

## ДЕТЕКЦИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ДЕТЕРМИНАНТ ВИРУЛЕНТНОСТИ В ГЕНОМАХ БАКТЕРИОФАГОВ

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

**Фурсова Н.К. \***, кандидат биологических наук,

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

**Воложанцев Н.В. \***, кандидат биологических наук,

тел. 7-4967-36-01-47; [nikvol@obolensk.org](mailto:nikvol@obolensk.org)

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

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

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

тел. 8(4967) 36-00-79, [svetoch@obolensk.org](mailto: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 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 <sub>m</sub> , °C	Ген-мишень	Примечание
invA	AACAGTGCCTCGTTTACGACC	58	invA	Идентификации ДНК сальмонелл
	AAGACGACTGGTACTGATCG			
rfbO157	CAGGTGAAGGTGGAATGGTTG	60	rfb <sub>O157</sub>	Идентификация ДНК <i>E. coli</i> O157:H7
	GAGTACATTGGCATCGTGTGG			
rfbO104	TCCACGATCATCGGATAGA	60	rfb <sub>O104</sub>	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.*