

## ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ И ГЕНОТИПИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОБИОТИЧЕСКОГО ШТАММА *E. COLI* M-17

Белова И.В.<sup>1</sup>, Точилина А.Г.<sup>1</sup>, Соловьева И.В.<sup>1</sup>, Горлова И.С.<sup>2</sup>, Ефимов Е.И.<sup>1</sup>,  
Жирнов В.А.<sup>1</sup>, Иванова Т.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, e-mail: lab-lb@yandex.ru;

<sup>2</sup>Федеральное государственное унитарное предприятие «Научно-производственное объединение «Микроген» Минздрава России, Нижний Новгород, e-mail: gorlova@imbio.ru

В статье представлены данные по углубленному изучению свойств производственного пробиотического штамма *Escherichia coli* M-17. Работа проводилась с использованием спектра современных методов: биохимических тест-систем, MALDI TOF масс-спектрометрии и полногеномного секвенирования. Получен биохимический профиль, проведено прямое белковое профилирование штамма, установлены характерные для него масс-пики белков. С помощью полногеномного секвенирования установлены структурные особенности генома штамма, показано, что он не обладает антибиотикорезистентностью трансмиссивного типа, не содержит в геноме детерминант патогенности, вирулентности, интегрированных плазмид и мобильных элементов. С использованием данных полногеномного секвенирования подтвержден серотип штамма - O2:H6 и впервые установлен его сиквенс-тип (ST-141). Установлены индивидуальные особенности штамма *E. coli* M-17, доказано, что он соответствует требованиям, предъявляемым к производственным пробиотическим штаммам.

Ключевые слова: *Escherichia coli*, штаммы-продуценты, иммунобиологические препараты.

## PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERISTICS OF *E. COLI* M-17 THE PROBIOTIC STRAIN

Belova I.V.<sup>1</sup>, Tochilina A.G.<sup>1</sup>, Soloveva I.V.<sup>1</sup>, Gorlova I.S.<sup>2</sup>, Efimov E.I.<sup>1</sup>,  
Zhirnov V.A.<sup>1</sup>, Ivanova T.P.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Budget Institution of Science «Nizhny Novgorod Scientific and Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after academician I.N. Blochina» Of Federal Service on Surveillance for Consumer Rights Protection and Human Welfare, Nizhny Novgorod, e-mail: lab-lb@yandex.ru;

<sup>2</sup>Federal State Scientific-Industrial Company MICROGEN, Nizhny Novgorod, e-mail: gorlova@imbio.ru

The article presents data on the in-depth study of properties of *Escherichia Coli* M-17 production probiotic strain. The work was carried out using a range of modern methods, such as biochemical test systems, MALDI TOF mass spectrometry and full genome sequencing, which allowed to obtain a biochemical profile, implement a direct protein profiling of the strain and establish protein mass peaks typical for it. The full genome sequencing helped to establish structural features of the strain genome. It has been testified that the microorganism does not have a transmissible antibiotic resistance, and the genome does not contain determinants of pathogenicity, virulence, integrated plasmids or mobile elements. The full genome sequencing data helped to confirm -O2: H6 strain serotype and to establish (for the first time ever) its sequence-type (ST-141). It has been proved that *E. coli* M-17 strain meets the requirements for industrial probiotic strains. Strain peculiar features have been established as well.

Keywords: *Escherichia coli*, strains-producers, immunobiological preparations.

*E. coli* M-17 имеет долгую историю использования в качестве продуцента пробиотического препарата «Колибактерин сухой», на протяжении которой штамм неоднократно подвергался многочисленным исследованиям с целью определения способности к продукции колицинов и уровня антагонистической активности, антибиотикорезистентности, биохимической активности и т.д. Безвредность штамма была подтверждена эмпирическим путем. В начале использования данного штамма в качестве продуцента пробиотика важное диагностическое значение имел его серотип (O2:H6), так как

штамм периодически проводили через организм здоровых добровольцев для сохранения его антагонистических свойств [4].

Согласно требованиям современных нормативных документов производственные пробиотические штаммы должны быть изучены по множеству признаков, в том числе подтверждающих их безвредность, апатогенность и авирулентность [1; 2]. Существующие в настоящее время наукоемкие технологии позволяют провести анализ полного генома штаммов микроорганизмов и подтвердить их безвредность на генетическом уровне.

**Целью** нашей работы было углубленное исследование биологических свойств штамма *E. coli* M-17, используемого для производства пробиотика «Колибактерин сухой» с использованием наукоемких методов – современных биохимических тест-систем, MALDI TOF масс-спектрометрии, полногеномного секвенирования и биоинформатического анализа данных.

**Материалы и методы исследования.** Восстановление лиофильно высушенного штамма проводили с использованием мясо-пептонного бульона (Nutrient Broth, HiMedia), подращённую культуру титровали в диапазоне разведений  $10^{-1}$  –  $10^{-7}$  и проводили высевы по 0,05 мл на среду Эндо (Питательная среда для выделения энтеробактерий – агар Эндо ГРМ, Оболенск), далее инкубировали при 37 °С 24 часа. Выросшие колонии микроорганизмов оценивали по морфологии, по 10 колоний каждого морфологического вида отбирали для следующего этапа исследования – масс-спектрометрии.

Масс-спектрометрический анализ осуществляли с помощью времяпролетного MALDI масс-спектрометра Autoflex (Bruker Daltonics, Германия), пробоподготовка суточных культур исследуемых микроорганизмов проводилась методом прямого нанесения по стандартному протоколу, представленному в руководстве пользователя. Идентификация, запись, обработка и анализ масс-спектров проводилась с помощью программы BioTyper RTC.

Остаток колонии засеивали на мясо-пептонный бульон для наращивания биомассы и последующей биохимической идентификации. Для биохимической идентификации отбирали культуры, по результатам масс-спектрометрии имевшие значения Score 2,100 и более.

Для расширенного изучения биохимических свойств штаммов использовали пластины биохимические, дифференцирующие энтеробактерии (ПБДЭ) («Диагностические системы», Россия), системы индикаторные бумажные для идентификации микроорганизмов - набор № 2 для межродовой и видовой дифференциации энтеробактерий (ФГУП НПО «Микроген» Минздрава России) и среды HiMedia (HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия)). Пробоподготовку, культивирование, идентификацию микроорганизмов и интерпретацию полученных результатов проводили согласно инструкциям производителей.

В работу по полногеномному секвенированию была отобрана культура *E. coli* M-17 с изученным профилем рибосомальных белков с максимально высоким Score, известной биохимической активностью. Геномную ДНК выделяли с использованием коммерческого набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия), подготовку библиотек производили с помощью набора TrueSeq (Illumina Inc, США), секвенирование выполняли на платформе MiSeq (Illumina). Аннотация генома производилась с помощью утилиты Prokka v. 1.11 [17] и геномного сервера RAST [16]. Для подробного изучения генома использовали специализированные программные продукты, доступные на сайте Центра геномной эпидемиологии: изучение CRISPR-региона проводили с использованием программы CrisprFinder [10], поиск детерминант антибиотикорезистентности и патогенности с использованием ResFinder 2.1 и PathogenFinder [9; 18]. Для поиска детерминант вирулентности применяли программу VirulenceFinder [11], для обнаружения интегрированных плазмид – PlasmidFinder 1.3. [8]. MLST типирование проводили с использованием программы MLST-1.8 Server [13], для установления серотипа использовали программу SerotypeFinder 1.1 [12].

**Результаты исследования и их обсуждение.** Для идентификации методом масс-спектрометрии были выбраны характерные крупные малиновые колонии с металлическим блеском в S-форме. В результате идентификации микроорганизмов в автоматическом режиме получен ряд масс-спектров со Score от 2,05 до 2,56. Характерный масс-спектр представлен на рис. 1.

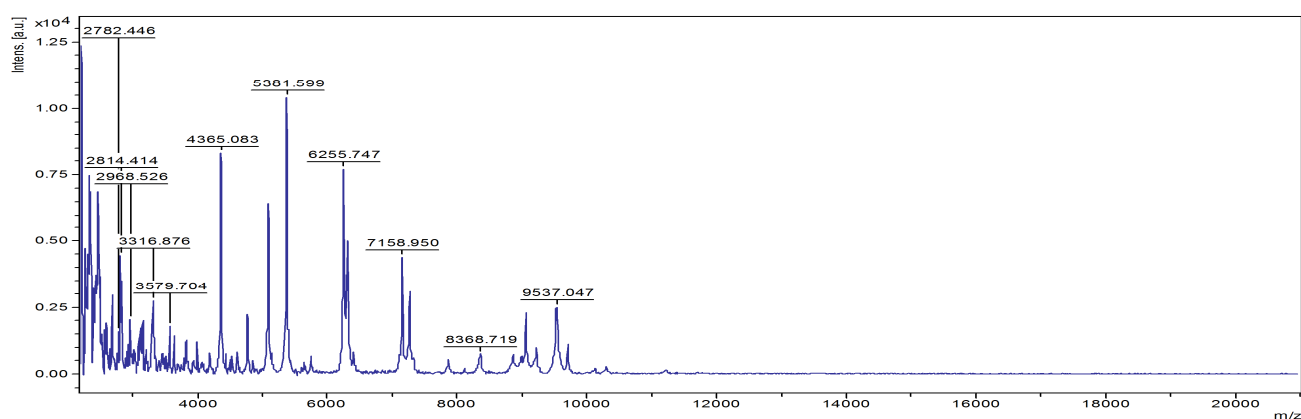


Рис. 1. MALDI масс-спектр штамма *E. coli* M-17 при использовании  $\alpha$ -CHCA матрицы

Установлено, что масс-спектр штамма *E. coli* M-17 составляют 85 пиков, 62 из которых воспроизводимы. При анализе ряда полученных масс-спектров обнаружено, что для изучаемого штамма характерно наличие следующих масс ионизированных белков (m/z): 2329, 2569, 2940, 3168, 3638, 5340, 6243, 6255, 6276, 8875, 9713.

В результате исследования биохимических с помощью стандартных тест-систем ПБДЭ и СИБ, а также дополнительных тестов (ксилоза, рамноза, дульцит и тест на желатиназную активность) с использованием сред HiMedia выявлено, что данный штамм обладает способностью ферментировать сахарозу, мальтозу, сорбит, глюкозу, лактозу, арабинозу, маннит, ксилозу, рамнозу, образует индол, обладает  $\beta$ -галактозидазной активностью, утилизирует цитрат натрия с глюкозой, образует лизин- и орнитиндекарбоксилазу. Штамм неспособен разжижать желатин, утилизировать цитрат и малонат натрия, не обладает аргининдегидролазой, фенилаланиндезаминазой, не образует ацетилметилкарбинол, не ферментирует инозит, дульцит, не гидролизует мочевины, не образует сероводород. Именно такой биохимический профиль характерен для классического штамма *E. coli* M-17, предложенного Л.Г. Перетцем в 1930 году [4].

Далее было проведено полногеномное секвенирование генома штамма и установлены его основные характеристики (табл. 1).

Таблица 1

Основные характеристики генома *E. coli* M-17

Характеристики	<i>E. coli</i> M-17
Размер генома, п.н.	4.483.110
GC, %	50.7
Количество генов	5.107
Количество псевдогенов	80
CDS (последовательности, кодирующие белки)	4.930
Количество представленных подсистем согласно RAST	595
CRISPR-регион	1
Опероны синтеза бактериоцинов:	
V	1 (KLD50841.1, KLD50842.1)
M	1 (KLD42107.1)
B	1 (KLD42108.1)
rRNA	13
tRNA	77

Очевидно, что данный штамм имеет «кишечное» происхождение, так как в его геноме присутствует большое количество псевдогенов и компонент системы устойчивости к солям желчи - мембранный протеин *DamX* (KLD50520.1).

В геноме обнаружены опероны синтеза колицина V, M и B – бактериоцинов, характерных для *E. coli*, которые обуславливают высокий уровень антагонистической активности данного штамма.

С использованием программы CrisprFinder проанализирован CRISPR-регион изучаемого штамма, расположенный в пределах 57 контига (LBDD01000002). Установлено,

что по структурной организации CRISPR-регион исследуемого штамма отнесится к I-E типу, что типично для представителей рода *Escherihia* [14]. Уникальные последовательности спейсеров и повторов данного региона можно рассматривать как «метку штамма» и впоследствии использовать для его индикации (рис. 2).

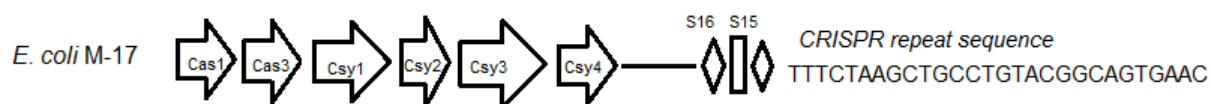


Рис. 2. Организация CRISPR-кассеты *E. coli* M-17. Стрелками обозначены соответствующие Cas-белки, ромбы обозначают повторы, прямоугольники – уникальные спейсеры

Присутствие в составе генома CRISPR-региона говорит о внедрении фагов в прошлом. О том, что изучаемый микроорганизм подвергался атакам фагов, свидетельствует и тот факт, что в его геноме обнаружены профаги - гены, кодирующие фаговые белки, элементы капсида, ферменты репликации, гены-активаторы белков фага - всего 96 детерминант.

Метаболизм штамма изучен с использованием RAST. Установлено, что в геноме детерминировано несколько путей центрального метаболизма углеводов: гликолиз, путь Энтнера-Дудорова и пентозофосфатный путь; выявлено, что данные метаболические пути штамма не имеют особенностей. В целом *E.coli* M-17 обладает выраженным метаболическим потенциалом и способен утилизировать широкий спектр субстратов.

С использованием RAST и программы ResFinder полногеномная последовательность штамма была проанализирована на наличие генов антибиотикорезистентности. Установлено, что в состав генома изучаемого штамма входит кластер транспортных генов (mdtABCD), наличие которого обуславливает устойчивость к новобиоцину и доксихолату [7]. Также в геноме представлены гены оперона, регулирующего экспрессию генов, отвечающих за систему эффлюкса лекарственных, в том числе и антибактериальных препаратов (MAR locus), а также другие виды молекулярных эффлюксных помп - *CmeA*, *CmeB*, *TolC*, *AcrR*, *MacA*, *MacB*, а также эффлюксные помпы семейств MATE и MFS. Все перечисленные детерминанты имеют хромосомную локализацию, типичны для представителей рода и не представляют угрозы в плане трансмиссивного распространения [6].

Далее геном был проанализирован с использованием программ PlasmidFinder-1.3, VirulenceFinder-1.5 и PathogenFinder. В результате установлено, что исследуемый штамм не содержит интегрированных плазмид, детерминант вирулентности и патогенности.

На современном этапе существует ряд методов, позволяющих типировать штаммы с использованием их полногеномных последовательностей. Наиболее распространенным является метод мультилокусного сиквенс типирования (MLST), предполагающий установление аллельных профилей отдельных «генов домашнего хозяйства» штамма [13]. Для проведения MLST штамма использовали программу MLST-1.8. В данной схеме анализируются фрагменты семи «генов домашнего хозяйства» – аденилаткиназы (*adk*), фумарат гидратазы (*fumC*), ДНК гиразы (*gyrB*), изоцитрат дегидрогеназы (*icd*), малат дегидрогеназы (*mdh*), аденилосукцинат дегидрогеназы (*purA*) и рекомбиназы А (*recA*). Обнаружено, что исследуемый штамм *E. coli* M-17 принадлежит к 141 сиквенс-типу (ST-141) (табл. 2).

Таблица 2

Аллельные профили «генов домашнего хозяйства» исследуемого штамма

Штамм	Аллели							ST
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
<i>E. coli</i> M-17	13	52	10	14	17	25	17	141

Согласно данным научной литературы микроорганизмы с таким сиквенс-типом ранее не вызывали эпидемических вспышек заболеваний [3]. Данные, представленные в международной базе данных [15], указывают на то, что сиквенс-тип характерен для непатогенных эшерихий человеческого происхождения.

С использованием программного продукта SerotypeFinder-1.1. определен серотип штамма. Эта программа использует полногеномные последовательности и позволяет анализировать детерминанты антигенов микроорганизма. Для *E. coli* это ген, кодирующий структурный белок флагеллин *fliC* (KLD44527.1) и белки О-антигена - *Wzx* (KLD49178.1) и *Wzy* (KLD49266.1). Установлено, что штамм *E. coli* M-17 имеет серотип O2:H6, который соответствует серотипу *E. coli* M-17 согласно «Регламенту производства колибактерина сухого» [5].

**Заключение.** В результате проведенной работы установлено, что штамм *E. coli* M-17 (ФГУП «НПО «Микроген») обладает типичными биохимическими свойствами, заявленными в ОФС на колисодержащие пробиотики. Для штамма характерны следующие массы ионизированных белков: 2329, 2569, 2940, 3168, 3638, 5340, 6243, 6255, 6276, 8875, 9713. При анализе полногеномной последовательности у штамма не обнаружены трансмиссивные гены антибиотикорезистентности, гены патогенности, вирулентности и интегрированные плазмиды. В геноме детерминирован ряд фаговых генов - гены, кодирующие фаговые белки, элементы капсида, ферменты репликации, гены-активаторы белков фага - всего 96

детерминант. Определен серотип штамма – O2:H6, который соответствует серотипу *E. coli* M-17 согласно Регламенту производства колибактерина сухого (1980). Впервые с использованием метода мультилокусного сиквенс-типирования был установлен сиквенс-тип штамма - ST141. Полногеномная последовательность генома штамма *E. coli* M-17 (ФГУП «НПО «Микроген») задепонирована в международной базе данных GenBank под соответствующим номером проекта - LBDD00000000.1.

### Список литературы

1. Методические указания по контролю биологических и микробиологических факторов. Система предрегистрационного доклинического изучения безопасности препаратов. Отбор, проверка и хранение производственных штаммов, используемых при производстве пробиотиков: методические указания № 4.2.2602-10. – М.: Роспотребнадзор, 2011. – 80 с.
2. Методические указания по санитарно-эпидемиологической оценке безопасности и функционального потенциала пробиотических микроорганизмов, используемых для производства пищевых продуктов: методические указания № 2.3.2.2789-10 – М.: Роспотребнадзор, 2010. – 71 с.
3. Молекулярно-генетический мониторинг в системе эпидемиологического надзора за инфекциями, связанными с оказанием медицинской помощи. Федеральные клинические рекомендации – М., 2014. – 45 с.
4. Перетц Л.Г. Значение нормальной микрофлоры для организма человека. – М.: Медгиз, 1955. – 410 с.
5. Регламент производства колибактерина сухого N 153-80. Утв. Главным управлением по производству бактериальных и вирусных препаратов МЗ СССР. – М.: Изд-во стандартов, 1980. – 21 с.
6. Alekshun M.N., Levy S.B. The *Escherichia coli* mar Locus — Antibiotic Resistance and More The mar locus and related systems confer multiple antibiotic resistance and control expression of virulence factors and genes for metabolizing small molecules // ASM News Y. – 2004. – Vol. 70. – P. 451-455.
7. Baranova N., Nikaido H. The baeSR two-component regulatory system activates transcription of the yegMNOB (mdtABCD) transporter gene cluster in *Escherichia coli* and increases its resistance to novobiocin and deoxycholate // J Bacteriol. – 2002. – Vol. 184 (15). – P. 4168-76. PMID: 12107134.
8. Carattoli A., Zankari E., García-Fernández A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing // Antimicrob Agents Chemother. – 2014 – Vol. 58 (7). – P. 3895-903. PMID: 24777092.

9. Cosentino S., Voldby L. M., Møller A. F., Lund O. PathogenFinder - Distinguishing Friend from Foe Using Bacterial Whole Genome Sequence Data // PLoS ONE. – 2013. – Vol. 8 (10). PMID: 24204795.
10. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats // Nucleic Acids Res. – 2007. – Vol. 35. – P. 52-57. PMID: 17537822.
11. Joensen K., Scheutz F., Lund O. Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli* // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52 (5). – P. 1501-10. PMID: 24574290.
12. Joensen K.G., Tetzschner A.M., Iguchi A. et al. Rapid and Easy In Silico Serotyping of *Escherichia coli* Isolates by Use of Whole-Genome Sequencing Data // J. Clin. Microbiol. – 2015. – Vol. 53 (8). – P. 1501-10. PMID: 25972421.
13. Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S. et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria // J Clin Microbiol. – 2012. – Vol. 50 (4). – P. 1355-61. PMID: 22238442.
14. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems // Nat Rev Microbiol. – 2015. – Vol. 13 (11). – P. 722-36. PMID: 26411297.
15. MLST databases of Warwick University [Электронный ресурс]. - Режим доступа: [www.mlst.warwick.ac.uk](http://www.mlst.warwick.ac.uk) (дата обращения: 26.03.17).
16. RAST – rapid annotation subsystem technology server [Электронный ресурс]. - Режим доступа: <http://rast.nmpdr.org> (дата обращения: 20.03.17).
17. Seemann T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation // Bioinformatics. – 2014. – Vol. 30 (14). – P. 2068-9. PMID: 24642063.
18. Zankari E., Hasman H., Cosentino S. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes // J. Antimicrob Chemother. – 2012. – Vol. 67 (11). – P. 2640-4. PMID: 22782487.