

DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-62-68

УДК 616.932:579.25

С.П. Заднова, А.А. Крицкий, Н.А. Плеханов, Н.П. Гусева, Ю.В. Лозовский, Н.И. Смирнова

ВЫЯВЛЕНИЕ МЕХАНИЗМОВ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОДУКЦИИ АЦЕТОИНА У ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* O1 БИОВАРА ЭЛЬ ТОР

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

Цель работы – установление механизмов изменения биосинтеза ацетоина в реакции Фогес-Проскауэра у генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор. **Материалы и методы.** Использовали девять генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор биовара, завезенных на территорию Российской Федерации и Украины в 1993–2011 гг., и четыре типичных штамма, изолированных в 1970–1972 гг. В качестве отрицательного контроля при изучении продукции ацетоина штаммами *V. cholerae* в реакции Фогес-Проскауэра использовали штамм *V. cholerae* 569B O1 серогруппы классического биовара. Относительную экспрессию генов изучали методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Построение модели белка проводили с использованием автоматизированного сервера SWISS – MODEL. **Результаты и обсуждение.** Показано, что диагностически значимый признак – реакция Фогес-Проскауэра, используемая для дифференциации биоваров *V. cholerae* O1, изменен у всех изученных генетически измененных штаммов возбудителя холеры, выделенных в разные периоды текущей седьмой пандемии (66,7 % штаммов дают слабоположительную реакцию, 33,3 % – отрицательную). Полученные данные указывают на снижение или отсутствие продукции ацетоина у изученных штаммов. Анализ четырех структурных генов *als* оперона, а также исследование экспрессии регуляторных генов *alsR* и *aphA*, контролирующих его биосинтез, выявил, что изменение продукции ацетоина у геновариантов является следствием делеции единичного нуклеотида (Т в позиции 315) в структурном гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, а также высокого уровня экспрессии негативного регулятора биосинтеза ацетоина – гена *aphA*. Моделирование пространственной структуры белка AlsD геноварианта M1293 и референс-штамма N16961 показало, что белок AlsD геноварианта действительно сильно редуцирован. Однако в отсутствие ацетолактат декарбоксилазы возможно спонтанное декарбоксилирование, что фенотипически проявляется в наличии слабоположительной реакции Фогес-Проскауэра.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, реакция Фогес-Проскауэра, биосинтез ацетоина, структура генов *als* оперона, экспрессия регуляторных генов.

Корреспондирующий автор: Заднова Светлана Петровна, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Гусева Н.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Выявление механизмов изменения продукции ацетоина у генетически измененных штаммов *Vibrio cholerae* O1 биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; 2:62–68. DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-62-68

S.P. Zadnova, A.A. Kritsky, N.A. Plekhanov, N.P. Guseva, Yu.V. Lozovsky, N.I. Smirnova

Identification of the Mechanisms of Acetoin Production Change in Genetically Altered *Vibrio cholerae* Strains O1 Biovar El Tor

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe” of the Rospotrebnadzor, Saratov, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was to determine the mechanisms of acetoin biosynthesis change in genetically altered El Tor *V. cholerae* strains in Voges-Proskauer test. **Materials and methods.** We used nine genetically altered *V. cholerae* O1 strains, biovar El Tor, imported in the territory of the Russian Federation and Ukraine between 1993–2011, and four typical strains isolated in 1970–1972. When assessing acetoin production in *V. cholerae* strains in Voges-Proskauer test, the strain *V. cholerae* 569B O1 serogroup, classical biovar served as negative control of the assay. Relative gene expression was studied using real-time RT-PCR. Protein model construction was performed by means of automated server SWISS – MODEL. **Results and discussion.** It has been demonstrated that diagnostically significant feature – Voges-Proskauer reaction, utilized for *V. cholerae* O1 biovar differentiation, is changed in all investigated genetically altered strains of cholera agent, isolated in different periods of the current seventh pandemic (66.7 % of the strains show weakly positive reaction, 33.3 % – negative one). The data obtained testify to the reduction or absence of acetoin production in the investigated strains. Analysis of four structural genes of *als* operon, as well as expression of regulatory genes *alsR* and *aphA*, responsible for acetoin biosynthesis, has revealed that changes in acetoin production in the genovariants stem from the deletion of a single nucleotide (T in the position 315) in the structural gene *alsD*, encoding acetolactat decarboxylase, and also from high levels of negative acetoin biosynthesis regulator expression – *aphA* gene. Modeling of the spatial (3-D) structure of AlsD protein in the genovariant M1293 and the reference-strain N16961 has shown that AlsD protein of the genovariant is, indeed, considerably reduced. However, spontaneous decarboxylation is possible in the absence of acetolactat decarboxylase, which phenotypically manifests itself in borderline positive Voges-Proskauer test.

Key words: *Vibrio cholerae* O1 serogroup, biovar El Tor; Voges-Proskauer test; acetoin biosynthesis; gene structure of *als* operon; expression of regulatory genes.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Svetlana P. Zadnova, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Citation: Zadnova S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Guseva N.P., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Identification of the Mechanisms of Acetoin Production Change in Genetically Altered *Vibrio cholerae* Strains O1 Biovar El Tor. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2019; 2:62–68. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2019-2-62-68

Received 08.04.19. Revised 11.04.19. Accepted 17.04.19.

Эпидемическая ситуация по холере – особо опасной кишечной инфекции, вызываемой токсигенными штаммами *Vibrio cholerae*, остается напряженной. Вспышки и эпидемии данной болезни не прекращаются в ряде стран Азии, Африки, Карибского бассейна. Ежегодно регистрируется в среднем 2,9 млн случаев холеры, из которых почти 95000 заканчиваются летально [1]. Согласно данным ВОЗ, в 2017 г. зарегистрирован 1227391 больной в 34 странах и 5654 умерших [2]. Из эндемичных территорий туристами и путешественниками возбудитель завозится в неэндемичные страны, включая и Российскую Федерацию.

В настоящее время продолжается седьмая пандемия холеры, начавшаяся в 1961 г. и вызванная токсигенными типичными штаммами *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор. Возбудителями предыдущих шести пандемий предположительно были штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы классического биовара. Несмотря на то, что данные штаммы относятся к одной O1 серогруппе, они отличаются друг от друга по составу, структуре и экспрессии ряда генов патогенности, пандемичности и адаптации. Отличия между ними по некоторым микробиологическим и биохимическим свойствам – чувствительности к полимиксину В, диагностическим холерным фагам, способности агглютинировать куриные эритроциты и образовывать ацетонин из глюкозы в реакции Фогес-Проскауэра – используют для дифференциации биоваров [3]. Холерные вибрионы биовара Эль Тор устойчивы к полимиксину В и хорошо растут на средах с добавлением данного антибиотика (50 мкг/мл), агглютинируют куриные эритроциты, дают положительную реакцию Фогес-Проскауэра (образуют ацетонин при выращивании в среде Кларка), лизируются холерным диагностическим фагом эльтор. В соответствии с Методическими указаниями МУ 4.2.2218-07 «Лабораторная диагностика холеры» определение биовара выделенного природного штамма *V. cholerae* O1 серогруппы является обязательным этапом в схеме лабораторного исследования материала на холеру.

В результате эволюционных преобразований возбудителя холеры в 90-х годах прошлого столетия возникли генетически измененные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор (геноварианты) с повышенной вирулентностью, содержащие в опероне *ctxAB*, кодирующем биосинтез холерного токсина, ген *ctxB* классических вибрионов. В короткие сроки геноварианты распространились по миру, вытеснив типичные штаммы, вызвавшие начало текущей пандемии. Несмотря на появление новых свойств, значительное количество изученных геновариантов имело диагностически значимые признаки, характерные для вибрионов биовара Эль

Тор. В то же время проведенные исследования по определению биовара более 170 клинических генетически измененных штаммов, изолированных в Матлабе (Бангладеш) в 1991–1994 гг., показали, что среди них были изоляты с отрицательной реакцией Фогес-Проскауэра, характерной для классических холерных вибрионов [4, 5]. Это означало, что у изученных штаммов один из диагностически значимых признаков, используемых для дифференциации биоваров, был изменен. Далее было обнаружено, что у геновариантов, сформировавшихся в более поздний период эволюции возбудителя (Бангладеш, 2001–2005 гг.; Гаити, 2010 г.), реакция Фогес-Проскауэра также изменилась. Она оказалась слабopоложительной, что указывало на снижение способности ферментировать глюкозу до ацетона [6, 7]. Несмотря на важность этих данных для диагностики холеры, генетический механизм изменения продукции ацетона у природных геновариантов до сих пор не установлен.

Цель работы – установление механизмов изменения биосинтеза ацетона в реакции Фогес-Проскауэра у генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. В работе использованы как изолированные из внешней среды штаммы, так и *V. cholerae* 569В O1 серогруппы классического биовара и 13 штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор, вызвавших вспышки и единичные случаи холеры. Штаммы получены из Государственной коллекции патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб». Культивирование штаммов осуществляли в бульоне и на агаре LB.

Производство ацетона. Способность штаммов к продукции ацетона определяли в реакции Фогес-Проскауэра. Исследуемые штаммы культивировали в глюкозо-фосфатном бульоне Кларка (0,5 % пептона, 0,5 % глюкозы, 0,5 % K_2HPO_4) в течение 48 ч при температуре 37 °С. Затем к 1 мл выросшей культуры добавляли 0,6 мл 5 % раствора α -нафтола и 0,4 мл 40 % раствора гидроксида калия. Учет реакции проводили через 1 ч инкубации пробирок при температуре 37 °С. В штаммах, не образующих ацетонин, цвет среды не изменился и остался светло-желтым – отрицательная реакция. В штаммах, синтезирующих ацетонин, среда окрашивается в ярко малиновый цвет – положительная реакция. Цвет среды от светло- до темно-розового учитывается как слабopоложительная реакция Фогес-Проскауэра [8].

Выделение ДНК и РНК. Получение нуклеиновых кислот из штаммов *V. cholerae* для фрагментарного секвенирования, а также для постановки ПЦР

проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Применяли коммерческие наборы AxyPrep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Axygen Biosciences, США) и Promega Total RNA Isolation System (Promega, США), работу проводили в соответствии с протоколами производителя.

Качество и количество выделенных нуклеиновых кислот оценивали общепринятым методом с использованием сканирующей спектрофотометрии, измеряя оптическую плотность препаратов на приборе Biowave DNA (Biochrome Ltd, Великобритания) при трех длинах волн – 230 нм, 260 нм, 280 нм [9]. Каждый образец измеряли трехкратно. Концентрацию нуклеиновых кислот определяли при длине волны 260 нм. Очистку от белковых примесей контролировали по значениям соотношения A260/A280 (для чистых нуклеиновых кислот в пределах 1,8–2,2). Оценку чистоты от химических веществ (компонентов рабочих растворов) осуществляли при A260/A230 (>2,0).

Полимеразная цепная реакция. ПЦР проводили в микропробирках объемом 200 мкл на амплификаторе RotorGene Q (Qiagen, Германия). Конечный объем реакционной смеси составлял 25 мкл и включал по 8 пмоль каждого праймера, 4 пмоль зонда, 1,5 ед термостабильной ДНК-полимеразы, 2,5 мкл десятикратного ПЦР-буфера (рН 8,4), 25 ммоль раствора хлорида магния, раствор дезоксирибонуклеотидтрифосфатов по 2 ммоль каждого, 2,5 мкл исследуемой ДНК (100 нг/мкл), а также деионизованную воду до конечного объема 25 мкл.

Оценка уровня относительной экспрессии генов. Для определения уровня экспрессии генов холерного вибриона использовали ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) в реальном времени, в которой экспрессия гена оценивается по количеству кДНК, полученной в результате обратной транскрипции из молекул РНК исследуемого гена, относительно ПЦР-стандартов с установленной концентрацией. Окончательную оценку уровня экспрессии генов осуществляли методом $2^{-\Delta\Delta C_t}$, который учитывает уровень экспрессии гена «домашнего хозяйства», экспрессия которого является постоянной [10]. В качестве референсного штамма, экспрессия генов которого принималась за единицу, произвольно выбран штамм *V. cholerae* M818 биовара Эль Тор, в качестве гена-нормализатора – ген «домашнего хозяйства» *recA*. Праймеры и зонды на изучаемые гены рассчитывали при помощи интернет сервисов PrimerQuest и GenScript, с учетом требований, предъявляемых к дизайну олигонуклеотидов в системе TaqMan®: *alsR-F* – AACCCAGCTTGCGCCATAGT, *alsR-R* – TCGCGGATCGTATGCTG, *alsR-P* – (FAM)CGCCACAGTTAAGAACGGCA(BHQ1); *aphA-F* – GATGCAACCGGGTACGATATAA, *aphA-R* – TCTGTTTGCCTTCCTGTG, *aphA-P* – (FAM)ACGATATACCTGCTGATGGCTGGC(BHQ1); *recA-F* – ACGG

GTAACCTCAAGCAATC, *recA-R* – TATCCAAACG AACAGAAGCG, *recA-P* – (FAM)CCACTGGCGGTAACGCACTGA(BHQ1). Для реакции обратной транскрипции использовали набор реактивов «Реверта» (АмплиСенс, Россия).

Секвенирование. Фрагментное секвенирование гена *alsD* с праймерами *alsD-F* CAGTGGTGAAGGCGAGATTT и *alsD-R* GGCCGCTGCTGTTTGGT проводили на приборе ABI Prism® 3500 XL (Applied Biosystems, США). Для биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей использовали пакет программы BioEdit V. 7.0.9.0. (BioEdit, США).

Пространственное моделирование структуры белка α -ацетолактат декарбоксилазы. Для моделирования белка AlsD использовали автоматизированный сервер SWISS – MODEL (swissmodel.expasy.org). Первичную аминокислотную последовательность белка α -ацетолактат декарбоксилазы определяли при помощи программы BioEdit Sequence Alignment Editor V. 7.0.9.0. по нуклеотидной матрице гена *alsD* с использованием нуклеотидной последовательности полного генома. Аминокислотную последовательность белка AlsD геновариантов выравнивали по целевому шаблону белка α -ацетолактат декарбоксилазы типичного штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор при помощи алгоритма ProMod 3 V. 1.1.0. Оценку качества производили с использованием функции QMEAN (Qualitative Model Energy Analysis) [11, 12].

Статистическая обработка. Для статистической обработки экспериментальных данных применяли программы Microsoft Excel (Microsoft, США) и Statistica 6.0 (StatSoft, Россия), вычисляя среднюю арифметическую, стандартную ошибку средней арифметической и доверительный интервал.

Результаты и обсуждение

В работе использовались генетически измененные штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенные на территорию Российской Федерации и Украины с 1993 по 2011 год (табл. 1). Необходимо отметить, что геноварианты изолировали в разные периоды текущей пандемии холеры и отличались по структуре генов патогенности, пандемичности, адаптации, что ранее установили другие исследователи [13, 14, 15, 16, 17].

При постановке реакции Фогес-Проскауэра, используемой для дифференциации биоваров холерных вибрионов O1 серогруппы, выявлено, что данная реакция изменена у всех изученных штаммов (рис. 1). У большинства исследованных геновариантов (6 из 9 штаммов, что составило 66,7 %) она была слабopоложительной, у остальных (33,3 %) – отрицательной. Полученные данные указали на снижение либо отсутствие способности геновариантов образовывать ацетоин из глюкозы. При этом все взятые в качестве контроля типичные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор дали положительную реакцию

Таблица 1 / Table 1

Реакция Фогес-Проскауэра и экспрессия регуляторных генов, контролирующих биосинтез ацетона, в штаммах *V. cholerae* биовара Эль Тор

Voges-Proskauer test and expression of regulatory genes, encoding acetoin biosynthesis in *V. cholerae* strains, biovar El Tor

Штамм / Strain	Год, место и источник выделения / Year, site and source of isolation	Результаты реакции Фогес-Проскауэра / Voges-Proskauer test results	Относительная экспрессия генов* / Relative gene expression*	
			<i>alsR</i>	<i>aphA</i>
Геноварианты биовара Эль Тор / Genovariants of El Tor biovar				
M1270	1993, Татарстан, человек / Tatarstan, patient	Слабоположительная / Weakly positive	0,85±0,04	1,52±0,07
M1299	1993, Краснодар, человек / Krasnodar, patient	Отрицательная / Negative	1,13±0,05	1,74±0,07
M1266	1994, Пермь, вн. ср. / Perm, ambient environment	Слабоположительная / Weakly positive	1,08±0,05	2,46±0,11
M1293	1994, Дагестан, человек / Dagestan, patient	Отрицательная / Negative	н/и / not studied	н/и / not studied
P17644	1997, Ачинск, человек / Achinsk, patient	Слабоположительная / Weakly positive	2,60±0,12	2,06±0,10
M1345	2001, Казань, человек / Kazan, patient	Слабоположительная / Weakly positive	3,05±0,15	2,31±0,11
147	2010, Ялта, вн. ср. / Yalta, ambient environment	Отрицательная / Negative	1,13±0,05	5,09±0,24
301	2011, Таганрог, вн. ср. / Taganrog, ambient environment	Слабоположительная / Weakly positive	1,93±0,09	2,28±0,11
39	2011, Мариуполь, вн. ср. / Mariupol, ambient environment	Слабоположительная / Weakly positive	2,77±0,13	3,92±0,19
Типичные штаммы биовара Эль Тор / Typical strains of El Tor biovar				
M818**	1970, Балаково, человек / Balakovo, patient	Положительная / Positive	1	1
M1062	1970, Астрахань, человек / Astrakhan, patient	Положительная / Positive	1,53±0,06	0,93±0,04
M893	1970, Астрахань, человек / Astrakhan, patient	Положительная / Positive	2,14±0,10	1,32±0,06
M1011	1972, Башкирия, человек / Bashkortostan, patient	Положительная / Positive	1,79±0,07	0,90±0,04

Примечания: н/и – не изучали; *среднее значение относительного уровня экспрессии рассчитано по результатам трех измерений (p<0,05); **экспрессия генов данного штамма взята за 1.

Note: *average value of relative expression level is computed based on the results of three measurements (p<0,05); **gene expression of this strain is assumed as 1.

Фогес-Проскауэра (малиновое окрашивание среды) (табл. 1). У штамма *V. cholerae* 569В классического биовара данная реакция была отрицательная (светло-желтая окраска среды).

Таким образом, установлено, что диагностически значимый признак, реакция Фогес-Проскауэра, изменен у всех изученных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор, завезенных в разные периоды седьмой пандемии.

Для выявления механизмов измененной продукции ацетона у геновариантов проведен анализ структурных генов *als* оперона, а также изучена экспрессия регуляторных генов *alsR* и *aphA*, контролирующих его биосинтез, у типичных штаммов и геновариантов.

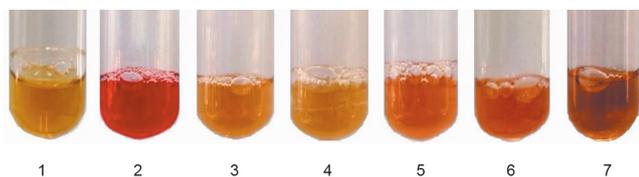


Рис. 1. Образование ацетона штаммами *V. cholerae* в реакции Фогес-Проскауэра:

1 – штамм классического биовара 569В (отрицательный контроль); 2 – типичный штамм *V. cholerae* M818 биовара Эль Тор (положительный контроль); 3–7 – геноварианты *V. cholerae* M1299, 147, M1345, P17644, M1266 биовара Эль Тор

Fig. 1. Acetoin production by *V. cholerae* strains in Voges-Proskauer test:

1 – strain of classical biovar 569B (negative control); 2 – typical *V. cholerae* strain M818, biovar El Tor (positive control); 3–7 – *V. cholerae* genovariants M1299, 147, M1345, P17644, M1266, biovar El Tor

Согласно данным литературы, *als* оперон включает шесть генов – *alsR*, *alsD*, *alsS*, *alsO*, *acgA* и *acgB*. При этом гены *acgA* и *acgB* не участвуют в биосинтезе ацетона, так как кодируют соответственно белки с фосфодиэстеразным (EAL) и дигуанилат циклазным (GGDEF) доменами, которые контролируют содержание сигнальной молекулы – циклического дигуанилата. Остальные четыре гена необходимы для продукции ацетона. При этом *alsR* кодирует транскрипционный регулятор, позитивно контролирующей экспрессию генов *alsD*, *alsS* и *alsO*, ответственных соответственно за продукцию ферментов – ацетолактат декарбоксилазы, ацетолактат синтазы, ацетолактат оксидоредуктазы. Между генами *alsR* и *alsD* расположен сайт связывания с регуляторным белком AphA, положительно контролирующим биосинтез факторов вирулентности, но подавляющим продукцию ацетона [8].

При анализе нуклеотидной последовательности генов *alsR*, *alsD*, *alsS*, *alsO* типичных штаммов установлена их идентичность таковым референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор. Исключение составил штамм M893, у которого в гене *alsS* в позиции 644 от начала гена выявлена несинонимичная замена С на Т. Однако наличие указанной SNP не влияет на образование ацетона данным штаммом.

Исследование структуры *als* оперона генетически измененных штаммов показало, что они содержат интактный ген *alsR*, структура генов *alsO* и *alsS* также была идентична таковым референс-штамма. Однако у всех изученных геновариантов в после-

довательности гена *alsD*, кодирующего ацетолактат декарбоксилазу, выявлено отсутствие тиминового нуклеотида в позиции 315 от начала гена. Наличие делеции подтвердилось при последующем проведении фрагментарного секвенирования гена *alsD* у взятых в анализ штаммов. Необходимо отметить, что указанная делеция в гене *alsD* выявлена нами ранее при анализе шести клинических генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор [18], что указывает на закономерность, присущую всем изученным генетически измененным штаммам. Кроме того, при анализе последовательности гена *alsD* генетически измененного штамма *V. cholerae* ВАА-2163 биовара Эль Тор (Гаити, 2010), нуклеотидная последовательность полного генома которого депонирована в GenBank (2010E1 – 1786, код доступа AELN00000000.1) и который, согласно данным литературы, дает слабоположительную реакцию Фогес-Проскауэра [6, 7], также выявлена данная делеция. Таким образом, снижение (или отсутствие) продукции ацетоина у геновариантов коррелирует с изменением структуры гена *alsD*.

Делеция тиминового нуклеотида в позиции 315 в гене *alsD* приводит к сдвигу рамки считывания и образованию преждевременного стоп-кодона. Последующий анализ предполагаемой аминокис-

лотной последовательности белка AlsD у взятого в качестве модельного штамма *V. cholerae* M1293 в сравнении с таковой референс-штамма N16961 биовара Эль Тор действительно выявил различия в количестве аминокислот. Так, у геноварианта было на 145 аминокислотных остатков меньше, чем у референс-штамма. При этом процентное содержание некоторых аминокислот возрастало в результате уменьшения их общего количества (табл. 2).

Далее проведено моделирование пространственной структуры белка AlsD геноварианта M1293 и референс-штамма N16961 (рис. 2). Score (Z) QMEAN моделей белка AlsD составил – 1,13, что указывало на их высокое качество (модели с показателем Z ниже – 4,0 считаются низкокачественными). В результате наглядно показано, что белок AlsD геновариантов действительно сильно редуцирован. Таким образом, выявленные структурные изменения гена *alsD* геновариантов приводят к биосинтезу дефектного фермента ацетолактат декарбоксилазы, не способной участвовать в процессе декарбоксилирования α -ацетолактата в ацетоин.

Однако в отсутствии ацетолактат декарбоксилазы возможно спонтанное (неферментативное) декарбоксилирование, что фенотипически проявляется в наличии слабоположительной реакции Фогес-

Таблица 2 / Table 2

Сравнительный анализ аминокислотного состава белка AlsD референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор и геноварианта M1293 с использованием программы BioEdit Sequence Alignment Editor
Comparative analysis of amino-acid composition of AlsD protein in *V. cholerae* reference-strain N16961, biovar El Tor and genovariant M1293, using BioEdit software tools, Sequence Alignment Editor

Аминокислота / Amino acid	Референс-штамм N16961 / Reference-strain N16961		Геновариант M1293 / Genovariant M1293	
	количество аминокислот / number of amino acids	содержание, в % / content, %	количество аминокислот / number of amino acids	содержание, в % / content, %
Аланин / Alanine	19	7,28	13	11,21
Цистеин / Cysteine	3	1,15	3	2,59
Аспарагиновая кислота / Asparagine acid	11	4,21	4	3,45
Глутаминовая кислота / Glutamine acid	16	6,13	8	6,90
Фенилаланин / Phenylalanine	17	6,51	8	6,90
Глицин / Glycine	19	7,28	9	7,76
Гистидин / Histidine	10	3,83	5	4,31
Изолейцин / Isoleucine	20	7,66	7	6,03
Лизин / Lysine	4	1,53	1	0,86
Лейцин / Leucine	19	7,28	13	11,21
Метионин / Methionine	4	1,53	2	1,72
Аспарагин / Asparagine	7	2,68	2	1,72
Пролин / Proline	15	5,75	6	5,17
Глутамин / Glutamine	26	9,96	11	9,48
Аргинин / Arginine	17	6,51	3	2,59
Серин / Serine	13	4,98	9	7,76
Треонин / Threonine	18	6,90	6	5,17
Валин / Valine	16	6,13	3	2,59
Триптофан / Tryptophan	0	0,00	0	0,00
Тирозин / Tyrosine	7	2,68	3	2,59
Всего аминокислот / Total number of amino acids	261	100,00	116	100,00

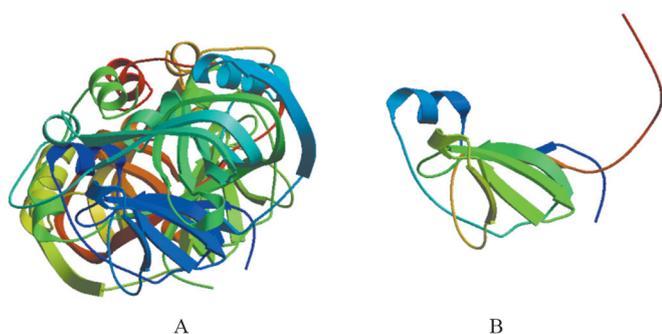


Рис. 2. Моделирование пространственной структуры белка AlsD у референс-штамма *V. cholerae* N16961 биовара Эль Тор (A) и генетически измененного штамма M1293 (B) с использованием алгоритма ProMod 3 V. 1.1.0

Fig. 2. Modeling of spatial (3-D) structure of AlsD protein in *V. cholerae* reference-strain N16961, biovar El Tor (A) and genetically altered strain M1293 (B), using ProMod V.1.1.0. algorithm

Проскауэра [8]. Возможно, у анализируемых нами генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор также происходит процесс спонтанного декарбоксилирования. При этом у каждого штамма данный процесс, возможно, происходит с неодинаковой интенсивностью и образуется разное количество ацетоина, поэтому мы наблюдаем слабоположительную реакцию Фогес-Проскауэра с разной окраской среды (от светлорозового до темнорозового).

Учитывая важную роль в образовании ацетоина регуляторных белков AlsR и AphA [8], далее изучена экспрессия генов *aphA* и *alsR* методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. В качестве референс-штамма, экспрессия генов которого взята за единицу, произвольно выбран типичный штамм *V. cholerae* M818. В результате установлено, что у геновариантов уровень экспрессии *alsR* сопоставим с экспрессией данного гена в типичных штаммах (табл. 1). В то же время уровень экспрессии *aphA* превышает этот показатель типичных штаммов в среднем в 2,5 раза.

Увеличенная продукция белка AphA, являющегося одним из центральных регуляторов экспрессии генов вирулентности, у генетически измененных штаммов вполне объяснима. Как известно, указанные штаммы отличаются повышенной продукцией данных факторов вирулентности [4, 13, 19, 20]. Возможно, повышение уровня экспрессии гена *aphA*, являющегося негативным регулятором биосинтеза ацетоина, также может обуславливать понижение или отсутствие его продукции у генетически измененных штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор.

Таким образом, диагностически значимый признак – реакция Фогес-Проскауэра, используемая для дифференциации биоваров *V. cholerae* O1, изменен у всех изученных генетически измененных штаммов возбудителя холеры, завезенных в разные периоды седьмой пандемии холеры (1993–2011 гг.). Показано, что, в отличие от типичных изолятов, у 66,7 % исследованных геновариантов реакция Фогес-Проскауэра является слабоположительной, у 33,3 % – отрицательной, что указывает на снижение либо отсутствие

их способности образовывать ацетоин из глюкозы. Измененная способность к образованию ацетоина у геновариантов возбудителя холеры Эль Тор, возможно, является следствием делеции единичного нуклеотида (Т в позиции 315) в структурном гене *alsD*, кодирующем ацетолактат декарбоксилазу, а также высокого уровня экспрессии гена *aphA*, негативного регулятора биосинтеза ацетоина. Однако мы не исключаем у геновариантов возможного присутствия еще не известных механизмов, также оказывающих влияние на биосинтез ацетоина данными штаммами.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Ali M., Nelson A. R., Lopez A.L., Sack D. A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832
2. World Health Organization. Cholera, 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.
3. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–89.
4. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. 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):3296–99. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.
5. Safa A., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T., Takeda Y., Sack D.A., Nair G.B. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55(11):1563–69. DOI: 10.1099/jmm.0.46689-0.
6. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.
7. Brumfield K.D., Carignan B.M., Son M.S. Genotypic and phenotypic assays to distinguish *Vibrio cholerae* biotype. In: Sikora A., editor. *Vibrio cholerae. Methods in Molecular Biology.* Humana Press, New York, NY; 2018. Vol. 1839. P. 11–28. DOI: 10.1007/978-1-4939-8685-9_2.
8. Kovacicova G., Lin W., Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2005; 57: 420–433. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04700.x.
9. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Молекулярное клонирование. М.: Мир; 1984. 480 с.
10. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCt} method. *Methods.* 2001; 25:402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
11. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics.* 2011; 27:343–50. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq662.
12. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 2017; 7:10480. DOI: 10.1038/s41598-017-09654-8.
13. Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П., Краснов Я.М., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2011; 3:3–10.
14. Савельев В.Н., Савельева И.В., Бабеншпев Б.В., Куличенко А.Н. Эволюция возбудителя и клинико-эпидемиологические особенности современной холеры Эль Тор. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2012; 5:31–5.
15. Плеханов Н.А., Заднова С.П. Структурно-функциональный анализ генов, кодирующих биосинтез маннозочувствительных гемагглютинирующих пилей адгезии у различных штаммов *Vibrio cholerae* биовара Эль Тор. *Проблемы особо опасных инфекций.* 2016; 4:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-75-78.
16. Монахова Е.В., Писанов Р.В., Титова С.В. Особенности структуры генома возбудителей холеры, циркулирующих на территориях России и сопредельных стран. В кн.: Покровский

В.И., редактор. Сборник трудов IX Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика». Тамбов: ООО фирма «Юлис», 2017. Т. 1. С. 325–7.

17. Kuleshov K.V., Kostikova A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Tikhonov S.N., Savelieva I.V., Saveliev V.N., Vasilieva O.V., Zinich L.S., Pidchenko N.N., Kulichenko A.N., Shipulin G.A. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44:471–8. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.039.

18. 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. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017; 35(2):64–9. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-64-69.

19. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.

20. Ghosh P., Sinha R., Samanta P., Saha D.R., Koley H., Dutta S., Okamoto K., Ghosh A., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 strains manifest higher virulence in animal models. *Front. Microbiol.* 2019; 10:111. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00111.

References

1. Ali M., Nelson A. R., Lopez A.L., Sack D. A. Updated global burden of cholera in endemic countries. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2015; 9(6):e0003832. DOI: 10.1371/journal.pntd.0003832

2. World Health Organization. Cholera, 2017. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2018; 93(38):489–500.

3. Kaper J.B., Morris J., Levin M. Cholera. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995; 8(1):48–89.

4. Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., Kamruzzaman M., Siddique A.K., Sack D.A. 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):3296–99. DOI: 10.1128/JCM.40.9.3296-3299.2002.

5. Safa A., Bhuyian N.A., Nusrin S., Ansaruzzaman M., Alam M., Hamabata T., Takeda Y., Sack D.A., Nair G.B. Genetic characteristics of Matlab variants of *Vibrio cholerae* O1 that are hybrids between classical and El Tor biotypes. *J. Med. Microbiol.* 2006; 55(11):1563–69. DOI: 10.1099/jmm.0.46689-0.

6. Son M.S., Megli C.J., Kovacicova G., Qadri F., Taylor R.K. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype variant clinical isolates from Bangladesh and Haiti, including a molecular genetic analysis of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2011; 49(11):3739–49. DOI: 10.1128/JCM.01286-11.

7. Brumfield K.D., Carignan B.M., Son M.S. Genotypic and phenotypic assays to distinguish *Vibrio cholerae* biotype. In: Sikora A., editor. *Vibrio cholerae. Methods in Molecular Biology.* Humana Press, New York, NY; 2018. Vol. 1839. P. 11–28. DOI: 10.1007/978-1-4939-8685-9_2.

8. Kovacicova G., Lin W., Skorupski K. Dual regulation of genes involved in acetoin biosynthesis and motility/biofilm formation by the virulence activator AphA and the acetate-responsive LysR-type regulator AlsR in *Vibrio cholerae*. *Mol. Microbiol.* 2005; 57: 420–433. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2005.04700.x.

9. Maniatis T., Fritsch E., Sambrook J. *Molecular cloning.* M.: “Mir”; 1984. 480 p.

10. Livak K.J., Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using realtime quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods.* 2001; 25:402–8. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

11. Benkert P., Biasini M., Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bio-*

informatics. 2011; 27:343–50. DOI: 10.1093/bioinformatics/btq662.

12. Bertoni M., Kiefer F., Biasini M., Bordoli L., Schwede T. Modeling protein quaternary structure of homo- and hetero-oligomers beyond binary interactions by homology. *Sci. Rep.* 2017; 7:10480. DOI: 10.1038/s41598-017-09654-8.

13. Smirnova N.I., Goryaev A.A., Zadnova S.P., Krasnov Ya.M., Lozovsky Yu.V., Kutuyev V.V. Genetic characteristics of clinical *Vibrio cholerae* strains, imported in the territory of the Russian Federation in the modern period. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii i Immunobiologii [Journal of Microbiology, Epidemiology, and Immunobiology].* 2011; 3:3–10.

14. Savel'ev V.N., Savel'eva I.V., Babenyshev B.V., Kulichenko A.N. Evolution of the agent and clinical-epidemiological peculiarities of modern-day cholera El Tor. *Epidemiologiya i Infektsionnyye Bolezni [Epidemiology and Infectious Diseases].* 2012; 5:31–5.

15. Plekhanov N.A., Zadnova S.P. Structural-Functional Analysis of the Genes, Encoding Biosynthesis of Mannose-Sensitive Hemagglutinating Pili of Adhesion in Different *Vibrio cholerae* El Tor Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections].* 2016; 4:75–8. DOI: 10.21055/0370-1069-2016-4-75-78.

16. Monakhova E.V., Pisanov R.V., Titova S.V. [Peculiarities of genome structure in cholera agents, circulating in the territories of Russia and other neighboring countries]. In: Pokrovsky V.I., editor. [Proceedings of the IX All-Russian Scientific-and-Practical Conference with International Participation “Molecular Diagnostics”]. Tambov: «Ulyss» Ltd.; 2017. Vol. 1. P. 325–7.

17. Kuleshov K.V., Kostikova A., Pisarenko S.V., Kovalev D.A., Tikhonov S.N., Savelieva I.V., Saveliev V.N., Vasilieva O.V., Zinich L.S., Pidchenko N.N., Kulichenko A.N., Shipulin G.A. Comparative genomic analysis of two isolates of *Vibrio cholerae* O1 Ogawa El Tor isolated during outbreak in Mariupol in 2011. *Infect. Genet. Evol.* 2016; 44:471–8. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.07.039.

18. Zadnova S.P., Cheldyshova N.B., Kritsky A.A., Adamov A.K., Devdariani Z.L., Kutuyev V.V. Comparative analysis of glucose metabolism in *Vibrio cholerae* strains, biovar El Tor. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya, Virusologiya [Molecular genetics, Microbiology, and Virology].* 2017; 35(2):64–9. DOI: 10.18821/0208-0613-2017-35-2-64-69.

19. Ghosh-Banerjee J., Senoh M., Takahashi T. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11):4283–6. DOI: 10.1128/JCM.00799-10.

20. Ghosh P., Sinha R., Samanta P., Saha D.R., Koley H., Dutta S., Okamoto K., Ghosh A., Ramamurthy T., Mukhopadhyay A.K. Haitian variant *Vibrio cholerae* O1 strains manifest higher virulence in animal models. *Front. Microbiol.* 2019; 10:111. DOI: 10.3389/fmicb.2019.00111.

Authors:

Zadnova S.P., Kritsky A.A., Plekhanov N.A., Guseva N.P., Lozovsky Yu.V., Smirnova N.I. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Об авторах:

Заднова С.П., Крицкий А.А., Плеханов Н.А., Гусева Н.П., Лозовский Ю.В., Смирнова Н.И. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrap@microbe.ru.

Поступила 08.04.19.

Отправлена на доработку 11.04.19.

Принята к публ. 17.04.19.