

На правах рукописи



ЗАМАРИН АНТОН АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ДЕТЕКЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
СЕМЕЙСТВА SXT/R391 В ШТАММАХ *VIBRIO CHOLERAЕ* РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Волгоград – 2018

Работа выполнена в Федеральном казенном учреждении здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: Захарова Ирина Борисовна
кандидат биологических наук, доцент

Официальные оппоненты: Монахова Елена Владимировна
доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории микробиологии холеры ФКУЗ «Ростовский-на-Дону научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Савельева Ирина Вилориевна
кандидат медицинских наук, врач-бактериолог научно-производственной лаборатории препаратов для диагностики особо опасных и других инфекций ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего востока» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится « 4 » октября 2018 г. в 9:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208. 008. 06 по защите докторских и кандидатских диссертаций при ГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1. E-mail: post@volgmed.ru.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу 400131, г. Волгоград, пл. Павших Борцов, д. 1 на сайтах: [http:// www.volgmed.ru](http://www.volgmed.ru), [http:// vak2.ed.gov.ru](http://vak2.ed.gov.ru).

Автореферат разослан « _____ » 2018 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

доктор социологических наук,

кандидат медицинских наук, профессор

Ковалева Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Стремительный рост числа возбудителей инфекционных заболеваний, имеющих множественную лекарственную резистентность, является значительной проблемой современного здравоохранения. Рост заболеваемости и смертности, увеличение продолжительности пребывания в стационарах зачастую связаны с инфекциями, вызываемыми такими микроорганизмами [Livermore D.M. et al, 2009]. Устойчивость микроорганизмов к антибактериальным препаратам является неизбежным следствием широкого клинического применения антибиотиков. В различные периоды времени, в зависимости от перечня антибиотиков разных функциональных групп, интенсивно используемых в схемах лечения, в популяциях бактериальных патогенов развиваются разные механизмы резистентности к антибактериальным препаратам и способы распространения генов лекарственной устойчивости [Wright G.D. et al, 2010]. Распространение генов резистентности среди возбудителей инфекционных болезней человека в настоящее время приняло угрожающий характер [Warren R.E. et al, 2009].

Проблема множественной лекарственной устойчивости приобретает все большую актуальность и для отдельных групп микроорганизмов, относящихся к возбудителям особо опасных инфекций.

В отличие от многих бактериальных патогенов, у которых антибиотикорезистентность проявлялась вскоре после начала масштабного использования соответствующих препаратов, возбудитель холеры в течение довольно длительного времени оставался чувствительным к широкому ряду антимикробных соединений. Массовое выделение штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп, обладающих фенотипом множественной устойчивости к антибиотикам, наблюдается с 90-х годов XX века. К концу 1990-х гг. большинство выделяемых штаммов возбудителя были устойчивы к 3 - 8 антимикробным соединениям, включая фторхинолоны. Среди выделенных на территории нашего региона штаммов *V. cholerae* различных серогрупп также имеются изоляты, обладающие широкими спектрами устойчивости к антибиотикам различных классов [Викторов Д.В. с соавт., 2008; Замарин А.А. с соавт., 2016; Подшивалова М.В. с соавт., 2011, 2012, 2013].

Появление устойчивых к антибиотикам штаммов существенно снижает эффективность лечения холеры по стандартной схеме. Множественная устойчивость к антибиотикам у *V. cholerae* может формироваться в результате горизонтального генетического переноса,

опосредованного трансмиссивными плазмидами, интегронами, а также интегративными конъюгативными элементами (ICE) [Baron S. et al., 2017; Hochhut B. et al., 2001, Mala W., 2017].

Перечисленные выше обстоятельства активизировали исследования, направленные как на расшифровку генетических механизмов формирования множественной антибиотикорезистентности возбудителя, так и оценку распространенности тех или иных профилей лекарственной устойчивости холерных вибрионов.

Молекулярные механизмы, посредством которых реализуется резистентность возбудителей к тому или иному классу лекарственных препаратов, весьма разнообразны: инактивация действующего вещества, изменение клеточной мишени, снижение мембранной проницаемости, активный выброс из клеток определенных классов препаратов. Детерминанты резистентности указанных типов могут иметь как хромосомную локализацию, так и входить в состав способных к горизонтальному переносу мобильных генетических элементов.

Геном возбудителя холеры содержит целый ряд мобильных генетических элементов, имеющих механизмы аккумуляции и передачи детерминант резистентности к антибактериальным препаратам – интегроны, суперинтегроны, интегративные конъюгативные элементы. Одним из основных путей формирования множественной устойчивости к антибиотикам у *V. cholerae* является аккумуляция индивидуальных генов антибиотикорезистентности в составе этих специализированных генетических структур [Amita S.R. et al., 2003; Ceccarelli D. et al., 2006; Hochhut B. et al., 2001].

Вопрос о масштабах и механизмах горизонтального переноса генов в природных популяциях вызывает большой научный интерес с целью изучения механизмов эволюции бактериальных геномов. А также имеет прикладное значение в связи с необходимостью оценки риска возникновения новых патогенных штаммов у ранее непатогенных бактерий и быстрого распространения множественной лекарственной резистентности среди клинических штаммов.

Таким образом, исследования по идентификации и молекулярному анализу мобильных генетических элементов актуальны как в аспекте изучения генетических основ и эволюции лекарственной резистентности *V. cholerae*, так и в плане разработки новых методов характеристики и молекулярного типирования штаммов возбудителя.

Цель исследования - анализ распространенности и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации.

Задачи исследования

1. Провести скрининг штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ, на наличие ICE семейства SXT/R391.
2. Оценить присутствие интегративных конъюгативных элементов (ICEs) семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio* spp., выделенных из воды открытых водоемов на территории Волгоградской области в 2013 – 2014 гг.
3. Проанализировать область трех локусов варибельной ДНК SXT исследуемых изолятов, которые могут содержать детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам: варибельного региона VRIII и горячих точек HS3 и HS5.
4. Оценить принадлежность ICEs штаммов *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области, к интегративным конъюгативным элементам семейства SXT/R391.
5. Оценить генетическое разнообразие исследуемых штаммов по маркерам множественной антибиотикорезистентности, связанным с мобильными генетическими элементами.

Научная новизна

В рамках проделанной работы:

Получены новые данные о наличии интегративных конъюгативных элементов в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ.

Впервые проведен скрининг штаммов *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области, на наличие интегративных конъюгативных элементов.

Впервые проведен анализ молекулярной структуры варибельных последовательностей горячих точек HS3, HS5 и варибельного региона VRIII ICE штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработанные в ходе выполнения диссертационного исследования методические приемы и аналитические алгоритмы используются для паспортизации и углубленного изучения свойств штаммов холерных вибрионов различных серогрупп в лабораториях ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт (справка о внедрении № 02-12/419 от 05.04.2018).

В Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора депонированы штаммы *V. cholerae* O1 El Tor 19243 и *V. cholerae* nonO1/nonO139, содержащие различные типы интегративных конъюгативных элементов. Штаммам присвоены номера Государственной

коллекции ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» *Vibrio cholerae* KM 2025 и *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 KM 2026, соответственно.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы исследования: бактериологические и молекулярно-генетические.

Положения, выносимые на защиту

1. Количество возросших случаев завоза в Российскую Федерацию холеры, обусловленных полирезистентными штаммами *V. cholerae*, коррелирует с третьей волной распространения в мире штаммов 7-ой пандемии в начале 1990-х годов.
2. Интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391 после 2012 получили широкое распространение среди штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и близкородственных вибрионов, входящих в состав микрофлоры открытых водоемов Волгоградской области.
3. Вариабельные регионы VRIII обнаруженных ICE семейства SXT/R391 региональных экологических штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 содержат отличающиеся по составу кластеры генов резистентности.
4. ICE семейства SXT/R391 большинства региональных штаммов *Vibrio* spp. не содержат генов резистентности в составе кластера VRIII и горячих точках HS3 и HS5 и представлены типом SXT(ΔR), обнаружен единственный элемент типа SXT^{ET} (ΔR , *dfrA1*).
5. Молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории РФ, продемонстрировало широкий спектр вариабельной ДНК в составе исследованных ICEs.

Степень достоверности и апробация результатов

Диссертация выполнена в рамках двух государственных тем №079-4-13 (№ гос. регистрации 01201351987) и № 182-4-16 (№ гос. регистрации АААА-А16-116070610105-6). Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации в 2016 и 2017 гг.

План и аннотация диссертации обсуждены и одобрены на заседании ученого совета ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 23.03.2016 г., протокол № 1.

Результаты исследований обсуждены на общеинститутской конференции ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора 16.02.2018 г., протокол № 1.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 4 работы, включающие 2 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 13 рисунками и 17 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, пяти глав собственных исследований, заключения и выводов. Список использованных источников литературы включает 146 работ (16 отечественных и 130 зарубежных).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В работе было исследовано 112 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп, 38 штаммов рода *Vibrio* spp., не относящихся к виду *V. cholerae*, выделенных из объектов внешней среды (поверхностные водоемы) на территории Волгоградской области в 2013 – 2014 годах сотрудниками ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. ДНК 108 штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 из коллекции Ростовского-на-Дону противочумного института, выделенных в различных регионах РФ в 1971 – 2013 гг.

Культуры штаммов *V. cholerae* выращивали на щелочном агаре (рН 7,8) при 37 °С в течение 18 - 20 ч.

Все манипуляции с токсигенными штаммами *V. cholerae* проводились в соответствии СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности».

Выделение ДНК проводили методом протеиназного лизиса.

Аmplификацию мишеней проводили на амплификаторе С1000 (Bio-Rad) при параметрах: в монолокусном формате: 95°С – 3 мин, 35 циклов (94°С - 30 с, Т°С - 30 с, 72°С - 30 с), 72°С – 5 мин, где Т – температура отжига праймеров: *sulII* F/R и *strB* F/R - 61,8°С; *dfr18* F/R - 60,4°С; *dfrA1* F/R - 57,8°С; мультилокусном формате: 95°С - 3 мин, 35 циклов (94°С - 1 мин, 60,4°С - 1 мин, 72°С - 1 мин), финальная элонгация 72°С - 10 мин;. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

Результаты исследований и обсуждение

Скрининг последовательностей ICE семейства SXT/R391 в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп

В настоящей работе была исследована ДНК 108 антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп из коллекции Ростовского противочумного института, выделенных на территории Советского Союза и Российской Федерации за 40 лет в период с 1972 по 2012 годы.

Отдельные представители интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 не являются идентичными, но все эти ICE кодируют высоко гомологичную интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ *Int* и интегрируют в *prfC* – ген, кодирующий вспомогательный фактор терминации транскрипции [Ahmed A.M. et al, 2005; Ehara M. et al, 2004; Hochhut B. et al, 2001; Juiz-Rio S. et al, 2005]. Данное обстоятельство определило выбор в качестве мишени для поиска SXT элемента последовательности гена интегразы *int*_{SXT}.

Для детекции последовательностей гена интегразы *int* SXT-элемента были использованы две пары праймеров: SXT-F/SXT-B и INT1/INT2, характеристики которых приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Олигонуклеотидные праймеры для детекции гена интегразы *int*

Праймер	Последовательность	Размер ампликона	Мишень	Номер в Genbank/ автор
SXT-F	TTATCGTTTCGATGGC	820 п.н.	Ген интегразы	AF099172
SXT-B	GCTCTTCTGTCCGTTC			
INT1	GCTGGATAGGTTAAGGGCGG	592 п.н.	<i>int</i>	Hochhut B.
INT2	CTCTATGGGCACTGTCCACATTG			

Амплификация последовательности гена интегразы *int* с парами праймеров SXT-F/SXT-B и INT1/INT2 показала наличие искомой последовательности у 25 из 108 исследованных штаммов, причем, с обеими парами праймеров были получены идентичные результаты. Полученные данные свидетельствуют о наличии в их геномах ICE элемента семейства SXT/R391.

Кроме того, мы провели скрининг штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и штаммов *Vibrio* spp., не относящихся к виду *V. cholerae*, выделенных на территории Волгоградской области за эпидемические сезоны 2013-2014 гг., на наличие последовательности гена интегразы

int с праймерами SXT-F/SXT-B. Анализ выявил 40 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 из 66 выделенных в 2013 году и 25 штаммов *Vibrio* spp. из 38 выделенных в 2013 году, несущих данную генетическую структуру. В числе 46 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в 2014 году, SXT-положительных оказалось 18. Всего выявлено 58 SXT-положительных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и 25 *Vibrio* spp.

Таким образом, около 50 % изолятов из воды открытых водоемов в Волгоградской области содержат в своем геноме интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391.

Ретроспективный анализ выявления полирезистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп на территории СССР и РФ за период с 1972 по 2012 годы

Ретроспективный анализ паспортных данных полирезистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп из коллекции Ростовского-на-Дону противочумного института показал, что из 108 зарегистрированных за период с 1972 по 2012 годы резистентных штаммов 99 были выделены после 1992 года. За предшествующий 20-летний период на территории Советского Союза было выделено всего 9 штаммов холерных вибрионов, резистентных к двум и более антибактериальным препаратам. Семь из них выделены от больных и относятся к *V. cholerae* non O1/O139: 6079; 6089; 9727; 9729 (Ростов-на-Дону, 1971-75 гг.), 16141; 16145; 16150 (Узбекистан, 1987-90 гг.); один штамм *V. cholerae* O1 El Tor 8110 выделен из сточных вод г. Кировска в 1974 г. и второй *V. cholerae* O1 El Tor 13740 от больного в Ташкенте в 1988 г. Среди перечисленных штаммов только последний содержал в своем геноме SXT-элемент.

То есть, в нашей стране случаи завоза инфекции, обусловленной резистентными штаммами, стали регистрироваться значительно чаще после 1992 года, что совпадает с распространением по миру штаммов третьей волны 7-й пандемии и появлением в Индии новой эпидемически значимой O139-й серогруппы *V. cholerae*, характерной чертой которой была множественная резистентность. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Количество полирезистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ в разные временные промежутки

Период	Всего штаммов	Полирезистентных штаммов
1972 – 1991 гг	108	9
1992 – 2012 гг		99

Молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391

Из ряда SXT⁺ штаммов из коллекции Ростовского-на-Дону противочумного института, выделенных во время единых вспышек с идентичным фенотипом, для молекулярного типирования было выбрано по одному представителю – всего 14 штаммов.

Мы провели анализ трех локусов варибельной ДНК, которые могут содержать интрагенные вставки, несущие детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам. Варибельный регион в интрагенном пространстве оперона *gumAB*–*VRIII* может содержать транспозоноподобную структуру с кластером генов резистентности к триметоприму (*dfr18*), хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strAB*) и сульфаметаксазолу (*sulII*). Описанная структура кластера резистентности относится к ICE типа SXT^{MO10}. У элемента SXT^{ET}, характерного для *V. cholerae* O1 серогруппы, в кластере резистентности отсутствует ген дегидрофолатредуктазы *dfr18*, но имеется его аналог *dfrA1* вне кластера – в горячей точке HS3. Также SXT^{ET} может нести ген резистентности к канамицину (*kan*) в горячей точке HS5.

Молекулярное типирование штаммов, выделенных на территории РФ, в ПЦР с праймерами, специфичными искомым последовательностям SXT элементов продемонстрировало, что три штамма *V. cholerae* O1 El Tor (13740, 17372, 17827) содержали типичный SXT^{ET} с кластером генов антибиотикоустойчивости *sulII* – *strB* и генами резистентности *kan* и *dfrA1*, локализованными вне этого кластера в интрагенном пространстве горячих точек HS5 и HS3, соответственно. Четыре штамма *V. cholerae* O1 El Tor № 18378, 18826, 19241, 19243 содержали ICE типа SXT^{ET}, но без гена резистентности к канамицину в HS5. В штаммах *V. cholerae* O1 El Tor № 18367 и *V. cholerae* nonO1/nonO139 № 18640, 19190 детектирован вариант элемента SXT^{ET} - типа, несущий последовательность *dfrA1* в горячей точке HS3, не имеющий кластера резистентности в варибельном регионе *VRIII* и гена резистентности к канамицину в HS5. В трех штаммах – *V. cholerae* O1 ElTor № 18977 и *V. cholerae* nonO1/O139 № 17450, 18827 выявлены SXT элементы, полностью лишённые генов устойчивости к антибиотикам. В штамме *V. cholerae* O139 № 16064 обнаружен ICE с типичным для SXT^{MO10} кластером генов антибиотикоустойчивости *sulII* - *strB* - *dfr18* и содержащий в горячей точке HS5 ген резистентности к канамицину *kan*, характерный для типа SXT^{ET}. Сравнительный анализ геномов ICEs семейства SXT/R391 демонстрирует, что данные элементы часто являются мозаичными, сформировавшимися, по-видимому, в результате рекомбинации между различными «исходными» ICEs. В настоящем исследовании в геноме штамма *V. cholerae* O139 16064 нами обнаружен такой гибридный элемент.

Таким образом, мы выявили пять типов ICE элементов, обозначенные в соответствии с принятой номенклатурой ICE *VchRus0*, ICE *VchRus1*, ICE *VchRus3* и ICE *VchRus4*(SXT^{ET}) и ICE *VchRus4*(SXT^{hyb}). Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Характеристика ICE элементов, обнаруженных в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ

№ Штамма	ICE <i>VchRus0</i>	ICE <i>VchRus1</i>	ICE <i>VchRus3</i>	ICE <i>VchRus4</i>	ICE <i>VchRus4</i> (SXT ^{hyb})
13740O1 El Tor				SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB, kan)	
17372 O1 El Tor				SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB, kan)	
17827 O1 El Tor				SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB, kan)	
18367 O1 El Tor		SXT ^{ET} (dfrA1)			
18378 O1 El Tor			SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB)		
18826 O1 El Tor			SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB)		
18977 O1 El Tor	SXT (ΔR)				
19241O1 El Tor			SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB)		
19243O1 El Tor			SXT ^{ET} (dfrA1, sulII, strB)		
16064 O139					SXT ^{MO10} (dfr18, sulII, strB, kan)
17450 non O1/O139	SXT (ΔR)				
18640 non O1/O139		SXT ^{ET} (dfrA1)			
18827 non O1/O139	SXT (ΔR)				
19190 non O1/O139		SXT ^{ET} (dfrA1)			
Токсигенность	<i>ctx-</i> , <i>tcp-</i>	вариабельно	<i>ctx+</i> , <i>tcp+</i>	<i>ctx+</i> , <i>tcp+</i>	<i>ctx+</i> , <i>tcp+</i>

Интересно, что все три штамма, содержащие идентифицированный в настоящей работе ICE *VchRus0*, а также штамм *V. cholerae* O1 El Tor Inaba B-161, выделенный из воды р. Волга в 1993 году, с ICE, также не содержащим генов резистентности [Подшивалова, М.В. с соавт., 2011], были атоксигенными, а все штаммы, ICEs которых имели не менее трех генов резистентности, содержали в своем геноме СТХφ и VPI-1.

На основании анализа относительно небольшой выборки ICE-положительных штаммов делать вывод о наличии корреляции между присутствием в геноме клетки-хозяина профага СТХφ, острова патогенности VPI-1 и количеством генов резистентности в составе ICE, на наш взгляд, некорректно. Однако, нельзя исключать вероятность наличия среди генов с неизвестными функциями СТХφ и/или VPI-1 факторов, которые облегчают приобретение новой ДНК, аналогично недавно обнаруженному H-NS-подобному белку, кодируемого конъюгативной плазмидой *Shigella flexneri* pSf-R27, который минимизирует изменение уровня транскрипции генов хозяина после приобретения дополнительной ДНК [Doyle M. et al, 2007].

Определение наборов детерминант резистентности в составе ICE штаммов *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области

В работе было исследовано 112 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп, 38 штаммов рода *Vibrio* spp., не относящиеся к виду *V. cholerae*, выделенных из объектов внешней среды (поверхностные водоемы) на территории Волгоградской области.

Наличие генов резистентности в составе ICEs, обнаруженных в штаммах холерных и других вибрионов, анализировали в форматах моно- и мультилокусной ПЦР. У всех исследованных штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 обнаружены фрагменты гена *dfr18* ожидаемого размера 389 п.н., кроме того, у штаммов 233 и 298-13 выявлены специфические ампликоны (515 п.н.) с праймерами *strB*. Среди всех исследованных штаммов *Vibrio* spp. единственный штамм 287-9 содержал ген резистентности к триметоприму *dfrA1* (ампликон размером 278 п.н.)

Анализ вариабельного региона VR III обнаруженных ICEs региональных экологических штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 показал наличие интегрированного в локус *rumB* кластера резистентности с частичными делециями. Мы идентифицировали два варианта состава кластера: у семи штаммов (127, 135, 162, 174, 270-1, 305-9 и 982) он был представлен только геном резистентности к триметоприму *dfr18*, у двух штаммов (233 и 298-13) присутствовали детерминанты устойчивости к стрептомицину (*strB*) и триметоприму (*dfr18*). Известно, что *dfr18* специфичен для штаммов *V. cholerae* O139, в то время как *dfrA1* является специфическим для *V. cholerae* O1 El Tor, т.е., описываемые ICEs *V. cholerae* nonO1/nonO139 относятся к типу

SXT^{MO10}. В 16 региональных штаммах *V. cholerae* nonO1/nonO139 ICEs не несли генов резистентности, этот тип элемента мы обозначили SXT(ΔR). Ни в одном из ICEs исследованных штаммов *Vibrio* spp. кластера генов резистентности в VR III не обнаружено. Известно, что его наличие не является маркерным признаком ICEs семейства SXT/R391. Так, ранее описаны элементы этого семейства ICE VchMex1 из штамма *V. cholerae* неопределенной серогруппы и ICE VchHKO1 *V. cholerae* O139, ICE VflTha2 *V. fluvalis* V49, ICE VvuTha1 *V. vulnificus* V268, в которых кластер резистентности отсутствовал. В ICE единственного штамма *Vibrio* sp. 287-9 мы обнаружили вставку в HS3, содержащую ген резистентности к триметоприму *dfrA1*, характерный для SXT^{ET} штаммов *V. cholerae* O1. Результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Результаты типирования региональных штаммов *Vibrio* spp.

	Тип элемента	Наличие специфического ампликона				
		<i>S026-027</i> (653 п.н.)	<i>SUL II</i> (628 п.н.)	<i>STR B</i> (515 п.н.)	<i>DFR18</i> (O139) (389 п.н.)	<i>DFRA1</i> (O1) (278 п.н.)
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (7 штаммов)	SXT ^{MO10}	-	-	-	+	-
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (2 штамма)	SXT ^{MO10}	-	-	+	+	-
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139 (16 штаммов)	SXT(ΔR)	-	-	-	-	-
<i>Vibrio</i> sp. 287-9	SXT ^{ET}	-	-	-	-	+
<i>Vibrio</i> spp. (24 штамма)	SXT(ΔR)	-	-	-	-	-

Таким образом, в региональных изолятах *V. cholerae* nonO1/nonO139 идентифицировано три типа ICE: SXT^{MO10} (*dfr18*), SXT^{MO10} (*strB*, *dfr18*) и SXT(ΔR), а у штаммов нехолерных вибрионов – два типа: SXT^{ET} (*dfrA1*) и SXT(ΔR).

Выше уже упоминался штамм *V. cholerae* O1 El Tor Inaba B-161, выделенный на территории Волгоградской области из волжской воды, ICE которого не содержал генов резистентности. Весьма высока вероятность того, что именно этот штамм являлся источником интегративных конъюгативных элементов SXT(*AR*) для автохтонной вибриофлоры нашего региона, в которой он сохраняется уже более 20 лет.

Интересно отметить, что из 24 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в период 2003-2007 гг. в Волгоградской области, только два (18/841 и 34-I) имели в составе генома интегративные конъюгативные элементы SXT^{MO10} типа, в кластере резистентности которых присутствовали гены *dfr18* и *suIII*. Тогда как среди штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных через 10 лет, более 50 % содержали ICEs также SXT^{MO10} типа, но с иными вариантами состава кластера генов резистентности.

Таким образом, показано присутствие и быстрое распространение среди вибриофлоры региональных открытых водоемов интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391. Этот факт следует учитывать, поскольку штаммы *V. cholerae* nonO1/nonO139, а также родственные вибрионы могут служить источником для вибрионов эпидемически значимых серогрупп новых, ранее не встречавшихся у них признаков [Rodríguez-Blanco A. et al, 2012].

Считалось, что распространение генов резистентности – это основная роль интегративных конъюгативных элементов, но сейчас очевидно, что ICEs могут быть посредником для передачи самого разнообразного набора функций. Они позволяют бактериям быстро адаптироваться к новым условиям окружающей среды и колонизировать новые ниши.

ICEs обеспечивают свое собственное разнообразие путем формирования рекомбинантных элементов, несущих новые комбинации генов, в том числе, детерминант устойчивости к антибиотикам, расширяющих адаптивный потенциал бактериальных видов. Обнаружение последовательностей интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 и выявленные различия их структуры и вариабельности состава кластера генов антибиотикорезистентности в исследованных нами штаммах *V. cholerae* подтверждают важную роль данных генетических элементов в формировании множественной устойчивости возбудителя холеры к антимикробным соединениям.

В заключение еще раз подчеркнем, что горизонтальный перенос генов играет фундаментальную роль в бактериальной эволюции, а разнообразные мобильные генетические элементы, включая ICEs, позволяют бактериальным видам приобретать новые фрагменты ДНК, кодирующие широкий спектр новых функций, способствуют поддержанию внутривидового генетического разнообразия и обеспечивают перенос генетического материала между различными видами и родами бактерий. Кроме обеспечения генетического разнообразия,

конъюгационный перенос является основным механизмом распространения устойчивости к антибиотикам.

Проблема антибиотикорезистентности среди клинически значимых микроорганизмов уходит своими корнями в сложные экологические и эволюционные отношения между самими микроорганизмами, сложившиеся задолго до появления человека как биологического вида.

Интерпретация широкого распространения в клинике антибиотикорезистентных штаммов бактерий как явления, вызванного исключительно применением антибиотиков, сильно упрощает понимание данной проблемы и порождает иллюзию возможности ее решения путем ограничения использования антибиотиков в клинической практике [Супотницкий М.В. с соавт., 2011]. Целесообразно расширить круг исследуемых проблем, связанных с распространением антибиотикорезистентных патогенных микроорганизмов в клинике, включив в него процессы, благодаря которым происходит накопление и обмен генов антибиотикорезистентности среди бактерий в природных экосистемах.

Молекулярно-генетический анализ детерминант резистентности *V. cholerae* является важным направлением исследований, необходимым для понимания адаптационных механизмов и эволюции микроорганизма, а также дальнейшего совершенствования средств и методов эпидемиологического надзора за холерой.

Выводы

1. Ретроспективный анализ штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных в период с 1972 по 2012 годы и резистентных к двум и более антибактериальным препаратам, из коллекции ФКУЗ Ростовский противочумный институт Роспотребнадзора показал, что из 108 зарегистрированных за этот период резистентных штаммов 99 были выделены после 1992 года. То есть, учащение случаев завоза в Российскую Федерацию холеры, обусловленной резистентными штаммами *V. cholerae*, коррелирует с третьей волной распространения в мире штаммов 7-ой пандемии в начале 1990-х годов.

2. Показано, что около 50 % изолятов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и близкородственных вибрионов из воды открытых водоемов в Волгоградской области, выделенных в 2013-2014 годах, содержат в своем геноме интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391.

3. Молекулярное типирование ICE семейства SXT/R391 региональных экологических штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 по составу кластера резистентности выявило наличие трех типов элементов: SXT(Δ R) – не несет кластера резистентности

(16 штаммов), SXT^{MO10} (*dfr18*) – содержит в кластере ген устойчивости к триметоприму (7 штаммов) и SXT^{MO10} (*strB*, *dfr18*) – гены устойчивости к стрептомицину и триметоприму.

4. Установлено, что в составе всех ICE семейства SXT/R391 региональных штаммов *Vibrio* spp. отсутствует кластер резистентности в варибельном регионе VR III; среди них обнаружен единственный элемент типа SXT^{ET} (ΔR , *dfrA1*), с наличием гена *dfrA1* в HS3 вне кластера.

5. Молекулярное типирование ICEs штаммов, выделенных на территории РФ, разделило исследованные элементы по 5 группам: элементы, полностью лишенные генов устойчивости к антибиотикам – ICE *VchRus0*; типичные SXT^{ET} с кластером генов *suIII* - *strB* и генами *kani* *dfrA1* вне кластера – ICE *VchRus4*(SXT^{ET}); SXT^{ET}, но без гена резистентности к канамицину в HS5 – ICE *VchRus3*; SXT^{ET}, несущий последовательность *dfrA1* в горячей точке HS3, и не имеющий кластера резистентности в VR III и гена *kan* в HS5 – ICE *VchRus1*; гибридный ICE с типичным для SXT^{MO10} кластером *suIII* - *strB* - *dfr18* и содержащий в горячей точке HS5 ген резистентности к канамицину *kan*, характерный для типа SXT^{ET} – ICE *VchRus4*(SXT^{hyb}).

По теме диссертации опубликованы следующие работы:

1. **Замарин, А.А.** Характеристика интегративных конъюгативных элементов штаммов нехолерных вибрионов, выделенных на территории Волгоградской области / **А.А. Замарин**, И.Б. Захарова, М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, Н.Н. Тетерятникова, Я.А. Лопастейская, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2016. - № 2 (58). – С. 104-106 (журнал из перечня ВАК).
2. Захарова, И.Б. Детекция и анализ интегративных конъюгативных элементов в штаммах *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области / И.Б. Захарова, Ю.А. Кузютина, М.В. Подшивалова, **А.А. Замарин**, А.В. Топорков, Д.В. Викторов // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2016. - № 21(6). – С. 347-351 (журнал из перечня ВАК).
3. Захарова, И.Б. Оценка распространенности интегративных конъюгативных элементов в штаммах микроорганизмов рода *Vibrio*, выделенных на территории Волгоградской области / И.Б. Захарова, М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, Я.А. Лопастейская, **А.А. Замарин** // Сборник «Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-

эпидемиологической охране территории Российской Федерации». – 2016. - № 29. - С. 146-149.

4. **Замарин А.А.** Идентификация и дифференциация холерных вибрионов не о1/ не о139 серогрупп и близкородственных видов / **А.А. Замарин**, Я.А. Лопастейская, Т.Н. Шаров, И.Б. Захарова // Сборник «Холера и патогенные для человека вибрионы: сборник статей проблемной комиссии (48.04) Координационного научного совета по санитарно-эпидемиологической охране территории Российской Федерации». – 2017. - С.155-159.

Список сокращений, используемых в тексте

П.н. - пара нуклеотидов;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ctxAB – оперон, локализованный в геноме профага СТХф, кодирующий холерный токсин.

HS- Hot spot - горячие точки;

ICE – integrative conjugative element – интегративный конъюгативный элемент;

In1 - интегрон класса 1;

intI - ген, кодирующий интегразу интегронов семейства тирозиновых рекомбиназ;

kan - ген резистентности к канамицину;

sulI - ген резистентности к сульфонидам;

VR – variable region – переменный регион.

Замарин Антон Александрович

**ДЕТЕКЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
СЕМЕЙСТВА SXT/R391 В ШТАММАХ *VIBRIO CHOLERAЕ* РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Подписано в печать 02.07.2018

Формат 60×84 1/16. Объем 18,0 п.л.

Тираж 100. Заказ № 86

Отпечатано в типографии по адресу: