

Биологическая и генетическая характеристика холерного бактериофага Rostov 7

Н.Е.Гаевская, М.П.Погожова, А.С.Водопьянов, Р.В.Писанов,
Л.В.Романова, А.О.Аноприенко, С.Н.Головин, А.В.Тюрина

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, Ростов-на-Дону,
Российская Федерация

На сегодняшний день обнаружено множество генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, которые могут быть встроены в фаговый геном. Весьма актуальным является изучение выделенных фагов на предмет наличия в них этих генов. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз является полногеномное секвенирование. Целью нашего исследования было изучить не только биологию холерного бактериофага *Vibrio phage Rostov 7*, но и провести полногеномное секвенирование с дальнейшей оценкой перспектив его практического использования. Наличие или отсутствие генетических детерминант факторов резистентности, токсинов и интеграз проверяли при помощи созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения под названием PhageAnalyzer. При помощи электронно-микроскопического исследования установлена морфология корпускул холерного бактериофага Rostov 7, а также подтверждена его специфичность. На газоне индикаторной культуры бактериофаг Rostov 7 образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм. Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что размер его генома составляет 45903 п.н. с общим количеством ORF 35, также обнаружены гены, характерные для хвостатых фагов. Установлено, что бактериофаг Rostov 7 имеет обособленное положение и является уникальным. В структуре генома найдены две интегразы (YP_009043902.1 и YP_009043892.1), поэтому использование фага в профилактических или лечебных препаратах исключено, так как он является умеренным. Генетических детерминант факторов антибиотикорезистентности и токсинов не обнаружено. В настоящее время бактериофаг активно используется в экспериментальной деятельности лаборатории и для конструирования диагностических препаратов. Полная геномная последовательность *Vibrio phage Rostov 7* депонирована в международной базе GenBank (NCBI) под номером MK575466.1.

Ключевые слова: *Vibrio phage Rostov 7*, *Myoviridae*, холера, секвенирование, бактериофаг

Для цитирования: Гаевская Н.Е., Погожова М.П., Водопьянов А.С., Писанов Р.В., Романова Л.В., Аноприенко А.О., Головин С.Н., Тюрина А.В. Биологическая и генетическая характеристика холерного бактериофага Rostov 7. Бактериология. 2019; 4(2): 27–30. DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-27-30

Biological and genetic characteristics of the cholera bacteriophage Rostov 7

N.E.Gaevskaya, M.P.Pogozhova, A.S.Vodopyanov, R.V.Pisanov,
L.V.Romanova, A.O.Anoprienko, S.N.Golovin, A.V.Tyurina

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Currently a variety of genes encoding integrases, antibiotic resistance, and toxins had been identified which maybe inserted into the phage genome. The study of isolated phages for the presence of these genes are highly relevant. The most informative method for identifying genetic determinants of pathogenicity factors and integrase is genome sequencing. The aim of our study was to study not only the biology of the cholera bacteriophage *Vibrio phage Rostov 7*, but also to conduct whole genome sequencing with a further assessment of the prospects for its practical use. The presence or absence of genetic determinants of resistance factors, toxins and integrase was checked with the help of the database created by us and the software developed, named "PhageAnalyzer". The morphology of the cholera bacteriophage Rostov 7 corpuscles was determined by means of electron microscopy, and this specificity was confirmed. On the lawn of the indicator culture, the bacteriophage Rostov 7 forms transparent negative colonies with a diameter of 1.0–1.5 mm. Analysis of the nucleotide sequences revealed that its genome size is 45903 bp with the total number of ORF 35, genes characteristic of caudate phages were also found. The bacteriophage Rostov 7 was shown to have a separate position and to be unique. Two integrases were found in the genome structure (YP_009043902.1 and YP_009043892.1), therefore, the use of phage in prophylactic or therapeutic preparations is excluded, since it is moderate. Genetic determinants of resistance factors and toxins were not detected. At the moment the bacteriophage is actively used in the experimental work of the laboratory. *Vibrio phage Rostov 7* can be successfully used to construct diagnostic products. The complete genomic sequence of *Vibrio phage Rostov 7* is deposited in the international database NCBI GenBank under the accession number MK575466.1.

Keywords: *Vibrio phage Rostov 7*, *Myoviridae*, cholera, sequencing, bacteriophage

For citation: Gaevskaya N.E., Pogozhova M.P., Vodopyanov A.S., Pisanov R.V., Romanova L.V., Anoprienko A.O., Golovin S.N., Tyurina A.V. Biological and genetic characteristics of the cholera bacteriophage Rostov 7. Bacteriology. 2019; 4(2): 27–30. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2019-2-27-30

Для корреспонденции:

Гаевская Наталья Евгеньевна, кандидат медицинских наук, научный сотрудник, заведующая лабораторией бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

Статья поступила 21.03.2019 г., принята к печати 27.06.2019 г.

For correspondence:

Natalya E. Gaevskaya, MD, PhD, researcher, head of the bacteriophage laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857
E-mail: gaevskaya.nata@mail.ru

The article was received 21.03.2019 accepted for publication 27.06.2019

Продолжающаяся седьмая пандемия холеры привлекла пристальное внимание исследователей к проблеме холерных вибрионов. Бактериофаги являются постоянными спутниками холерных вибрионов, а их присутствие в клетках бактерий приводит к появлению новых свойств [1]. Фаги удобно использовать для решения таких вопросов, как взаимоотношение вируса с бактериальной клеткой [2], действие инактивирующих факторов на фаги, изменчивость свойств бактерий при передаче генетической информации фагами, а также разработка эффективных методов профилактики и фагодиагностики возбудителей болезней.

Вирулентные формы фагов являются основным элементом биологической борьбы с бактериальной инфекцией. Их поиск и изучение свойств представляют большой интерес [3]. Подтверждение вирулентности или умеренности бактериофага можно осуществить в ходе выявления генов, кодирующих известные интегразы [4]. Фаги идентифицируют как вирулентные, если у них нет гена интегразы. На сегодняшний день обнаружено множество генов интеграз, антибиотикорезистентности и токсинов, которые могут быть встроены в фаговый геном. Весьма актуальным является изучение выделенных фагов на предмет наличия в них этих генов. Наиболее информативным методом для выявления генетических детерминант факторов патогенности и интеграз является полногеномное секвенирование.

Цель исследования: изучить биологические свойства холерного бактериофага *Vibrio phage Rostov 7*, а также провести полногеномное секвенирование с дальнейшей оценкой перспектив его практического использования.

Материалы и методы

В исследование взят бактериофаг Rostov 7, выделенный нами ранее из окружающей среды. Источником выделения фага послужили пробы воды, доставленные для исследования на вибриофлору. Биологические свойства изучали общепринятыми методами [5]. Образцы просматривали в трансмиссионном электронном микроскопе JEM-1011. Электронограммы получены при помощи CDC-камеры Olympus-SIS-Veleta и программного обеспечения iTEM-TEMimagingPlatform. Выделение ДНК фагов проводили в соответствии с ранее описанными методиками [6–8]. Количество и качество выделенной ДНК контролировали электрофорезом в 0,8% агарозном геле. Отсутствие бактериальных хромосом в пробах подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием ген-специфичных праймеров для определения фрагментов ДНК *hly* и *ctx+*. Раствор фаговой ДНК хранили при температуре -20°C . Геномная последовательность бактериофагов была определена с использованием высокопроизводительного секвенирования (high-throughput sequencing) на платформе MiSeq (Illumina). Оценку первичных данных секвенирования проводили с использованием программы FastQC [9]. Для тримминга и коррекции ридов использовали алгоритмы Trimmomatic [10] и Lighter [11]. Сборку геномов, представленных в виде ридов, проводили с использованием программы Spades [12]. Сравнение собранного генома с аннотированными последовательностями известных бактериофагов проводили при помощи алгоритма

BLASTN 2.2.29 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Наличие или отсутствие генетических детерминант факторов резистентности, токсинов и интеграз проверяли при помощи созданной нами базы данных и разработанного программного обеспечения PhageAnalyzer, позволяющего проводить быстрый анализ данных полногеномного секвенирования бактериофагов.

Результаты и обсуждение

Выделенный нами из водных объектов окружающей среды при мониторинге холеры бактериофаг Rostov 7 на газоне индикаторной культуры образует прозрачные негативные колонии диаметром 1,0–1,5 мм. *Vibrio phage Rostov 7* активен в отношении *V. cholerae* O1 серогруппы биовара *El Tor*. Специфичность фага Rostov 7 в отношении хозяина подтверждена на большом наборе представителей близкородственных микроорганизмов семейств *Vibrionaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*. Спектр литической активности – 66,3%. Серологические свойства – VII серотип.

По данным электронно-микроскопического исследования холерный бактериофаг Rostov 7 относится по морфологии корпускул к V морфогруппе по классификации Тихоненко А.С. (1968) и типу A семейства *Myoviridae* по классификации Ackermann H.W. (1987) (рис. 1).

Vibrio phage Rostov 7 имеет отросток сложного строения, чехол которого способен к сокращению.

Анализ нуклеотидных последовательностей показал, что размер генома бактериофага Rostov 7 составляет 45903 п.н. с общим количеством ORF 35, также обнаружены гены, характерные для хвостатых фагов. Путем сравнения с имеющимися в NCBI генами обнаружено 28 ORF из рода *Vibrio* и 7 ORF из других родов с установленными функциями.

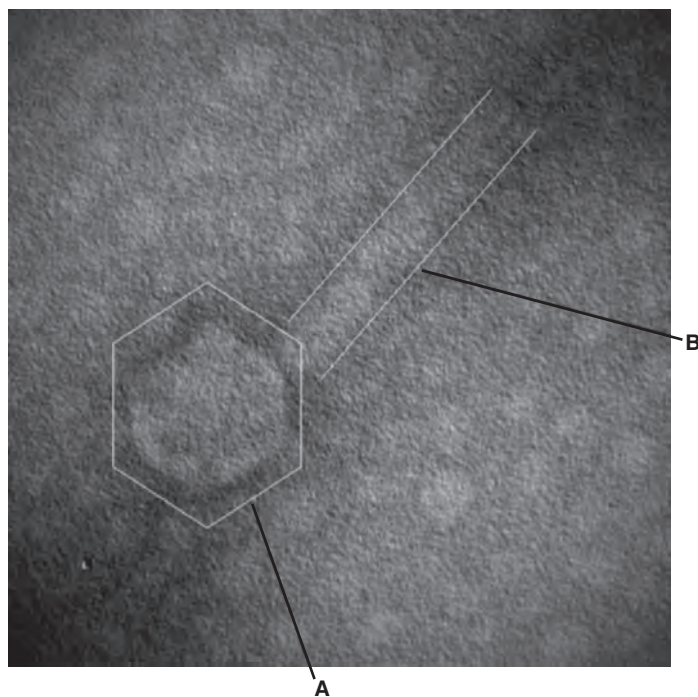


Рис. 1. Морфология холерного бактериофага Rostov 7 (увеличение $\times 150\,000$). А – многогранная головка ($453 \times 510 \text{ \AA}$); В – отросток (1023 \AA).

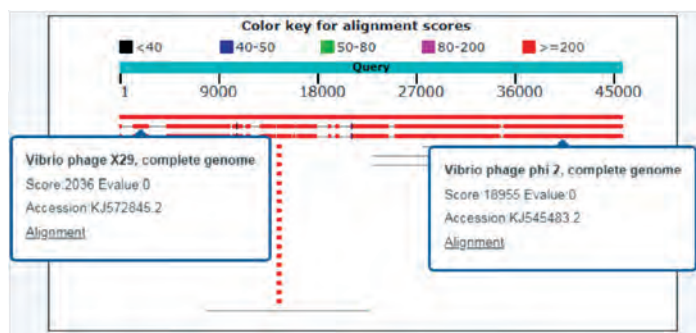


Рис. 2. Выравнивание ORF системой BLASTN.

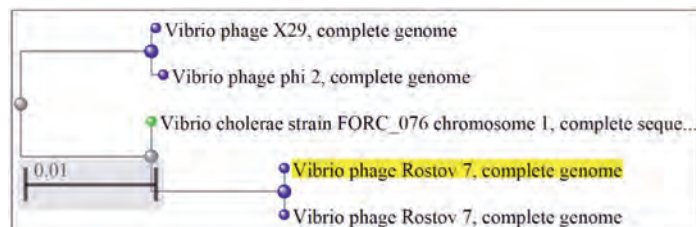


Рис. 3. Дендрограмма для *Vibrio phage Rostov 7*.

Обнаружены гомологичные последовательности в известных бактериальных геномах – гипотетические белки гамма-протеобактерий и профаг *Bacillus subtilis*. Также найдены две интегразы со сходством 96,6% (YP_009043902.1) и 94% (YP_009043892.1). Генетических детерминант факторов резистентности и токсинов не обнаружено.

После анализа данных, предоставленных системой BLASTN, были обнаружены всего лишь два холерных бактериофага, гомологичных Rostov 7, – X29 (KJ572845.2) и phi2 (KJ545483.2) с 83% перекрытием генов и идентичных на 98,15% и 98% соответственно, из группы *Vibrio phage* (рис 2). В сиквенсах найденных холерных фагов, так же как и у Rostov 7, найдены гены интеграз, значит, они являются умеренными.

На рисунке 2 видно, что процент совпадения генома Rostov 7 с фагами, найденными в системе BLASTN, невелик. Из дендрограммы на рисунке 3 понятно, что *Vibrio phage Rostov 7* имеет обособленное положение, поэтому считается уникальным.

Заключение

Для характеристики бактериофагов использования основных биологических методов исследования недостаточно. Полногеномное секвенирование дает более полную информацию о структуре и свойствах фагов, а также оказывается полезным для получения достоверных данных при тонкой внутривидовой дифференциации фагов.

В итоге нашего исследования было установлено, что бактериофаг Rostov 7 имеет обособленное положение и является уникальным. В структуре генома найдены две интегразы, поэтому использование фага в профилактических или лечебных препаратах исключено, так как он является умеренным. В настоящее время бактериофаг активно используется в экспериментальной деятельности лаборатории и для конструирования диагностических препаратов.

Полная геномная последовательность *Vibrio phage Rostov 7* депонирована в международной базе NCBI GenBank под номером MK575466.1.

Литература

- Ильина ТС. Механизмы горизонтального переноса генов: роль бактериофагов и интегров в эволюции патогенных бактерий. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2003;4:3-10.
- Каттер Э, Сулаквелидзе А. Бактериофаги: Биология и практическое применение. Пер. с англ. коллектив переводчиков; науч. ред. А.В.Летаров. М.: Научный мир; 2012, 640 с.
- Шлегель Г. Общая микробиология. Пер. с нем. М., 1987, 142 с.
- Groth AC, Calos MP. Phage Integrases: Biology and Applications. J Mol Biol. 2004 Jan 16;335(3):667-78. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.09.082
- Adams MH. Bacteriophages. New York, N.Y.: Inter science Publishers; 1959, 620 p.
- Габрилович ИМ. Практическое пособие по бактериофагии. Минск, 1968, с. 10.
- Маниатис Т, Фрич Э, Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии: Молекулярное клонирование. Пер. с англ. М., 1984, 458 с.
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology. 1970 Mar;40(3):734-44. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90218-7
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. Bioinformatics. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Song L., Florea L. Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. Genome Biol. 2014;15(11):509. DOI: 10.1186/s13059-014-0509-9
- Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021

References

- Ilyina TS. The mechanism of horizontal gene transfer: the role of bacteriophages and integrons in the evolution of pathogenic bacteria. Molecular Genetics, Microbiology and Virology. 2003;4:3-10. (In Russian).
- Katter E, Sulakvelidze A. Bakteriofagi: biologiya i prakticheskoe primeneniye [Bacteriophages: biology and practical application]. A.V.Letarov (ed). Moscow: "Scientific World" Publ.; 2012, 640 p. (In Russian).
- Shlegel' G. Obshchaya mikrobiologiya [General Microbiology]. Moscow, 1987, 142 p. (In Russian).
- Groth AC, Calos MP. Phage Integrases: Biology and Applications. J Mol Biol. 2004 Jan 16;335(3):667-78. DOI: 10.1016/j.jmb.2003.09.082
- Adams MH. Bacteriophages. New York, N.Y.: Inter science Publishers; 1959, 620 p.
- Gabrilovich IM. Prakticheskoe posobie po bakteriofagii [Practical guide to bacteriophage]. Minsk, 1968, p. 10. (In Russian).
- Maniatis T, Frich E, Sembruk Dzh. Metody geneticheskoi inzhenerii: Molekulyarnoe klonirovanie [Genetic engineering techniques: Molecular cloning]. Moscow, 1984, 458 p. (In Russian).
- Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L, Treiber G. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. Virology. 1970 Mar;40(3):734-44. DOI: 10.1016/0042-6822(70)90218-7
- Andrews S. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data 2010. URL: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>

10. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014 Aug 1;30(15):2114-20. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170
11. Song L., Florea L. Langmead B. Lighter: fast and memory-efficient sequencing error correction without counting. *Genome Biol*. 2014;15(11):509. DOI: 10.1186/s13059-014-0509-9
12. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol*. 2012 May;19(5):455-77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021

Информация об авторах:

Погожова Марина Павловна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Водопьянов Алексей Сергеевич, кандидат медицинских наук, заведующий группой вирусологии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266

Писанов Руслан Вячеславович, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией диагностики особо опасных инфекций ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9113

Романова Людмила Васильевна, доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биохимии микробов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2266

Аноприенко Анна Олеговна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Головин Сергей Николаевич, лаборант группы электронной микроскопии ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 234-2311

Тюрина Анна Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории бактериофагов ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора
Адрес: 344000, Ростов-на-Дону, ул. Максима Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-2857

Information about authors:

Marina P. Pogozhova, junior researcher, laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

Alexey S. Vodopyanov, MD, PhD, head of the virology group, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266

Ruslan V. Pisanov, PhD (Biology), head of laboratory for diagnosis of especially hazardous infections, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-9113

Lyudmila V. Romanova, MD, PhD, DSc, senior researcher of the microbial biochemistry laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2266

Anna O. Anoprienko, junior researcher, laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

Sergey N. Golovin, laboratory assistant, electron microscopy group, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 234-2311

Anna V. Tyurina, junior researcher, laboratory of bacteriophages, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 Maksima Gor'kogo str., Rostov-on-Don, 344000, Russian Federation
Phone: (863) 240-2857

НОВОСТИ НАУКИ

Компания Hologic Inc. получила одобрение Европейского Сообщества на применение Panther Fusion Bordetella. Это набор для ПЦР-анализа в реальном времени для выявления и дифференциации *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis* из образцов мазков из носоглотки, взятых у пациентов с симптомами заболевания. Система позволяет лабораториям обрабатывать до 500 анализов за 8 часов.



Bordetella assay now CE marked Europe [Electronic resource].

URL: <https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/bordetella-assay-now-ce-marked-europe/>

Экспрес-тест на *S. pneumoniae* и *L. pneumophila*

Streptococcus pneumoniae является основной причиной внебольничной пневмонии, а *Legionella pneumophila* является причиной дорогостоящих госпитализаций и интенсивной терапии. Клинически различать две бактерии сложно, и из-за различий в лечении заболеваний руководящие принципы рекомендуют двойное тестирование.

Тест ImmuView Antigen позволяет теперь легко различать оба микроорганизма у пациентов с предполагаемой инфекцией, что позволяет врачам начать правильное лечение антибиотиками. Это единственный быстрый тест, который определяет и *Streptococcus pneumoniae*, и *Legionella pneumophila* в одном тесте. ImmuView очень прост в использовании, не требует специального оборудования и показывает результат всего за несколько минут. На самом деле, всего за 3 простых шага, он определяет, есть ли у пациента двойная инфекция или нет, инфекция пневмонии, инфекция *Legionella* или ничего из этого.

S. pneumoniae and *L. pneumophila* rapid test [Electronic resource].

URL: <https://www.clinlabint.com/detail/clinical-laboratory/s-pneumoniae-and-l-pneumophila-rapid-test/>