

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И
БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

ЗАМАРИН АНТОН АЛЕКСАНДРОВИЧ

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

03.02.03 – микробиология

Диссертация

на соискание учёной степени кандидата медицинских наук



Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Захарова И.Б.

Волгоград 2018

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1 Распространение холеры	11
1.2 Краткая характеристика рода <i>Vibrio</i>	16
1.3 Общая характеристика генома возбудителя <i>Vibrio cholerae</i>	19
1.3.1 Структура генома <i>Vibrio cholerae</i>	19
1.3.2 Генетическое разнообразие холерных вибрионов	21
1.3.3 Мобильные генетические элементы как источник генетического разнообразия холерных вибрионов	26
1.4 Интегративные конъюгативные элементы (ICE)	30
1.4.1 Характеристика и номенклатура ICE	30
1.4.2 Распространенность ICE	32
1.4.3 Структура элементов семейства SXT/R391 и пути ее эволюции	33
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	37
2.1 Штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования	37
2.2 Выделение нуклеиновых кислот	45
2.3 Постановка ПЦР	46
2.4 Анализ продуктов амплификации	47
ГЛАВА 3 ДЕТЕКЦИЯ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА SXT/R391 В ШТАММАХ <i>V. CHOLERAЕ</i> РАЗЛИЧНЫХ СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ	48
3.1 Скрининг последовательностей ICE семейства SXT/R391 в штаммах <i>V. cholerae</i> различных серогрупп	48

3.2 Ретроспективный анализ выявления полирезистентных штаммов <i>V. cholerae</i> различных серогрупп на территории СССР и РФ за период с 1972 по 2012 годы	53
ГЛАВА 4 МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА SXT/R391	55
4.1 Определение наборов детерминант резистентности в составе ICE штаммов <i>V. cholerae</i> различных серогрупп, выделенных на территории РФ	56
4.2 Определение наборов детерминант резистентности в составе ICE штаммов <i>Vibrio</i> spp., выделенных на территории Волгоградской области	66
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	70
ВЫВОДЫ	78
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	80
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	82

ВВЕДЕНИЕ

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 [89]. 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 [141]. Распространение генов резистентности среди возбудителей инфекционных болезней человека в настоящее время приняло угрожающий характер [135].

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 [21]. Среди выделенных на территории нашего региона штаммов *V. cholerae* различных серогрупп также

имеются изоляты, обладающие широкими спектрами устойчивости к антибиотикам различных классов [2, 5, 10, 11, 12].

Появление устойчивых к антибиотикам штаммов существенно снижает эффективность лечения холеры имеющимися на настоящий момент препаратами. Множественная устойчивость к антибиотикам у *V. cholerae* может формироваться в результате горизонтального генетического переноса, опосредованного трансмиссивными плазмидами, интегронами, а также интегративными конъюгативными элементами (ICE) [24, 73, 93].

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 [18, 41, 70].

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 работы - 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 переменных последовательностей горячих точек HS3, HS5 и переменного 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* КМ 2025 и *Vibrio cholerae* nonO1/nonO139 КМ 2026, соответственно.

Методология и методы исследования

Изучение распространенности интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации, проводили с использованием следующего алгоритма: из числа коллекционных штаммов методом ретроспективного анализа паспортных данных было выбрано 108 штаммов *V. cholerae* O1, O139 и nonO1/nonO139 серогрупп, устойчивых к двум и более антибактериальным препаратам, ДНК которых была исследована на наличие гена интегразы SXT. Также был проведен скрининг на наличие интегративных конъюгативных элементов 112 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 серогрупп и 38 штаммов рода *Vibrio* spp., выделенных из объектов внешней среды (поверхностные водоемы), на территории Волгоградской области. Молекулярное типирование SXT-положительных изолятов проводили путем анализа структуры переменных последовательностей горячих точек HS3, HS5 и переменного региона VRIII интегративных конъюгативных элементов. В работе были использованы бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования.

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.

Публикации

Результатом научной работы являются четыре публикации по теме диссертации, в том числе две статьи, опубликованные в рецензируемых периодических изданиях, входящих в перечень ВАК.

Структура и объем диссертации

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

1.1 Распространение холеры

На протяжении столетий холера оставалась одной из самых страшных болезней. Описания болезни на индийском субконтиненте, считающейся холерой, встречаются на санскрите еще в V веке до нашей эры. Приблизительно в это же время заболевание было описано Гиппократом. Традиционно считается, что регион происхождения инфекции – дельта Ганга и Брахмапутры в Индии и Бангладеш, откуда холера распространилась по всему миру. Холера эндемична в Африке, Южной и Юго-Восточной Азии и практически ликвидирована в большинстве развитых стран [66]. Холера по-прежнему является одной из основных проблем общественного здравоохранения и затрагивает, прежде всего, развивающиеся страны мира, население которых не имеет надлежащего доступа к адекватным ресурсам водоснабжения и санитарии.

Об эпидемиях холеры в Азии известно начиная с XV века. С 1817 по 1926 года произошло 6 пандемий холеры, вызванных *Vibrio cholerae asiaticae*, которые охватывали, в том числе, и Россию, унеся множество жизней.

В XVIII веке Джон Сноу во время вспышки холеры в Сохо в 1854 году впервые установил связь между распространением холеры и загрязненной водой. В своем фундаментальном труде «On The Mode of Communication of Cholera» он ввел понятия, которые все еще являются частью основного инструментария современной эпидемиологии: источник инфекции и инкубационный период [74]. Этиологический агент азиатской холеры был впервые описан Филиппо Пачини в 1854 году. Он первым применил родовое название *Vibrio* с конкретным эпитетом *cholerae* для бактерии, которая являлась причиной азиатской холеры. Филиппо Пачини – профессор патологии в Королевском институте высших исследований во Флоренции изучал азиатскую холеру во время эпидемии в 1854 году в Тоскане и интересовался этим заболеванием всю жизнь. Бьянки (1885) опубликовал после смерти Пачини неотредактированные лабораторные заметки и иллюстрации,

которые Пачини делал при изучении трупов жертв холеры во Флоренции. Пачини увидел в огромных количествах изогнутый этиологический агент азиатской холеры в эпителии кишечного тракта и в содержимом кишечника умерших [74].

Роберт Кох (1884) был первым, кто выделил возбудителя азиатской холеры. Он дал более подробное описание микроорганизма и использовал название *Komma bacillus*, не зная, что Пачини описал и назвал его *Vibrio cholerae* 30 годами ранее в 1854 году. Итальянский систематик граф Витторе Тревисан предложил в 1885 году принять родовое название, предложенное Пачини [74].

Возбудитель холеры – грамотрицательная, подвижная, изогнутая палочка - *V. cholerae*, в естественных условиях обитающая как в морской, так и пресной воде [66]. В воде холерные вибрионы способны переходить в жизнеспособную, но некультивируемую форму [105].

На основании различий в структуре липополисахарида О-антигена *V. cholerae* подразделяется на более чем 200 серогрупп [66]. Из них только две серогруппы О1 и О139 вызывают эпидемическую холеру. *V. cholerae* О1 далее делится на два биотипа, классический и El Tor [116]. Помимо этого существует два основных серотипа - Огава и Инаба, которые различаются по распространенности [90].

Седьмая пандемия холеры, вызванная биотипом *V. cholerae* О1 El Tor началась в Индонезии на о. Сулавеси в 1961 году [25]. К 1965 г. холера достигла Афганистана и Ирана, была завезена на территорию СССР в Узбекистан и Каракалпакию, в 1970 г. значительные эпидемические вспышки произошли в регионах Черноморского и Каспийского бассейнов. В 1970-е годы холера продолжала распространяться через Африку, вспышки произошли в Европе [23], и отдельные случаи в 1983 году были зафиксированы в прибрежных районах Соединенных Штатов Америки, граничащих с Мексиканским заливом, и в Мексике [80; 29].

По мере распространения седьмой пандемии холеры биотип *V. cholerae* О1El Tor полностью заменил вибрионы классического биотипа. Однако, в 1979 году, после многих лет отсутствия, в Бангладеш вновь появились штаммы

классического биотипа [119], что свидетельствует об их длительном выживании на уровнях ниже порога обнаружения. Причины повторного появления классического холерного вибриона, как и причины его вытеснения до конца не ясны.

В конце 1992 г. во время вспышек холеры на юго-востоке Индии был выделен еще один эпидемически значимый вариант холерного вибриона – *V. cholerae* O139 Bengal. Штаммы данной серогруппы быстро распространились по всей Азии и на время вытеснили *V. cholerae* O1 как основную причину холеры в Индии и Бангладеш [104].

На рисунке 1 показано общее количество вспышек холеры в течение 32-летнего периода исследования. Приведенные данные хорошо демонстрируют тот факт, что в странах, расположенных вблизи экватора, больше вспышек по сравнению со странами в более высоких географических широтах [55].

В последние десятилетия максимальный уровень заболеваемости холерой приходился на Африканский континент: до 98 % от общего числа случаев в мире в период 2001-2009 годов и до 44 % в 2013 году [76].

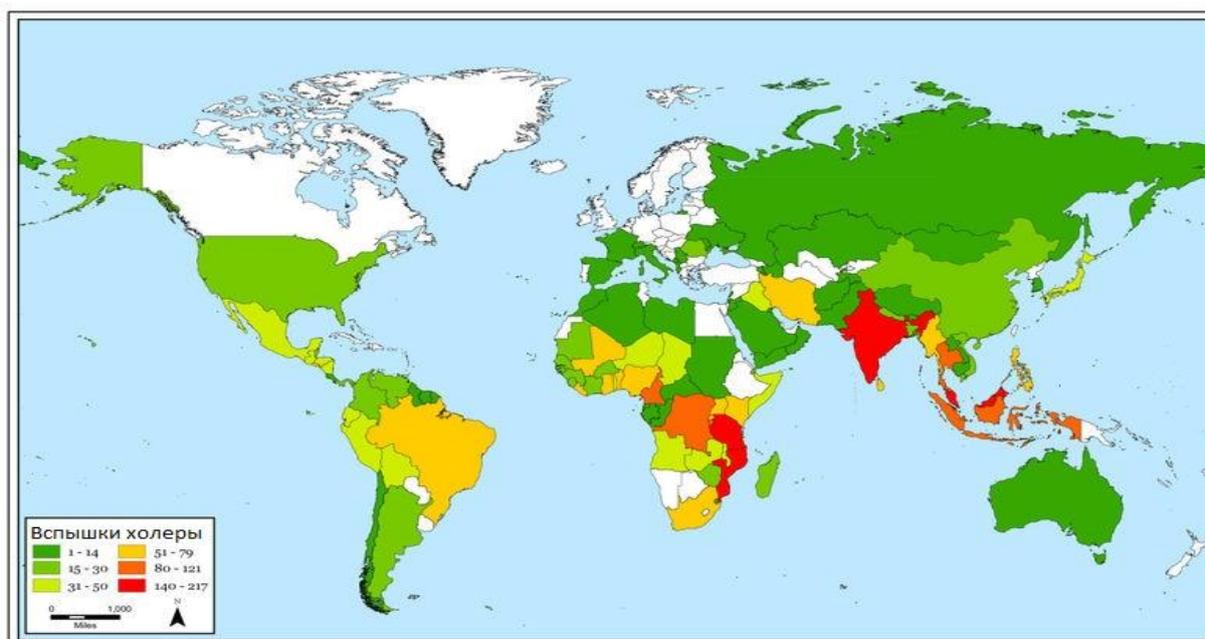


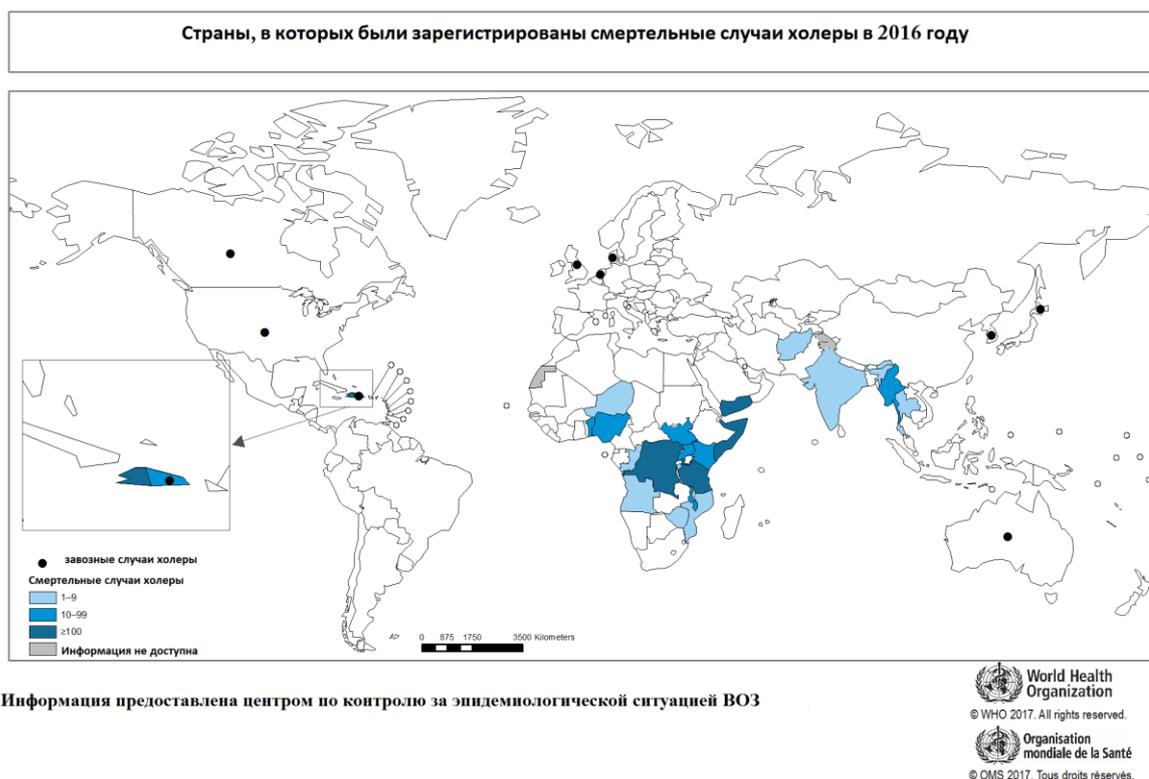
Рисунок 1 - Распределение вспышек холеры в мире в 1974-2005 годах.

В 2013 году о вспышках холеры ВОЗ информировали 26 стран, 17 из которых – страны Африки, где было зарегистрировано большинство смертельных случаев (65 %).

Недавняя вспышка холеры на Гаити является наглядным напоминанием о том, насколько значительную роль в распространении холеры играют, наряду с природными факторами, социально-экономические условия. После сильного землетрясения в январе 2010 года более миллиона человек остались без крова. Первый случай холеры был диагностирован 21 октября 2010 года. Необычайно жаркий летний сезон на фоне разрушенной инфраструктуры и последующий ураган, вызвавший наводнение, привели к стремительному распространению инфекции по всей территории Гаити. Всего за один год после начала эпидемии заболело около 500 000 человек, из которых 6500 умерли [57]. По данным ВОЗ, к настоящему времени эпидемия идет на спад, но до конца не ликвидирована: за четыре месяца 2017 года зарегистрировано в общей сложности 4 871 случаев холеры, в том числе 69 смертельных, что приблизительно на 60 % ниже, чем за аналогичные периоды 2015 и 2016 годов.

В 2015 году ВОЗ сообщала о 172 454 случаях (из них - 1304 смертельных) холеры. В целом, 41 % случаев было зарегистрировано в Африке, 37 % - в Азии и 21 % - в Северной и Южной Америках.

По информации Роспотребнадзора в 2016 году холера зарегистрирована в 18-ти странах мира, и число заболевших составило свыше 54 тыс. человек. Наиболее сложная обстановка по холере продолжала оставаться на Гаити, где отмечено более 25 000 заболевших, в Танзании (13 000 заболевших) и Демократической Республике Конго (11 000 заболевших), Йемен (368 000 заболевших). В этом же году отмечено осложнение эпидемиологической ситуации по холере на Украине, где в сопредельных с Россией областях зарегистрировано более 30 случаев заболевания. На рисунке 2 показаны страны, в которых были зарегистрированы смертельные случаи холеры в 2016 году (информация World Health Organization).



Информация предоставлена центром по контролю за эпидемиологической ситуацией ВОЗ

Рисунок 2 – Распределение зарегистрированных смертельных случаев холеры в 2016 году (по данным ВОЗ).

Эпидемиологическая обстановка по холере в России характеризуется как неустойчивая, что обусловлено высокими рисками завоза инфекции из неблагоприятных по холере регионов мира. Все зарегистрированные в стране вспышки инфекции являются импортированными. Так, причиной эпидемических вспышек холеры в Дагестане в 1994 (было зарегистрировано 2359 больных и вибрионосителей в 187 населенных пунктах 27 районов и 8 городах) и 1998 гг. был завоз паломниками инфекции из Саудовской Аравии [7]. Вспышка холеры в 1999 г. в Приморском крае (66 больных холерой и 21 вибрионоситель) была обусловлена завозом инфекции из Китая [8]. За последние годы на территории России зарегистрированы отдельные завозные случаи холеры: в 2001 г. в Республике Татарстан, в 2004 и 2008 гг. – в Республике Башкортостан, в 2006 г. – в Мурманске, в 2010, 2012 и 2014 гг. – в Москве [9].

V. cholerae как вид включает как патогенные, так и непатогенные штаммы, различающиеся по содержанию и набору генов вирулентности [58]. Сравнительно

недавно (1990–1991 гг.) стало очевидным возникновение новых генетически измененных штаммов возбудителя холеры EI Tor или геновариантов, отличающихся более высокой вирулентностью. Считают, что такие геноварианты появились в результате приобретения типичными штаммами *V. cholerae* EI Tor профага CTXφ^{Class} классических вибрионов или его гена *ctxB1* путем горизонтального переноса генов [13].

Изучение молекулярно-генетических особенностей холерных вибрионов способствует пониманию механизмов эволюции патогена и появления штаммов с новыми свойствами, а также определяет возможность выявления потенциальных источников инфекции, что является одной из основных задач молекулярно-эпидемиологического мониторинга за холерой.

Волгоградская область, наряду с Астраханской и Ростовской, при районировании субъектов Российской Федерации по типу эпидемических проявлений холеры отнесена к I типу с высокой или повышенной степенью потенциальной опасности водного пути распространения возбудителя инфекции, что свидетельствует о необходимости постоянного совершенствования системы эпидемиологического надзора, в том числе с применением молекулярных методов.

1.2 Краткая характеристика рода *Vibrio*

Ранее к роду *Vibrio* относили большое количество разнообразных грамотрицательных палочковидных бактерий с полярными жгутиками. Однако в середине 60-х годов Международным комитетом по таксономии вибрионов были установлены дополнительные критерии для рода *Vibrio*. В итоге большинство видов, ранее классифицированных как *Vibrio*, были исключены из этого рода. С другой стороны, таксономические исследования родственных организмов показали тесную связь между тремя родами *Vibrio*, *Aeromonas* и *Plesiomonas* [52].

Таксономическое положение холерных вибрионов (по Bergeys manual of systematic bacteriology, 2009):

Царство: Бактерии

Тип: Протеобактерии

Класс: Гамма-протеобактерии

Порядок: *Vibrionales*

Семейство: *Vibrionaceae*

Род: *Vibrio*

Вид: *Vibrio cholerae*

Дифференциация представителей рода *Vibrio* от родственных родов проводится на основе биохимических характеристик. Используемая в настоящее время классификация была предложена West и Colwell [137]. Род *Vibrio* содержит несколько видов, из которых *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* и *V. vulnificus* являются наиболее важными патогенами человека. В то время как *V. parahaemolyticus* вызывает диарею, инфекции, вызванные *V. vulnificus*, могут варьироваться от саморазрешающегося гастроэнтерита и раневых инфекций до тяжелых некротизирующих инфекций мягких тканей, а также смертельной септицемии [136]. *V. mimicus* также может вызывать диарею, а некоторые его штаммы продуцируют термостабильный токсин [99, 110].

V. cholerae классифицируется по наличию соматических антигенов (О-антигенов) в серовары, существует более 200 известных сероваров [26]. До недавнего времени серогруппа O1 включала все эпидемически значимые штаммы возбудителя холеры; она имеет два основных серотипа: Огава и Инаба, а серотип Гикошима встречается редко. Эти серотипы можно разделить на два биотипа, классический и El Tor, основанные на некоторых биохимических свойствах и восприимчивости к бактериофагам [118].

Существует не менее 200 известных серогрупп вибрионов nonO1. Эти вибрионы обладают биохимическими и морфологическими характеристиками,

очень сходными с таковыми у вибриона холеры, но не агглютинируют с поливалентной O1 антисывороткой. Такие вибрионы агглютинируются их собственной антисывороткой. Серогруппа *V. cholerae* nonO1 была связана, главным образом, со спорадическими случаями диареи и внекишечных инфекций [77]. Однако, в 1992 году, было обнаружено, что крупная холероподобная вспышка в Бангладеш и Индии вызвана *V. cholerae* non-O1 штаммом. Этот штамм не принадлежал ни к одной из 138 известных на тот момент O-серогрупп *V. cholerae*, а был отнесен к новой серогруппе, которая позже была обозначена O139. С тех пор *V. cholerae* O139 считают вторым этиологическим агентом холеры. Следовательно, в настоящее время существуют две серогруппы O1 и O139, которые связаны с эпидемическим заболеванием. Среди штаммов этих серогрупп имеются те, которые лишены генов stxAV. Такие штаммы не являются эпидемически опасными, но бывают связаны с локальными вспышками острых кишечных инфекций (ОКИ) и заслуживают особого внимания.

Морфология и тинкториальные свойства. Для холерного вибриона характерен выраженный полиморфизм. Вибрион имеет форму палочки (длина 1,5 -3 мкм, ширина 0,2 -0,4 мкм) с различной степенью изогнутости. Возбудитель холеры может принимать форму прямых палочек, нитей, длинных спиралей, кокков при выращивании на искусственных питательных средах и в организме больных. *V. cholerae* является грамотрицательным микроорганизмом, который не образует спор и капсул, подвижен. Бактерия окрашивается всеми анилиновыми красителями [3].

Культуральные и биохимические свойства. Возбудитель холеры - строгий аэроб, хорошо растет и быстро размножается на плотных и жидких средах с щелочным рН (7,6 - 8,2), оптимум роста 37 °С. Через 10—12 часов роста на мясо-пептонном щелочном агаре образуются круглые, с ровным краем, колонии с гладкой поверхностью, в проходящем свете прозрачные с голубоватым оттенком и маслянистой консистенцией. С течением времени колонии мутнеют. В качестве элективной среды для ранней диагностики холеры используют пептонную воду (рН 8,0). На щелочной пептонной воде вибрион растет быстро, через 6-8 часов

появляется нежная тонкая пленка. В процессе роста холерный вибрион может диссоциировать из S-формы в R-форму. Выросшие на пептонной воде R-формы образуют грубую сухую морщинистую пленку. Возбудитель холеры ферментирует глюкозу, левулезу, галактозу, сахарозу, мальтозу, маннозу и крахмал с образованием кислоты без газа, не изменяет лактозу, арабинозу, дульцит. Образует индол, аммиак и сероводород, восстанавливает нитраты в нитриты [3].

1.3 Общая характеристика генома возбудителя *Vibrio cholerae*

1.3.1 Структура генома *Vibrio cholerae*

Первый проект по секвенированию генома *Vibrio cholerae* O1 biovar El Tor 16961 был осуществлен в конце 1990-х годов в The Institute for Genomic Research (Rockville, США) - TIGR, и его результаты были опубликованы в журнале «Nature» в августе 2000 г. [69, 144]. Геном возбудителя общим размером 4 033 460 п.н. представлен двумя циркулярными хромосомами: большой, обозначенной как хромосома 1 (2 961 146 п.н.) и малой – хромосома 2 (1 072 314 п.н.), со средним содержанием G + C 46,9 % и 47,7 %, соответственно.

В распределении генов между двумя хромосомами существует выраженная асимметрия. На хромосоме 1 локализованы большинство генов, ответственных за репликацию, репарацию ДНК, транскрипцию, трансляцию, биосинтез клеточной стенки и O-антигена, а также разнообразных общих катаболических и биосинтетических путей. Часть генов систем репарации (*alkA*, *ada1*, *ada2*, *phr3*, *mutK*, *sbcCD*, *dcm*, *mutT3*) локализованы на малой хромосоме. На большей хромосоме присутствуют все опероны рибосомальных РНК, а также, как минимум, по одной копии всех тРНК, четыре из которых дублируются на второй хромосоме. Однако некоторые из генов домашнего хозяйства, например, гены

рибосомальных белков L20 и L35 обнаружены только на хромосоме 2. На большой хромосоме также расположены гены факторов патогенности: холерного токсина, токсин-корегулируемых пилей, систем секреции. Здесь же располагается ген, определяющий синтез нейраминидазы, способствующей реализации действия токсина, и ген мальтоза-чувствительного гемагглютинина. При этом гены факторов колонизации кишечника – энтеротоксигенного гемолизина (*hlyA*) и растворимой гемагглютининпротеазы (*hap*), которая, деструктивно воздействуя на рецепторы кишечного эпителия, колонизированные вибрионами, способствует выведению возбудителя из кишечника во внешнюю среду, находятся на хромосоме 2 [69].

Хромосома 2, предположительно, изначально была мегаплазмидой, захваченной предковым видом *Vibrio*, поскольку она содержит значительное количество генов, нехарактерных для γ -протеобактерий. Малая хромосома содержит большую долю (59 %) гипотетических генов и генов неизвестной функции, по сравнению с хромосомой 1 (42 %). Значительная часть генов гипотетических белков на хромосоме 2 локализованы в области суперинтегрона. Хромосома 2 также несет ген 3-гидрокси-3-метилглутарил-СоА-редуктазы, возможно, приобретенный от архей [69, 144].

Для 105 генов обнаружена локализация на обеих хромосомах, по меньшей мере, по одной из ORF на каждой, что указывает на наличие относительно недавних рекомбинаций между хромосомами. Несколько ORF с явно идентичными функциями существуют на обеих хромосомах. Например, два гена *glyA* (кодирующие серингидрокси-метилтрансферазу), локализованные на разных хромосомах, имеют различное происхождение: копия *glyA* большей хромосомы при филогенетическом анализе группируется с таковыми альфа-протеобактерий, тогда как копия с хромосомы 2 – с ORF гамма-протеобактерий. Также на обеих хромосомах обнаружены опероны двух разных фосфатных транспортеров. Интересно, что структурный ген и его регулятор могут быть расположены на разных хромосомах, как в случае энтеротоксигенного гемолизина HlyA, ген

которого находится на хромосоме 2, а ген *hlyU* его транскрипционного регулятора – на первой [69].

Анализ геномов *V. cholerae* показал присутствие интегративных мобильных генетических элементов (IMGE) в обеих хромосомах. У *V. cholerae* имеются три основных класса IMGE: профаги, геномные острова (VPI) и интегративные конъюгативные элементы (ICE) [79, 37, 47], на которых локализованы гены основных факторов патогенности возбудителя холеры, а также детерминанты устойчивости к противомикробным препаратам.

1.3.2 Генетическое разнообразие холерных вибрионов

В типовом виде *V. cholerae* разделяют серогруппы O1 и O139, которые являются истинными возбудителями холеры, и nonO1/nonO139 – микроорганизмы, вызывающие гастроэнтериты и системные инфекции.

В свою очередь, холерные вибрионы O1-серогруппы подразделяются на два биовара, которые отличаются по фенотипическим и генотипическим свойствам – классический и El Tor [1, 14, 82, 88, 107].

Разделение *V. cholerae* на биовары основано на отличиях в чувствительности к бактериофагам. Классический холерный вибрион лизируется бактериофагами IV группы по Микефе, а вибрион биовара Эль-Тор - бактериофагами V группы [4, 14, 42].

Новые генетически разнообразные варианты возбудителя холеры El Tor сформировались на современном этапе эволюции. Изменённые El Tor, мозамбикские и гибридные варианты по биоварспецифическим фенотипическим свойствам относятся к холерным вибрионам биовара El Tor, тогда как у матламбских вариантов определить биовар не удаётся [14].

Атипичные клинические штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, содержащие гены классических холерных вибрионов, являются генетически разнородными

[130]. Фенотипические и генотипические особенности штаммов *V. cholerae* O1 и их атипичных вариантов представлены в таблицах 1 и 2.

Таблица 1 - Фенотипические особенности типичных штаммов *V. cholerae* O1 и их атипичных вариантов (по Смирновой Н. И. [14])

Биовар или вариант	Фенотип				
	Агглютина- ция куриных эритроцито в	Полимик- син	Реакция Фогес- Проскауэ ра	Фаг С Классиче ский	Фаг Эль-Тор
Типичный биовар					
Классический	-	S	-	S	R
El Tor	+	R	+	R	S
Атипичные варианты <i>V.</i> <i>cholerae</i> биовара El Tor					
Матлабские:					
тип 1	-	R	-	R	R
тип 2	-	S	-	R	S
тип 3	-	R	-	R	S
Изменённые El Tor	+	R	+	S	El
Мозамбикские	+	R	+	R	S
Гибридные El Tor	+	R	+	R	S
Примечание: R или S - резистентность или чувствительность к полимиксину или к диагностическим холерным бактериофагам С классическому или El Tor.					

Таблица 2 - Генотипические особенности типичных штаммов *V. cholerae* O1 и их атипичных вариантов (по Смирновой Н. И. [14])

Биовар или вариант	Генотип		
	<i>tcpA</i>	<i>rstR</i>	<i>ctxB</i>
Типичный биовар			
Классический	<i>Class</i>	<i>Class</i>	<i>Class</i>
El Tor	<i>El</i>	<i>El</i>	<i>El</i>
Атипичные варианты <i>V. cholerae</i> биовара El Tor			
Матлабские:			
тип 1	<i>Class</i>	<i>Class</i>	<i>Class</i>
тип 2	<i>Class</i>	<i>El</i>	<i>El</i>
тип 3	<i>Class</i>	<i>Class/El</i>	<i>Class/El</i>
Изменённые El Tor	<i>Class/El</i>	<i>Class</i>	
Мозамбикские	<i>El</i>	<i>Class/El</i>	<i>Class</i>
Гибридные El Tor	<i>El</i>	<i>Class/El</i>	<i>Class</i>

Матлабские варианты были изолированы в 1991-1994 гг. от больных с тяжёлой формой холеры в Матлабе (Бангладеш) [130, 115]. На основе фено- и генотипических свойств эти варианты отнесены к 3 типам.

У матлабских вариантов 1 типа нуклеотидная последовательность генов патогенности *tcpA*, а также *rstR* и *ctxB*, входящих в состав острова патогенности *VPI-1* и профага *CTXφ* соответственно, не отличается от таковой у классических вибрионов. У матлабских вариантов 2 типа ген *tcpA* белка токсин-корегулируемых пилей адгезии совпадает с классическим биоваром, а с биоваром El Tor - ген-антирепрессор *rstR* и ген *ctxB* репрессоров профагов *CTXφ*.

В штаммах 3 типа обнаружено присутствие на малой хромосоме tandemных повторов двух копий классического профага *CTXφ* при наличии на большой хромосоме лишь tandemного повтора *RS1* - последовательности [106].

Повторные исследования показали, что в геноме этих гибридных вариантов присутствуют специфичные для *V. cholerae* биовара El Tor острова патогенности *VSP-I*, в которых присутствует аллель *tcpA*, и пандемичности *VSP-II* с протяжённой делецией [62, 130, 115].

Важно отметить, что по фенотипическим свойствам матлабские варианты не могут быть отнесены ни к классическому, ни к El Tor -биовару. Они являются производными *V. cholerae* биовара El Tor, появившимися в результате горизонтального переноса генов вирулентности от классических вибрионов [130].

Изменённые варианты El Tor. Эта группа атипичных клинических штаммов, впервые описанных G. V. Nair и соавторами, также обнаружена на территории Бангладеш в 2001 году. Они характеризуются появлением в составе профага *CTX ϕ* , содержащего биоварспецифический ген *rstR^{EL}*, гена *cxtB1* классических холерных вибрионов, нового аллеля гена *tcpA*, ответственного за биосинтез основной субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии, необходимых на первом этапе развития инфекционного процесса - колонизации, а также протяжённой делеции в острове пандемичности *VSP-II* [130, 115].

В целом, изменённые варианты El Tor по фенотипическим свойствам, включая биоварспецифические, не отличаются от типичных штаммов холерных вибрионов биовара El Tor [62, 130]. Анализ аминокислотной последовательности *B*-субъединицы холерного токсина, кодируемого опероном *ctxAB*, содержащимся в геноме профага *CTX ϕ* , продуцируемого этими штаммами, подтвердил биосинтез ими холерного токсина 1-го типа. Важной особенностью этого варианта является повышенный уровень продукции холерного токсина в сравнении с типичными штаммами возбудителя холеры El Tor [16].

Необходимо отметить, что с 2001 года изменённые варианты El Tor в Индии, Вьетнаме и ряде других стран Африки полностью вытеснили типичные штаммы *V. cholerae* биовара El Tor, вызвавшие 7 пандемию холеры [4].

Мозамбикские варианты. В 2004 году в Мозамбике (Юго-Восточная Африка) была зарегистрирована вспышка холеры El Tor, вызванная штаммами, имеющими значительное генетическое сходство с холерными классическими

вибрионами. У многих больных наблюдалась тяжёлая форма заболевания [14]. Геномный анализ мозамбикского варианта показал присутствие на его малой хромосоме двух копий профага, расположенных в тандемном порядке и содержащих $rstR^{Class}$, кодирующий репрессор, который запрещает транскрипцию гена $rstA$, необходимого для репликации фага $CTX\phi$, а значит отвечающий за лизогенное состояние холерных вибрионов, и $ctxB^{Class}$ [86, 107]. Профаг данного варианта $CTX^{Moz}\phi$ отличается от типичного профага $CTX^{Class}\phi$ тем, что имеет мозаичную структуру: $ig-1$, $rstR$, $ig-2$, а также около 30 % нуклеотидной последовательности генов $rstA$ и $ctxB$ идентичны таковой профага $CTX^{Class}\phi$, при этом остальная часть коровой области почти неотличима от таковой профага $CTX^{EL}\phi$ [14, 53]. Геном мозамбикского штамма лишён $RS1$ -элемента, являющегося постоянным спутником профага $CTX^{EL}\phi$ вибрионов El Tor, а значит вибрионы не способны образовывать зрелые фаговые частицы, которые при определённых условиях могут инфицировать нетоксигенные штаммы холерного вибриона, превращая их в токсигенные [40].

Вьетнамский вариант штаммов несёт на малой хромосоме тандемные повторы классического профага. На большой хромосоме присутствует дополнительный профаг $CTX^{Class}\phi$.

Гибридные варианты El Tor. В 1991-2004 годах на территории ряда стран Азии и Африки (помимо Индии, Бангладеш и Мозамбика) обнаружены варианты *V. cholerae* биовара El Tor, в геноме профага которых, помимо гена $ctxB1$, присутствуют гены $rstR^{Class}$ и $rstR^{EL}$. Это означает наличие двух различных копий $CTX\phi$ ($CTX^{EL}\phi$ и $CTX^{Class}\phi$), расположенных в тандемном порядке на одной хромосоме, или же локализованных на разных хромосомах [1, 14, 50, 146, 78].

1.3.3 Мобильные генетические элементы как источник генетического разнообразия холерных вибрионов

Мобильные генетические элементы играют важную роль в формировании генетического разнообразия и распространении в бактериальных популяциях полезных признаков, увеличивая адаптационный потенциал несущих их бактерий.

Характерной особенностью пандемических штаммов холерных вибрионов является наличие в их геноме профага СТХφ, а также островов патогенности (VPI) и пандемичности (VSP), что делает штаммы O1 и O139 серогрупп более вирулентными, чем штаммы не-O1/139 серогрупп [32].

Умеренный фаг СТХφ, играющий ведущую роль в вирулентности *V. cholerae*, состоит из двух функционально различных кластеров [116]: первый кластер содержит гены *ctx* АВ, кодирующие СТ, а также пять генов - *psh*, *cep*, *pШСТХ*, *ace* и *zot*, необходимых для фагового морфогенеза. Второй кластер RS2 кодирует белки, участвующие в репликации (RstA), интеграции (RstB) и регуляции сайт-специфической рекомбинации (RstR) СТХφ [134, 124, 116]. У токсигенных штаммов *V. cholerae* El Tor рядом с СТХφ может присутствовать сателлитный фаг RS1, сходный с RS2, за исключением того, что он содержит дополнительный ген *rstC*, кодирующий антирепрессор транскрипции генов СТХφ, необходимых для генерации инфекционных частиц [132].

Профаги СТХφ обнаружены как в классическом, так и в El Tor биотипах *V. cholerae* O1, однако, они отличаются последовательностью их репрессорного гена *rstR* и классифицируются как СТХφ^{Class} и СТХφ^{ElTor}, согласно биотипу штаммов, в которых они были первоначально обнаружены [48]. При этом СТХφ^{Class} также широко распространен в *V. cholerae* El Tor O1 и O141 [131]. Интересно, что хромосомный сайт интеграции СТХφ также служит местом инсерции и для фагоподобных генетических элементов и геномных островов (GI). Причем у токсигенных штаммов способность аккумулировать дополнительные элементы в этом сайте оказалась выше, чем у нетоксигенных. Возможно, эта

особенность является одной из причин «успешности» пандемических штаммов, поскольку за счет дополнительных элементов повышается их генетическое разнообразие и, соответственно, адаптационный потенциал [44].

Остров патогенности VPI-1 детерминирует синтез токсинов-корегулируемых пилей, участвующих в образовании биопленки, прикреплении к хитину беспозвоночных, а также служащих рецептором для СТХφ [32]. Этот остров был обнаружен во всех O1 штаммах и не выявлен ни в одном из штаммов не-O1/O139, выделенных на Гаити. Но на месте VPI-1 у 85 % изолятов не O1/O139 были идентифицированы три разных геномных острова: GI-41 присутствовал как в клинических, так и в экологических штаммах, тогда как GI-102 и GI-81 были идентифицированы исключительно у водных штаммов. При этом GI-81 является частично делетированным вариантом VSP-II [67].

Сравнительный анализ геномного контента штаммов *V. cholerae classical* и El Tor 6-ой пандемии и штаммов El Tor 7-ой пандемии, проведенный M. Dziejman с соавторами [53], показал высокую степень генетического сходства между штаммами, изолированными за прошедшее столетие. Тем не менее, была определена группа генов, уникальных для штаммов седьмой пандемии. Эти гены сгруппированы в двух хромосомных кластерах, которые отличаются более низким содержанием GC, чем в среднем для остальной части хромосомы (40-41 % против 47 %), что предполагает достаточно высокую вероятность их приобретения путем горизонтального переноса. Эти регионы были обозначены VSP-I и VSP-II (*Vibrio seventh pandemic island*). Оба острова пандемичности содержат, в основном, гены гипотетических или консервативных гипотетических протеинов с неизвестными функциями. Аннотация последовательностей трех генов VSP-I показала возможное происхождение этого региона от мобильного генетического элемента: обнаружена частичная гомология с генами транспозазы, деаминазы, а третий белок принадлежит к семейству, включающему в себя лизогенный репрессор для СТХφ – RstR. VSP-II детерминирует пили IV типа, белки хемотаксиса, репарации, AraC-подобный транскрипционный регулятор и фагоподобную интегразу. Murphy и Boyd (2008) показали способность обоих VSP

исключаться из хромосомы с формированием циркулярного интермедиата за счет сайт-специфической рекомбинации, осуществляемой интегразой, ген которой входит в состав острова [101]. Возможно, именно гены VSP потенциально кодируют ключевые свойства, которые привели к стремительному глобальному распространению штаммов 7-ой пандемии [53].

Еще одним источником генетического разнообразия холерных вибрионов служит суперинтегрон размером около 120 т.п.н., локализованный на малой хромосоме [69]. Строго говоря, суперинтегрон не является мобильным элементом, поскольку его консервативная платформа, включающая ген интегразы семейства тирозиновых рекомбиназ и сайт интеграции генных кассет, является стационарной хромосомной структурой. Однако, генные кассеты его переменной части способны за счет рекомбинации, осуществляемой интегразой, как встраиваться или вырезаться из интегрона, так и менять свою локализацию внутри него. Интересно, что при исключении из сравнительного анализа последовательности этого региона, штаммы *V. cholerae* O1 El Tor седьмой пандемии, сформировавшие на филогенетическом дереве единый кластер (рис. 3), имеют одинаковый генный контент, за исключением нескольких геномных островов, в том числе тех, которые обнаружены в области интеграции СТХφ [44].

Сравнение геномных последовательностей штаммов *V. cholerae*, выделенных за почти 100 лет, продемонстрировало разделение на 12 различных филогенетических линий (рис. 3). Штаммы, не-O1/O139 серогрупп из разных источников показали значительное геномное разнообразие, в отличие от штаммов *V. cholerae* O1, образовавших монофилетическую кладу [44]. Основная часть генома штаммов *V. cholerae* O1 El Tor является высококонсервативной, а межштаммовые отличия обусловлены однонуклеотидными заменами и, главным образом, латеральным переносом мобильных генетических элементов. На основании этих результатов J. Chun с соавторами выдвинули предположение о едином происхождении штаммов 7-ой пандемии. Согласно этой гипотезе, предковым штаммом был *V. cholerae* O1 El Tor, содержащий несколько GI (VPI-1,2, GI-1 – GI-10) и приобретший VSP-1, VSP-2 и GI-11 путем горизонтального

переноса, что, наконец, привело к возникновению современных штаммов *V. cholerae* O1 El Tor и O139 [44].

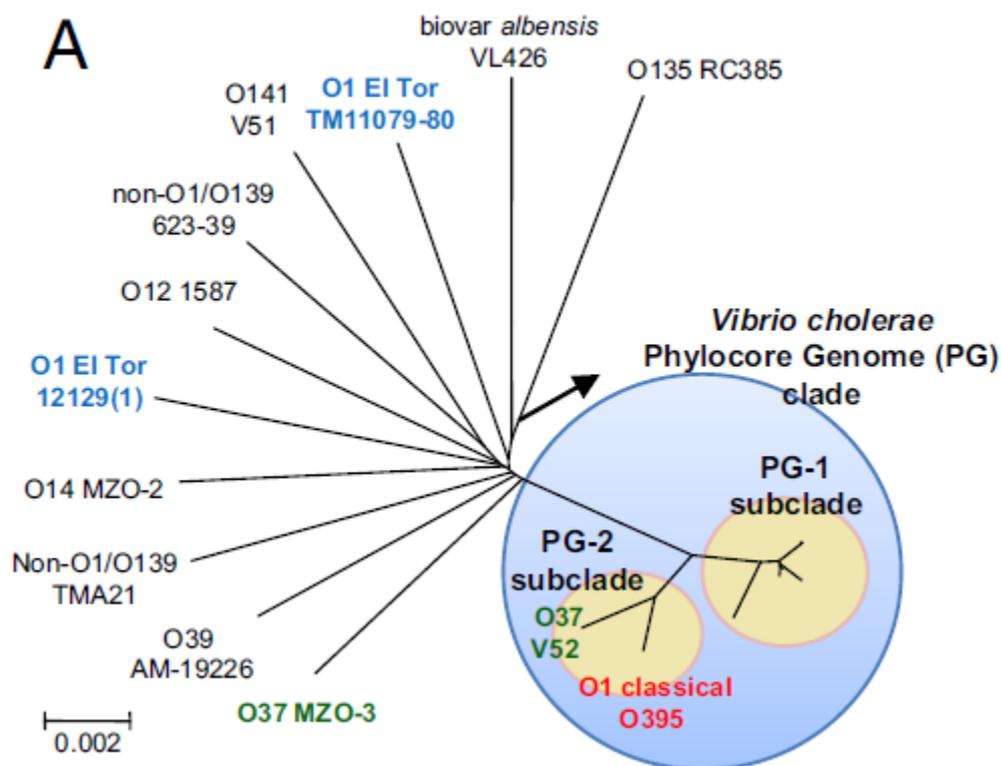


Рисунок 3 – Филогенетические взаимоотношения штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, группирование методом neighbour-joining по данным геномного анализа [44].

Источник штаммов, вызвавших 7-ю пандемию, предположительно, находился в Бенгальском заливе, откуда они распространились в отдаленные места в трех независимых, но перекрывающихся волнах [103]. Штаммы первой волны распространились из Азии в Африку и Южную Америку. Ни один из штаммов *V. cholerae* O1 El Tor, относящихся к первой волне пандемической передачи, не содержал ICE [103]. Ключевым событием в точке перехода между пандемическими клонами первой и второй волн было приобретение интегративного конъюгативного элемента ICE VchInd 5 семейства SXT/R391 [119, 91]. Этот переход датируется примерно с 1978 по 1984 годы и совпадает с

датировкой последнего общего предка (MRCA) для штаммов *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп [103]. Для штаммов третьей волны характерно появление элемента SXT ориентировочно всего одним годом ранее первой вспышки, обусловленной *V. cholerae* O139 на Индийском субконтиненте [125].

1.4 Интегративные конъюгативные элементы (ICE)

1.4.1 Характеристика и номенклатура ICE

Классические хорошо охарактеризованные семейства мобильных элементов включают плазмиды и бактериофаги. Интегративные конъюгативные элементы или ICE – это большой, относительно недавно охарактеризованный класс, которому присущи свойства плазмид, фагов и транспозонов. Интегративные конъюгативные элементы способны опосредовать собственную интеграцию, вырезание и конъюгативную передачу между бактериями [127]. Как и плазмиды, ICEs переносятся путем конъюгации, но в отличие от плазмид, они автономно не реплицируются. Интегрированные ICEs могут вырезаться из хромосомы и формировать циркулярные молекулы, которые являются промежуточным звеном при конъюгативном переносе. Способность специфически интегрировать в геном хозяина и реплицироваться вместе с ним – свойство транспозонов и бактериофагов, более того гены, регулирующие у ICE процессы интеграции/вырезания, очень схожи с фаговыми [38, 140, 49, 65].

ICE подразделяются на семейства на основании сходства последовательности гена интегразы и специфических сайтов интеграции. Классификация данных генетических элементов находится в процессе становления; не все из идентифицированных ICEs отнесены к определенным филогенетическим семействам, наиболее детально охарактеризованным из которых является семейство элементов SXT/R391 *Vibrio cholerae* [6].

Сам термин ICE (integrative conjugative element) был введен в 2002 г. [92], спустя десять лет после открытия SXT–первого элемента этого класса.

SXT – это ICE размером приблизительно 100 т.п.н., впервые обнаруженный у *V. cholerae* O139 MO10, выделенного в Юго-Восточной Индии в конце 1992 года. O139 серогруппа *V. cholerae* была первой в истории не O1 серогруппой возбудителя, вызвавшей эпидемию холеры [43]. Штаммы *V. cholerae* O139 быстро распространились по всей Азии, в 1993 г. временно заменив *V. cholerae* O1 как основную причину холеры на Индийском субконтиненте. Кроме O-антигена *V. cholerae* O139 отличалась от *V. cholerae* O1 спектром антибиотикочувствительности. Первые клинические изоляты O139 из Индии и Бангладеш были устойчивы к четырем антибиотикам: сульфаметаксозолу, триметоприму, хлорамфениколу и стрептомицину, гены которых входили в состав нового мобильного элемента, названного SXT по совместной аббревиатуре сульфаметоксазола и триметоприма, а затем переименованного в SXT^{MO10} [73, 24, 93, 133]. Позже SXT^{MO10} были обнаружены в большинстве изолятов O139, при том, что они полностью отсутствовали у O1 штаммов, выделенных до 1992 г. [18]. Однако, к 1994 г. клинические изоляты *V. cholerae* O1 El Tor были устойчивы к тем же четырем антибиотикам, что и *V. cholerae* O139 [143], а соответствующие гены резистентности входили в состав интегративного конъюгативного элемента, очень схожего, но не идентичного SXT^{MO10}, который обозначили SXT^{ET} [72].

Вновь открываемые ICE получали произвольные названия, часто не отражающие их принадлежность к типу мобильных элементов. Burrus V. с соавторами в 2006 году предложил для новых элементов данного типа использовать универсальную номенклатуру, при этом для ранее открытых оставить устоявшиеся названия. В настоящее время в название интегративных конъюгативных элементов входят: префикс ICE, аббревиатура вида происхождения элемента, три буквы названия страны выделения и количество генов резистентности [37], например ICE *VchMex1* – ICE, выделенный из холерного вибриона в Мексике.

1.4.2 Распространенность ICE

Как упоминалось выше, характерной особенностью штаммов *V. cholerae* эпидемически значимых серогрупп второй и третьей волн распространения по миру является присутствие в их геномах интегративных конъюгативных элементов. Прототипные элементы SXT и R391 были выделены из *V. cholerae* O139 в Индии и *Providencia rettgeri* в Южной Африке, соответственно [133, 108].

SXT-элементы широко распространены среди азиатских клинических изолятов [54, 75]. Dalsgaard с соавт. сообщили о наличии ICE семейства SXT/R391 у клинических изолятов *V. cholerae* в Мозамбике и Южной Африке [46, 112, 121, 120, 142]. Клинические штаммы, выделенные во время эпидемии на Гаити, обладали ICE, высокогомологичными элементу ICEVchBan5, идентифицированному в клиническом штамме из Бангладеш [67]. Интересно, что ICEs клинических изолятов, выделенных после 2000 года в разных регионах мира (Мозамбик, Бангладеш, Вьетнам, Лаос, Гаити), несут детерминанту резистентности к тетрациклину [46, 121, 142, 54, 75, 67].

Более того, в штаммах нетоксигенных серогрупп *V. cholerae*, выделенных из окружающей среды в Азии, Латинской Америке обнаружены ICEs, большинство из которых не содержали генов резистентности [37]. Во всем мире уже выявлено более 35 SXT-подобных элементов в изолятах *V. cholerae* различных серогрупп и, по меньшей мере, в девяти других видах рода *Vibrio* [36].

Распространение SXT-подобных ICEs не ограничивается только родом *Vibrio*, эти элементы присутствуют в широком спектре свободно живущих гамма-протеобактерий, занимающих различные экологические ниши в водной среде [114, 87, 22, 20]. К настоящему времени разнообразные ICEs найдены у различных грамположительных и грамотрицательных организмов. В дополнение к консервативному набору генов, они обычно содержат гены, опосредующие адаптационные признаки, такие как устойчивость к антибиотикам и тяжелым

металлам [30, 138, 133, 119, 59], деградация ароматических соединений [111] или фиксация азота [126].

1.4.3 Структура элементов семейства SXT/R391 и пути ее эволюции

Описанные на сегодняшний день ICEs имеют размеры, варьирующие в диапазоне от 80 до 105 т.п.н. и содержат набор консервативных генов, присутствующий у всех элементов, а также переменную ДНК.

Консервативная часть представлена 52 основными генами, из которых 25 требуются для обеспечения ключевых функций элемента: интеграция/вырезание, конъюгативный перенос и регуляция; значительное число консервативных генов ICEs функционально не аннотированы [28, 129, 113].

Консервативные гены занимают в общей сложности около 50 т.п.н., а переменная ДНК, интегрированная в горячие точки, от 30 до 60 т.п.н.

Как для консервативной, так и для переменной части характерна модульная организация: функционально связанные гены сгруппированы в виде кластеров. Например, *int* и *xis*, гены, необходимые для интеграции и вырезания, являются смежными с *setR* и *setC/D*, ключевыми регуляторами SXT, и находятся рядом друг с другом на 3'-конце элементов, хотя и разделены четырьмя консервативными генами с неизвестной функцией. Каждый ICE также имеет четыре генных кластера, участвующих в процессах конъюгативного переноса ДНК. Наконец, каждый из ICE имеет почти идентичные точки начала переноса (*oriT*), участки ДНК, которые иницируют процессинг ДНК во время конъюгативной передачи [39]. На 5'-конце интегрированных форм ICEs обычно расположены гены резистентности к антибиотикам [140, 49, 65].

Помимо 52 основных генов, все известные ICE имеют участки переменной ДНК, в значительной степени индивидуальной для различных элементов [34]. Большинство последовательностей переменных ДНК

интегрированы в пяти межгенных горячих точках (HS, hotspot), обозначаемых HS1 –HS5. Кроме того, некоторые ICEs также содержат переменную ДНК, встроенную вне горячих точек, в четырех переменных регионах (VR, variable region), обозначаемых VR I – VR IV [19] (рис. 4).

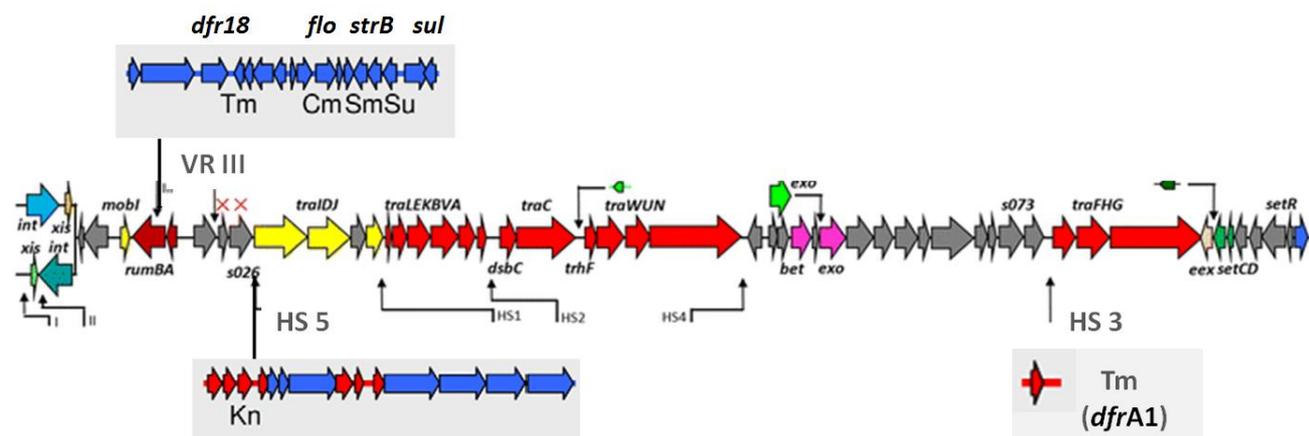


Рисунок 4 - Основной геном ICE семейства SXT/R391 с переменной ДНК, характерной для SXT^{ET} (ниже основного генома) и SXT^{MO10} (выше основного генома), интегрированными в горячие точки, указанные стрелками.

В составе переменной части ICEs обнаружено немало генов, обеспечивающих адаптивные свойства для бактерии-хозяина, такие как множественная устойчивость к лекарственным средствам и тяжелым металлам, системы рестрикции-модификации и альтернативные метаболические пути [37, 31, 114].

Решающую роль в формировании структуры ICE и стимулировании ее эволюции, по-видимому, играют рекомбинационные процессы [35, 61, 33, 68, 64]. Молекулярная рекомбинация между ICE может происходить посредством обмена большими фрагментами ДНК между двумя различными ICE, находящимися в одной и той же клетке [61, 33, 68, 64]. Такая RecA-зависимая рекомбинация часто происходит в экспериментах *in vitro* [61, 33, 68, 64, 60]. Последующая

сопряженная передача двух ICE вполне возможна, поскольку в семействе обнаружены только две группы несовместимости (S и R) [95] и ICEs разных групп несовместимости могут временно сосуществовать в одной и той же хромосоме хозяина с образованием тандемных массивов [35]. Такие массивы являются превосходными субстратами для рекомбинации и способствуют формированию гибридных ICE [61]. Транспозазы, элементы ISCR (insertion sequence common region) и другие инсерционные последовательности среди вариабельных областей ICE семейства SXT/R391 достаточно многочисленны [140]. Они могут способствовать перестройкам в составе ICE и/или приобретению новых генов. Примером этого является организация кластера резистентности SXT, область 14 т.п.н. между генами *rum B* и *rum A*, состоящая из семи транспозаз и элементов ISCR2, которая включает в себя детерминанты резистентности к антибактериальным средствам [27, 123, 51].

ICEs семейства SXT-R391 генерируют свое собственное генетическое разнообразие, опосредуя рекомбинацию между двумя элементами, расположенными в тандемном массиве посредством двух механизмов: RecA-зависимая рекомбинация, о чем упоминалось выше, и RecA-независимый путь [61, 60]. Белки Vet и Eho, работающие в RecA-независимой гомологичной рекомбинационной системе, детерминируемые самим ICE, опосредуют образование гибридных элементов и, вероятно, ответственны за большую часть генетической изменчивости, наблюдаемой в семействе SXT/R391 [61]. Более того, показано, что межмолекулярные рекомбинации возможны между ICEs, циркулирующими в разных гамма-протеобактериях, например, ICE VchInd5 и ICE PmiUSA1 и ICE VflInd1, обнаруженных у *P. mirabilis* и *V. fluvialis* соответственно. В настоящее время не вызывает сомнений, что пангеном микрофлоры водной среды является для ICEs семейства SXT-R391 пулом для приобретения нового генетического материала и расширения своего генного репертуара [122].

Кроме того, приобретение штаммами *V. cholerae* интегративных конъюгативных элементов вызывает значительную изменчивость и на геномном уровне. Установлено, что ICE семейства SXT/R391 способны мобилизовать

прилегающие области хромосомной ДНК и/или ассоциированные с ICE геномные острова [45], а также стимулировать инверсии значительных фрагментов хромосомы (~ 400 т.п.н.) в области интеграции ICE [83].

Таким образом, в формировании генетического разнообразия штаммов *V. cholerae* седьмой пандемической линии значительную роль играют как приобретение генетического материала путем горизонтального переноса, так и рекомбинационные процессы. И оба вектора микроэволюции возбудителя холеры, так или иначе, опосредованы мобильными генетическими элементами.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования

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. Штаммы для исследования из коллекции Ростовского-на-Дону противочумного института были отобраны по признаку резистентности к двум и более антибактериальным препаратам с.н.с. лаборатории биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Селянской Н.А. Сведения об использованных в исследовании штаммах приведены в таблице 3.

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».

Таблица 3 - Штаммы возбудителя холеры, использованные в работе

№ п/п	Штамм	Группа по Хейбергу	Дата, источник выделения
Штамм, выделенный в Волгоградской области, 2013 г.			
1	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 43	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
2	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 57	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
3	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 71	I	Вода поверхностных водоёмов 08.07.13 г.
4	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 73	I	Вода поверхностных водоёмов 08.07.13 г.
5	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 75	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
6	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 77	III	Вода поверхностных водоёмов 08.07.13 г.
7	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 78	III	Вода поверхностных водоёмов 08.07.13 г.
8	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 80	I	Вода поверхностных водоёмов 08.07.13 г.
9	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 89	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
10	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 92	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
11	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 92/2	I	Вода поверхностных водоёмов 13.07.13 г.
12	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 93	I	Вода поверхностных водоёмов 07.13 г.
13	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 102	I	Вода поверхностных водоёмов 13.07.13 г.
14	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 111	I	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
15	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 112	I	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
16	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 120	II	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
17	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 126	I	Вода поверхностных водоёмов 01.08.13 г.
18	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 127	I	Вода поверхностных водоёмов 01.08.13 г.
19	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 137	I	Вода поверхностных водоёмов 01.08.13 г.
20	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 143	II	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
21	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 147	II	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
22	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 151	II	Вода поверхностных водоёмов 20.07.13 г.
23	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 153	I	Вода поверхностных водоёмов 01.08.13 г.
24	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 169	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
25	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 171	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
26	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 173	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
27	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 174	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.

Продолжение таблицы 3

28	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 176	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
29	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 177	I	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
30	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 179	III	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
31	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 180	III	Вода поверхностных водоёмов 10.08.13 г.
32	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 216	III	Вода поверхностных водоёмов 31.08.13 г.
33	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 218	III	Вода поверхностных водоёмов 31.08.13 г.
34	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 232	III	Вода поверхностных водоёмов 31.08.13 г.
35	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 233	III	Вода поверхностных водоёмов 31.08.13 г.
36	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 260	I	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13 г.
37	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 262-10	I	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13 г.
38	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 262-30	I	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13 г.
39	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 270-1	I	Вода поверхностных водоёмов 25.07.13 г.
40	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 270-2	I	Вода поверхностных водоёмов 25.07.13 г.
41	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 270-3	I	Вода поверхностных водоёмов 25.07.13 г.
42	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 277-5	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.13 г.
43	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 277-6	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.13 г.
44	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 284-7(2)	I	Вода поверхностных водоёмов 02.08.13 г.
45	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 284-7(3)	I	Вода поверхностных водоёмов 02.08.13 г.
46	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 289	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
47	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-2	II	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
48	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-3	II	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
49	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-4	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
50	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-7	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
51	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-8	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
52	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 291-12	I	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
53	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 296-1	I	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.

Продолжение таблицы 3

54	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-1	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
55	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-2	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
56	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-9	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
57	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-11	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
58	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-12	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
59	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-13	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
60	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-14	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
61	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-15	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13 г.
62	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 298-17	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13 г.
63	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 305-3	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13 г.
64	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 305-13	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13 г.
65	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 339 (1)	I	Вода поверхностных водоёмов 23.09.13 г.
66	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 761	I	Кал от больного 05.07.13 г.
67	<i>Vibrio</i> spp. 252/2174	IV	Вода поверхностных водоёмов 05.07.13 г.
68	<i>Vibrio</i> spp. 253/2175	I	Вода поверхностных водоёмов 05.07.13
69	<i>Vibrio</i> spp. 255/2177	I	Вода поверхностных водоёмов 05.07.13
70	<i>Vibrio</i> spp. 257/2179	V	Вода поверхностных водоёмов 05.07.13
71	<i>Vibrio</i> spp. 258/2198	III	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13
72	<i>Vibrio</i> spp. 260-1/2200	III	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13
73	<i>Vibrio</i> spp. 261-1/2201	III	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13
74	<i>Vibrio</i> spp. 261-9/2201	III	Вода поверхностных водоёмов 15.07.13
75	<i>Vibrio</i> spp. 270/2216		Вода поверхностных водоёмов 25.07.13
76	<i>Vibrio</i> spp. 272-2	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.13
77	<i>Vibrio</i> spp. 282-1		Вода поверхностных водоёмов 02.08.13
78	<i>Vibrio</i> spp. 283-6		Вода поверхностных водоёмов 02.08.13
79	<i>Vibrio</i> spp. 284-7		Вода поверхностных водоёмов 02.08.13
80	<i>Vibrio</i> spp. 285-1/2362	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
81	<i>Vibrio</i> spp. 285-3/2362	III	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
82	<i>Vibrio</i> spp. 287-2/2364	III	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
83	<i>Vibrio</i> spp. 287-1/2364	III	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
84	<i>Vibrio</i> spp. 287-9/2364	VII	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
85	<i>Vibrio</i> spp. 290-5/2367	VII	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
86	<i>Vibrio</i> spp. 291-1/2368	II	Вода поверхностных водоёмов 12.09.13
87	<i>Vibrio</i> spp. 291-5/2368	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
88	<i>Vibrio</i> spp. 291-6/2368	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13

Продолжение таблицы 3

89	<i>Vibrio</i> spp. 291-9/2368	I	Вода поверхностных водоёмов 12.09.13
90	<i>Vibrio</i> spp. 291-11/2368	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
91	<i>Vibrio</i> spp. 298-4/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
92	<i>Vibrio</i> spp. 298-5/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
93	<i>Vibrio</i> spp. 298-6/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
94	<i>Vibrio</i> spp. 298-7/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
95	<i>Vibrio</i> spp. 298-8/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
96	<i>Vibrio</i> spp. 298-10/2434	II	Вода поверхностных водоёмов 21.08.13
97	<i>Vibrio</i> spp. 298-16/2434	I	Вода поверхностных водоёмов 12.08.13
98	<i>Vibrio</i> spp. 299-1/2452	IV	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
99	<i>Vibrio</i> spp.300-4/2453	III	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
100	<i>Vibrio</i> spp.305-2/2458	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
101	<i>Vibrio</i> spp.305-5/2458	VI	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
102	<i>Vibrio</i> spp.305-7/2458	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
103	<i>Vibrio</i> spp.305-8/2458	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
104	<i>Vibrio</i> spp.305-12/2458	II	Вода поверхностных водоёмов 26.08.13
Штаммы, выделенные в Волгоградской области, 2014 г.			
1	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 54	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
2	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 59	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
3	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 66	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
4	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 97	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
5	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 109	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
6	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 110	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
7	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 111	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
8	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 112	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
9	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 113	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
10	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 117	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
11	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 118	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
12	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 121	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
13	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 122	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
14	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 124	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
15	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 125	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
16	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 127	II	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
17	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 130	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
18	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 132	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
19	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 135	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
20	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 136	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
21	<i>V. cholerae</i> non O1/O139137	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
22	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 139	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
23	<i>V. cholerae</i> non O1/O139141	II	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
24	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 142	II	Вода поверхностных водоёмов 19.07.14 г.
25	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 143	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
26	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 149	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
27	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 150	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
28	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 151	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
29	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 152	III	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
30	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 153	III	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
31	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 157	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.

Продолжение таблицы 3

32	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 158	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
33	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 159	I	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
34	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 160	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
35	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 161	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
36	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 162	III	Вода поверхностных водоёмов 26.07.14 г.
37	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 165	I	Вода поверхностных водоёмов 21.07.14 г.
38	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 233	I	Вода поверхностных водоёмов 11.07.14 г.
39	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 377	I	Вода поверхностных водоёмов 16.06.14 г.
40	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 620-2		Вода поверхностных водоёмов 24.07.14 г.
41	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 620-3		Вода поверхностных водоёмов 24.07.14 г.
42	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 627-5		Вода поверхностных водоёмов 31.07.14 г.
43	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 735-1	I	Вода поверхностных водоёмов 14.08.14 г.
44	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 735-4	I	Вода поверхностных водоёмов 21.08.14 г.
45	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 735-8	I	Вода поверхностных водоёмов 21.08.14 г.
46	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 983	III	Фекалии пациента 21. 07. 14г.
Штаммы из коллекции Ростовского-на-Дону ПЧИ			
1	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 27		Волго-Балт 220, Таганрог, балл, 09.08.13
2	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 28		Волго-Балт 220, Таганрог, 16.08.13
3	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 32		Сандра 2, Таганрог, 23.08.13
4	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 33		ВФ Танкер 4, Таганрог, 24.08.13
5	<i>V. cholerae</i> non O1/O13936		Астон Трэвелер, Ростов, 01.09.13
6	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 38		ВФ Танкер 4, Таганрог, 01.09.13
7	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 52		ВФ Танкер 8, Таганрог, 22.09.13
8	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 59		Пляж «Тополь», Таганрог, 20.05.13
9	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 117		Акватория порта г. Таганрог, 10.06.13
10	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 182		Пляж «Маяковка», Таганрог, 01.07.13
11	<i>V. cholera</i> non O1/O139 6079		Ростов-на-Дону, от больного 1971 г.
12	<i>V. cholera</i> non O1/O139 6089		Ростов-на-Дону, от больного 1972 г.
13	<i>V. cholera</i> O1 El Tor 8110		Кировск, сточная вода 27.08. 1974 г.
14	<i>V. cholera</i> non O1/O139 9727		Ростов-на-Дону, от больного 30.08.1975 г.
15	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 9729		Ростов-на-Дону, от больного 31.07.1975 г.
16	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 13740		г. Ташкент, из испражнений больного
17	<i>V. cholerae</i> O13916063		г. Азов, от больного 1993 г
18	<i>V. cholerae</i> O13916064		г. Азов, от больного 1993 г
19	<i>V. cholerae</i> O13916065		г. Азов, от больного 1993 г
20	<i>V. cholerae</i> O13916131		Ростовская область 1993 г. от больного
21	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 16141	I	Респ. Узбекистан, Самаркандская обл., 1990 г., от больного
22	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 16145	I	Респ. Узбекистан, Самаркандская обл., 1990 г., от больного
23	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 16150	I	Респ. Узбекистан, Ташкентская область, г. Чиназ, 1987 г., от больного
24	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17370		г. Дербент от больного, 1994
25	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17372		г. Дербент, от больного 1994
26	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17385		Дагестан, от больного 1994 г.

Продолжение таблицы 3

27	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 17450		От больного
28	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17471		Дагестан, от больного 1996
29	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17827		Дагестан, Дербентский р-н, из испражнений больной 1998 г.
30	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 17828		Дагестан, Дербентский район, от больного 1998 г.
31	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18111		респ. Калмыкия от больного 1999 г.
32	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18358		Азинское озеро, 26.07.2001
33	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18367		г. Ростов-на-Дону сточные воды 2001
34	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18368		г. Ростов-на-Дону 2001г. река Дон
35	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18375		г. Казань, от больного 2001
36	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18377		г. Казань, от больного 2001
37	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18378		г. Казань, от больного 2001
38	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18379		г. Казань, от больного 2001
39	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18380		г. Казань, от больного 2001
40	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18634	I	Респ. Калмыкия, от больного 2003г.
41	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18640	I	Респ. Калмыкия, от больного 2003г.
42	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18676	II	Респ. Узбекистан, Наманганская область, г. Туракурган, от больного 2008г.
43	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18681	II	Респ. Узбекистан, Наманганская область, от больного 2000г.
44	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18775		Ростовская обл., г. Каменск-Шахтинский, от больного 2005 г.
45	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18778		Ростовская обл., г. Каменск-Шахтинский, от больного 06.08.2005 г.
46	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18780		Ростовская обл., г. Каменск-Шахтинский, п. Чистоозерный, от больного 14.08.05.
47	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18785		Ростовская обл., Каменский район, х. Богданов, от больного 26.08.05.
48	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18815		Каменский р-н, пос. Чистоозерный, от больного 2005 г.
49	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18819		Каменский р-н, пос. Чистоозерный, от больного 2005 г.
50	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18820		Каменский р-н, пос. Чистоозерный, от больного, 2005 г.
51	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18822		Ростовская обл., Каменский район, п. Чистоозерный, от больного 27.08.05
52	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18826		Тверь, от больного, прибывшего из Таджикистана 2005г.
53	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 18827		Респ. Калмыкия, от больного 2005г.
54	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18841		Респ. Калмыкия, г. Элиста, пруд Заячий, 2005 г.
55	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18846		г. Псков, р. Великая, 2005 г.
56	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18849		г. Ессентуки, станция Ессентукская, р. Подкумок, 2005 г.
57	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18864		Приморский край, Партизанский район, р. Литовка, 2005 г.

Продолжение таблицы 3

58	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18865		Приморский край, Партизанский район, р. Литовка, 2005 г.
59	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18866		Приморский край, Партизанский район, р. Литовка, 2005 г.
60	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18867		Приморский край, Партизанский район, р. Литовка 2005 г.
61	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18905		г. Хабаровск, пос. Гаровка, р.Черная 2006
62	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18907		Респ. Калмыкия, р. Элистинка, 2006 г.
63	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18948		Ставропольский край, Предгорный район, станица Ессентукская, насосная станция №4, 2006 г.
64	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18960		Краснодарский край, Тимашевский район, станица Медведовская, р. Кочеты 2005 г.
65	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18977		Респ. Калмыкия, р. Элистинка, 2007 г.
66	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 18986		Респ. Калмыкия, р. Элистинка, 2007 г.
67	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19021		Г. Уссурийск, р. Раздольная, 2007 г.
68	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19023		Приморский край, г. Находка, залив Находка, бухта Врангеля, 2007 г.
69	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19024		Уссурийский район, с. Ново-Никольск, р. Славянка, 2007 г.
70	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19025		Уссурийский район, а/д мост ПГСХА, р. Репьевка, 2007 г.
71	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19029		Читинская обл., оз. Харанор, 2007 г.
72	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19030		Читинская обл., р. Борзянка, 2007 г.
73	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19064		Ростовская обл., Неклиновский район, с. Ивановка, от больного 28.08.08
74	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19065		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Кирзавода, 2008 г.
75	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19066		Приморский край, р. Раздольная, 2008 г.
76	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19068		Приморский край, р. Репьевка, 2008 г.
77	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19070		Приморский край, р. Раздольная, 2008 г.
78	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19072		Приморский край, р. Репьевка, 2008 г.
79	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19077		Приморский край, Уссурийский р-н, с. Ново-Никольск, р. Славянка, 2008 г.
80	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19088	II	Ростовская обл., Неклиновский район, х. Семаки, от больного 04.07.09
81	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19094		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Кирзавода, 2009 г.
82	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19095		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Колонский, 2009 г.
83	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19097		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд 2009 г.
84	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19098		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Заячий, 2009 г.
85	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19100		Республика Калмыкия, Октябрьский р-н, пруд БАМ, 2009 г.
86	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19105		г. Якутск, оз. Сергелях, 2009 г.
87	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19106		Алтайский край, г. Барнаул, р. Обь 2009

Продолжение таблицы 3

88	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19107		Забайкальский край, р. Читинка 2009 г.
89	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19108		Забайкальский край, р. Борзя 2009 г.
90	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19111		Приморский край, г. Находка, р. Партизанская, 2009 г.
91	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19112		Иркутская обл., Усольский р-н, р. Ангара 2009 г.
92	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19189	II	Ростовская обл., Неклиновский район, с. З. Коза, 08.07.12, от больного
93	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19190		г. Таганрог, 2012г. от больного
94	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19195		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Кирзавода, 2010 г.
95	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19204		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Заячий, 2010 г.
96	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19209		Астраханская обл., Красноярский район, от больного 24.07.10
97	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19210		г. Астрахань, от больного 20.08.10
98	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19211		г. Астрахань, от больного 22.08.10
99	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19241		Ростовская обл., г. Таганрог, морская вода 2011 г.
100	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19243		Г. Москва, от больного 2012
101	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19260	II	Ростовская область, г. Таганрог, от больного 28.07.11
102	<i>V. cholerae</i> non O1/O139 19261	II	Ростовская область, г. Таганрог, от больного 03.06.11
103	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19331		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Колонский, 2012 г.
104	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19332		Республика Калмыкия, г. Элиста, р. Элистинка, 2012 г.
105	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19333		Республика Калмыкия, г. Элиста, р. Элистинка, 2012 г.
106	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19335		Республика Калмыкия, г. Элиста, р. Элистинка, 2012 г.
107	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19339		Республика Калмыкия, г. Элиста, пруд Заячий, 2012 г.
108	<i>V. cholerae</i> O1 El Tor 19340		Республика Калмыкия, г. Элиста, р. Элистинка, 2012 г.

2.2 Выделение нуклеиновых кислот

Выделение ДНК проводили методом протеиназного лизиса в соответствии со следующим протоколом [145].

Для выделения ДНК использовали культуры штаммов, выращенные на плотных питательных средах в течение 18 - 24 ч при 37 °С. 200 мкл

бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl pH 7,2 плотностью 2×10^9 м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 mM трис-HCl, 100 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 мг/мл желатина, 0,9 % Nonidet P-40, 0,9 % Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), аккуратно перемешивали, инкубировали при 65 °С 120 мин и прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента. Пробы центрифугировали (10.000 об/мин, 1 мин), супернатант использовали при постановке ПЦР.

2.3 Постановка ПЦР

Конечный объем ПЦР – смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составлял 15 мкл с учетом добавления ДНК мишени.

Необходимые реакционные компоненты вносили в пропорциях, указанных в таблице 4, исходя из количества анализируемых штаммов. Реакционную смесь распределяли по 13 мкл в индивидуальные пробирки для ПЦР; в каждую пробирку добавляли по 2 мкл препарата геномной ДНК. Далее в каждую пробирку добавляли по 1 капле минерального масла поверх реакционной смеси. Амплификацию проводили согласно протоколам, приведенным в соответствующих разделах.

Таблица 4 - Состав амплификационной смеси для одной реакции

Компонент	Объем, мкл
Деионизованная вода	3,5
2× ПЦР-буфер с Mg ²⁺ и смесью dNTP	7,5
Taq – полимеразы	0,25
Праймеры	2
Объем реакционной смеси	13

2.4 Анализ продуктов амплификации

Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозном геле. Электрофорез в агарозном геле проводили с использованием трис-боратного буфера.

Состав трис-боратного буфера:

1. 0,089 М трис-борат,
2. 0,089 М борная кислота,
3. 0,002 М ЭДТА.

Напряженность электрического поля составляла 8 В/см, реакцию проводили в течение 40 мин. Гели окрашивали раствором бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Электрофореграммы оцифровывали при помощи фоторегистрирующей системы GelDoc (Bio-Rad, США).

ГЛАВА 3 ДЕТЕКЦИЯ ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ
СЕМЕЙСТВА SXT/R391 В ШТАММАХ *V. CHOLERAЕ* РАЗЛИЧНЫХ
СЕРОГРУПП, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ РФ

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

В исследование были взяты препараты ДНК 108 штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в коллекционном центре Ростовского НИПЧИ. Штаммы перечислены в таблице 3 в разделе 2.1 «Штаммы микроорганизмов, питательные среды, условия культивирования».

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 5.

Таблица 5 - Олигонуклеотидные праймеры для детекции гена интегразы *int*

Праймер	Последовательность 5' – 3'	Мишень	Размер ампликона	Номер в Genbank/ автор
SXT-F	TTATCGTTTCGATGGC	Ген интегразы <i>int</i> SXT-элемента	820 п.н.	AF099172
SXT-B	GCTCTTCTTGTCCGTTC			
INT1	GCTGGATAGGTTAAGGGCGG	Ген интегразы <i>int</i> SXT-элемента	592 п.н.	Hochhut B.
INT2	CTCTATGGGCACTGTCCACATT G			

Протоколы амплификации последовательностей гена интегразы *int* SXT приведены в таблицах 6 и 7.

Таблица 6 - Параметры реакции амплификации с праймерами SXT-F/SXT-B

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	94	5 мин	1
Денатурация	94	30 с	40
Отжиг	55	30 с	
Элонгация	72	45 с	
Финальная элонгация	72	10 мин	1

Таблица 7 - Параметры реакции амплификации с праймерами INT1/INT2

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 с	40
Отжиг	59,8	30 с	
Элонгация	72	36 с	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

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 (табл. 8, рис. 5). Полученные данные свидетельствуют о наличии в их геномах ICE элемента семейства SXT/R391.

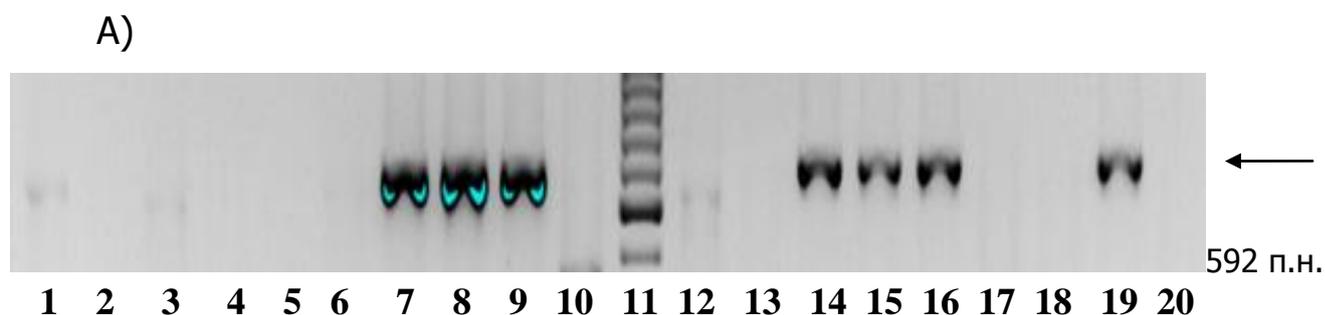


Рисунок 5 А - Выборочные результаты ПЦР-скрининга штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ на наличие последовательности гена интегразы *int* SXT-элемента с праймерами INT1- INT2 (размер специфического ампликона 592 п.н.):

- | | |
|----------------------|-----------------------|
| 1. 13622 O1 El Tor | 11. M - Mr SMO241 |
| 2. 17471 O1 El Tor | 12. 18634 non O1/O139 |
| 3. 18676 O1 El Tor | 13. 19189 non O1/O139 |
| 4. 19064 non O1/O139 | 14. 18826 O1 El Tor |
| 5. 17827 O1 El Tor | 15. 18827 non O1/O139 |
| 6. 18960 O1 El Tor | 16. 18977 O1 El Tor |
| 7. 18378 O1 El Tor | 17. 19210 non O1/O139 |
| 8. 13740 O1 El Tor | 18. 19261 non O1/O139 |
| 9. 18640 non O1/O139 | 19. 19243 O1 El Tor |
| 10. 18907 O1 El Tor | 20. 19209 non O1/O139 |

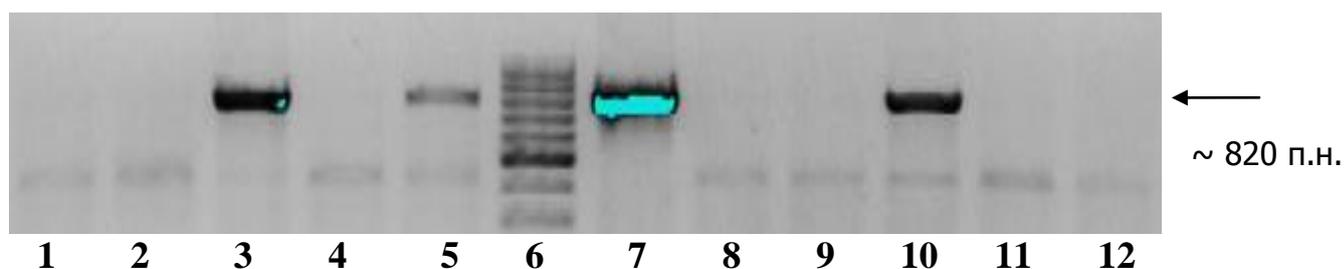


Рисунок 5 Б - Выборочные результаты ПЦР-скрининга штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ на наличие последовательности гена интегразы *int* SXT-элемента с праймерами SXT-F - SXT-B (размер специфического ампликона 820 п.н.):

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| 1. 17828 O1 El Tor | 7. B-191 O139 (контроль) |
| 2. 18775 O1 El Tor | 8. 18815 O1 El Tor |
| 3. 13740 O1 El Tor | 9. 18640 non O1/O139 |
| 4. 19064 non O1/O139 | 10. 19241 O1 El Tor |
| 5. 18826 O1 El Tor | 11. 19100 O1 El Tor |
| 6. M - Mr SMO241 | 12. 19095 O1 El Tor |

Таблица 8 - Перечень штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ, показавших наличие гена интегразы *int*

№ штамма <i>V. cholerae</i>	Наличие специфического ампликона	
	с праймерами INT1- INT2 (592 bp)	с праймерами SXT-F - SXT-B (~820 bp)
O1 серогруппа		
13740	+	+
17370	+	+
17372	+	+
17385	+	+
17827	+	+
18367	+	+

Продолжение таблицы 8

18368	+	+
18375	+	+
18377	+	+
18378	+	+
18379	+	+
18380	+	+
18826	+	+
18977	+	+
19241	+	+
19243	+	+
O139 серогруппа		
16063	+	+
16064	+	+
16065	+	+
16131	+	+
не O1/O139 серогруппа		
17450	+	+
18111	+	+
18640	+	+
18827	+	+
19190	+	+

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.. Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты скрининга штаммов рода *Vibrio* на наличие SXT элемента

Вид	Количество штаммов	
	SXT ⁺	всего
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	58	112
<i>Vibrio</i> spp.	25	38

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

3.2 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 в сочетании с результатами, изложенными выше, показал следующее. 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.

ГЛАВА 4 МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ ИНТЕГРАТИВНЫХ
КОНЬЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ СЕМЕЙСТВА SXT/R391

Молекулярное типирование обнаруженных интегративных элементов проводили путем анализа структуры локусов варибельной ДНК, несущих детерминаты резистентности к антибактериальным препаратам. С этой целью нами был использован набор олигонуклеотидов, специфичных: гену устойчивости к сульфаметоксазолу *sulII*, гену устойчивости к стрептомицину *strB*, детерминантам устойчивости к триметоприму – дигидрофолатредуктазам *dfr18* и *dfrA1*, характерным для вариантов SXT^{MO10} и SXT^{ET}, соответственно, и гену устойчивости к канамицину *kan* (табл. 10). Амплификацию мишеней проводили в монолокусном формате на амплификаторе C1000 (Bio-Rad).

Таблица 10 - Олигонуклеотидные праймеры для типирования SXTэлемента

Праймер	Последовательность	Размер фрагмента, п.н.	Номер в Genbank/ автор
SULII-F	TGTGCGGATGAAGTCAGCTCC	626	AY034138
SULII-R	AGGGGGCAGATGTGATCGAC		
DFR18- F	TGGGTAAGACACTCGTCATGGG	389	AY034138
DFR18- R	ACTGCCGTTTTTCGATAATGTGG		
STRB-F	GGCACCCATAAGCGTACGCC	470	Iwanaga с соавт.
STRB-R	TGCCGAGCACGGCGACTACC		
DFRA1-F	AGTTTACATCTGACAATGAGAACGT AT	278	GQ46314 0
DFRA1-R	ACCCTTTTGCCAGATTTGGTA		

Продолжение таблицы 10

S026-F	AAGCAATGGAACCGAATCGTT	653	AY055428
S027-R	ACCATGCATCAGCGGTAAAG		

4.1 Определение наборов детерминант резистентности в составе ICE штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ

В исследование были взяты препараты ДНК 14 SXT⁺ штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории РФ и хранящихся в коллекционном центре Ростовского НИПЧИ: O1 серогруппы – 9 изолятов, O139 серогруппы – 1, nonO1/nonO139 серогруппы – 4 изолята; а также SXT-положительные штаммы, выделенные из воды открытых водоемов на территории Волгоградской области в 2013-14 гг.: *V. cholerae* nonO1/nonO139 - 58 изолятов и 25 штаммов *Vibrio* spp.; в качестве положительного контроля использовали ДНК штамма *V. cholerae* O139 В-191.

Протоколы амплификации последовательностей гена устойчивости к сульфаметоксазолу *sulII* и гена устойчивости к стрептомицину *strB* приведены в таблице 11.

Таблица 11 - Параметры реакции амплификации с праймерами SULII-F/SULII-R и STRB-F/STRB-R

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	40
Отжиг	61,8	30 с	

Продолжение таблицы 11

Элонгация	72	48 с	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

Результаты проведенного исследования приведены на рисунках 6 и 7

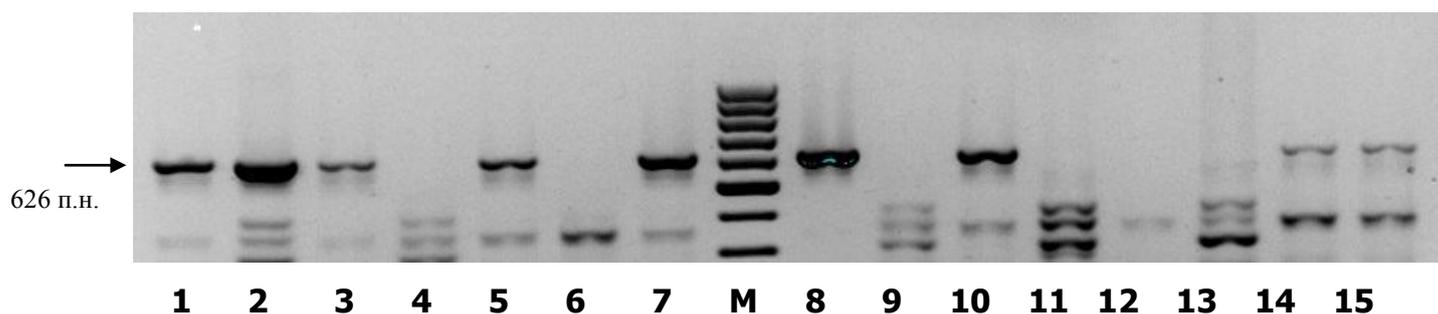


Рисунок 6 - Результаты ПЦР с ДНК штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в музее коллекционного центра Ростовского НИПЧИ с праймерами SULII-F/SULII-R (размер специфического ампликона 626 п.н.):

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| 1. 13740 O1 El Tor | 8. B-191 O139 (контроль) |
| 2. 16064 O139 | 9. 18640 non O1/O139 |
| 3. 17372 O1 El Tor | 10. 18826 O1 El Tor |
| 4. 17450 non O1/O139 | 11. 18827 non O1/O139 |
| 5. 17827 O1 El Tor | 12. 18977 O1 El Tor |
| 6. 18367 O1 El Tor | 13. 19190 non O1/O139 |
| 7. 18378 O1 El Tor | 14. 19241 O1 El Tor |
| М - Mr SMO241 | 15. 19243 O1 El Tor |

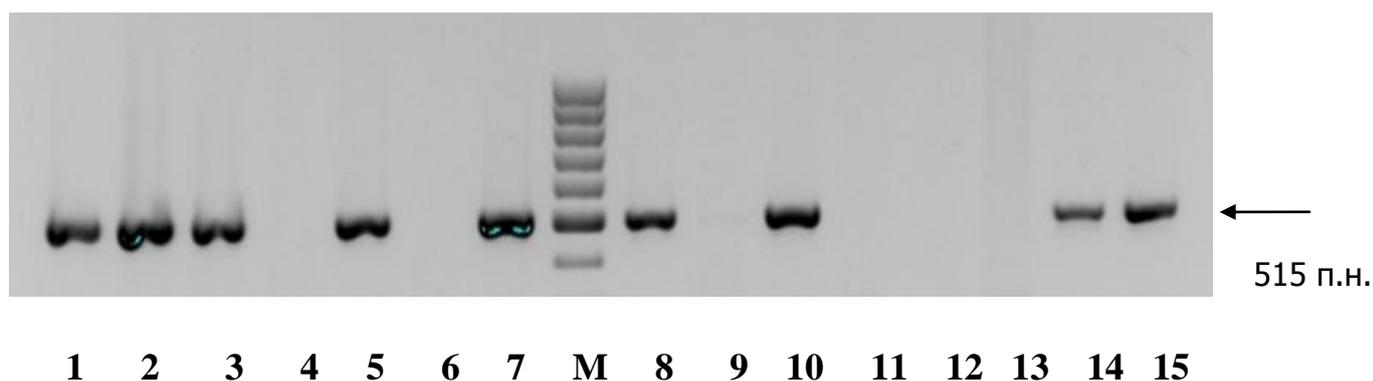


Рисунок 7 - Результаты ПЦР с ДНК штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в музее коллекционного центра Ростовского НИПЧИ с праймерами STRB-F/STRB-R (размер специфического ампликона 515 п.н.):

- | | |
|----------------------|--------------------------|
| 1. 13740 O1 El Tor | 8. B-191 O139 (контроль) |
| 2. 16064 O139 | 9. 18640 non O1/O139 |
| 3. 17372 O1 El Tor | 10. 18826 O1 El Tor |
| 4. 17450 non O1/O139 | 11. 18827 non O1/O139 |
| 5. 17827 O1 El Tor | 12. 18977 O1 El Tor |
| 6. 18367 O1 El Tor | 13. 19190 non O1/O139 |
| 7. 18378 O1 El Tor | 14. 19241 O1 El Tor |
| М - Mr SMO241 | 15. 19243 O1 El Tor |

Протокол амплификации последовательности гена *dfr18* приведен в таблице 12.

Таблица 12 - Параметры реакции амплификации с праймерами DFR18-F/DFR18-R

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	40

Продолжение таблицы 12

Отжиг	60,4	30 с	
Элонгация	72	30 с	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

Результаты проведенного исследования приведены на рисунке 8.

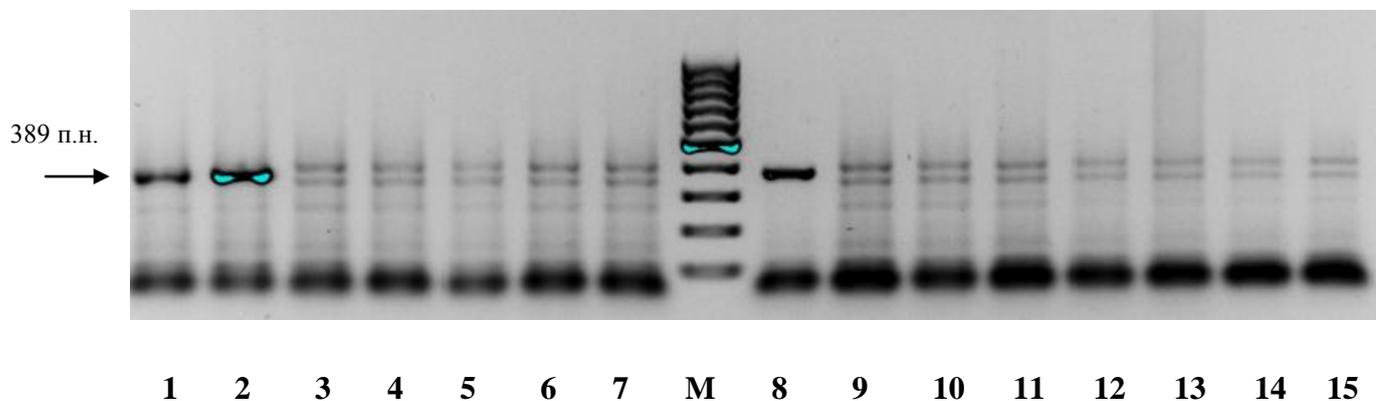


Рисунок 8 - Результаты ПЦР с ДНК штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в музее коллекционного центра Ростовского НИПЧИ с праймерами DFR18-F/DFR18-R (размер специфического ампликона 389 п.н.):

1. 13740 O1 El Tor
2. 16064 O139
3. 17372 O1 El Tor
4. 17450 non O1/O139
5. 17827 O1 El Tor
6. 18367 O1 El Tor
7. 18378 O1 El Tor
- М - Mr SMO241

8. B-191 O139 (контроль)
9. 18640 non O1/O139
10. 18826 O1 El Tor
11. 18827 non O1/O139
12. 18977 O1 El Tor
13. 19190 non O1/O139
14. 19241 O1 El Tor
15. 19243 O1 El Tor

Протокол амплификации последовательности гена *dfrA1* приведен в таблице 13.

Таблица 13 - Параметры реакции амплификации с праймерами DFRA1-F/DFRA1-R

Этап	Температура, °С	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	95	3 мин	1
Денатурация	95	30 с	40
Отжиг	57,8	30 с	
Элонгация	72	30 с	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

Результаты проведенного исследования приведены на рисунке 9.

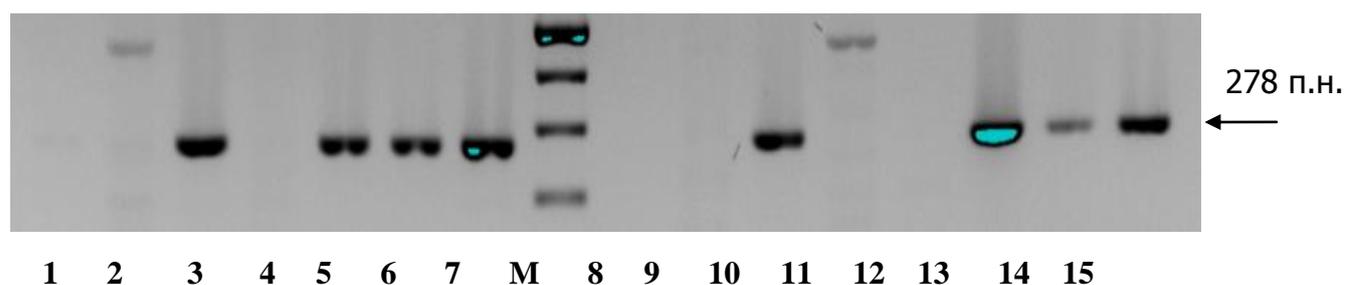


Рисунок 9 - Результаты ПЦР с ДНК штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в музее коллекционного центра Ростовского НИПЧИ с праймерами DFRA1-F/DFRA1-R (размер специфического ампликона 278 п.н.):

1. 13740 O1 El Tor
2. 16064 O139

3. 17372 O1 El Tor
4. 17450non O1/O139

Продолжение рисунка 9

- | | |
|-------------------------------------|----------------------|
| 5. 17827 O1 El Tor | 10.18826 O1 El Tor |
| 6. 18367 O1 El Tor | 11.18827 non O1/O139 |
| 7. 18378 O1 El Tor
M - Mr SMO241 | 12.18977 O1 El Tor |
| 8. B-191O139(контроль) | 13.19190 non O1/O139 |
| 9. 18640 non O1/O139 | 14.19241 O1 El Tor |
| | 15.19243 O1 El Tor |

Протоколы амплификации области вставки в HS5 между ORF *s026* и *s027* приведены в таблице 14.

Таблица 14 - Параметры реакции амплификации с праймерами *s 026-F/s027-R*

Этап	Температура, °C	Продолжительность	Количество циклов
Прогрев	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 с	35
Отжиг	58,7	30 с	
Элонгация	72	60 с	
Финальная элонгация	72	5 мин	1

Результаты проведенного исследования приведены на рисунке 10

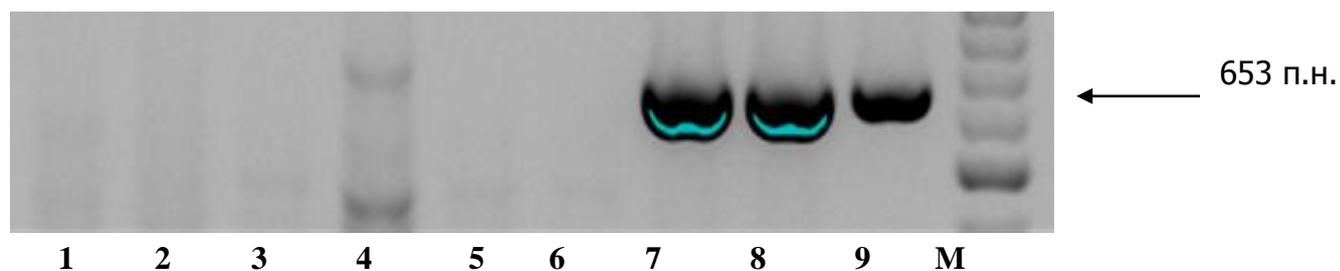


Рисунок 10 – Выборочные результаты ПЦР с ДНК штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ и хранящихся в музее коллекционного центра Ростовского НИПЧИ и праймерами s026-F/s027-R (размер специфического ампликона 653 п.н.):

- | | |
|----------------------|-------------------|
| 1. 17450 non O1/O139 | 6. 18826O1 El Tor |
| 2. 18640 non O1/O139 | 7. 17372O1 El Tor |
| 3. 18827 non O1/O139 | 8. 16064 O139 |
| 4. 19190 non O1/O139 | 9. 13740O1 El Tor |
| 5. 18367O1 El Tor | М - Mr SMO241 |

Результаты проведенного исследования суммированы в таблице 15.

Таблица 15 - Результаты типирования штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ.

№ п/ п	№ штамма	Наличие специфического ампликона				
		S026- F/S027-R (653 п.н.)	SULII- F/SULII- R (628 п.н.)	STRB- F/STRB-R (515 п.н.)	DFR18-F/ DFR18-R (O139) (389 п.н.)	DFRA1- F/ DFRA1-R (O1) (278 п.н.)
1	13740 O1El Tor	+	+	+	-	+
2	17372 O1El Tor	+	+	+	-	+
3	17827 O1El Tor	+	+	+	-	+
4	18367 O1El Tor	-	-	-	-	+
5	18378 O1El Tor	-	+	+	-	+
6	18826 O1El Tor	-	+	+	-	+
7	18977 O1El Tor	-	-	-	-	-
8	19241O1El Tor	-	+	+	-	+
9	19243O1El Tor	-	+	+	-	+
10	16064 O139	+	+	+	+	-
11	17450 non O1/O139	-	-	-	-	-
12	18640 non O1/O139	-	-	-	-	+
13	18827 non O1/O139	-	-	-	-	-
14	19190 non O1/O139	-	-	-	-	+

Типирование исследуемых штаммов в ПЦР с праймерами, специфичными последовательностям SXT элементов продемонстрировало:

1. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor № 13740, 17372, 17827 содержат типичный SXT^{ET} с кластером генов антибиотикоустойчивости *sulIII* - *strB* - *dfrA1* и геном резистентности к канамицину *kan*, локализованном вне этого кластера в интрагенном пространстве горячей точки HS5.

2. Штаммы *V. cholerae* O1 El Tor № 18378, 18826, 19241, 19243 содержат ICE типа SXT^{ET}, но без гена резистентности к канамицину в HS5.

3. В одном штамме *V. cholerae* O1 El Tor № 18367 и двух штаммах *V. cholerae* nonO1/O139 № 18640, 19190 детектирован вариант элемента SXT^{ET} - типа, несущий только последовательность *dfrA1*, и не имеющий генов устойчивости к сульфаметоксазолу *sul II* и аминогликозидам I поколения *strB*.

4. В одном штамме *V. cholerae* O1 El Tor № 18977 и двух штаммах *V. cholerae* nonO1/O139 № 17450, 18827 выявлены SXT элементы, полностью лишённые кластера генов устойчивости к антибиотикам.

5. В штамме *V. cholerae* O139 № 16064 обнаружен ICE с типичным для SXT^{MO10} кластером генов антибиотикоустойчивости *sulIII* - *strB* - *dfr18* и содержащий в горячей точке HS5 ген резистентности к канамицину *kan*, характерный для типа SXT^{ET}.

Таким образом, мы выявили пять типов ICE элементов, обозначенные ICE *VchRus0*, ICE *VchRus1*, ICE *VchRus3*, ICE *VchRus4* и ICE *VchRus4*(SXT^{hyb}) (табл. 16)

Таблица 16 - Характеристика ICE элементов, обнаруженных в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории РФ

№ п/п	№ Штамма	ICE <i>VchRus0</i>	ICE <i>VchRus1</i>	ICE <i>VchRus3</i>	ICE <i>VchRus4</i> / ICE <i>VchRus4</i> (SXT ^{hyb})
1	13740 O1 El Tor				SXT ^{ET} (<i>kan</i>)
2	17372 O1 El Tor				SXT ^{ET} (<i>kan</i>)
3	17827 O1 El Tor				SXT ^{ET} (<i>kan</i>)
4	18367 O1 El Tor		SXT ^{ET} (Δ <i>suII</i> , Δ <i>strB</i>)		
5	18378 O1 El Tor			SXT ^{ET} (Δ <i>kan</i>)	
6	18826 O1 El Tor			SXT ^{ET} (Δ <i>kan</i>)	
7	18977 O1 El Tor	SXT (Δ <i>cluster</i> ^R)			
8	19241 O1 El Tor			SXT ^{ET} (Δ <i>kan</i>)	
9	19243 O1 El Tor			SXT ^{ET} (Δ <i>kan</i>)	
10	16064 O139				SXT ^{MO10} (<i>kan</i>)
11	17450 non O1/O139	SXT (Δ <i>cluster</i> ^R)			
12	18640 non O1/O139		SXT ^{ET} (Δ <i>suII</i> , Δ <i>strB</i>)		
13	18827 non O1/O139	SXT (Δ <i>cluster</i> ^R)			
14	19190 non O1/O139		SXT ^{ET} (Δ <i>suII</i> , Δ <i>strB</i>)		

4.2. 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 с праймерами, приведенными в таблице 10.

Параметры амплификации приведены в таблицах 9, 10, 11, 12.

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.) (рис. 11, 12, 13).

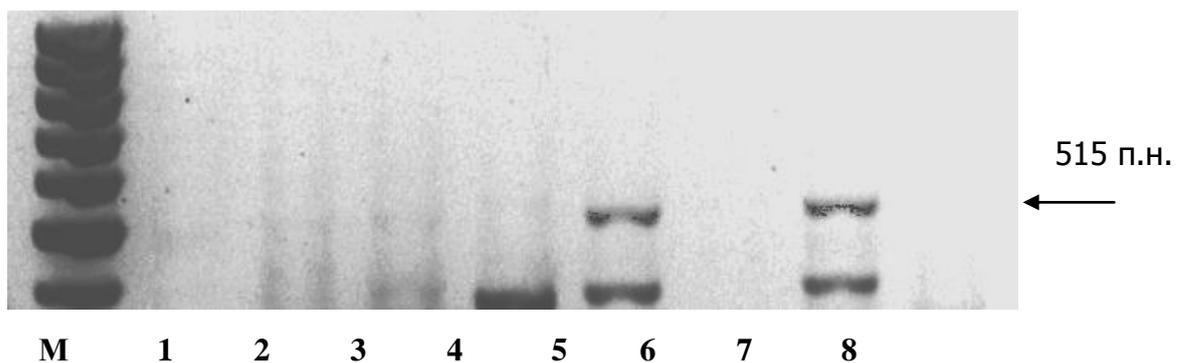


Рисунок 11 - Монолокусная ПЦР с праймерами *strBF/R* (размер специфического ампликона 515 п.н.):

Продолжение рисунка 11

1. *V. cholerae* non-O1/ O139 127,
2. *V. cholerae* non-O1/ O139 135,
3. *V. cholerae* non-O1/ O139 162,
4. *V. cholerae* non-O1/ O139 174,
5. *V. cholerae* non-O1/ O139 233,

6. *V. cholerae* non-O1/ O139 270-1,
7. *V. cholerae* non-O1/ O139 298-13,
8. *V. cholerae* non-O1/ O139 305-3,
- М - ДНК-маркер (100-1000 п.н.).

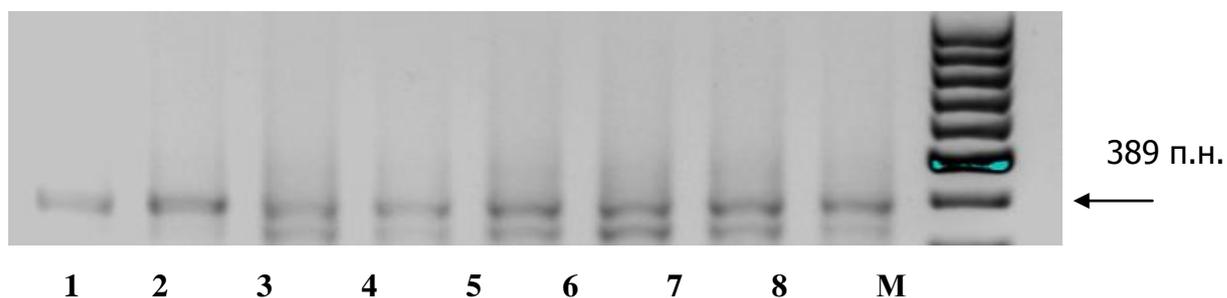


Рисунок 12 - Монолокусная ПЦР с праймерами *dfr18F/R* (размер специфического ампликона 389 п.н.):

1. *V. cholerae* non-O1/ O139 127,
2. *V. cholerae* non-O1/ O139 135,
3. *V. cholerae* non-O1/ O139 162,
4. *V. cholerae* non-O1/ O139 174,
5. *V. cholerae* non-O1/ O139 233,

6. *V. cholerae* non-O1/ O139 270-1,
7. *V. cholerae* non-O1/ O139 298-13,
8. *V. cholerae* non-O1/ O139 305-3,
- М - ДНК-маркер (100-1000 п.н.).

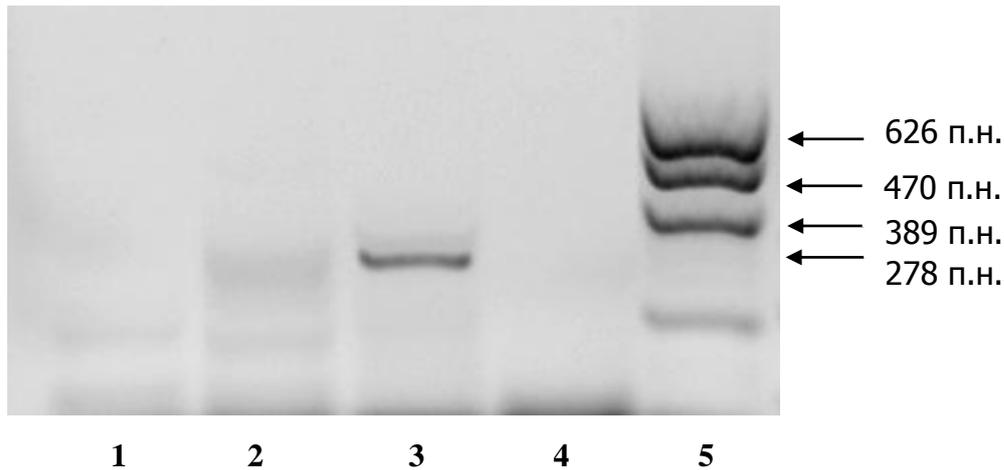


Рисунок 13 - Мультилокусная ПЦР с праймерами *sul IIF/R* (626 п.н.), *str BF/R* (470 п.н.), *dfr18F/R* (389 п.н.) и *dfrAIF/R* (278 п.н.):

1. *Vibrio* sp. 270,
2. *Vibrio* sp. 287-1,
3. *Vibrio* sp. 287-9,
4. *Vibrio* sp. 290-5,
5. *V. cholerae* O139 B191(в качестве контроля)

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 [88], т.е., описываемые ICEs *V. cholerae* nonO1/nonO139 относятся к типу SXT^{M010}. 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. 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.

Таблица 17 - 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).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представители рода *Vibrio* широко распространены в морских средах и пресноводных водоемах. Возможность вибрионов занимать различные ниши обитания является свидетельством их высокого адаптационного потенциала [128].

Важным фактором в процессе эволюции генома у вибрионов является горизонтальный перенос генов, представляющий механизм передачи ДНК из одной бактериальной клетки в другую без необходимости деления клеток [91, 97, 85, 100, 114]. Привнесенная ДНК интегрирует в геном реципиента как путем гомологичной рекомбинации, так и посредством мобильных генетических элементов [63], что обеспечивает ее стабильное наследование.

Чрезвычайная пластичность генома *V. cholerae* приводит к появлению новых патогенных клонов, несущих разные комбинации фенотипических и генотипических признаков, что значительно влияет на усилия общественного здравоохранения по борьбе с холерой.

Определение места и роли латерального переноса в эволюции генома *V. cholerae* в последнее десятилетие является предметом научного интереса ведущих специалистов в области геномики *V. cholerae*. К настоящему времени установлено, что гены основных факторов патогенности, а также ряда важных адаптивных функций сгруппированы в областях хромосомы, приобретенных возбудителем холеры в результате горизонтального переноса от близкородственных и/или гетерологичных бактерий. Ярким примером этого является приобретение *V. cholerae* O1 El Tor инновационных кластеров генов, ответственных за синтез ЛПС [133] и появление новой O139 серогруппы, способной вызвать эпидемическую холеру.

Механизмы, обеспечивающие устойчивость бактерий к антимикробным агентам, основаны на способности бактерий быстро изменять свои геномы. Эта пластичность является следствием не только спонтанных мутаций и перестроек,

которые могут возникать во время бактериального жизненного цикла, но и экзогенного приобретения генов. Интенсивное изучение данной проблемы показало, что одним из ведущих механизмов формирования множественной устойчивости к антибактериальным соединениям у многих представителей гамма-протеобактерий, в том числе и *Vibrio cholerae*, является приобретение и аккумуляция индивидуальных генов антибиотикорезистентности в интегронах, трансмиссибельных плазмидах и интегративных конъюгативных элементах (ICE) [91, 97, 114].

Ранее считалось, что детерминанты резистентности к антибиотикам имеют у вибрионов исключительно внехромосомную локализацию. Однако, в 1992 году, во время крупной вспышки холеры в Индии, в клиническом изоляте *V. cholerae* MO10 новой O139 серогруппы был обнаружен хромосомный конъюгативный генетический элемент, названный SXT^{MO10}, на котором были локализованы гены резистентности к сульфаметаксазолу, триметоприму, хлорамфениколу и стрептомицину [133].

Целью исследования настоящей работы являлся анализ распространенности и молекулярное типирование интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 в штаммах *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Российской Федерации.

Отдельные представители интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 не являются идентичными, но все эти ICE кодируют высокомолекулярную интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ Int и интегрируют в *prfC* – ген, кодирующий вспомогательный фактор терминации транскрипции [17, 18, 54, 70, 72, 81, 98].

Данное обстоятельство определило выбор в качестве мишени для поиска SXT элемента последовательности гена интегразы *int*_{SXT}. Скрининг штаммов *Vibrio* spp., выделенных из воды открытых водоемов в Волгоградской области, в ПЦР с праймерами, специфичными к этому гену, выявил 40 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139 и 25 штаммов *Vibrio* spp., несущих данную генетическую структуру из 66 и 38, соответственно, выделенных в 2013 году. 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., то есть около 50 % изолятов из воды открытых водоемов в Волгоградской области содержат в своем геноме интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391. Интересно, что из 24 штаммов *V. cholerae* nonO1/nonO139, выделенных в период 2003-2007 гг. на территории Волгоградской области, только два (18/841 и 34-I) имели в составе генома интегративные конъюгативные элементы [10]. Таким образом, мы установили наличие в пангеноме вибриофлоры региональных открытых водоемов интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391 и их быстрое распространение.

Также в настоящей работе было исследовано 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. Показательна значительная разница в количестве резистентных изолятов в разные временные промежутки. За 20 лет до 1992 года на территории Советского Союза было выделено всего 9 штаммов холерных вибрионов, резистентных к двум и более антибактериальным препаратам. После появления в Индии новой эпидемически значимой O139-й серогруппы *V. cholerae*, характерной чертой которой была множественная резистентность, и в нашей стране случаи завоза инфекции, обусловленной полирезистентными штаммами, стали регистрироваться значительно чаще.

Анализ ДНК 108 антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* различных серогрупп показал наличие гена интегразы *int* в 25 образцах. Хронологически первыми SXT-положительными штаммами на территории нашей страны были *V. cholerae* O139 El Tor, выделенные в 1993 г. от больных в г. Азов, вскоре после появления штаммов этой серогруппы в Индии.

Из ряда SXT⁺ штаммов, 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 инtragenные вставки, несущие детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам. Варибельный регион в инtragenном пространстве оперона *agumAB–VRIII* может содержать транспозоноподобную структуру с кластером генов резистентности к триметоприму (*dfr18*), хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strAB*) и сульфометаксазолу (*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 *suIII* - *strB* и генами резистентности *kan* и *dfr A1*, локализованными вне этого кластера в инtragenном 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 El Tor № 18977 и *V. cholerae* nonO1/O139 № 17450, 18827 выявлены SXT элементы, полностью лишенные 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}).

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 [10], были атоксигенными, а все штаммы, ICEs которых имели не менее трех генов резистентности, содержали в своем геноме СТХф и VPI-1.

На основании анализа относительно небольшой выборки ICE-положительных штаммов делать вывод о наличии корреляции между присутствием в геноме клетки-хозяина профага СТХф, 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 СТХф 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 [52].

Анализ варибельного 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 [78], 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 [63, 34, 76]. 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.

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(ΔR) 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., 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 *sulII*. 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 [114].

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 [15]. 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(ΔR) – 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 переменном регионе VRIII; 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 *sulII* - *strB* и генами *kan* и *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 *sulII* - *strB* - *dfr18* и содержащий в горячей точке HS5 ген резистентности к канамицину *kan*, характерный для типа SXT^{ET} – ICE *VchRus4*(SXT^{hyb}).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

МГЭ – мобильные генетические элементы

П.н. - пара оснований

Т.п.н. - Тысяча пар нуклеотидов, или килобаза (Кб)

Acf – accessory colonization factor – кластер генов, контролирующих биосинтез дополнительного фактора колонизации возбудителя холеры

attC - сайты - сайты рекомбинации генных кассет

attI - сайт рекомбинации

CS - консервативные сегменты

CT – Cholera toxin – холерный токсин

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

СТХφ – Cholera-Toxin – лизогенный нитевидный фаг

GI – genomic island – геномный остров

HS- Hotspot - горячие точки

ICE – integrative conjugative element – интегративный конъюгативный элемент

IMGE – integrative mobile genetic element – интегративный мобильный генетический элемент

In1 - интегрон класса 1

intI - ген, кодирующий интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ

kan - ген резистентности к канамицину

MGC (mobile gene cassettes) - мобильные генные кассеты

ORF – open reading frame – открытая рамка считывания

PI – pathogenicity island – остров патогенности

sul1 - ген резистентности к сульфонидамидам

TCP – toxin-coregulated pilus – токсин – корегулируемые пили

VPI - Vibrio pathogenicity island– остров патогенности вибрионов

VR - variable region – переменный регион

VSP - Vibrio seventh pandemic island– остров пандемичности вибрионов

World Health Organization – Всемирная организация здравоохранения

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бароян, О.В. Холера Эль-Тор / О.В. Бароян. - М.: Медицина, 1971. – 256 с.
2. Викторов, Д.В. Структурный анализ интегронов штаммов *Vibrio cholerae* с различными фенотипами антибиотикорезистентности / Д.В. Викторов, В.В. Алексеев, М.В. Подшивалова, С.Т. Савченко // Сб. материалов проблемной комиссии Коорд. научного совета по сан.-эпид. охране территории РФ. – 2008. – вып. 21. – С. 105-108.
3. Воробьев, А.В. Микробиология / А.В. Воробьев, А.С. Быков, Е.П. Пашков, А.М. Рыбакова.- 2-е изд., перераб. и доп. - М.: Медицина, 2003. - 336 с.: ил. 2003.
4. Горяев, А.А. Изменённые варианты возбудителя холеры, выделенные на территории Российской Федерации / А.А. Горяев, С.П. Заднова, А.В. Шубина, Я.М. Краснов, Н.И. Смирнова // РНИПЧИ «Микроб», Саратов. - 2010. - стр. 49-52.
5. Замарин, А.А. Характеристика интегративных конъюгативных элементов / А.А. Замарин, М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, Я.А. Лопастейская, Н.Н. Тетерятникова, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Вестник ВолгГМУ.- 2016.- 2 (58).- С. 104-107.
6. Захарова, И.Б. Интегративные конъюгативные элементы микроорганизмов (ICEs) / И.Б. Захарова, Викторов Д.В // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. - 2015. - Т.33, №3. - С. 9-16.
7. Онищенко, Г.Г. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее / Г.Г. Онищенко, Е.Н. Беляев, Э.А. Москвитина, В.И. Резайкин, Ю.М. Ломов, Г.М. Мединский // Ростов-на-Дону. 1995. 120 с.
8. Онищенко, Г.Г. Холера на Дальнем Востоке России. Сообщ. 1. Эпидемиологическая характеристика вспышки холеры Эль-Тор в г. Владивостоке / Г.Г. Онищенко, А.С. Марамович, Е.П. Голубинский, Д.В. Маслов, Т.И.

Вершкова, Л.Я. Урбанович, А.В. Алленов, Г.П. Мурначев, Л.В. Гарковенко, В.М. Воронок // Журнал микробиологии.- 2000.-№ 5.- С. 26–31.

9. Онищенко, Г.Г. Эпидемиологический надзор за холерой в России в период седьмой пандемии / Г.Г. Онищенко, Э.А. Москвитина, В.Д. Кругликов, С.В. Титова, О.Л. Адаменко, А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов // Вестник РАМН.- 2015.- 70 (2).- С. 249–256.

10. Подшивалова, М.В. Детекция генов антибиотикорезистентности SXT элемента *Vibrio cholerae* в мультилокусной ПЦР / М.В. Подшивалова, Я.А. Лопастейская, Н.Н. Тетерятникова, Д.В. Викторов // Холера и патогенные для человека вибрионы: материалы совещания и проблемной комиссии. - Ростов 2011.- №24.– с. 101-104.

11. Подшивалова, М.В. Молекулярная детекция генов антибиотикорезистентности в штаммах *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Волгоградской области / М.В. Подшивалова, Я.А. Лопастейская, М.Н. Свиридова, Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова // Инфекция и иммунитет.- 2012, Т. 2, № 1–2, с.313.

12. Подшивалова, М.В. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT типа / М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова, Я.А. Лопастейская, Д.В. Викторов // Эпидемиология и инфекционные болезни.- 2014.- 18(3).- С. 34-39.

13. Смирнова, Н.И. MLVA-типирование клинических штаммов *Vibrio cholerae*, изолированных в разные периоды текущей пандемии холеры / Н.И. Смирнова, Т.А. Кульшань, Я.М. Краснов // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. – 2015. – Т. 33. – №. 1.

14. Смирнова, Н.И. Эволюция генома возбудителя холеры в современный период / Н.И. Смирнова, А.А. Горяев, В.В. Кутырев // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. - 2010. - №4.- с. 11-19.

15. Супотницкий, М.В. Механизмы развития резистентности к антибиотикам у бактерий / М.В. Супотницкий // Биопрепараты. - 2011. - № 2. - С. 4-44.

16. Шашкова, А.В. Фенотипический и молекулярно-генетический анализ генетически измененного токсигенного штамма *Vibrio cholerae* 301 биовара Эль-Тор, изолированного в 2011 году в России / А.В. Шашкова, Д.А. Агафонов, А.В. Черкасов, С.П. Заднова, Н.И. Смирнова // Проблемы ООИ. - 2012. - № 4. - с.61-64.
17. Ahmed, A.M. A variant type of *Vibrio cholerae* SXT element in multidrug-resistant strain of *Vibrio flicvialis* / A.M. Ahmed, S. Shinoda, T. Shimamoto // II FEMS Microbiol. Lett. — 2005. Vol.242, №2. - P.241-247.
18. Amita, S.R. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India / S.R. Amita, M. Thungapathra, T. Ramamurthy, G.B. Nair, A. Ghosh // Emerg. Infect. Dis.- 2003.- 9.- P. 500–502.
19. Armshaw, P. Integrative conjugative elements (ICEs) of the SXT/R391 group as vehicles for acquisition of resistance determinants, stable maintenance and transfer to a wide range of enterobacterial pathogens. Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them / P. Armshaw, J. Pembroke // Science, Technology and Education, ed. A. Méndez-Vilas (Badajoz: Formatex Research Center). -2013. – P. 439-446.
20. Badhai, J. Presence of SXT integrating conjugative element in marine bacteria isolated from the mucus of the coral *Fungia echinata* from Andaman Sea / J. Badhai, P. Kumari, P. Krishnan, T. Ramamurthy, S. K. Das // FEMS Microbiol.- 2013. Lett. 338:118 –123. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12033>.
21. Baine, W.B. Epidemiology of cholera in Italy in 1973 / W.B. Baine, A. Zampieri, M. Mazzotti // Lancet.- 1974.- P. 1370-1376.
22. Balado, M. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family from fish-isolated *Vibrios* encode restriction–modification systems that confer resistance to bacteriophages / Balado M., Lemos M.L., Osorio C.R. // FEMS Microbiology Ecology,- 2013.-V. 83, Issue 2.- P. 457–467. <https://doi.org/10.1111/1574-6941.12007>.
23. Baranwal, S. Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae* / S. Baranwal, K.

Dey, T. Ramamurthy, G.B. Nair, M. Kundu // *Antimicrob Agents Chemother.*- 2002.- 46.- P. 2676–8.

24. Baron, S. Antimicrobial Susceptibility among Urban Wastewater and Wild Shellfish Isolates of Non-O1/Non-O139 *Vibrio cholerae* from La Rance Estuary / S. Baron, E. Larvor, S. Chevalier, E. Jouy // *Front. Microbiol.*-2017.-V. 8.- P. 1637. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01637>

25. Barua, D. The global epidemiology of cholera in recent years / D. Barua // *Proc Soc Med.*- 1972.- 65.- P. 423-432.

26. Baumann, P. Genus *Vibrio* / P. Baumann, A.L. Furniss, J.V. Lee // In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1, eds. Krieg, N.R. & Holt, J.G. pp. 518–538. Baltimore: Williams & Wilkins. ISBN 0-683-04108-8.

27. Beaber, J.W. Comparison of SXT and R391, two conjugative integrating elements: definition of a genetic backbone for the mobilization of resistance determinants / J.W. Beaber, V. Burrus, B. Hochhut, M.K. Waldor // *Cell Mol. Life Sci.*- 2002.- 59.- P. 2065– 2070.

28. Beaber, J.W. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae* / J.W. Beaber, B. Hochhut, M.K. Waldor // *J. Bacteriol.*- 2002. 184, 4259–4269.

29. Blake, P.A. Toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from Mexico identical to United States isolates / P.A. Blake, K. Wachsmuth, B.R. Davis.- 1983.- *Lancet.*- P. 912.

30. Boltner, D. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements / D. Boltner, C. MacMahon, J.T. Pembroke, P. Strike, A.M. Osborn // *J. Bacteriol.*- 2002.- 184.- P. 5158–5169.

31. Bordeleau, E. Beyond antibiotic resistance: integrating conjugative elements of the SXT/R391 family that encode novel diguanylate cyclases participate to c-di-GMP signalling in *Vibrio cholerae* / E. Bordeleau, E. Brouillette, N. Robichaud, V. Burrus // *Environ. Microbiol.*- 2010.- V. 12. № 2.- P. 510–523.

32. Boyd, E.F. Molecular analyses of a putative CTXphi precursor and evidence for independent acquisition of distinct CTX(phi)s by toxigenic *Vibrio cholerae* / E.F. Boyd, A.J. Heilpern, M.K. Waldor//*J Bacteriol.*-2000;182.- P. 5530-8.

33. Burrus V. Mechanisms of stabilization of integrative and conjugative elements / V. Burrus // *Current Opinion in Microbiology*.-2017.-V. 38. P. 44-50. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.03.01>.
34. Burrus, V. Conjugative transposons: the tip of the iceberg / V. Burrus, G. Pavlovic, B. Decaris, G. Guedon // *Mol. Microbiol.*- 2002.- 46.- P. 601–610.
35. Burrus, V. Formation of SXT tandem arrays and SXT-R391 hybrids / V. Burrus, M.K. Waldor // *J. Bacteriol.*- 2004.- V. 186.- P. 2636–2645.
36. Burrus, V. Shaping bacterial genomes with integrative and conjugative elements / V. Burrus, M.K. Waldor // *Res. Microbiol.*-2004.-V.155.- P. 376–386.
37. Burrus, V. Significance of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements in *Vibrio cholera* / V. Burrus // *Epidemiological and molecular aspects on cholera infectious disease*. Springer.- 2011. -P. 161-184.
38. Burrus, V. SXT-related integrating conjugative element in new world *Vibrio cholerae* / V. Burrus,, R. Quezada-Calvillo, J. Marrero, M.K. Waldor // *Appl. Environ. Microbiol.*- 2006; 72.- P. 3054–3057.
39. Burrus, V. The current ICE age: Biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements / V. Burrus, J. Marrero, M.K. Waldor // *Plasmid.*- 2006.- V.55. -№ 3. - P. 173-183.
40. Cambray, G. Integrons / G. Cambray, A.-M. Guerout, D. Mazel // *Annu Rev Genet.* - 2010. –V. 44.- P. 141-66.
41. Ceccarelli, D. Prevalence of aadA1 and dfrA15 class 1 integron cassettes and SXT circulation in *Vibrio cholerae* O1 isolates from Africa / D. Ceccarelli, S. Bani, P. Cappuccinelli, M.M. Colombo // *J. Antimicrob. Chemother.* – 2006. – Vol. 58. – P. 1095-1097.
42. Choi, S.Y. Involvement of capsular polysaccharide via a TLR2/NF-kappaB pathway in *Vibrio vulnificus*-induced IL-8 secretion of human intestinal epithelial cells / S.Y. Choi, H.J. Lee, E.J. Kim // *J. Med. Microbiol.* - 2010. - Vol. 59. -P. 302-308.
43. Cholera Working Group. Large epidemic of cholera-like disease in Bangladesh caused by *Vibrio cholerae* O139 synonym Bengal. *Lancet* 1993;342:387-90

44. Chun, J. Comparative genomics reveals mechanism for short-term and long-term clonal transitions in pandemic *Vibrio cholerae* / J. Chun, C.J. Grim, N.A. Hasan, J.H. Lee, S.Y. Choi, B.J. Haley // Proc Natl Acad Sci U S A.- 2009 06(36).- P. 15442–15447.
45. Daccord, A. Integrating conjugative elements of the SXT/R391 family trigger the excision and drive the mobilization of a new class of *Vibrio* genomic islands / A. Daccord, D. Ceccarelli, V. Burrus // Mol. Microbiol.- 2010.- V. 78.- P. 576–588.
46. Dalsgaard, A. *Vibrio cholerae* O1 outbreak isolates in Mozambique and South Africa in 1998 are multiple-drug resistant, contain the SXT element and the *aadA2* gene located on class 1 integrons / A. Dalsgaard, A. Forslund, D. Sandvang, L. Arntzen, K. Keddy // J. Antimicrob. Chemother.- 2001.- V. 48. P. 827–838.
47. Das, B. Acquisition and dissemination mechanisms of CTX Φ in *Vibrio cholerae*: New paradigm for dif residents / B. Das, G.B. Nair, R.K. Bhadra // World J Med Genet.- 2014.- V. 4(2). P. 27-33.
48. Davis, B.M. CTX prophages in classical biotype *Vibrio cholerae*: Functional phage genes but dysfunctional phage genomes / B.M. Davis, K.E. Moyer, E.F. Boyd, M.K. Waldor // J Bacteriol.- 2000.- V. 182. P. 6992–6998.
49. De Santis, B. Case studies on genetically modified organisms (GMOs): Potential risk scenarios and associated health indicators / B. De Santis, N. Stockhofe, J-M. Wal, E. Weesendorp, J-P. Lalles, J. Dijk, E. Kok, M. Giacomo, R. Einspanier, R. Onori, C. Brera, P. Bikker, J. Meulen, K. Gijs // Food and Chemical Toxicology.-2017.- in press.
50. Dean, A. Comparative Analysis of Superintegrons: Engineering Extensive Genetic Diversity in the *Vibrionaceae* / A. Dean, A.-M. Guerout, L. Biskri, P. Bouige, D. Mazel // Genome Res. - 2003. – V. 13(3). P. 428-442.
51. Delavat. F The hidden life of integrative and conjugative elements F. Delavat,R. Miyazaki,N. Carraro,N. Pradervand, Jan Roelof van der Meer // FEMS Microbiology Reviews.-2017.- V. 41, Issue 4.-P. 512–537.
doi.org/10.1093/femsre/fux008

52. Doyle, M. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria / M. Doyle, M. Fookes, A. Ivens, M.W. Mangan, J. Wain, C.J. Dorman // *Science*.- 2007.- V. 315.- P. 251–252.
53. Dziejman, M. Comparative genomic analysis of *Vibrio cholerae*: genes that correlate with cholera endemic and pandemic disease / M. Dziejman, E. Balon, D. Boyd, C.M. Fraser, J.F. Heidelberg, J.J. Mekalanos // *Proc Natl Acad Sci USA*.- 2002.- V. 99. – V. 1556–61.
54. Ehara, M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam / M. Ehara, B.M. Nguyen, D.T. Nguyen, C. Toma, N. Higa, M. Iwanaga // *Epidemiol Infect.*- 2004.- V. 132(4). P. 595-600.
55. Emch, M. Seasonality of cholera from 1974 to 2005: a review of global patterns / M. Emch, C. Feldacker, M.S. Islam, M. Ali // *Int. J. Health Geogr.* -2008.- V. 7:31.
56. Ewing, W.H. Studies on the aeromonas group. Atlanta, Ga / W.H. Ewing, R. High, J.G. Johnson // Communicable Disease Center, U.S. Department of Health, Education and Welfare; 1961.
57. Farmer, P.E. Cholera in Haiti: the equity agenda and the future of tropical medicine / P.E. Farmer, L.C. Ivers // *AmJTrop Med Hyg.*-2012.- V. 86. P. 7–8.
58. Faruque, S.M. Epidemiology, genetics, and ecology of toxigenic *Vibrio cholerae* / S.M. Faruque, M.J. Albert, J.J. Mekalanos // *Microbiol Mol Biol Rev.*- 1998.62.- P. 1301–1314.
59. Franke, A.E. Evidence for a chromosome-borne resistance transposon (Tn916) in *Streptococcus faecalis* that is capable of “conjugal” transfer in the absence of a conjugative plasmid / A.E. Franke, D.B. Clewell // *J Bacteriol.*- V.145. P. 494–502.
60. Garriss, G. DNA-damaging agents induce the RecA-independent homologous recombination functions of integrating conjugative elements of the SXT/R391 Family / G. Garriss, D. Poulin-Laprade, V. Burrus // *J Bacteriol.*- 2013.V. 195. P. 1991–2003.
61. Garriss, G. Mobile antibiotic resistance encoding elements promote their own diversity / G. Garriss, Waldor M.K., Burrus V.. *PLoS Genet.*- 2009. 5:e1000775.

62. Ghosh-Banerjee, J. Cholera toxin production by the El Tor variant of *Vibrio cholerae* O1 compared to prototype El Tor and classical biotypes / J. Ghosh-Banerjee, M. Senoh, T. Takahashi, T. Hamabata, S. Barman, H. Koley // *J. Clin. Microbiol.* - 2010. - 48(11).- P. 4283-6.
63. Gillings, M. The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance / M. Gillings, Y. Boucher, M. Labbate, A. Holmes, S. Krishnan, M. Holley, H.W. Stokes // *J. Bacteriol.*- 2008. – V. 190. P. 5095–5100.
64. Gillings, M.R. Genomics and the evolution of antibiotic resistance / M.R. Gillings, I.T. Paulsen, S.G. Tetu // *Annals of the New York Academy of Sciences.*- 2016, Wiley.- V. 1388. P. 92-107. DOI: 10.1111/nyas.13268.
65. Hall, J. P. J. Sampling the mobile gene pool: innovation via horizontal gene transfer in bacteria / J. P. J. Hall, M. A. Brockhurst, E. Harrison // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.*- 2017.- V. 372, issue 1735. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0424>.
66. Harris, J.B. Cholera / J.B. Harris, R.C. LaRocque, F. Qadri, E.T Ryan., S.B. Calderwood // *Lancet.*- 2012.- V. 379(9835).- P. 2466-76. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60436-X.
67. Hasan, N.A. Genomic diversity of 2010 Haitian cholera outbreak strains / N.A. Hasan, S.Y. Choi, M. Eppinger, P.W. Clark // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* – 2012. – V. 109. – №. 29. – P. E2010-E2017.
68. Haskett, T.L. Evolutionary persistence of tripartite integrative and conjugative elements / T.L. Haskett, J. P. Ramsay, A. A. Bekuma, J. T. Sullivan, G.W. O'Hara, J.J. Terpolilli // *Plasmid.* -2017.-V. 92.- P. 30-36. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2017.06.001>
69. Heidelberg, J.F. DNA sequence of both chromosomes of the cholera pathogen *Vibrio cholerae* / J.F. Heidelberg, J.A. Eisen, W.C. Nelson, R.A. Clayton // *Nature.*- 2000.- V. 3;406(6795).- P. 477-83.
70. Hochhut, B. Formation of chromosomal tandem arrays of the SXT element and R391, two conjugative chromosomally integrating elements that share an

attachment site / B. Hochhut, J.W. Beaber, R. Woodgate, M.K. Waldor // J. Bacteriol.- 2001a.183.- P. 1124– 1132.

71. Hochhut, B. Mobilization of plasmids and chromosomal DNA mediated by the SXT element, a constin found in *Vibrio cholerae* O139 / B. Hochhut, J. Marrero, M.K. Waldor // J. Bacteriol.- 2000.-V. 182.- P. 2043–2047.

72. Hochhut, B. Site-specific integration of the conjugal *Vibrio cholerae* SXT element into *prfC* / B. Hochhut, M.K. Waldor // Mol. Microbiol.- 1999.-V. 32. P. 99– 110.

73. Hochhut, B., Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins / B. Hochhut, Y. Lotfi, D. Mazel, S.M. Faruque, R. Woodgate, M.K. Waldor // Antimicrob. Agents Chemother.- 2001b. 45.- P. 2991–3000.

74. Hugh, R. The proposed conservation of the generic name *Vibrio pacini* 1854 and designation of the neotype strain of *Vibrio choleraePacini* 1854/ R. Hugh // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.- 1964.- V. 14. P. 87-101.

75. Iwanaga, M. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos / M. Iwanaga, C. Toma, T. Miyazato, S. Insisiengmay, N. Nakasone, M. Ehara // Antimicrob. Agents Chemother.- 2004.-V. 48.- V. 2364–2369.

76. Jahan, S. Cholera–Epidemiology, Prevention and Control. Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases / S. Jahan // InTech, 2016. P. 313.ISBN 978-953-51-2277-7.

77. Janda, J.M. Current perspective on the epidemiology and pathogenesis of clinically significant *Vibrio* spp. / J.M. Janda, C. Powers, R.G. Bryant, S.L. Abbott // Clin Microbiol Rev.- 1988.- V. 1. – P. 245–267.

78. Jang, H.M. Prevalence of antibiotic resistance genes from effluent of coastal aquaculture, South Korea / H.M. Jang, Y.B. Kim, S. Choi, Y. Lee, S. G. Shin, T. Unno, Y.M. Kim // Environmental Pollution.-2018.-V. 233.-P. 1049-1057. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.006>.

79. Jermyn, W.S. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (nanH) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates / W.S. Jermyn, E.F. Boyd // *Microbiology*.- 2002.- V. 11.- P. 3681-3693.
80. Johnston, J.M. Cholera on a Gulf Coast oil rig / J.M. Johnston, D. L. Martin, J. Perdue, L.M. McFarland, C.T. Caraway, E.C.Lippy, P.A. Blake // *N. Engl. J. Med.*-1983.- V.309.- P. 523-526.
81. Juiz-Rio, S. Subtractive hybridization reveals a high genetic diversity in the Wsh pathogen *Photobacterium damsela* subsp. piscicida: evidence of a SXT-like element / S. Juiz-Rio, C.R. Osorio, V. de Lorenzo, M.L. Lemos // *Microbiology*.- 2005.- V. 151.- P. 2659–2669.
82. Kaper, J.B. Cholera / J.B. Kaper, J.G. Morris, M.M. Levine // *Clin. Microbiol. Rev.* - 1995. - Vol. 8, N 1. - P. 48-86.
83. Katz, L.S. Evolutionary dynamics of *Vibrio cholerae* O1 following a single source introduction to Haiti / L.S. Katz, A. Petkau, J. Beaulaurier, S. Tyler, E.S. Antonova, M.A. Turnsek, Y. Guo, S. Wang, E.E. Paxinos, F. Orata, L.M. Gladney, S. Stroika, J.P. Folster, Rowe L., M.M. Freeman, N. Knox, M. Frace, J. Boncy, M. Graham, B.K. Hammer, Y. Boucher, A. Bashir, W.P. Hanage, G. Van Domselaar, L. Tarr // *mBio*.- 2013. 4:e00398-10.
84. Kitiyodom, S. Characterization of antibiotic resistance in *Vibrio* spp. isolated from farmed marine shrimps (*Penaeus monodon*) / S. Kitiyodom, S. Khemtong, J. Wongtavatchai, R. Chuanchuen // *FEMS Microbiol. Ecol.*- 2010.- V. 72. P. 219-227.
85. Kumar, M. Dissemination Mechanism of Antibiotic Resistance Genes in Environment / M. Kumar, R. Prasad, S. Sharma, A. Varma, V. Kumar // *Antibiotics and Antibiotics Resistance Genes in Soils*.- V. 51.- P. 191-205.
86. Labbate, M. Use of chromosomal integrons arrays as a phylogenetic typing system for *Vibrio cholerae* pandemic strains / M. Labbate, Y. Boucher, M.J. Joss, C.A. Michael, M.R. Gillings, H.W. Stokes // *Microbiol.*- 2007. - Vol. 153. - P. 1488-1498.
87. Li, L.-G. Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection / L.-G. Li, Y. Xia, T. Zhang // *The ISME Journal*.- V.11.- P.651–662. doi:10.1038/ismej.2016.155.

88. Lin W. Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage / W. Lin, K.J. Fullner, R. Clayton / Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage // Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999.-Vol. 96.-P. 1071-1076.
89. Livermore, D.M. Has the era of unbeatable infections arrived? / D.M. Livermore // J Antimicrob Chemother.- 2009. 64 (suppl 1).- P. 29–36.
90. Longini, I.M. Epidemic and endemic cholera trends over a 33-year period in Bangladesh / I.M. Longini, M. Yunus, K. Zaman, A.K. Siddique, R.B. Sack, A. Nizam // J Infect Dis.- 2002.- V. 186(2).- P. 246–251.
91. MacDonald, D. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination / D. MacDonald, G. Demarre, M. Bouvier // Nature.- 2006.- V. 440.- P. 1157—1162.
92. Maeda, K. Complete nucleotide sequence of carbazole/dioxin-degrading plasmid pCAR1 in *Pseudomonas resinovorans* strain CA10 indicates its mosaicity and the presence of large catabolic transposon Tn4676 / K. Maeda, H. Nojiri, M. Shintani, T. Yoshida, H. Habe, T. Omori // J. Mol. Biol.- 2003.- V. 326. P. 21–33.
93. Mala W. Antimicrobial resistance and genetic diversity of the SXT element in *Vibrio cholerae* from clinical and environmental water samples in northeastern Thailand/K. Faksri, K. Samerpitak, U. Yordpratum, W. Kaewkes, U. Tattawasart, C. Chomvarin // Infection, Genetics and Evolution.-2017.-V.52. P. 89-95. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.04.013>
94. Marrero, J. Interactions between inner membrane proteins in donor and recipient cells limit conjugal DNA transfer / J. Marrero, M.K. Waldor // Dev. Cell.- 2005.- V. 8.- P. 963–970.
95. Marrero, J., Waldor, M.K. The SXT/R391 family of integrative conjugative elements is composed of two exclusion groups / J. Marrero, M.K. Waldor // J. Bacteriol.- 2007.- V. 189.- P. 3302–3305.
96. Matthew, M. Types of beta-lactamase determined by plasmids in gram-negative bacteria / M. Matthew, R.W. Hedges, J.T. Smith // J. Bacteriol.- 1979.- V. 138.- P. 657–662.

97. Mazel, D. Integrons: agents of bacterial evolution / D. Mazel // Nat. Rev. Microbiol.- 2006.- V. 4.- P. 608—620.
98. McGrath, B.M. Detailed analysis of the insertion site of the mobile elements R997, pMERPH, R392, R705 and R391 in *E. coli* K12 / B.M. McGrath, J.T. Pembroke // FEMS Microbiol.- 2004. Lett. 237.- P. 19–26.
99. Morris, J.G. Cholera and other vibrios in the United States / J.G. Morris, R.E. Black // N Eng J Med.- 1985.- V. 312.- P. 343–350.
100. Moser, K.A. The Role of Mobile Genetic Elements in the Spread of Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* From Chickens to Humans in Small-Scale Production Poultry Operations in Rural Ecuador / K.A. Moser, L. Zhang, I. Spicknall, N.P. Braykov, K. Levy, C.F. Marrs, B. Foxman, G. Trueba, W. Cevallos, J. Goldstick // American Journal of Epidemiology.-2018.-V. 187, I. 3.- P. 558–567. <https://doi.org/10.1093/aje/kwx286>.
101. Murphy, D.B. Transfer of the IncJ plasmid R391 to recombination deficient *Escherichia coli* K12: evidence that R391 behaves as a conjugal transposon / Murphy D.B., Pembroke J.T. // FEMS Microbiol.- 1995. Lett. 134.- P. 153–158.
102. Murphy, R.A. Three pathogenicity islands of *Vibrio cholerae* can excise from the chromosome and form circular intermediates / R.A. Murphy, E.F. Boyd // J. Bacteriol.- 2008. 190(2).- P. 636–647.
103. Mutreja, A. Evidence for several waves of global transmission in the seventh cholera pandemic / A. Mutreja, D.W. Kim, N.R. Thomson, T.R. Connor, J.H. Lee, S. Kariuki.- Nature.- 2011.- V. 477(7365).- P. 462–465.
104. Nair, G.B. *Vibrio cholerae* O139 Bengal: the new serogroup causing cholera / G.B. Nair, M.J. Albert, T. Shimada // Reviews in Medical Microbiology.- 1996.- V. 7. – P. 43-52.
105. Nelson, E.J. Cholera transmission: the host, pathogen and bacteriophage dynamic / E.J. Nelson, J.B. Harris, J.G. Morris, Jr. S.B. Calderwood, A. Camilli // Nat Rev Microbiol. – 2009.- V. 7(10).- P. 693–702.
106. Nusrin, S., Khan G.Y., Bhuiyan N.A // J. Clin. Microbiol. - 2004. -Vol. 42, N 12. - P. 5854-5856.

107. Olsvik, O., Wahlberg J., Petterson B. J. Clin. Microbiol. - 1993. - Vol. 31. - P. 22-25.
108. Peters, S.E. Novel mercury resistance determinants carried by IncJ plasmids pMERPH and R391 / S.E. Peters, J.L. Hobman, P. Strike, D.A. Ritchie // Mol. Gen. Genet.- 1991.- V. 228.- P. 294–299.
109. Ramachandran, D. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholera* / D. Ramachandran, R. Bhanumathi, D.V. Singh // J. Med. Microbiol.- 2007.- V. 56.- P. 346–351.
110. Ramamurthy, T. *Vibrio mimicus* with multiple toxin types isolated from human and environmental sources / T. Ramamurthy, M.J. Albert, A. Huq, R.R. Colwell, Y. Takeda, T. Takeda, T. Shimada, B.K. Mandal, G.B. Nair // J Med Microbiol.- 1994.- V. 40.- P. 194–196.
111. Ravatn, R. Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas sp.* Strain B13 / R. Ravatn, S. Studer, D. Springael, A.J. Zehnder, J.R. van der Meer. // J Bacteriol.- 1998.- V. 180.- P. 4360–4369.
112. Rezaie, N. Distribution of resistance genetic determinants among *Vibrio cholerae* isolates of 2012 and 2013 outbreaks in IR Iran / N. Rezaie, B. Bakhshi, S. Najar-Peerayeh // Microbial Pathogenesis.-2017.-V. 104.- P. 12-16.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath>.
113. Richard, D. Adaptation of genetically monomorphic bacteria: evolution of copper resistance through multiple horizontal gene transfers of complex and versatile mobile genetic elements / D. Richard, V. Ravigné, A. Rieux, B. Facon // Molecular ecology.- 2017.-V. 26, Issue 7.- P. 2131–2149.
114. Rodríguez-Blanco, A. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments / A. Rodríguez-Blanco, M.L. Lemos, C.R. Osorio // Antimicrob. Agents Chemother.- 2012.- V. 56. P. 2619 –2626.

115. Rowe-Magnus, D.A. Comparative analysis superintegrons: engineering extensive genetic diversity to *Vibrionaceae* / D.A. Rowe-Magnus, A.M. Guérout, L. Biskri, P. Bouige, D. Mazel. - 2003. - Res 13. - 428-442.
116. Sack, D.A., Sack R.B., Nair G.B., Siddique, A.K. Cholera. Lancet.- 2004 363(9404).- P. 223–233.
117. Safa, A. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1 / A. Safa, G.B. Nair, R.Y. Kong // Trends Microbiol.- 2010.-V. 18.- P. 46–54.
118. Sakajaki, R. Classification and characteristics of vibrios. Public health papers no. 40. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1970.
119. Samadi, A.R. Seasonality of classical and El Tor cholera in Dhaka, Bangladesh: 17-year trends / A.R. Samadi, M.K. Chowdhury, M.I. Huq, M.U. Khan // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.- 1983. 77(6).- P. 853-856.
120. Sambe-Ba, B. Identification of Atypical *El Tor V. cholerae* O1 Ogawa Hosting SXT Element in Senegal, Africa / B. Sambe-Ba, M. H. Diallo, A. Seck, A. A. Wane, G. C. de Magny, C. S.-B. Boye, A. I. Sow, A. Gassama-Sow // Front. Microbiol.-2017.-V. 71.-P. 64-70.
121. Shah, M.R. *Vibrio cholerae* O1 with Reduced Susceptibility to Ciprofloxacin and Azithromycin Isolated from a Rural Coastal Area of Bangladesh / M.R. Shah, A.H. Nur, M. Alam, A. Sadique, M. Sultana, Md. M. Hoq, R. B. Sack, R. R. Colwell // Front. Microbiol. – 2017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00252>.
122. Shoemaker, N.B. Cloning and characterization of a Bacteroides conjugal tetracycline-erythromycin resistance element by using a shuttle cosmid vector / N.B. Shoemaker, R.D. Barber, A.A. Salyers // J Bacteriol.- 1989.-171.- P. 1294–1302.
123. Silva-Valenzuela, C.A. Growth arrest and a persister state enable resistance to osmotic shock and facilitate dissemination of *Vibrio cholera* / C.A. Silva-Valenzuela, D.W. Lazinski, S.C. Kahne, Y. Nguyen, R.C. Molina-Quiroz, A. Camilli // The ISME Journal .-2017.- V.11.- P.2718–2728. doi:10.1038/ismej.2017.121
124. Smirnova, N.I. Effect of CTX_φ prophage deletion in cholera agent on expression of regulatory genes controlling virulence and biofilm formation / N.I.

Smirnova, D.A. Agafonov, T.A. Kul'shan', E.Y. Shchelkanova, Y.M. Krasnov, Y.V. Lozovsky, V.V.Kutyrev // Russian Journal of Genetics.- 2017. -V. 53, № 3.- P. 302-313.

125. Spagnoletti, M.Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage / M. Spagnoletti, D. Ceccarelli, A. Rieux, M. Fondi, E. Taviani, R.Fani, M.M. Colombo, R.R. Colwell, F. Balloux // mBio.-2014; 5:e01356-14.

126. Sullivan, J.T. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene / J.T. Sullivan, C.W. Ronson // Proc Natl Acad Sci U S A.- 1998. 95.- P. 5145–5149.

127. Taviani, E. Genomic analysis of a novel integrative conjugative element in *Vibrio cholerae* / E. Taviani, C.J. Grim, J. Chun, A. Huq, R.R. Colwell // FEBS Letters.- 2009;583.- P. 3630-3636.

128. Thompson, F.L. Biodiversity of vibrios / F.L. Thompson, T. Iida, J. Swings // Microbiol. Mol. Biol. Rev.- 2004.-V. 68. P. 403–431.

129. Touchon, J.C. Integrative and conjugative elements and their hosts: composition, distribution and organization / J.C. Touchon,E.P.C. Rocha // Nucleic Acids Research.- 2017.- V. 45.- P.-8943–8956. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx607>.

130. Trucksis, M. The *Vibrio cholerae* genome contains two unique circular chromosomes / M. Trucksis, J. Michalski, Y.K. Deng, J.B. Kaper // Proc. Natl Acad. Sci. USA.- 1998.. 95/- P. 14464—14469.

131. Udden, S.M. Acquisition of classical CTX prophage from *Vibrio cholerae* O141 by El Tor strains aided by lytic phages and chitin-induced competence / S.M. Udden, M.S. Zahid, K. Biswas, Q.S. Ahmad, A. Cravioto, G.B. Nair // Proc Natl Acad Sci 2008. USA 105:11951–11956.

132. Waldor, M.A new type of conjugative transposon encodes resistance to sulfamethoxazole, trimethoprim, and streptomycin in *Vibrio cholerae* O139 / M. Waldor, H. Tschäpe, J. Mekalanos // J. Bacteriol.- 1996.- V. 178(14).- P. 4157-4165.

133. Waldor, M.K. Emergence of a new cholera pandemic: molecular analysis of virulence determinants in *Vibrio cholerae* O139 and development of a live vaccine prototype / M.K. Waldor, J.J. Mekalanos // *J. Infect. Dis.*- 1994. 170 (2). -P. 278–283.

134. Waldor, M.K. Regulation, replication, and integration functions of the *Vibrio cholerae* CTXphi are encoded by region RS2 / M.K. Waldor, E.J. Rubin, G.D. Pearson, H. Kimsey, J.J. Mekalanos // *Mol Microbiol.*- 1997. 24.- P. 917–926.

135. Warren, R.E. Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. / R.E. Warren, V.M. Ensor, P. O'Neill // *J. Antimicrob. Chemother.*- 2008.- V. 61. – P. 504–508.

136. West, P.A. Identification and classification of *Vibrionaceae*—an overview. In: Colwell R R, editor. *Vibrios in the environment* / P.A. West, R. R. Colwell // N.Y: John Wiley & Sons, Inc.-1984.- P. 285–363.

137. West, P.A. The human pathogenic vibrios—a public health update with environmental perspectives / P. A. West // *Epidemiol Infect.*-1989.- V. 103.- P. 1–34.

138. Whittle, G. The role of *Bacteroides* conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes / G. Whittle , N.B. Shoemaker, A.A. Salyers // *Cell Mol. Life Sci.*- 2002.- V. 59.- P. 2044–2054.

139. Wozniak, R. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs / R. Wozniak, D. Fouts, M. Spagnoletti, M. Colombo // *PLoS Genet.*- 2009.- V. 5, №12.

140. Wozniak, R.A.F. Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow / R.A.F. Wozniak , M.K. Waldor // *Nature reviews. Microbiology.*- 2010. 8:552.

141. Wright, G. D. Antibiotic resistance in the environment: a link to the clinic? / G. D. Wright // *Curr. Opin. Microbiol.*- 2010.- V. 13.- P. 589–594.

142. Xu, Yi-Gang. Simultaneous detection of *Vibrio cholerae*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in seafood using dual priming oligonucleotide (DPO) system-based multiplex PCR assay / Yi-Gang Xu, Liu-

Mei Sun, Yu-Sai Wang, Pei-Pei Chen, Zhong-Mei Liu, Yi-Jing Li, Jing Li, Li-Jie Tang
// Food control.- 2016.-№ 71. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.06.024>.

143. Yamamoto, T. Survey of in vitro susceptibilities of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents / T. Yamamoto, G. B. Nair, M. J. Albert, C. C. Parodi, Y. Takeda // Antimicrob. Agents Chemother.- 1995.- V. 39.- P. 241–244.

144. Yen, M. A cocktail of three virulent bacteriophages prevents *Vibrio cholerae* infection in animal models / M. Yen, L.S. Cairns, A. Camilli // Nature communications.-2017.-V.8 - nature.com. doi:10.1038/ncomms14187.

145. Zakharova, I. Development of a multiplex PCR assay for the detection and differentiation of *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia thailandensis*, and *Burkholderia cepacia* complex/ I. Zakharova, N. Teteryatnikova, A. Toporkov, D. Viktorov // Acta Tropica.- 2017.-V. -174.- P. 1-8.

146. Zhang, J. Expression of a *Vibrio parahaemolyticus* toxin in *Escherichia coli* results in chromosomal DNA degradation / J. Zhang, S. Taniguchi, H. Ito, K. Iiyama, M. Hino, T. Katayama// Biosci. Biotechnol. Biochem.; 81(10): 1937-1940. <https://doi.org/10.1080/09168451.2017.1347486>.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю свою искреннюю признательность заведующему лабораторией биологической безопасности и лечения ООИ ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Веркиной Л.М. и старшему научному сотруднику этой же лаборатории Селянской Н.А. за проведенный отбор полирезистентных штаммов холерных вибрионов из коллекции института и оказанной помощи при выделении геномной ДНК из этих штаммов.