

© Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., 2019

УДК 616:579.61

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА CUTIBACTERIUM (PROPIONIBACTERIUM) ACNES A1-14 КАК ПРЕДСТАВИТЕЛЯ СИМБИОТИЧЕСКОЙ МИКРОБИОТЫ ЧЕЛОВЕКА

А.Е. Алексеева, Н.Ф. Бруснигина, А.Ю. Кашников, Н.А. Новикова

ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, д. 71, г. Нижний Новгород, 603950, Россия

Бактерии вида *Cutibacterium* (ранее *Propionibacterium*) *acnes*, с одной стороны, являются представителями нормальной микрофлоры кожи человека, а с другой, – способствуют развитию воспалительных процессов, таких как акне, инфекционные осложнения в посттравматический и послеоперационный период глаза (эндофтальмит), сердечно-сосудистой системы (эндокардит), центральной нервной системы и опорно-двигательного аппарата (остеомиелит), имплант-ассоциированные инфекции. Используются различные молекулярно-генетические подходы для определения эпидемически значимых генотипов, обладающих высоким патогенетическим потенциалом и генотипов низкопатогенных комменсалов. Впервые проведено полногеномное секвенирование штамма *C. acnes* A1-14, выделенного из толстого кишечника здорового человека. В результате выравнивания и объединения нуклеотидная последовательность генома составила 2 484 560 пар нуклеотидов. Согласно результатам генотипирования штамм относится к фило типу II, риботипу 6 и сиквенс-типу 7 (схема McDowell A. с соавторами) или 73 (схема Lomholt H.B., Kilian M.). Показано, что в геноме *C. acnes* A1-14 отсутствуют мобильные элементы, детерминанты патогенности и антибиотикорезистентности, мутации в генах 16S рРНК, 23S рРНК, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, установлено наличие CRISPR-Cas структуры. Обнаружена внехромосомная последовательность, принадлежащая геному бактериофага семейства *Syphoviridae*. С использованием электронно-микроскопического метода исследования дана морфологическая характеристика вириона бактериофага, присутствие которого в виде экстрахромосомной структуры характерно для многих штаммов *C. acnes*. Таким образом, результаты, полученные в нашем исследовании, дополняют представления о молекулярно-генетических особенностях штаммов *C. acnes*, выделенных из различных биотопов человека и являющихся представителями симбиотической микрофлоры.

Ключевые слова: *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*, полногеномное секвенирование, MLST, генотипирование, факторы патогенности, CRISPR-Cas, бактериофаг.

Для цитирования: Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф., Кашников А.Ю., Новикова Н.А. Молекулярно-генетическая характеристика штамма *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* A1-14 как представителя симбиотической микрофлоры человека // Здоровье населения и среда обитания. 2019. № 8 (317). С. 39–44. DOI: <http://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-39-44>

A.E. Alekseeva, N.F. Brusnigina, A.Yu. Kashnikov, N.A. Novikova □ MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTIC OF CUTIBACTERIUM (PROPIONIBACTERIUM) ACNES A1-14 STRAIN AS HUMAN SYMBIOTIC MICROBIOTA REPRESENTATIVE □ Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, 71 Malaya Yamskaya Str., Nizhny Novgorod, 603950, Russia.

The bacteria of the *Cutibacterium* (formerly *Propionibacterium*) *acnes* species are representatives of normal microbiota of human skin on the one hand and they contribute to the development of inflammatory processes, such as acne, infectious complications in the post-traumatic and postoperative period of the eye (endophthalmitis), the cardiovascular system (endocarditis), central nervous system and musculoskeletal system (osteomyelitis), implant-associated infections on the other hand. To identify epidemically significant genotypes with high pathogenetic potential and genotypes of low pathogenic commensals the different molecular genetic approaches are used. The whole genome sequencing of *C. acnes* A1-14 strain isolated from the large intestine of a healthy person was carried out for the first time. As a result of alignment and collection, the nucleotide sequence of the genome was 2,484,560 pairs of nucleotides. The strain belongs to a phylotype II, a ribotype 6 and sequence-type 7 (McDowell A. et al. scheme) or 73 (Lomholt H. B., Kilian M. scheme) according to the results of genotyping. We showed that there are no mobile elements, determinants of pathogenicity and antibiotic resistance, mutations in the 16S rRNA, 23S rRNA, *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* genes and established the presence of CRISPR-Cas structure in the genome of *C. acnes* A1-14. An extrachromosomal sequence belonging to the genome of the *Syphoviridae* family bacteriophage was found. The morphological characteristic of the bacteriophage virion, the presence of that as extrachromosomal structure is typical to many *C. acnes* strains, is given using the electronic microscopic method of research. Thus, the obtained in our study results complement the understanding of the molecular genetic features of *C. acnes* strains isolated from various human biotopes and which are symbiotic microbiota representatives.

Keywords: *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes*, whole genome sequencing, MLST, genotyping, pathogenicity factors, CRISPR-Cas, bacteriophage.

For citation: Alekseeva A.E., Brusnigina N.F., Kashnikov A.Yu., Novikova N.A. Molekulyarno-geneticheskaya kharakteristika shtamma *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* A1-14 kak predstavitelya simbioticheskoi mikrobioty cheloveka. [Molecular-genetic characteristic *Cutibacterium* (*Propionibacterium*) *acnes* A1-14 strain as human symbiotic microbiota representative]. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya*, 2019, no. 8 (317), pp. 39–44. (In Russ.) DOI: <http://doi.org/10.35627/2219-5238/2019-317-8-39-44>

Cutibacterium acnes, родовым названием которого до 2017 г. являлось *Propionibacterium* [19], плеоморфный неспорообразующий грамположительный факультативный анаэроб. Бактерии этого вида являются типичными представителями нормальной микрофлоры кожи человека и локализуются в основном в волосяных фолликулах, также микроорганизм может быть обнаружен в ротовой полости,

кишечном и урогенитальном тракте человека [2, 7, 12]. *C. acnes* препятствуют размножению таких патогенов, как *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus pyogenes*, но несмотря на это их относят к группе оппортунистических возбудителей, способствующих возникновению широкого круга воспалительных процессов, таких как угревая сыпь, стоматологические и офтальмологические инфекции, осложнения

после эндопротезирования за счет участия в формировании биопленок [2, 9, 16]. Также обсуждается роль *S. acnes* в развитии так называемого синдрома Synovitis-Acne-Pustulosis-Hyperostosis-Osteitis – SAPHO (синовит, акне, пустулез, гиперостоз, остеит) [18], саркоидоза [6] и рака простаты [3].

Проведение типирования штаммов *S. acnes* с помощью современных молекулярно-генетических методов позволяет выявить генотипы *S. acnes*, в наибольшей степени участвующие в развитии воспалительного процесса. Типирование включает определение сиквенс-типа (ST), обнаружение детерминант факторов патогенности и антибиотикорезистентности, анализ структур тандемных повторов (CRISPR и VNTR). Так, первоначально, на основании изучения биохимических и серологических свойств штаммов, а затем и филогенетического анализа нуклеотидной последовательности маркерного гена *recA* (рекомбиназа А), изоляты *S. acnes* были разделены на три различных фило типа – I и II и III [15]. Затем фило тип I разделили на субтипы, названия которых отличаются в зависимости от используемой схемы мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). По схеме McDowell A. с соавторами [16] выделяются субтипы IA1, IA2, IB1, IB2, IB3, и IC, по схеме Lomholt H.B., Kilian M. [12] – I-1a, I-1b, I-2. По данным McDowell A с соавт. заболевание кожи (акне) в основном ассоциировано с субтипом IA1, офтальмологические инфекции – со штаммами, относящимися к субтипам IA1 и IA2. Штаммы, принадлежащие фило типам IB, II и III чаще обнаруживаются у здоровых носителей и в очагах инфекций мягких тканей после хирургических манипуляций, связанных с установкой фиксирующих конструкций при переломах или эндопротезировании суставов [16]. Аналогичные результаты были получены также и другими исследователями [12]. В метагеномных исследованиях, проведенных Fitz-Gibbon S. с соавторами [7], штаммы дифференцировали на риботипы на основании анализа структуры гена 16S рРНК и показана связь определенных риботипов с акне.

В качестве факторов патогенности многими исследователями рассматривается синтез *S. acnes* эстераз, липаз, протеиназ, гемолизина и CAMP (Christie, Atkins, Munch-Peterson)-фактора. Продукция этих ферментов при неясных до конца условиях может инициировать развитие воспалительных процессов за счет нарушения целостности эпидермальных клеток кожи и барьерной функции стенки сальных фолликулов. Это в свою очередь приводит к высвобождению провоспалительных цитокинов из соседних кератиноцитов, которые будут распространяться в дерме, инициируя воспаление. Другими факторами *S. acnes*, обладающими иммуногенными свойствами, являются порфирины, гликокаликсный полимер и белки, синтезируемые в условиях пищевого, кислотного или теплового стресса [2, 4, 10].

Технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), которые появились и

активно используются в последнее десятилетие, позволили проводить молекулярно-генетическое типирование патогенов по широкому спектру маркеров, оценить патогенетический потенциал микроорганизма и установить филогенетические связи.

Цель исследования – дать молекулярно-генетическую характеристику штамма *Cutibacterium acnes* A1-14, на основании результатов полногеномного секвенирования. В задачи исследования входило типирование штамма с помощью схем MLST, выявление детерминант патогенности и антибиотикорезистентности, поиск и характеристика структур тандемных повторов и мобильных элементов, филогенетический анализ на основании данных о структурах полных геномов, находящихся в базе данных RefSeq (NCBI).

Материалы и методы. Объектом исследования являлся штамм *S. acnes* A1-14, выделенный из кишечника человека. Культивирование проводили на 5%-м кровяном агаре в анаэробных условиях с использованием газогенерирующих пакетов (GasPak Anaerobe Gas Generating Pouch System with Indicator) в течение 72 ч при 37 °С.

Выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора «Ампли-Прайм ДНКсорб-В» (ЦНИИЭ). Концентрацию ДНК определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Австрия). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT (Illumina) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование ДНК-библиотек проводили на приборе MiSeq (Illumina) с использованием набора MiSeq Reagent kit v2 (500cycle). Программное обеспечение SPAdes (версия 3.5.0) использовали для выравнивания и сборки полученных чтений de novo. Аннотирование нуклеотидных последовательностей генома штамма *S. acnes* A1-14 проводили с помощью сервера Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>). Сервис BLASTN (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi/>) использовали для поиска гомологичных последовательностей. При определении сиквенс-типов (ST) использовали базы данных MLST: <http://pacnes.mlst.net/> и <http://pubmlst.org/pacnes/>. С помощью сервера Center for Genomic Epidemiology (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/>), баз данных Virulens Factors Database (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/>) и Antibiotic Resistance Genes Database (ARDB) (<http://arbd.cbcb.umd.edu/>) осуществляли поиск детерминант патогенности и антибиотикорезистентности. Наличие интронов и IS-элементов определяли дополнительно с помощью web-сервисов Integrall (<http://integrall.bio.ua.pt/>) и IS-finder (<https://www-is.biotoul.fr/>). Поисковый сервис CRISPRCasFinder (<https://crisprcas.i2bc.paris-saclay.fr/CrisprCasFinder/Index>) использовали для детекции и типирования CRISPR-Cas структур.

Для проведения филогенетического анализа относительно базы данных RefSeq (NCBI), содержащей информацию как о полных геномах (complete genome), так и неполных

геномах (draft genome) *C. acnes* использовали web-ресурс REALPHY версия 1.12. (<https://realphy.unibas.ch/realphy/>). Построение филогенетической дендрограммы осуществляли методом ближайших соседей (Neighbor joining) с использованием программного обеспечения MEGA 7.0.

Анализ литической активности бактериофага *Propionibacterium phage PA1-14* по отношению к культуре штамма *C. acnes* A1-14 проводили методом агаровых слоёв по Грациа. Очистку и концентрирование фаговых частиц проводили по методике [1] в растворе, содержащем ПЭГ6000 (концентрация 7 %) и 0,1М NaCl, дополнительно проводили дифференциальное ультрацентрифугирование (ротор S140-AT, Sorvall MX 150, 26 000 об./мин, 80 мин) через подушку 20 % сахарозы в GTNE буфере (200 мМ глицин, 50 мМ трис HCl, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5) [1, 17]. Полученный образец фага исследовали методом электронной микроскопии (микроскоп Hitachi HT7700) при увеличении в 20–30 тыс. Сборка генома бактериофага de novo проводилась с использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench версия 5.5.

Результаты исследования. В результате сборки коротких чтений получено 11 контигов с общей длиной всей нуклеотидной последовательности генома штамма *C. acnes* A1-14 – 2 484 560 п.н. Описание общей структуры генома на основании аннотирования с помощью сервера RAST представлено в табл. 1.

Общая структура генома штамма *C. acnes* A1-14 полностью соответствует таковому для этого вида, депонированным в базе данных GenBank. Нужно отметить, что наше исследование впервые описывает генетическую структуру *C. acnes* A1-14, выделенного из кишечника человека, поскольку все депонированные в базе данных GenBank геномы штаммов *C. acnes* (*P. acnes*) были изолированы

с поверхности кожи или очагов воспаления мягких тканей.

Анализ нуклеотидной последовательности гена *gcsA* показал, что исследуемый штамм относится к типу II и, по данным большинства исследователей, объединяет типичных представителей симбиотической микробиоты [11, 12, 16, 20].

Fitz-Gibbon S. с соавт. [7] в своих исследованиях предложили дифференцировать штаммы на основании полной нуклеотидной структуры гена 16S рРНК, где было показано, что тип II объединяет два риботипа – RT2 и RT6. Причем штаммы, принадлежащие к RT6, в 99 % случаев ассоциированы с микробиотой здоровой кожи [7, 20]. Согласно полученным результатам штамм *C. acnes* A1-14 принадлежит к риботипу 6. Согласно схемам Lomholt H.B., Kilian M. и McDowell A. et al. аллельные профили представлены в табл. 2 и 3.

На основании результатов генотипирования, проведенного с использованием двух схем MLST и риботипирования, установлено, что только 5 штаммов из 193 геномов *C. acnes* (*P. acnes*), депонированных в базе данных GenBank (за май 2019), имеют такой же генотип (табл. 4).

Таким образом, исследуемый штамм относится к достаточно редко выявляемому генотипу. Согласно источникам литературы наиболее часто встречающимися как в волосяных фолликулах, так и на поверхности кожи являются представители клонального комплекса CC18 (по схеме Lomholt H.B., Kilian M.) и, в частности, ST18 [11, 12].

Филогенетический анализ, в который были включены последовательности геномов всех штаммов *C. acnes* (*P. acnes*) сиквенс-типа 73, показал, что последовательности генома исследуемого штамма группируются в один кластер с последовательностями геномов штаммов 11-79 и 10-43 (рис. 1).

Таблица 1. Общая структуры генома штамма *C. acnes* A1-14
Table 1. The general genome structure of *C. acnes* A1-14 strain

Характеристика	Штамм <i>C. acnes</i> A1-14
Общая длина генома, п.н.	2 484 560
Число ГЦ, %	60,0
Количество белок кодирующих последовательностей	2 223
Количество тРНК	41
Количество рРНК	3
Наличие внехромосомных структур	Геном бактериофага длиной 29 407 п.н.
Наличие CRISPR-Cas генов	Один участок CRISPR-Cas

Таблица 2. Аллельный профиль штамма *C. acnes* A1-14 по схеме Lomholt H.B., Kilian M.
Table 2. The allelic profile of the *C. acnes* A1-14 strain according to Lomholt H.B., Kilian M. scheme

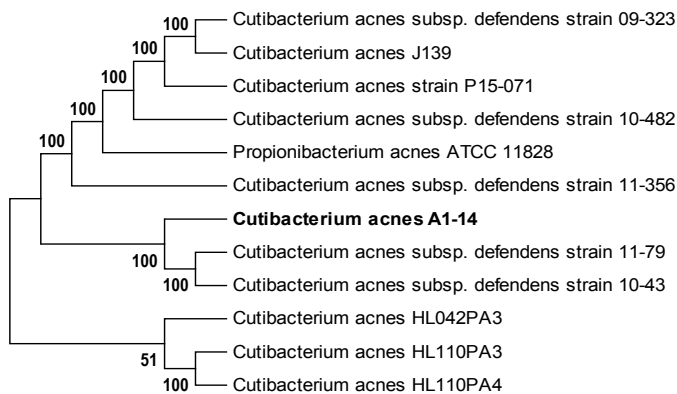
Ген	cel	coa	fba	gms	lac	oxc	pac	recA	zno	Сиквенс-тип (ST)
Аллельный вариант	3	16	8	11	7	7	5	6	14	73

Таблица 3. Аллельный профиль штамма *C. acnes* A1-14 по схеме McDowell A. et al.
Table 3. The allelic profile of the *C. acnes* A1-14 strain according to McDowell A. et al. scheme

Ген	aroE	atpD	gmk	guaA	lepA	sodA	tly	CAMP2	Сиквенс-тип (ST)
Аллельный вариант	15	4	2	4	2	3	10	10	7

Таблица 4. Штаммы *C. acnes*, имеющие сходный генотип со штаммом *C. acnes* A1-14Table 4. *C. acnes* strains with the similar genotype to *C. acnes* A1-14 strain

Штамм <i>C. acnes</i>	MLST-тип (схема Lomholt H.B., Kilian M/ McDowell A. et al.)	Тип (recA)	Риботип	Источник выделения	Автор, год, страна
A1-14	73/7	II	6	Кишечник человека	Alekseeva A.E. et al., 2015, Россия
HL042PA3	73/7	II	6	Кожа	Li H. et al., 2013, США
HL110PA3	73/7	II	6	Кожа	Weinstock G. et al, 2010, США
HL110PA4	73/7	II	6	Кожа	Weinstock G. et al, 2010, США
11-79	73/7	II	6	Раковая опухоль предстательной железы	Davidsson S., Bruggemann H., 2015, Швеция
10-43	73/7	II	6	Раковая опухоль предстательной железы	Davidsson S., Bruggemann H., 2015, Швеция

Рис. 1. Дендрогрaмма нуклеотидных последовательностей штаммов *C. acnes*, относящихся к сиквенс-типу 73Fig. 1. The dendrogram of nucleotide sequences of *C. acnes* strains belonging to sequence-type 73

В результате поиска относительно базы данных VFDB в геноме штамма *C. acnes* A1-14 не выявлены детерминанты патогенности, связанные с продукцией токсинов или проявлением инвазивных свойств. В результате аннотирования и поиска гомологичных последовательностей детерминант патогенности относительно генома штамма *P. acnes* KPA171202, описанного Вьггеманн Н. в 2004 г. [4], обнаружены 5 детерминант аналогов CAMP-фактора (фактор патогенности стрептококков), участвующего в связывании иммуноглобулинов IgM, IgG, и действующего как порообразующий токсин. Также выявлены три детерминанты сиалидазы: по одной детерминанте эндоглицероцерамидазы, гиалуронат лиаза и эндо-β-N-ацетилглюкозаминидаза. В структуре генома *C. acnes* A1-14 обнаружены также гены, кодирующие антиген 18 kDa и гомологичный белок антигена 84 *M. tuberculosis* и *M. leprae*, белки теплового шока GroEL, DnaK, DnaJ, GrpE и обладающие иммуногенными свойствами [4, 10].

Анализ нуклеотидной последовательности с помощью баз данных ARDB и сервера Center for Genomic Epidemiology показал отсутствие детерминант антибиотикорезистентности, кроме гена *bacA*, кодирующего ундекапренил-пирофосфатфосфатазу, катализирующую дефосфорилирование ундекапренилдифосфата (UP). На примере *E. coli* показано, что избыточная экспрессия этого гена способствует проявлению устойчивости к бацитрацину [8]. Также не выявлены мутации в генах 16S рРНК

и 23S рРНК. Таким образом, наличие только детерминанты резистентности к бацитрацину и отсутствие других детерминант, в частности, гена *ermX*, а также точечных мутаций в генах рибосомальных белков, обуславливающих проявление устойчивости к макролидам, линкомицинам и тетрациклинам, совпадает с характеристиками штаммов *C. acnes* (*P. acnes*), принадлежащих филолиту II. Известно, что наибольшее число устойчивых штаммов *C. acnes* выявляется среди представителей субтипа IA1, принадлежащих клональному комплексу CC3 [16].

При использовании поисковых сервисов IS-finder и Integrall в структуре генома исследуемого штамма не выявлено IS-элементов, интегронов и транспозонов.

С помощью сервиса CRISPRCasFinder обнаружен короткий участок, принадлежащий CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Он представлен тремя участками прямых повторов (Direct Repeats-DR) длиной 30 п.о. с двумя вариабельными регионами (spaces) длиной 31 п.о. Общая длина CRISPR составляет 151 п.о. Перед ним расположены гены восьми CRISPR-ассоциированных белков (Cas), находящихся в следующей последовательности: Cas3→Cse1→Cse2→Cse4→Cas5e→Cse3→Cas1→Cas2→CRISPR. Отсутствие в структуре генома мобильных элементов является отличительной чертой представителей филолиту II, что обусловлено наличием CRISPR-Cas структуры, которая отсутствует у штаммов, принадлежащих филолиту I [6]. Структура CRISPR-Cas локуса у исследуемого штамма совпадает с таковой других исследованных штаммов *C. acnes*, принадлежащих филолиту II. Согласно классификации Макарова К.С. с соавт. [14] структура CRISPR-Cas *C. acnes* A1-14 принадлежит типу I субтипу I-E. Нуклеотидные последовательности спейсерных участков совпали с таковой спейсерных участков CRISPR других штаммов *C. acnes* (*P. acnes*). В частности, нуклеотидная последовательность одного спейсера совпала с нуклеотидной последовательностью спейсера штамма *P. acnes* 36.1.R1 (номер GenBank JQ287512.1), которая согласно исследованиям Вьггеманн Н. с соавт. [5] также присутствует еще у 13 штаммов *C. acnes* (*P. acnes*). Другой спейсерный участок совпадает с нуклеотидной

последовательностью спейсеров, присутствующих в геноме 10 штаммов *C. acnes* (*P. acnes*).

При аннотировании нуклеотидных последовательностей генома исследуемого штамма выявлены экстрахромосомные последовательности, принадлежащие бактериофагу. С использованием программного обеспечения CLC Genomics Workbench версия 5.5 проведена сборка de novo целой последовательности бактериофага *Propionibacterium phage* PA1-14, длина которой составила 29 407 п.н. (номер GenBank KT934381.1). В результате исследования литической активности фага по отношению к культуре штамма *C. acnes* A1-14 методом агаровых слоев по Грация образования негативных пятен выявлено не было. Таким образом, фаг по отношению к данному штамму не является вирулентным. В связи с этим было сделано предположение, что культура является лизогенной, но способной к самопроизвольному освобождению фаговых частиц. При визуальной оценке образца, полученного в результате очистки и концентрирования частиц бактериофага из культуры *C. acnes* A1-14, с помощью электронного микроскопа были обнаружены вирионы, относящиеся по морфологическому строению, согласно Международной классификации, к семейству *Siphoviridae*. Вирион бактериофага имеет икосаэдрическую головку размером 50–60 нм и несокращающийся гибкий хвостовой отросток размером 200–250 нм (рис. 2).

По данным литературы представители семейства *Siphoviridae* являются наиболее часто встречающимися в культурах *C. acnes* (*P. acnes*). Размер головки у исследованных бактериофагов *C. acnes* (*P. acnes*) составлял 50–60 нм, а длина хвостового отростка по разным оценкам – 145–155 нм [13]. В составе генома бактериофага *P. phage* PA1-14 имеются гены, детерминирующие синтез и сборку белков капсида и хвостового отростка, репликацию ДНК, а также гены, ответственные за лизис стенки хозяина. Необходимо отметить, что в геноме *P. phage* PA1-14 не обнаружены гены интегразы и ее репрессора, ответственные за встраивание ДНК бактериофага в геном клетки-хозяина, что является обязательным для прояв-

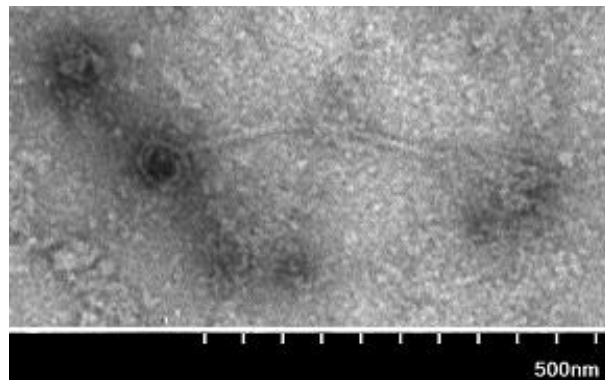


Рис. 2. Электронная микрофотография бактериофага *Propionibacterium phage* PA1-14
Fig. 2. Electron micrograph of *Propionibacterium phage* PA1-14 bacteriophage

ления истинно лизогенных свойств. В связи с этим геном бактериофага *P. phage* PA1-14 не является частью генома *C. acnes* (*P. acnes*) A1-14, а находится в виде экстрахромосомного элемента. Согласно данным Lood R., Collin M. [13] это свойство характерно для многих известных бактериофагов *P. acnes*, которые являются умеренными, но при этом утратившими генный модуль, ответственный за интеграцию в геном хозяина. Такое состояние является псевдолизогенным. При этом вирус частично может реплицироваться, упаковываться и лизировать клетки хозяина или наряду с репликацией ДНК бактериальной клетки образовывать копии и сохраняться в виде экстрахромосомной структуры в течение нескольких пассажей [13].

Следует сказать, что в геноме исследуемого бактериофага не обнаружены участки, несущие детерминанты вирулентности и лекарственной устойчивости. Причем это отмечается у всех изученных бактериофагов *C. acnes* (*P. acnes*) [4, 13].

Для проведения филогенетического анализа использовали как полногеномные последовательности фагов *C. acnes* (*P. acnes*), так и последовательности, представленные в базе данных GenBank, в виде скаффолдов или контигов. Общее количество штаммов составило 83. На рис. 3 представлена дендрограмма, включающая группу из 9 штаммов, которые находятся на одной крупной ветке и имеют наибольшее филогенетическое родство с *Propionibacterium phage* PA1-14.

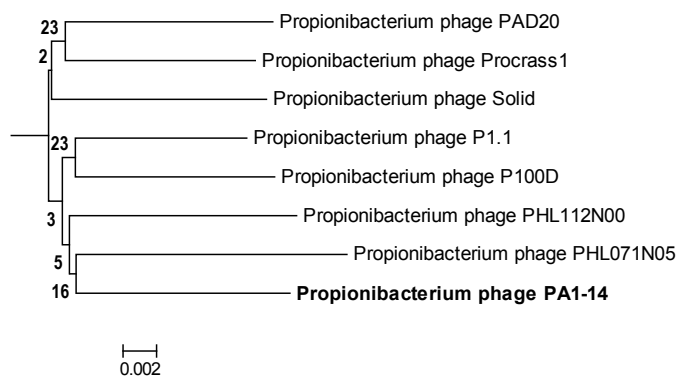


Рис. 3. Дендрограмма нуклеотидной последовательности *Propionibacterium phage* PA1-14 относительно последовательностей бактериофагов *C. acnes* (*P. acnes*), депонированных в базе данных GenBank

Fig. 3. The dendrogram of *Propionibacterium phage* PA1-14 nucleotide sequence regarding *C. acnes* (*P. acnes*) bacteriophages sequences deposited in the GenBank database

Наиболее близкородственным исследуемому фагу является *Propionibacterium phage* PHL071N05, выделенный с поверхности здоровой кожи человека при выполнении крупномасштабного проекта Human Microbiome Project, проводимом в США в 2012 г. В эту группу также входят штаммы, выделенные из различных очагов воспаления и с поверхности здоровой кожи.

Выводы. Таким образом, впервые дана молекулярно-генетическая характеристика штамма *C. acnes* A1-14, выделенного из кишечника человека. Проведенный анализ нуклеотидной последовательности позволил установить принадлежность исследуемого штамма к типу II, ST7 (по схеме McDowell A. et al.) или ST73 (по схеме Lomholt H.B., Kilian M.). На основе анализа полной нуклеотидной последовательности гена 16S рРНК установлено, что штамм *C. acnes* A1-14 относится к 6 риботипу, объединяющему представителей симбиотической микробиоты. Сходный генотип имеют штаммы *P. acnes* HL042PA3, HL110PA3, HL110PA4, 11-79, 10-43. Установлено, что генетическая структура штамма *C. acnes* A1-14, выделенная из кишечника человека, во многом совпадает с таковой большинства представителей филопита II, выделенных с поверхности кожи или воспалительных очагов мягких тканей. Показано отсутствие таких мобильных элементов, как транспозоны, интегроны, IS-элементы. Обнаруженная структура CRISPR-Cas, относящаяся к типу I субтипу I-E, имеет два спейсерных участка, нуклеотидная последовательность которых совпадает со спейсерами других исследованных штаммов *C. acnes* (*P. acnes*). Присутствие последовательностей бактериофага семейства *Siphoviridae*, находящихся в виде экстрахромосомной единицы, также характерно для многих исследованных штаммов *C. acnes*. Таким образом, исследуемый штамм не формирует филогенетически отдельную линию, а является близкородственным ранее исследованным штаммам *C. acnes*, выделенным с поверхности кожи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность за предоставленный штамм *C. acnes* A1-14 научным сотрудникам лаборатории микробиома человека и средств его коррекции НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной и ее руководителю Соловьевой Ирине Владленовне.

ЛИТЕРАТУРА

(пп. 2–20 см. References)

1. Вирусология. Методы // Под редакцией Б. Мейхи. М.: Мир, 1988. 172 с.

REFERENCES

1. Virusologia. Metody [Virology. A practical approach]. Edited by B.W J. Mahy. Moscow: Mir Publ., 1988, 172 p. (In Russ.)
2. Achermann Y., Goldstein E.J.C., Coenye T., Shirliff M.E. Propionibacterium acnes: from commensal to opportunistic biofilm-associated implant pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, no. 3, pp. 419–440.
3. Bae Y., Ito T., Iida T., Uchida K., Sekine M., Nakajima Y. et al. Intracellular Propionibacterium acnes infection in glandular epithelium and stromal macrophages of the prostate with or without cancer. *PLoS ONE*, 2014, no. 2 (9), 11 p. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0090324> (accessed: 17.01.2017).
4. Вьрггеманн Н. Insights in the pathogenic potential of Propionibacterium acnes from its complete genome. *Semin. Cutan. Med. Surg.*, 2005, no. 2 (24), pp. 67–72.
5. Вьрггеманн Н., Ломholt H.B., Теттелин Н., Килиан М. CRISPR/cas loci of type II Propionibacterium acnes confer immunity against acquisition of mobile elements present in type I P. acnes. *PLoS ONE*, 2012, no. 3 (7), 10 p. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034171> (accessed: 17.01.2017).

6. Eishi Y., Suga M., Ishige I., Kobayashi D., Yamada T., Takemura T. et al. Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, no. 40, pp. 198–204.
7. Fitz-Gibbon S., Tomida S., Chiu B.-H., Nguyen L., Du C., Liu M. et al. Propionibacterium acnes strain populations in the human skin microbiome associated with acne. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, no. 9, pp. 2152–2160.
8. Ghachi M.E., Bouhss A., Blanot D., Mengin-Lecreux D. The bacA gene of Escherichia coli encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J. Biol. Chem.*, 2004, no. 29 (279), pp. 30106–30113.
9. Jakab E., Zbinden R., Gubler J., Ruef C., von Graevenitz A., Krause M. Severe infections caused by Propionibacterium acnes: an underestimated pathogen in late postoperative infections. *Yale J Biol Med.*, 1996, no. 6 (69), pp. 477–482.
10. Lodes M.J., Secrist H., Benson D.R., Jen S., Shanebeck K.D., Guderian J. et al. Variable expression of immunoreactive surface proteins of Propionibacterium acnes. *Microbiology*, 2006, no. 12, pp. 3667–3681.
11. Lomholt H.B., Kilian M. Population genetic analysis of Propionibacterium acnes identifies a subpopulation and epidemic clones associated with acne. *PLoS ONE*, 2010, no. 8, 10 p. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012277> (accessed: 20.01.2017)
12. Lomholt H.B., Scholz C.F.P., Вьрггеманн Н., Теттелин Н., Килиан М. A comparative study of Cutibacterium (Propionibacterium) acnes clones from acne patients and healthy controls. *Anaerobe*, 2017, vol. 47, pp. 57–63.
13. Lood R., Collin M. Characterization and genome sequencing of two Propionibacterium acnes phages displaying pseudolysogeny. *BMC Genomics*, 2011, no. 12 (198), 14 p. Available at: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-198> (accessed: 20.04.2015)
14. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J. et al. An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, no. 11 (13), pp. 722–736.
15. McDowell A., Perry A.L., Lambert P.A., Patrick S. A new phylogenetic group of Propionibacterium acnes. *J. Med. Microbiol.*, 2008, no. 57, pp. 218–224.
16. McDowell A., Barnard E., Nagy I., Gao A., Tomida S., Li H. et al. An expanded multilocus sequence typing scheme for Propionibacterium acnes: investigation of «pathogenic», «commensal» and antibiotic resistant strains. *PLoS ONE*, 2012, no. 7, 14 p. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041480> (accessed: 20.01.2017)
17. Романыук Л.В., Товкач Ф.И., Иванита Т.В., Кущкина А.И., Остапчук А.Н., Горб Т.Е. Abortive infection in Erwinia carotovora J2, as a source of nanoparticles of phage nature. *Мікробіологічний журнал*, 2010, no. 6, pp. 51–57. (In Ukrain.)
18. Schaeferbeke T., Lequen L., de Barbeyrac B., Labbe L., Bebear C.M., Morrier Y. et al. Propionibacterium acnes isolated from synovial tissue and fluid in a patient with oligoarthritis associated with acne and pustulosis. *Arthritis Rheum.*, 1998, no. 10 (41), pp. 1889–1893.
19. Scholz C.F., Kilian M. The natural history of cutaneous propionibacteria and reclassification of selected species within the genus Propionibacterium to the proposed novel genera Acidipropionibacterium gen. nov., Cutibacterium gen. nov. and Pseudopropionibacterium gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 2016, no. 11 (66), pp. 4422–4432.
20. Tomida S., Nguyen L., Chiu B.-H., Liu J., Sodergren E., Weinstock G.M. et al. Pan-genome and comparative genome analyses of Propionibacterium acnes reveal its genomic diversity in the healthy and diseased human skin microbiome. *mBio*, 2013, no. 3 (4), 11 p. Available at: <http://mbio.asm.org/content/4/3/e00003-13> (accessed: 27.01.2017).

Контактная информация:

Алексеева Анна Евгеньевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора
e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

Contact information:

Alekseeva Anna, Candidate of Biological Science, Senior Researcher for Laboratory of Metagenomics and Molecular Indication of pathogens of the Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
e-mail: a.e.alexeeva79@mail.ru

