концентрации 1 М и выдерживали в течение 2 ч на ледяной бане, центрифугировали, отбрасывали осадок, а к супернатанту добавляли ПЭГ 8000 до концентрации 10 % и инкубировали еще 2 ч на ледяной бане. После повторного центрифугирования осадок растворяли в 1 мл SM буфера, обрабатывали протеиназой К в присутствии 0,5 % ДСН с последующей экстракцией фенолом в буфере TE (рН 8,0). Водную фазу переосаждали изопропиловым спиртом. Дальнейшую отмывку проводили этиловым спиртом. Подсушенный осадок ресуспендировали в 0,3 мл буфера TE. Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофоретически в 0,8 % агарозном геле и спектрофотометрически при длине волны 260 нм. Кроме того, подтверждали отсутствие генетического материала бактерий-хозяев с помощью мультипраймерных ПЦР тест-систем ТЭК-104 и ТЭК-157 (Оболensk, Россия), КОЛИПОЛ (Литех, Россия), АмплиСенс *Salmonella* spp.-EPh (Интерлабсервис, Россия), АмплиСенс Эшерихиозы-FL (Интерлабсервис, Россия), АмплиСенс ЕНЕС-FL (Интерлабсервис, Россия).

Детекцию генов вирулентности проводили с помощью полимеразной цепной реакции в классическом режиме на термоциклерах PTC 100 (MJ Research, США) и GeneAmp 2700 (Applied Biosystems, США), а также в формате реального времени на приборе CFX96 (BioRad, США). Для проведения реакции использовали 10× сульфатный буфер для ПЦР (650 mM Tris-HCl (рН = 8,9), 160 mM (NH₄)₂SO₄, 15 mM MgCl₂, 0,5 % Tween 20). Реакционная смесь содержала 200 μM ДНТП, 0,25-0,5 μM праймеров и 1 ед. активности *Taq*-полимеразы. Режим проведения ПЦР: начальная денатурация при 95 °С -5 мин; затем 30-35 циклов, включающих в себя денатурацию при 95 °С -1 мин, отжиг праймеров при 50-60 °С - 1 мин и элонгацию при 72 °С - 1 мин; затем завершающая элонгация при 72 °С - 5 мин. Температура отжига праймеров определялась характеристикой используемых праймеров (таблица 1).

Анализ продуктов ПЦР осуществляли методом электрофореза в 1,5 % агарозном геле в Трис-боратном буфере. Визуализацию ДНК проводили после окрашивания агарозных гелей

в течение 20 мин в растворе (1 мг/л) бромистого этидия. Для документирования полученных результатов использовали систему DOCPRINT (Vilber Lourmat, Франция).

Результаты исследований и их обсуждение. Результаты ПЦР-детекции показали, что во всех 24 исследованных образцах ДНК литических бактериофагов, специфичных к *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Infantis*, *Shigella* spp., *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli*, отсутствуют гены, детерминирующие синтез шига-подобных токсинов **Stx1** и **Stx2**, **термолабильного энтеротоксина LT**, термостабильных энтеротоксинов **ST** и **East**, а также гены гемолизина **Hly**. Полученные данные позволяют считать соответствующие литические бактериофаги достаточно безопасными с точки зрения возможной передачи генов токсинов при их использовании в качестве средств контроля плотности бактериальных популяций энтеробактерий у сельскохозяйственных животных и в окружающей среде.

Заключение. Проведенные молекулярно-генетические исследования показали отсутствие генов, детерминирующих синтез шига-подобных токсинов **I- и II-типов**, **термолабильного энтеротоксина**, термостабильных энтеротоксинов **St** и **East**, а также гемолизина (**Hly**) в геномах 24 литических бактериофагов, специфичных к *S. Enteritidis*, *S. Choleraesuis*, *S. Infantis*, *Shigella* spp., *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli*.

Таблица 1 – Праймеры, использованные для детекции генов бактерий

Праймер	Олигонуклеотидная последовательность, 5'— 3'	T _m , °C	Ген-мишень	Примечание
invA	AACAGTGCCTCGTTTACGACC	58	invA	Идентификации ДНК сальмонелл
	AAGACGACTGGTACTGATCG			
rfbO157	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTG	60	rfb _{O157}	Идентификация ДНК <i>E. coli</i> O157:H7
	GAGTACATTGGCATCGTGTGG			
rfbO104	TCCACGATCATCGGATAGA	60	rfb _{O104}	Идентификация ДНК <i>E. coli</i> O104:H4
	CATACATCTCGCATGGAGC			
stx1	TGTGGCAAGAGCGATGTTACG	60	stx1	Выявление гена шига-подобного токсина типа I, синтезируемого штаммами STEC
	ATCGCCGGACACATAGAAGG			
stx2	ATCAGCAATGTGCTTCCGGAG	60	stx2	Выявление гена шига-подобного токсина типа II, синтезируемого штаммами STEC
	CTGAGCACTTTGCAGTAACGG			
ltB	ATTTACGGCGTTACTATCCTC	58	ltB	Выявление гена субъединицы B термолабильного энтеротоксина, синтезируемого штаммами ETEC
	TTTTGGTCTCGGTCAGATATG			
stA	GCCTATGCATCTACACAATC	56	stA	Выявление гена субъединицы A термостабильного энтеротоксина, синтезируемого штаммами ETEC
	TGAGAAATGGACAATGTCCG			
eastA	TCCGTGAAACAACATGACGG	56	eastA	Выявление гена термостабильного энтеротоксина, синтезируемого штаммами EAEC
	ATAACATCCAGCACAGGCAG			
hlyA	AGTGACGCACATACAGGAAC	56	hlyA	Выявление гена гемолизина
	AATTTGAGCGAGCTAAGCAGC			

Библиографический список

1. Banks D.J., Beres S.B., Musser J.M. The fundamental contribution of phages to GAS evolution, genome diversification and strain emergence. // Trends Microbiol. – 2002. - Vol. 10. – No. 11. – P. 515-521.
2. Brüssow H., Canchaya C., Hardt W.D. Phages and the evolution of bacterial pathogens: from genomic rearrangements to lysogenic conversion. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. – 2004. – Vol. 68. – No. 3. – P. 560-602.
3. Abedon S.T., Lejeune J.T. Why bacteriophage encode exotoxins and other virulence factors. // Evol. Bioinform. Online. – 2007. – Vol. 1. – P. 97-110.
4. Roossinck M.J. The good viruses: viral mutualistic symbioses. // Nat. Rev. Microbiol. – 2011. - Vol. 9. – No. 2. – P. 99-108.
5. Bobay L.M., Rocha E.P., Touchon M. The Adaptation of Temperate Bacteriophages to Their Host Genomes. // Mol. Biol. Evol. – 2013. - Jan 15. [Epub ahead of print]
6. Busby B., Kristensen D.M., Koonin E.V. Contribution of phage-derived genomic islands to the virulence of facultative bacterial pathogens. // Environ. Microbiol. – 2013. – Vol. 15. – No. 2. P. 307-312.
7. Ohnishi M., Kurokawa K., Hayashi T. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? // Trends Microbiol. – 2001. – Vol. 9. – No. 10. – P. 481-485.
8. Faruque S.M., Naser I.B., Islam M.J. et al. Seasonal epidemics of cholera inversely correlate with the prevalence of environmental cholera phages. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA – 2005. - Vol. 102. – No. 5. – P. 1702–1707.
9. Pirnay J.-P., Verbeken G., Rose T., Jennes S., Zizi M., Huys I., Lavigne R., Merabishvili M., Vaneechoutte M., Buckling A., DeVos D. Introducing yesterday's phage therapy in today's medicine. // Future Virol. – 2012. – Vol. 7. – No. 4. – P. 379–390.

**DETECTION OF THE VIRULENCE DETERMINANTS
IN THE BACTERIOPHAGE GENOMES**

Bannov V.A., Fursova N.K., Volozhantsev N.V., Korovkin S.A., Svetoch E.A.

Key words: *bacteriophages, horizontal gene transfer, virulence genes*

The study presents the review of the publications and the experimental data concerning role of bacteriophages in horizontal and vertical gene transfer of the virulence determinants of the human pathogens.