

Характеристика генов факторов патогенности и оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus in vitro*

О.А.Цырулина, С.Ю.Темякова, В.В.Евдокимова, Л.П.Алексеева, О.С.Чемисова

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

Vibrio vulnificus – галофильный микроорганизм, вызывающий оппортунистические инфекции, проявляющиеся серьезными поражениями кожи и молниеносной септициемией у людей. Основными факторами патогенности *V. vulnificus* являются порообразующий холестерин-зависимый цитолизин VVH (*V. vulnificus* hemolysin) и высокомолекулярный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin). Молекула MARTX содержит ряд активных доменов, необходимых для проявления биологической активности. Цель данной работы – провести генетическое скрининговое тестирование детерминант патогенного потенциала штаммов *V. vulnificus* и оценить их цитотоксичность на модели перевиваемых клеточных линий. Анализ результатов полногеномного секвенирования показал, что все штаммы обладали генами *vvhA* и *rtxA1*, однако отличались по содержанию варибельных эффекторных доменов. Показано, что оптимальной моделью для оценки цитотоксической активности штаммов *V. vulnificus in vitro* является культура клеток HeLa (клетки карциномы шейки матки человека). Установлено, что отсутствие одного из эффекторных доменов может снизить цитотоксичность *V. vulnificus*. При этом только при наличии доменов RRSP (специфической эндопептидазы) и RID (инактивирующий гуанозинтрифосфатазу) у исследуемых штаммов наблюдался необратимый цитотоксический эффект на культуре клеток, что, вероятно, свидетельствует об их ключевой роли в реализации биологической активности.

Ключевые слова: *Vibrio vulnificus*, факторы вирулентности, цитолизин, MARTX, культура клеток, эффекторные домены

Для цитирования: Цырулина О.А., Темякова С.Ю., Евдокимова В.В., Алексеева Л.П., Чемисова О.С. Характеристика генов факторов патогенности и оценка цитотоксической активности штаммов *Vibrio vulnificus in vitro*. Бактериология. 2024; 9(3): 70–76. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-70-76

Characterization of genes of pathogenicity factors and assessment of cytotoxic activity of *Vibrio vulnificus in vitro*

O.A.Tsyurulina, S.Yu.Temyakova, V.V.Evdokimova, L.P.Alekseeva, O.S.Chemisova

Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор, Rostov-on-Don, Russian Federation

Vibrio vulnificus is a halophilic microorganism that causes opportunistic infections resulting in severe skin lesions and fulminant septicemia in humans. The main pathogenicity factors of *V. vulnificus* are the pore-forming cholesterol-dependent cytolysin VVH (*V. vulnificus* hemolysin) and the high molecular weight cytotoxin MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin). The MARTX molecule contains a number of active domains necessary for the manifestation of biological activity. The purpose of this work is to conduct genetic screening testing of the determinants of the pathogenic potential of *V. vulnificus* strains and evaluate their cytotoxicity using a model of continuous cell lines. Analysis of the results of whole-genome sequencing showed that all strains possessed the *vvhA* and *rtxA1* genes, however, they differed in the content of variable effector domains. It has been shown that the optimal model for assessing the cytotoxic activity of *V. vulnificus* strains in vitro is the HeLa cell culture (human cervical carcinoma cells). It has been established that the absence of one of the effector domains can reduce the cytotoxicity of *V. vulnificus*. Moreover, only in the presence of the RRSP (specific endopeptidase) and RID (guanosine triphosphatase inactivating) domains, the studied strains had an irreversible cytotoxic effect on cell culture, which probably indicates their key role in the implementation of biological activity.

Key words: *Vibrio vulnificus*, virulence factors, cytolysin, MARTX, cell culture, effector domains

For citation: Tsyurulina O.A., Temyakova S.Yu., Evdokimova V.V., Alekseeva L.P., Chemisova O.S. Characterization of genes of pathogenicity factors and assessment of cytotoxic activity of *Vibrio vulnificus in vitro*. Bacteriology. 2024; 9(3): 70–76. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-3-70-76

Для корреспонденции:

Цырулина Оксана Алексеевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Адрес: 344002, Ростов-на-Дону, ул. М. Горького, 117/40
Телефон: (863) 240-9122

Статья поступила 20.03.2024, принята к печати 30.09.2024

For correspondence:

Oksana A. Tsyurulina, PhD in Biological Sciences, Senior researcher of the laboratory «Collection of pathogenic microorganisms», Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзор
Address: 117/40 M. Gorky str., Rostov-on-Don, 344002, Russian Federation
Phone: (863) 240-9122

The article was received 20.03.2024, accepted for publication 30.09.2024

V*ibrio vulnificus* является грамотрицательным условно-патогенным галофильным микроорганизмом, который широко распространен в морской среде по всему миру. Этот патоген способен вызывать острый гастроэнтерит, некротизирующие раневые инфекции и опасную для жизни септицемию, особенно у восприимчивых людей с ослабленным иммунитетом, при этом смертность составляет >50% [1]. Случаи инфицирования людей *V. vulnificus* могут возникнуть в результате употребления в пищу зараженных морепродуктов (обычно моллюсков, таких как устрицы) или при контакте морской загрязненной воды с открытыми ранами или поврежденной кожей [2]. *V. vulnificus* встречается в прибрежных или эстуарийных средах с температурой воды от 9 до 31°C. Об инфицировании *V. vulnificus* сообщается по всему миру, причем часто регистрируются случаи в Соединенных Штатах Америки, Европе и Корее [3].

В России эти вибрионы выделяют из проб морской воды на Черноморском побережье: в городах Новороссийск, Сочи, Ялта (Республика Крым), в Таганрогском заливе Азовского моря, а также из проб балластных вод судов, прибывающих в международные порты Ростова, Таганрога и Азова из-за рубежа [4–6].

Проведенный ранее анализ литературы показал, что патогенность *V. vulnificus* обусловлена многими факторами, так как этот возбудитель экспрессирует множество клеточ-

но-ассоциированных и секретируемых факторов, которые потенциально способствуют патогенности. Однако наибольший вклад в развитие инфекции, обусловленной *V. vulnificus*, вносят порообразующий холестерин-зависимый цитолизин VVH (*V. vulnificus* hemolysin) и высокомолекулярный цитотоксин MARTX (multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin), под воздействием которых может происходить накопление жидкости в просвете кишечника, приводящее к диарее, частичному параличу и некрозу тканей в тонком кишечнике с последующей диссеминацией в кровоток и другие ткани [7]. Многими авторами было показано, что именно токсин MARTX, который на 80–90% гомологичен RtxA *V. cholerae* [8], играет важную роль в проявлении цитотоксичности *V. vulnificus* по отношению к эукариотическим клеткам, нарушая барьерные свойства мембраны клетки-хозяина, вызывая округление клеток и их гибель [9, 10]. MARTX содержит ряд активных доменов, необходимых для проявления биологической активности. Это домен CPD (цистеиновой протеазы) и эффекторный домен АВН (α/β -гидролазы), RID (инактивирующий ГТФазу), MCF (аутопротеолитической цистеиновой протеазы), DUF (домен неизвестной функции) и RRRSP (специфической эндопептидазы) [11]. Эффекторы токсина MARTX обычно действуют, нарушая один из 3 ключевых клеточных процессов: динамику цитоскелета, передачу сигналов GTPase или везикулярный транспорт. Ранее

Таблица 1. Характеристика штаммов *V. vulnificus*, взятых в исследование
 Table 1. Characteristics of *V. vulnificus* strains taken into the study

п/п №	Номер штамма / Strain number	Дата выделения / Isolation date	Источник выделения / Source of isolation	Место выделения / Place of isolation
1	13344	нет данных / no data	человек / man	США / USA
2	14100	1989	морская вода / sea water	г. Новороссийск / Novorossiysk
3	15828	1988	рыба / fish	г. Паланга, Литва / Palanga, Lithuania
4	15832	1991	человек / man	г. Бердянск, Украина / Berdyansk, Ukraine
5	15885	нет данных / no data	человек / man	Швеция / Sweden
6	19720	2014	балластная вода / ballast water	порт Таганрог, с. Сайда / Taganrog port, Saida village
7	20616	2020	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
8	20617	2020	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
9	21001	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
10	21002	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
11	21004	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
12	21005	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
13	21007	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
14	21009	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
15	21012	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
16	21013	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
17	21015	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
18	21017	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
19	21019	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
20	21021	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
21	21023	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
22	21024	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
23	21030	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay
24	21032	2022	морская вода / sea water	Таганрогский залив / Taganrog Bay

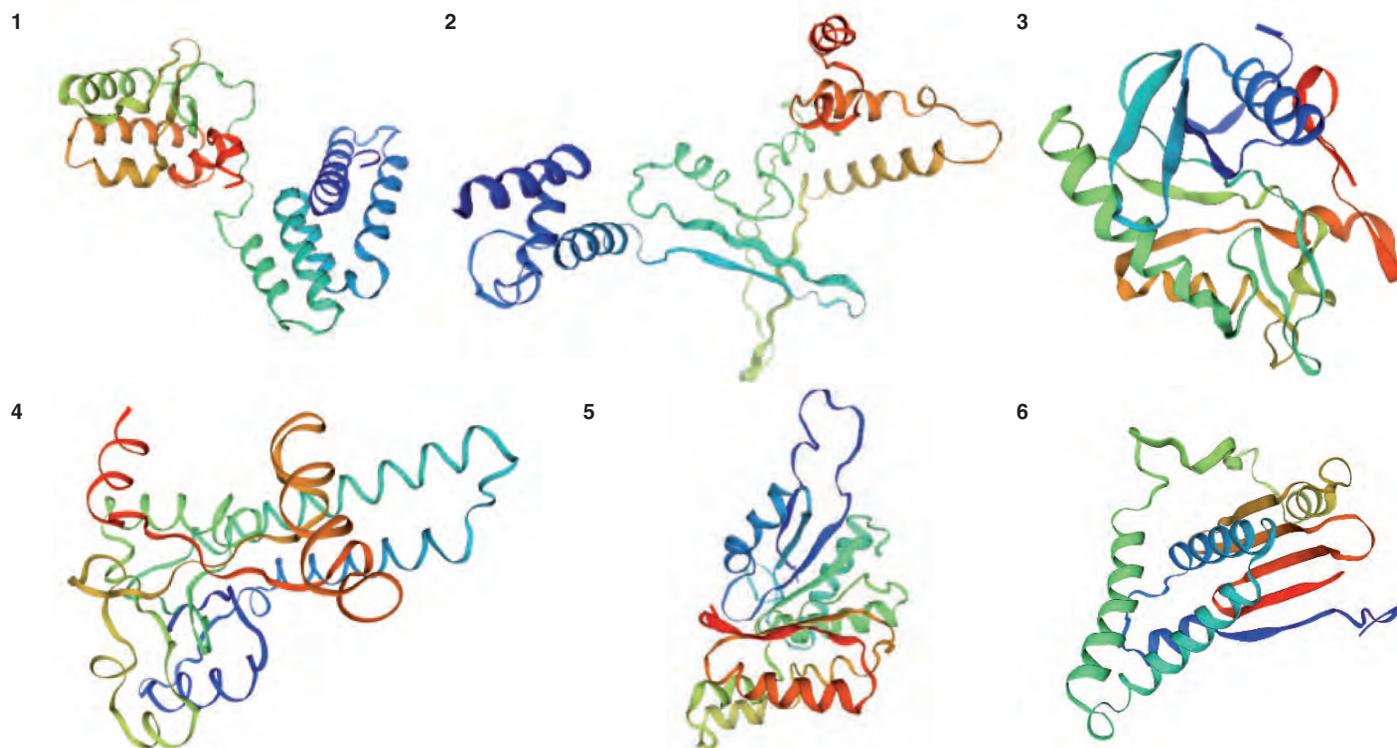


Рис. 1. 3D-структура доменов цитотоксина MARTX штамма *V. vulnificus* 21007.

- 1 – домен RRSP (специфической эндопептидазы)
- 2 – домен RID (инактивирующий ГТФазу)
- 3 – домен CPD (цистеиновой протеазы)
- 4 – домен DUF (домен неизвестной функции)
- 5 – домены ABH (α/β -гидролазы)
- 6 – MCF (аутопротеолитической цистеиновой протеазы)

Fig. 1. 3D structure of the MARTX cytotoxin domains of the *V. vulnificus* 21007 strain.

- 1 – RRSP (specific endopeptidase domain)
- 2 – RID (GTPase inactivating) domain
- 3 – CPD (cysteine protease) domain
- 4 – DUF (domain of unknown function) domain
- 5 – ABH (alpha-beta hydrolase) domains
- 6 – MCF (autoproteolytic cysteine protease)

установлено, что удаление любого из доменов может снизить эффективность цитотоксина и вирулентность *V. vulnificus* [12]. Известно, что эффекторные домены токсинов MARTX различаются не только у разных видов бактерий, но и у разных штаммов одного и того же вида. Более того, даже небольшие различия в аминокислотной последовательности и пространственном строении токсинов определяют различие в спектре их биологической активности [13].

Общепринятой моделью для изучения биологической активности бактериальных токсинов является культура клеток позвоночных, которая по чувствительности сопоставима с разрешающей способностью биопробы [14, 15].

В связи с вышеизложенным цель данной работы – провести генетическое скрининговое тестирование детерминант патогенного потенциала штаммов *V. vulnificus* и оценить их цитотоксичность на модели перевиваемых клеточных линий.

Материалы и методы

В работе были использованы 24 штамма *V. vulnificus*, выделенные в период 1989–2022 гг. из различных мест и источников (табл. 1).

Для сравнительного изучения биологической активности *V. vulnificus* в качестве моделей использовали паспортизированные перевиваемые клеточные линии L929 (фибробласты мыши) и HeLa (клетки эпителиоидной карциномы шейки

матки человека), полученные из Российской коллекции клеточных культур позвоночных Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург) и хранящиеся в криобанке ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора.

Монослойные клеточные культуры предварительно пассировали в ростовой среде (RPMI-1640 с 10% сыворотки плода коровы и 2 мМ глутамина). Общепринятыми методами проводили процедуру снятия клеток с помощью растворов версена и трипсина и готовили клеточную суспензию. Клетки высевали в 96-луночные планшеты в такой плотности, чтобы культура не достигла слияния в монослой (не более 5000 клеток/лунку). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C (5% CO₂, влажность не менее 70%) в течении 18 ч. Все манипуляции с клетками проводили в ламинарно-поточковом шкафу с принудительной подачей стерильного воздуха [16, 17].

Для культивирования *V. vulnificus* использовали агар Мартена с добавлением натрия хлорида до 1,5%. В дальнейшую работу брали только чистые культуры или изолированные колонии микроорганизмов.

С целью элиминации токсического действия питательных бактериологических сред суточные агаровые культуры штаммов *V. vulnificus* засеивали в пробирку с 3 мл среды RPMI-1640 и инкубировали при 37°C в течении 24 ч в стационарных условиях. В дальнейшую работу по оценке действия токсина брали бесклеточные супернатанты. Для этого

Таблица 2. Оценка цитотоксической активности штаммов *V. vulnificus* на культуре клеток HeLa
 Table 2. Evaluation of cytotoxic activity of *V. vulnificus* strains on HeLa cell culture

п/п №	№ штамма / Strain No.	Гены / Genes								Результат действия токсина / The result of the action of the toxin		Итоговый результат / Final result
		vvhA	rtxA1	Домены гена / Gene domains rtxA1						24 ч	48 ч	
				MCF	ABH	CPD	DUF	RID	RRSP			
1	13344	+	+	+	+	+	+	+	-	1/100	1/10	обратимое / reversible
2	14100	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	1/2	необратимое / irreversible
3	15828	+	+	+	+	+	+	+	-	1/10	1/2	обратимое / reversible
4	15832	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
5	15885	+	+	+	+	+	+	+	-	1/2	-	обратимое / reversible
6	19720	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
7	20616	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
8	20617	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
9	21001	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
10	21002	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
11	21004	+	+	+	+	+	-	-	+	1/2	-	обратимое / reversible
12	21005	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
13	21007	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
14	21009	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
15	21012	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
16	21013	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-
17	21015	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
18	21017	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
19	21019	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-
20	21021	+	+	+	+	+	+	+	+	1/100	1/100	необратимое / irreversible
21	21023	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
22	21024	+	+	+	+	+	+	+	+	1/2	1/2	необратимое / irreversible
23	21030	+	+	+	+	+	+	+	+	1/10	1/10	необратимое / irreversible
24	21032	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
25	RPMI-1640									-	-	-
26	RPMI-1640 + 1% сыв-ка / serum									-	-	-

«1/2-1/100» – разведение, в котором наблюдался цитотоксический эффект;
 «-» – отрицательный результат (отсутствие признака).
 “1/2-1/100” – dilution in which cytotoxic effect was observed;
 “-” – negative result (absence of sign).

суточные бульонные культуры центрифугировали при 8000 об./мин в течении 40 мин. В связи с нестабильностью токсинов контроль специфической стерильности не проводили и с супернатантами работали как с патогенными биологическими агентами (ПБА), т.е. работу проводили с необеззараженными образцами¹.

Для оценки цитотоксической активности вибрионов исследуемые пробы титровали в 96-луночном планшете в объеме 0,05 мл RPMI-1640 с 1% сыворотки крупного рогатого скота и вносили в лунки с клетками эукариот.

Предварительно из лунок с подготовленной культурой клеток отбирали среду и вносили образец в определенном разведении с соблюдением принципов стерильности. Планшеты помещали в CO₂-инкубатор и выдерживали в течение 24–48 ч при 37°C, 90%-й влажности и 5% CO₂.

¹ СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней.

Морфологические и деструктивные изменения клеток-мишеней оценивали *ad oculum* через 24 ч в инвертированном микроскопе. Поскольку действие токсина обратимо, через 48 ч проводили повторный учет результатов. Биологическую активность токсинсодержащих образцов испытуемых штаммов на культуре клеток оценивали по четырехкестной системе [18].

Полногеномное секвенирование взятых в работу штаммов было проведено на платформе Illumina MiSeq. Поиск наличия генов осуществлялся с помощью программы Fragment Extractor (<http://antiplague.ru/fragment-extractor/>). В качестве референсных генов доменов MARTX были использованы нуклеотидные последовательности штамма *V. vulnificus* CICESE-368 из базы данных NCBI.

3D-моделирование структуры токсина штамма *V. vulnificus* осуществляли с использованием web-ресурса SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>).

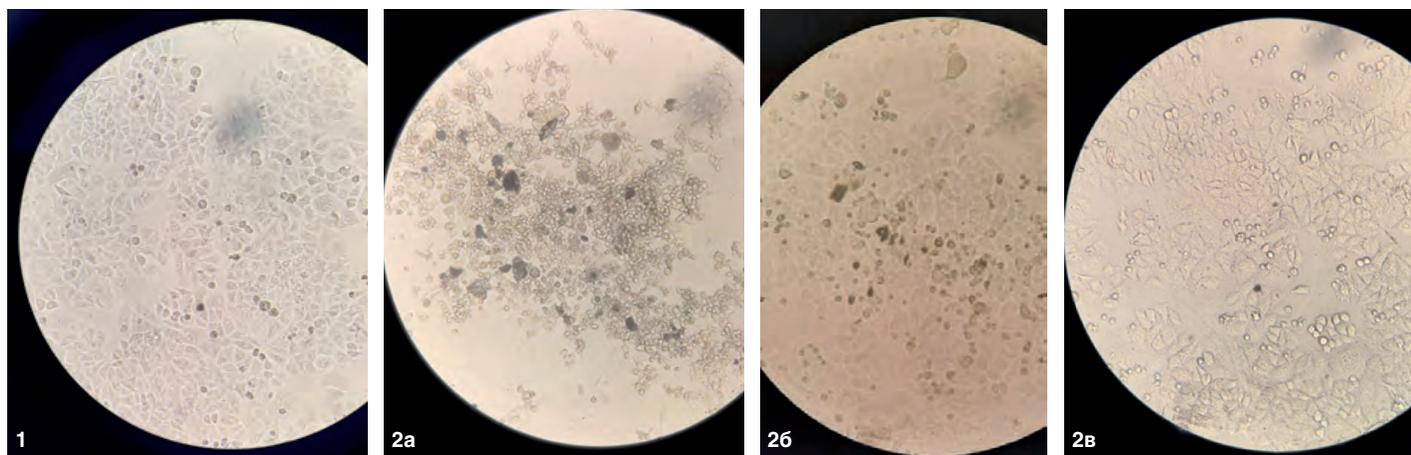


Рис. 2. Цитотоксическое действие штамма *V. vulnificus* №13344 на культуру клеток HeLa. Фазово-контрастная микроскопия (увеличение 4×60).

1 – контроль жизнеспособности клеток в среде культивирования;
2 – воздействие на клетки (округление клеток и гибель):
а) разведение 1/2 – на ++++;
б) разведение 1/10 – на +++;
в) разведение 1/100 – на +.

Fig. 2. Cytotoxic effect of *V. vulnificus* strain 13344 on HeLa cell culture. Phase-contrast microscopy (magnification 4×60).

1 – control of cell viability in the culture medium;
2 – effect on cells (cell rounding and death):
а) dilution 1/2 – by ++++;
б) dilution 1/10 – by +++;
в) dilution 1/100 – by +.

Результаты исследования и их обсуждение

На первом этапе исследования было проведено полногеномное секвенирование штаммов *V. vulnificus*. На основании анализа генов факторов патогенности было установлено наличие гена, кодирующего белок гемолизина/цитоллизина (*vvhA*), у всех взятых в работу штаммов. Ген *rtxA1*, кодирующий основной цитотоксин MARTX *V. vulnificus*, ответственный за цитотоксические и цитопатические изменения клеток, включая некроз и апоптоз во время инфекции [19], также присутствовал у всех штаммов. С помощью веб-ресурса SWISS-MODEL было произведено моделирование пространственной структуры доменов цитотоксина MARTX исследуемых штаммов. На рис. 1 продемонстрирована 3D-структура данных доменов на примере штамма *V. vulnificus* 21007.

Необходимо отметить различия по содержанию вариабельных эффекторных доменов у взятых в работу штаммов (табл. 2). Домен цистеинпротеазы (CPD), который ответственен за расщепление молекулы токсина при переходе доменов с токсическим действием в цитоплазму клеток-хозяев и домен α/β -гидролазы (ABH), специфически связанный с ингибированием фагоцитоза, аутофагии и транспорта эндоцитов, имели все взятые в работу штаммы. Домен аутопротеолитической цистеиновой протеазы (MCF), как принято считать, ассоциированный с индукцией апоптоза [11], отсутствовал только у одного штамма *V. vulnificus* 21005. Домены RID (инактивирующий ГТФазу), DUF (домен неизвестной функции) и RRSP (специфической эндопептидазы) присутствовали у испытуемых штаммов в разных сочетаниях.

Для определения цитотоксической активности исследуемых изолятов *V. vulnificus* использовали культуры клеток L-929 (фибробласты мышей) и HeLa (клетки карциномы шейки матки человека). Эксперименты на каждой из клеточных линий показали, что клетки HeLa отличались большей

чувствительностью к действию токсинсодержащих образцов штаммов *V. vulnificus*, поэтому они и были использованы в дальнейшей работе. Просмотр клеток HeLa в микроскопе после инкубации с опытными пробами *V. vulnificus* позволил выявить изменение их морфологии в виде набухания, округления, утончения или полного разрушения клеток. В то же время клетки HeLa в контроле были представлены типичным монослоем на всем протяжении эксперимента. Результаты изучения биологической активности изолятов *V. vulnificus* на культуре клеток HeLa в зависимости от наличия основных факторов патогенности отражены в табл. 2.

Данные, представленные в табл. 2, демонстрируют, что штаммы в зависимости от содержания тех или иных доменов токсина MARTX проявляли различную степень цитотоксичности и цитопатогенности в отношении монослойной клеточной линии HeLa. Штаммы, которые содержали весь комплекс доменов токсина MARTX, проявляли выраженный необратимый цитотоксический эффект через 24 и 48 ч во всех разведениях, начиная от 1/2 до 1/100 (рис. 2).

Стоит отметить также, что штаммы *V. vulnificus* №№ 13344, 15828, 15885, у которых отсутствовал только домен специфической эндопептидазы (RRSP), и № 21004, без доменов DUF (неизвестной функции) и RID (инактивирующий ГТФазу), проявляли цитотоксический эффект, однако его действие было обратимо через 48 ч. У штаммов *V. vulnificus* №№ 19720, 21023 и 21032, которые не имели в составе токсина MARTX только домена специфической эндопептидазы, морфологических и деструктивных изменений клеток-мишени зарегистрировано не было. Таким образом, выявлена закономерность между наличием доменов RRSP и RID в составе токсина и проявлением биологической активности. При отсутствии одного из этих доменов цитотоксическое действие штаммов *V. vulnificus* на культуру клеток снижалось или имело обратимый эффект. Это может свидетельствовать о важной роли упомянутых доменов в проявлении цитотоксической активности *V. vulnificus*.

Заключение

В результате сравнительного изучения свойств коллекционных перевиваемых клеточных линий животных L929 (мышинных фибробластов) и человека HeLa (клетки карциномы шейки матки человека) установлено, что наиболее эффективной моделью для оценки цитотоксичности штаммов *V. vulnificus in vitro* является монослойная клеточная линия HeLa. Клетки этой линии обладали относительно высокой чувствительностью в отношении токсинсодержащих штаммов, что позволяет рекомендовать ее в качестве модели для оценки цитотоксической активности возбудителя *V. vulnificus*.

Скрининг штаммов *V. vulnificus* на перевиваемой клеточной линии HeLa показал, что штаммы, несущие гены *vvhA*, *rtxA1* и имеющие все шесть доменов токсина MARTX, обладали необратимым цитотоксическим эффектом, который регистрировалась через 24 и 48 ч после контакта с клетками-мишенями.

По содержанию эффекторных доменов исследуемые изоляты *V. vulnificus* отличались. Отсутствие любого из доменов, особенно RRSP или RID, сопровождалось уменьшением активности токсина MARTX, и, как следствие, снижалось цитотоксическое действие *V. vulnificus* на культуру клеток.

Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

Financial support

No financial support has been provided for this work.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

Литература

1. D'Souza C, Prithvisagar KS, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I, Kumar BK. Exploring the Pathogenic Potential of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seafood Harvested along the Mangaluru Coast, India. *Microorganisms*. 2020 Jul 4;8(7):999. DOI: 10.3390/microorganisms8070999
2. Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis*. 2011 Mar;15(3):e157-66. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.11.003
3. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog*. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
4. Смоликова ЛМ, Ломов ЮМ, Хоменко ТВ, Мурначев ГП, Кудрякова ТА, Фецайлова ОП, и др. Галофильные вибрионы, обусловившие вспышку пищевой токсикоинфекции в г. Владивостоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2001;6:3-7.
5. Гальцева ГВ, Зайденов АМ, Брудный РА, Левкович АА, Нагорный СИ. Вибриофлора водных объектов рекреационных зон черноморского побережья и ее роль в патологии человека. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 1994;6:48-50.
6. Чемисова ОС, Рыковская ОА, Даликова РР, Непомнящая НБ, Чайка ИА, Водяницкая СЮ, и др. Характеристика штаммов *Vibrio parahaemolyticus* и других галофильных вибрионов, выделенных из балластных вод судов, прибывающих в международные порты Ростовской области. *Здоровье населения и среда обитания*. 2014;7(256):42-45.

7. Цырулина ОА, Чемисова ОС, Носков АК. Факторы патогенности *Vibrio vulnificus*. *Обзор. Здоровье населения и среда обитания*. 2022;6:59-65. DOI:10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65
8. Kim YR, Lee SE, Kang IC, Nam KI, Choy HE, Rhee JH. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium-mediated mitochondrial dysfunction. *J Infect Dis*. 2013 May 1;207(9):1406-15. DOI: 10.1093/infdis/jis746
9. Lee BC, Choi SH, Kim TS. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. *Microbes Infect*. 2008 Nov-Dec;10(14-15):1504-13. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.09.006
10. Kim YR, Lee SE, Kook H, Yeom JA, Na HS, Kim SY, et al. *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. *Cell Microbiol*. 2008 Apr;10(4):848-62. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01088.x
11. Gavin HE, Beubier NT, Satchell KJ. The Effector Domain Region of the *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. *PLoS Pathog*. 2017 Jan 6;13(1):e1006119. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006119
12. Gavin HE, Satchell KJF. RRSP and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. *J Infect Dis*. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
13. Satchell KJF. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of Vibrios. *Microbiol Spectr*. 2015 Jun;3(3):10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014
14. Walum E, Ekwall B. Cell toxicology a new paradigm. *Alternatives to Laboratory Animals*. 2000;28:159.
15. Пименова ЕВ, Храпова НП. Изучение потенциальной токсичности антигенов *Burkholderia pseudomallei* на модели перевиваемых клеточных культур. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2015;7:247-250.
16. Блажевич ОВ. Культивирование клеток: Курс лекций. Мн.: БГУ, 2004.
17. Тартаковский АД. Питательные среды для культивирования клеток млекопитающих. *Методы культивирования клеток*. Л.: Наука, 1988;44-63.
18. Фрешни Р. *Культура животных клеток: практическое руководство*. 5-е изд. М.: Бином. Лаборатория знаний, 2010.
19. Kim BS, Gavin HE, Satchell KJ. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin. *mBio*. 2015;6(2): e00324-15. DOI: 10.1128/mBio.00324-15

References

1. D'Souza C, Prithvisagar KS, Deekshit VK, Karunasagar I, Karunasagar I, Kumar BK. Exploring the Pathogenic Potential of *Vibrio vulnificus* Isolated from Seafood Harvested along the Mangaluru Coast, India. *Microorganisms*. 2020 Jul 4;8(7):999. DOI: 10.3390/microorganisms8070999
2. Horseman MA, Surani S. A comprehensive review of *Vibrio vulnificus*: an important cause of severe sepsis and skin and soft-tissue infection. *Int J Infect Dis*. 2011 Mar;15(3):e157-66. DOI: 10.1016/j.ijid.2010.11.003
3. Duong-Nu TM, Jeong K, Hong SH, Puth S, Kim SY, Tan W, et al. A stealth adhesion factor contributes to *Vibrio vulnificus* pathogenicity: Flp pili play roles in host invasion, survival in the blood stream and resistance to complement activation. *PLoS Pathog*. 2019 Aug 22;15(8):e1007767. DOI: 10.1371/journal.ppat.1007767
4. Smolikova LM, Lomov IM, Khomenko TV, Murnachev GP, Kudriakova TA, Fetсайлова OP, et al. Studies on halophilic vibrios causing a food poisoning outbreak in the city of Vladivostok. *Journal of Microbiology Epidemiology Immunobiology*. 2001;6:3-7. (In Russian).
5. Gal'tseva GV, Zaidenov AM, Brudnyĭ RA, Levkovich AA, Nagornyyĭ SI. The *Vibrio* flora of the bodies of water in the recreational areas along the Black Sea shore and

- its role in human pathology. Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol. 1994 Nov-Dec;(6):48-50. (In Russian).
6. Chemisova OS, Rykovskaya OA, Dalikova RR, Nepomnjashhaja NB, Chajka IA, Vodjanickaja SJu, et al. Characterization of *Vibrio* human pathogens isolated from ballast waters of ships arriving to rostov region international ports. Public Health and Life Environment. 2014;7(256):42-45. (In Russian).
 7. Tsyurulina OA, Chemisova OS, Noskov AK. Pathogenicity factors of *Vibrio vulnificus*: a review. Public Health and Life Environment. 2022;6:59-65. DOI: 10.35627/2219-5238/2022-30-6-59-65 (In Russian).
 8. Kim YR, Lee SE, Kang IC, Nam KI, Choy HE, Rhee JH. A bacterial RTX toxin causes programmed necrotic cell death through calcium-mediated mitochondrial dysfunction. J Infect Dis. 2013 May 1;207(9):1406-15. DOI: 10.1093/infdis/jis746
 9. Lee BC, Choi SH, Kim TS. *Vibrio vulnificus* RTX toxin plays an important role in the apoptotic death of human intestinal epithelial cells exposed to *Vibrio vulnificus*. Microbes Infect. 2008 Nov-Dec;10(14-15):1504-13. DOI: 10.1016/j.micinf.2008.09.006
 10. Kim YR, Lee SE, Kook H, Yeom JA, Na HS, Kim SY, et al. *Vibrio vulnificus* RTX toxin kills host cells only after contact of the bacteria with host cells. Cell Microbiol. 2008 Apr;10(4):848-62. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01088.x
 11. Gavin HE, Beubier NT, Satchell KJ. The Effector Domain Region of the *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin Confers Biphasic Epithelial Barrier Disruption and Is Essential for Systemic Spread from the Intestine. PLoS Pathog. 2017 Jan 6;13(1):e1006119. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006119
 12. Gavin HE, Satchell KJF. RRSP and RID Effector Domains Dominate the Virulence Impact of *Vibrio vulnificus* MARTX Toxin. J Infect Dis. 2019 Feb 23;219(6):889-897. DOI: 10.1093/infdis/jiy590
 13. Satchell KJF. Multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) Toxins of *Vibrios*. Microbiol Spectr. 2015 Jun;3(3):10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.VE-0002-2014
 14. Walum E, Ekwall B. Cell toxicology a new paradigm. Alternatives to Laboratory Animals. 2000;28:159.
 15. Pimenova EV, Khrapova NP. Study of potential cytotoxicity of antigens complex *Burkholderia pseudomallei* on model of continuous cell cultures. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2015;7:247-250. (In Russian).
 16. Blazhevich OV. Cell cultivation: A course of lectures. Mn.: BSU, 2004. (In Russian).
 17. Tartakovskij AD. Nutrient media for the cultivation of mammalian cells. Methods of cell cultivation. L.: Nauka, 1988;44-63. (In Russian).
 18. Freshni R. Animal cell culture: a practical guide. 5th ed. Moscow: Binom. Laboratory of Knowledge, 2010. (In Russian).
 19. Kim BS, Gavin HE, Satchell KJ. Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin. mBio. 2015;6(2): e00324-15. DOI: 10.1128/mBio.00324-15

Информация о соавторах:

Темякова Светлана Юрьевна, младший научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Евдокимова Вероника Вячеславовна, кандидат биологических наук, научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Алексеева Людмила Павловна, профессор, доктор биологических наук, главный научный сотрудник ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Чемисова Ольга Сергеевна, кандидат биологических наук, и.о. зав. лаборатории ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Svetlana Yu. Temyakova, Junior Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Veronika V. Evdokimova, PhD in Biological Sciences, Researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Lyudmila P. Alekseeva, PhD, DSc (Biological Sciences), Professor, Chief researcher, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

Ol'ga S. Chemisova, PhD in Biological Sciences, acting Head of the laboratory, Rostov-on-Don Antiplague Scientific Research Institute of Rosпотребнадзора

НОВОСТИ НАУКИ

Эффективное редактирование генома

Инфекция мочевыводящих путей (ИМП) является одной из наиболее распространенных бактериальных инфекций в мире. Основным возбудителем ИМП является уropатогенная *Escherichia coli* (UPEC). Существует настоятельная необходимость в новых стратегиях профилактики и лечения ИМП из-за растущей частоты возникновения резистентности к антимикробным препаратам среди уropатогенов. ABU 83972, бессимптомный штамм *E. coli*, вызывающий бактериурию, предотвращает ИМП, подавляя колонизацию UPEC. Однако природа конкуренции и подавления роста UPEC ABU 83972 неясна и является предметом этого исследования. Охарактеризована кинетика роста ABU 83972 и уropатогенов в моче человека и лабораторных средах. Затем была проведена серия экспериментов по конкурентному совместному культивированию, в которых ABU 83972 и уropатогены были инокулированы в соотношении 1 : 1 в моче человека и в различные среды, и было определено их относительное содержание. В моче человека ABU 83972 превзошел UPEC и дополнительные уropатогены, достигнув 90% от общей популяции после 24 часов инкубации. Напротив, UPEC превзошел ABU 83972 в минимальных средах LB и M9 и продемонстрировал лучшую колонизацию, чем ABU 83972 в мочевом пузыре мышей. Поскольку сконструированные живые материалы (ELM) могут использоваться для удержания интересующего организма в определенном месте, были разработаны ELM, содержащие ABU 83972, которые эффективно превзошли UPEC в моче человека. Эта работа устанавливает, что ABU 83972 превзойдет UPEC в зависимости от среды и плотности клеток, что подчеркивает важность метаболитов и питательных веществ, обнаруженных в моче человека, как детерминант конкурентной приспособленности ABU 83972.

George I, Kalairaj MS, Zimmern PE, Ware TH, Subashchandrabose S.
Competitive fitness of asymptomatic bacteriuria *E. coli* strain 83972 against uropathogens in human urine.
Infect Immun. 2024 Jun 11;92(6):e0017324. DOI: 10.1128/iai.00173-24