

5. Соловьева И.Л., Костинов М.П., Кусельман А.И. Особенности вакцинации детей с измененным преморбидным фоном против гепатита В, кори, эпидемического паротита. Ульяновск: УлГУ; 2006.
6. Таточенко В.К., Озеретковский Н.А., Федоров А.М. *Иммунопрофилактика — 2011 (справочник)*. М.: Издательство Союза педиатров России; 2011.
7. Anselem O., Tsatsaris V., Lopez E., Krivine A., Le Ray C., Loulergue P. et al. Measles and pregnancy. *Presse Med.* 2011; 40 (11): 1001—7.
8. Chiba M.E., Saito M., Suzuki N., Honda Y., Yaegashi N. Measles infection in pregnancy. *J. Infect.* 2003; 47 (1): 40—4.
9. Enders M., Biber M., Exler S. Measles, mumps and rubella virus infection in pregnancy. Possible adverse effects on pregnant women, pregnancy outcome and the fetus. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007; 50 (11): 1393—8.
10. Guillet M., Vauloup-Fellous C., Cordier A.G., Grangeot-Keros L., Benoist G., Nedellec S. et al. Measles in pregnancy: a review. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris).* 2012; 41 (3):209—18.
11. White S.J., Boldt K.L., Holditch S.J., Poland G.A., Jacobson R.M. Measles, mumps, and rubella. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2012; 55 (2): 550—9.
12. Gans H., DeHovitz R., Forghani B., Beeler J., Maldonado Y., Arvin A.M. Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine.* 2003; 21 (24): 3398-405.
13. Plans P., Costa J., Domínguez A., Torner N., Borrás E., Plasència A. Prevalence of protective measles virus antibody levels in umbilical cord blood samples in Catalonia, Spain. *Clin. Vac. Immunol.* 2010; 17 (4): 691—4.
6. Tatchenko V.K., Ozeretskovskiy N.A., Fedorov A.M. *Immunological prevention — 2011 (Directory)*. Moscow: Publishing House of the Union of Pediatricians of Russia; 2011. (in Russian)
7. Anselem O., Tsatsaris V., Lopez E., Krivine A., Le Ray C., Loulergue P. et al. Measles and pregnancy. *Presse Med.* 2011; 40 (11): 1001—7.
8. Chiba M.E., Saito M., Suzuki N., Honda Y., Yaegashi N. Measles infection in pregnancy. *J. Infect.* 2003; 47 (1): 40—4.
9. Enders M., Biber M., Exler S. Measles, mumps and rubella virus infection in pregnancy. Possible adverse effects on pregnant women, pregnancy outcome and the fetus. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2007; 50 (11): 1393—8.
10. Guillet M., Vauloup-Fellous C., Cordier A.G., Grangeot-Keros L., Benoist G., Nedellec S. et al. Measles in pregnancy: a review. *J. Gynecol. Obstet. Biol. Reprod. (Paris).* 2012; 41 (3):209—18.
11. White S.J., Boldt K.L., Holditch S.J., Poland G.A., Jacobson R.M. Measles, mumps, and rubella. *Clin. Obstet. Gynecol.* 2012; 55 (2): 550—9.
12. Gans H., DeHovitz R., Forghani B., Beeler J., Maldonado Y., Arvin A.M. Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine.* 2003; 21 (24): 3398-405.
13. Plans P., Costa J., Domínguez A., Torner N., Borrás E., Plasència A. Prevalence of protective measles virus antibody levels in umbilical cord blood samples in Catalonia, Spain. *Clin. Vac. Immunol.* 2010; 17 (4): 691—4.

Поступила 21.04.14

Received 21.04.14

REFERENCES

1. Zverev V.V., Yuminova N.V. Vaccines. Prevention of viral infections from E. Jenner to date. *Voprosy virusologii.* 2012; 1: 33—42. (in Russian)
2. WHO (2011). *Measles outbreaks: Regions of the Americas, Europe and Africa. Global Alert and Response (GAR)*. World Health Organization 2011. Available at: http://www.who.int/csr/don/2011_10_07/en/index.html
3. WHO (2013). Progress in global control and regional elimination of measles, 2000—2011. *Weekly epidemiological record.* 2013; 3(88): 29—36. Available at: <http://www.who.int/wer/2013/wer8803.pdf>
4. Onishchenko G.G. Infectious case rate in the Russian Federation for January - October 2012. *Meditsinskiy alfavit. Epidemiologiya i gigiena.* 2012; 4: 3—4. (in Russian)
5. Solov'eva I.L., Kostinov M.P., Kusel'man A.I. Features of vaccination of childhood with a changed premorbidal background against hepatitis B, measles and epidemic parotitis. *Ulyanovsk: Ulyanovsk State University; 2006.* (in Russian)

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2014

УДК 616.932:579.843.1

Подшивалова М.В., Кузютина Ю.А., Захарова И.Б., Лопастейская Я.А., Виктор Д.В.

ХАРАКТЕРИСТИКА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ*, НЕСУЩИХ ИНТЕГРАТИВНЫЕ КОНЬЮГАТИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ SXT-ТИПА

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7

В работе представлена характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на территории Волгоградской области в период 1980—2000 гг. Изучены культурально-морфологические свойства изолятов, их биохимическая активность, устойчивость к антибиотикам различных классов, проведена детекция генов вирулентности и последовательностей трансмиссивного SXT-элемента. Показано наличие различных типов SXT в составе геномов исследуемых штаммов — SXT^{MO10} элемента с кластером генов антибиотикоустойчивости *sulII-strB-dfr18*, SXT^{ET}-элемента, несущего последовательности *sulII dfrA1*, и не имеющего гена устойчивости к аминогли-

козидам *strB*, и *SXT^S* элемента с делетированным кластером генов устойчивости к антибиотикам.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*; *SXT* элемент; полимеразная цепная реакция.

Podshivalova M.V., Kuzutina Yu.A., Zakharova I.B., Lopasteyskaya Ya.A., Viktorov D.V.

CHARACTERISTICS OF ANTIBIOTIC RESISTANT STRAINS OF *VIBRIO CHOLERA*E CARRYING *SXT* TYPE INTEGRATIVE CONJUGATIVE ELEMENTS

Volgograd Anti-Plague Research Institute, 7, Golubinkaya st., Volgograd, Russian Federation, 400131

In the paper there is presented a characteristics of antibiotic-resistant strains of *Vibrio cholerae*, isolated in the Volgograd region during the period of 1980—2000. There were studied cultural and morphological properties of the isolates, their biochemical activity, resistance to antibiotics of different classes, there was performed the detection of virulence genes and sequences of transmissible *SXT*-element. There was demonstrated the presence of different types of *SXT* in the content of the genome of the examined strains — *SXT^{MO10}* element with cluster of the antibiotic resistance gene *sulII*—*strB*—*dfr18*, *SXT^{ET}* element carrying the sequences *sulII* *dfrA1*, and not having a resistance gene to aminoglycosides *strB*, and *SXT^S* element with deleted cluster of antibiotic resistance genes.

Key words: *Vibrio cholerae*, *SXT* element, polymerase chain reaction.

В течение довольно длительного времени возбудитель холеры оставался чувствительным к широкому ряду антимикробных соединений. Но уже начиная с 1990-х годов наблюдается массовое выделение штаммов *Vibrio cholerae* различных серогрупп с фенотипом множественной устойчивости к антибиотикам. В настоящее время большинство выделяемых на эндемичных территориях штаммов возбудителя устойчивы к 3—8 антимикробным соединениям, включая фторхинолоны [1, 2].

Одним из путей формирования множественной устойчивости к антибиотикам у *V. cholerae* является аккумуляция индивидуальных генов антибиотикорезистентности в составе специализированных генетических структур — интегронов хромосомной и плазмидной локализации и трансмиссивных *SXT*-элементах [3—6].

SXT-элементы, или ICEs (Integrative Conjugative Elements), — крупные (60—100 тыс. п. н.) транспозоноподобные структуры, интегрированные в определенные хромосомные локусы возбудителя холеры, способные к конъюгативному переносу, но не к автономной репликации. Наряду с генами транспозаз и генами *Tra*+-фенотипа в составе различных типов ICEs обнаружены гены резистентности к триметоприму (*dfr*), стрептомицину (*strA*, *strB*), сульфаметоксазолу (*sul2*) и хлорамфениколу (*floR*). Первоначально *SXT*-элементы были обнаружены в штаммах *V. cholerae* O139, выделенных во время эпидемии в Индии в 1990-х годах [5], впоследствии — в изолятах *V. cholerae* O1 eltor из Индии, Юго-Восточной Азии, Северной и Восточной Африки, Центральной и Южной Америки. Были установлены различия в структуре *SXT* и характере локализации в нем генов резистентности в штаммах O139- и O1-серогрупп [7]. Отметим, что штаммы *V. cholerae* O1 eltor, вызвавшие эпидемическую вспышку на Гаити, также содержат в составе генома *SXT*-элементы [8].

Для корреспонденции: Подшивалова Мария Васильевна, науч. сотр. лаб. функциональной геномики ФКУЗ "Волгоградской научно-исследовательский противочумный институт" Роспотребнадзора

Как уже было отмечено, в штаммах *V. cholerae* O139- и O1-серогрупп наблюдаются различия в структуре *SXT* и характере локализации в нем генов резистентности [7]. Элемент *SXT^{MO10}* штаммов *V. cholerae* O139 серогруппы несет гены устойчивости к хлорамфениколу (*floR*), сульфаметоксазолу (*sulII*), стрептомицину (*strA*, *strB*) и триметоприму (*dfr18*) [5]. В штаммах *V. cholerae* O1 eltor выявлен элемент *SXT^{ET}* типа, у которого отсутствует ген *dfr18* и присутствует ген резистентности к триметоприму *dfrA1*, расположенный вне основного кластера генов антибиотикостойчивости [5, 9]. Также были описаны варианты *SXT^{MO10}* с утраченными последовательностями *sulII* и *dfr18*, а также варианты *SXT^{MO10}* и *SXT^{ET}* с полностью делетированным кластером генов антибиотикорезистентности [8], что свидетельствует о высокой частоте рекомбинационных событий в пределах данной генетической структуры.

Приведенные сведения иллюстрируют важную роль *SXT*-элементов *V. cholerae* в приобретении и распространении детерминант лекарственной устойчивости. Очевидно, что разработка схем молекулярной детекции и анализа генов резистентности в составе *SXT* актуальна как в плане изучения генетических основ лекарственной устойчивости *V. cholerae*, так и в целях совершенствования алгоритмов генотипирования и эпидемиологического маркирования изолятов *V. cholerae*.

Целью данной работы являлась фенотипическая и молекулярно-генетическая характеристика штаммов *V. cholerae* различных серогрупп, выделенных на территории Волгоградской области и несущих фенотипические маркеры устойчивости *SXT*-элементов.

Материалы и методы

Изучение культурально-морфологических свойств проводили на плотных и жидких питательных средах — щелочном мясопептонном агаре и бульоне pH 8,0 ± 0,2, оценивая морфологию изолированных колоний, характер роста в жидкой среде и особенности морфологии клеток через 24 ч культивирования при

37°C. Ключевые дифференциально-диагностические признаки культур исследовали согласно регламентированной схеме МУК 4.2.2218-07 [10]. Постановку дополнительных тестов по определению биохимической активности проводили на автоматическом микробиологическом анализаторе MicroTax (SY-lab, Австрия) с использованием идентификационных наборов Micronault IDS (SY-lab, Австрия).

Устойчивость штаммов к антибиотикам определяли дискодиффузионным методом на агаре Мюллера—Хинтона согласно МУК 4.2.1890-04 [10], используя наборы дисков производства НИИЭМ.

Детекцию и идентификацию патогенных штаммов возбудителя холеры проводили с использованием набора реагентов «АмплиСенс® *Vibrio cholerae*-FL»-FRT (ЦНИИ эпидемиологии) согласно инструкции производителя.

Для выделения ДНК готовили суспензии клеток 24-часовой агаровой культуры тестируемых штаммов в стерильном 0,15 М NaCl плотностью $1 \cdot 10^5$ м.к/мл. Для обеззараживания суспензий клеток использовали мертиолят натрия в разведении 1:10 000 (0,01%) с последующим прогреванием суспензий при $56 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин. Выделение ДНК проводили с использованием комплекта реагентов «ДНК-сорб-В» (ЦНИИ эпидемиологии) согласно инструкции производителя.

Постановку реакций проводили на амплификаторе RotorGene 6000 (Corbett, Австралия) в формате «мультипрайм» с использованием «горячего старта»: вариант «Скрин» — амплификация мишеней *ctxA* (FAM/Green), *tcpA* (ROX/Orange) и ВКО (JOE/Yellow/HEX), вариант «Тип» — амплификация мишеней *hly* (JOE/Yellow/HEX) — холерные вибрионы всех серогрупп, *wbeT* (FAM/Green) — принадлежность к серогруппе O1, *whf* (ROX/Orange) — принадлежность к серогруппе O139. Общий объем реакции — 25 мкл, объем ДНК-пробы — 10 мкл.

Для идентификации и ПЦР-типирования SXT-элемента использовали набор праймеров, предло-

женный Ramachandran и соавт. [11] и включающий олигонуклеотиды, специфичные гену интегразы *int*_{SXT}, гену устойчивости к сульфаметоксазолу *suII*, гену устойчивости к стрептомицину *strB* и детерминантам устойчивости к триметоприму — генам дигидрофолатредуктаз *dfr18* и *dfrA1*, характерным для SXT^{MO10} (штаммы O139-серогруппы) и SXT^{ET} (штаммы O1-серогруппы), соответственно.

Амплификацию мишеней проводили в монолокусном и мультилокусном форматах на амплификаторе C1000 (Bio-Rad) при параметрах: плавление 94°C 2 мин, 35 циклов 94°C — 1 мин, 60,5°C — 1 мин, 72°C — 1 мин, финальная элонгация 72°C — 10 мин. В мультилокусном варианте ПЦР оптимальная концентрация праймеров составила 10 мкМ для *suII*, *dfr18*, *strB*; 20 мкМ для *dfrA1* и 12 мкМ для *int*_{SXT}.

Результаты и обсуждение

В ходе исследования были проанализированы 66 штаммов *V. cholerae* O1 Eltor и O139, выделенные на территории Волгоградской области из объектов внешней среды (вода поверхностных водоемов) в период 1970—2000 гг. Для детального исследования нами были отобраны 2 штамма O1 (B161, B196) и 1 штамм O139 (B191) серогрупп, имеющие повышенный уровень устойчивости к антибиотикам различных классов, включая фенотипические маркеры резистентности, характерные для SXT-элементов (аминогликозиды I поколения, триметоприм/сульфаметоксазол). Результаты определения антибиотикограмм тестируемых штаммов приведены в табл. 1. В качестве элемента сравнения в таблице 1 и далее показан атоксигенный штамм *V. cholerae* O1 Eltor B152, выделенный из проб воды р. Волги в 1978 г. и не отнесенный по результатам анализа к группе изолятов с фенотипом множественной антибиотикорезистентности.

В щелочном мясопептонном бульоне культуры штаммов *Vibrio cholerae* B161, *V. cholerae* B196, *V. cholerae* B191 вызывали равномерное помутнение среды с образованием на поверхности рыхлой беловатой пленки и легкого осадка на дне пробирки. На поверхности щелочного агара рост тестируемых культур холерных вибрионов проявляется в формировании крупных (2—3 мм) гладких прозрачных колоний с ровным краем, легко эмульгируемых в 0,15 М NaCl. В мазках по Граму клетки тестируемых культур штаммов представляют собой грамотрица-

Таблица 1

Антибиотикограммы исследуемых штаммов *V. cholerae*

Антибиотик	МПК препаратов, мкг/мл			
	<i>V. cholerae</i> B161	<i>V. cholerae</i> B191	<i>V. cholerae</i> B196	<i>V. cholerae</i> B152
Ампициллин	16	< 8	32	4
Амоксициллин	16	4	16	4
Амоксициллин/клавуланат	16	4	4	2—4
Имипенем	< 4	< 4	< 4	< 4
Цефтазидим	2	2—4	2—4	2
Левомецетин	< 4	16	< 4	< 4
Гентамицин	< 4	< 4	8	< 4
Амикацин	4	8	8	4
Ципрофлоксацин	< 1	< 1	< 1	< 1
Офлоксацин	< 2	< 2	< 2	< 2
Триметоприм/сульфаметоксазол	8	> 64	> 64	8
Доксициклин	< 4	< 4	< 4	< 4

Характеристика исследуемых штаммов по ключевым диагностическим признакам

Штамм	Оксидаза	Индо- фенол оксидаза	Дезокси- холат Na	Глюкоза окисле- ние	Глюкоза фермен- тация	Лизин декар- бокси- лаза	Аргинин дигидро- лаза	Орнитин декар- бокси- лаза	Манноза	Сахароза	Араби- ноза
<i>V. cholerae</i> B161	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i> B191	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
<i>V. cholerae</i> B196	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
<i>V. cholerae</i> B152	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

тельные, не содержащие спор, полиморфные слегка изогнутые палочки. Тест на подвижность методом «висячей капли» был положительным для всех изученных штаммов.

Пробы с диагностическими фагами и реакция агглютинации с холерными диагностическими сыворотками подтвердили принадлежность штаммов *V. cholerae* B161 и *V. cholerae* B196 к O1-серогруппе биовару эльтор, а штамма *V. cholerae* B191 — к O139-серогруппе возбудителя.

Результаты тестирования ключевых биохимических признаков 18-часовых агаровых культур штаммов приведены в табл. 2.

Результаты оценки биохимической активности тестируемых штаммов в отношении 23 субстратов на идентификационных планшетах Micronault IDS с использованием 24-часовых культур микроорганизмов, выращенных на щелочном агаре, приведены в табл. 3.

Проведенный анализ, таким образом, продемонстрировал, что исследуемые штаммы холерного вибриона обладают типичными родовыми и видовыми признаками биохимической активности. Идентификационные профили тестируемых изолятов, сформированные по результатам исследования активности в отношении расширенного набора биохимических субстратов (табл. 3) также соответствуют стандартным идентификационным биохимическим профилям штаммов *V. cholerae*.

Результаты проведенного генотипирования тестируемых штаммов суммированы в табл. 4. Из полученных результатов видно, что штамм O139 серогруппы *V. cholerae* B191 является эпидемически значимым, обладающим важнейшими детерминантами вирулентности — генами токсинообразования (*ctxA*) и токсинорегулируемых пилей адгезии (*tcpA*). Время выделения данного штамма (1993) соответствует периоду распространения эпидемически значимых вариантов *V. cholerae* O139 с территорий эндемичных по холере регионов мира. ПЦР-детекция видоспецифических (*hly*) и серогруппоспецифических (*wbeT* и *wbf*) мишеней подтвердила принадлежность *V. cholerae* B191 к O139-серогруппе, а *V. cholerae* B152, B161 и B196 — к O1-серогруппе холерных вибрионов.

Типирование исследуемых штаммов в мультилокусной ПЦР с праймерами, специфичными последовательностям SXT-элементов (см. рисунок) про-

демонстрировало, что *V. cholerae* B-191 содержит типичный SXT^{MO10} с кластером генов антибиотикоустойчивости *sulII—strB—dfr18*, идентичный SXT-элементу коллекционного штамма *V. cholerae* O139 Bengal, взятого для сравнения. В штамме *V. cholerae* B-196 детектирован вариант элемента SXT^{ET}-типа, несущий последовательности *sulIII* и *dfrA1* и не имеющий гена устойчивости к аминогликозидам I поколения (*strB*). SXT-элемент штамма *V. cholerae* B-161

Таблица 3

Профили биохимической активности штаммов *V. cholerae*

Тест	Номер штамма, результат теста			
	B161	B191	B196	B152
Образование индола	+	+	+	+
Гидролиз эскулина	-	-	-	-
Уреаза	-	-	-	-
Лизиндекарбоксилаза	+	+	+	+
Орнитиндекарбоксилаза	+	+	+	+
Аргининдигидролаза	+	-	-	+
Ферментация глюкозы	+	+	+	+
Ферментация сахарозы	+	+	+	+
Ассимиляция глюкозы	+	+	+	+
Ассимиляция маннозы	+	+	-	+
Ассимиляция мальтозы	+	-	+	+
Ассимиляция п-ацетилглюкозамина	+	-	+	+
Ассимиляция маннитола	+	-	+	+
Ассимиляция глюконата	+	-	+	+
Ассимиляция γ-гидроксibuтирата	-	-	-	-
Ассимиляция лактата	+	-	+	+
Ассимиляция адипата	-	-	-	-
Ассимиляция суберата	-	-	-	-
Ассимиляция малата	+	+	+	+
Ассимиляция фенилацетата	-	-	-	-
Ассимиляция гистидина	+	+	-	+
Ортонитрофенил-β-галактозидаза	+	+	-	+
Фосфолипаза C	+	+	+	+
Фосфодиэстераза	+	+	+	+
Пролинамидаза	+	-	+	+
α-Мальтозидаза	-	-	-	-
Хитиназа	+	+	+	+
Кислая фосфатаза	-	-	-	-
Оксидаза	+	+	+	+

Таблица 4

Результаты генотипирования штаммов <i>V. cholerae</i>				
	<i>V. cholerae</i> B161	<i>V. cholerae</i> B191	<i>V. cholerae</i> B196	<i>V. cholerae</i> B152
Серогруппа	O1	O139	O1	O1
Генотип	<i>hly</i> +	<i>ctxA</i> +	<i>hly</i> +	<i>hly</i> +
	<i>wbeT</i> +	<i>tcpA</i> +	<i>wbeT</i> +	<i>wbeT</i> +
		<i>wbf</i> +		

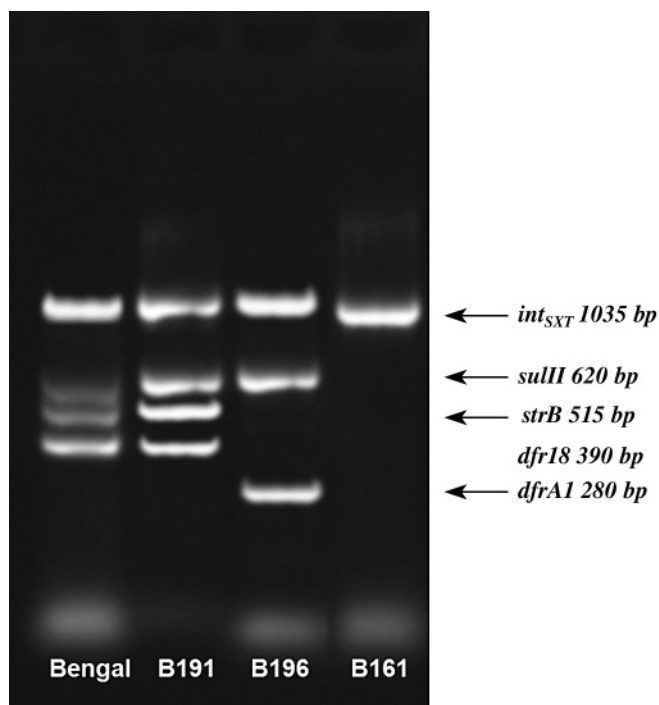
был полностью лишен кластера генов устойчивости к антибиотикам. Сопоставление выявленных генетических профилей SXT-элементов с профилями чувствительности к антибиотикам различных классов (см. табл. 1) демонстрирует наличие ожидаемых фенотипов резистентности у SXT⁺-штаммов.

Заключение

Первые упоминания о различных типах SXT относятся к началу 90-х годов прошлого века, когда в клинических изолятах *V. cholerae* O139 из Индии был обнаружен элемент SXT^{MO10}-типа, а в штаммах *V. cholerae* O1 эльтор из Бангладеш, Индии и Мозамбика выявлен SXT^{ET}-элемент, который является близкородственным, но не идентичным SXT^{MO10} [8]. В настоящее время большинство, если не все, азиатские штаммы *V. cholerae* содержат данные элементы [6, 7], примером могут служить и токсигенные штаммы *V. cholerae* O1 эльтор Огава, вызвавшие эпидемию 2010—2011 гг. на территории Гаити и содержащие в составе генома элемент SXT^{ET} типа [12].

Все известные ICEs содержат вариабельную ДНК, придающую элементу специфические свойства. Вариабельные регионы ICEs составляют от 30 до 60 тыс. п. н. [13], и кластеры генов антибиотикорезистентности входят в состав этих вариабельных регионов [14]. Частота рекомбинационных событий в пределах вариабельных регионов ICEs довольно высока; именно за счет данного обстоятельства возникают варианты SXT-элементов, распространенные в изолятах возбудителя из того или иного географического региона и несущие различные наборы генов устойчивости к антибиотикам. Наличие SXT-элемента определенного типа в геноме штамма возбудителя может, таким образом, указывать на вероятный источник его происхождения и ожидаемый спектр антибиотикорезистентности.

Ранее мультилокусный ПЦР-анализ кластера генов антибиотикорезистентности ICE, основанный на детекции фрагментов гена интегразы *int*_{SXT}, гена устойчивости к сульфаметоксазолу *sul2*, гена устойчивости к стрептомицину *strB* и детерминант устойчивости к триметоприму *dfr18* и *dfrA1*, характерных для вариантов элементов SXT^{MO10} (штаммы O139) и SXT^{ET} (штаммы O1 eltor) соответственно, был использован для генетической паспортизации штаммов холерного вибриона, циркулирующих в эндемичных по холере регионах Азии [12]. В настоящей работе сходный методологический подход был ис-



Результаты генотипирования SXT-элемента в антибиотикорезистентных штаммах *V. cholerae*. Расположение на треках, слева направо: *V. cholerae* Bengal SXT^{MO10}, *V. cholerae* B191 SXT^{MO10}, *V. cholerae* B196 SXT^{ET}, *V. cholerae* B161 SXT^S.

пользован нами для ретроспективной углубленной генетической характеристики региональных изолятов *V. cholerae* с фенотипом множественной устойчивости к антибиотикам. В результате проведенных исследований, таким образом, нами были впервые идентифицированы штаммы *V. cholerae* O1- и O139-серогрупп, выделенные на территории Российской Федерации и несущие ICEs с различным набором генов антибиотикорезистентности.

Обнаружение последовательностей интегративных элементов семейства SXT/R391 и выявленные различия их структуры и вариабельности состава кластера генов антибиотикорезистентности в исследованных нами штаммах *V. cholerae*, несущих фенотипические маркеры устойчивости к аминогликозидам и триметоприму/сульфаметоксазолу, подтверждают важную роль данных генетических элементов в формировании множественной устойчивости возбудителя холеры к антимикробным соединениям. Семейство SXT/R391 является самым представительным по числу относящихся к нему ICEs; эти генетические элементы описаны в штаммах *Vibrio cholerae* различных серогрупп, у 5 видов рода *Vibrio*, а также других родов *Vibrionaceae*. Сравнительный анализ геномов SXT/R391 ICEs демонстрирует, что данные элементы в большинстве являются мозаичными, сформировавшимися, по-видимому, в результате рекомбинации между различными «исходными» ICEs. Формирование рекомбинантных ICEs может дать новые мобильные элементы, несущие новые комбинации генов, в том числе детерминант устойчивости к антибиотикам,

расширяющие адаптивный потенциал бактериальных видов.

Охарактеризованные нами штаммы *V. cholerae* O1- и O139-серогрупп были депонированы в Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур ФБУН ГНЦ ПМБ Роспотребнадзора (Оболensk) как референтные для различных типов ICEs и предназначенные для дальнейшего изучения молекулярно-генетических механизмов устойчивости к антибиотикам возбудителя холеры и генетической паспортизации антибиотикорезистентных штаммов *V. cholerae* на основе генетических маркеров, связанных с интегронами, конъюгативными плазмидами и трансмиссивными интегративными элементами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Baranwal S., Dey K., Ramamurthy T., Nair G.B., Kundu M. Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2676—8.
2. Krishna B.V., Patil A.B., Chandrasekhar M.R. Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100: 224—6.
3. Amita S. R., Thungapathra M., Ramamurthy T., Nair G.B. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 500—2.
4. Ceccarelli D., Bani S., Cappuccinelli P., Colombo M.M. Prevalence of aadA1 and dfrA15 class I integron cassettes and SXT circulation in *Vibrio cholerae* O1 isolates from Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 1095—7.
5. Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Faruque S.M., Woodgate R. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2991—3000.
6. Ehara M., Nguyen B.M., Nguyen D.T., Toma C., Higa N., Iwanaga M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. *Epidemiol. and Infect.* 2004; 132 (4): 595—600.
7. Iwanaga M., Toma C., Miyazato T., Insisiengmay S., Nakasone N. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 2364—9.
8. Sjölund-Karlsson M., Reimer A., Folster J., Walker M., Dahourou G., Batra D.G. et al. Drug-resistance mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 outbreak strain, Haiti, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 17: 2151—4.
9. Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 4259—69.
10. Методические указания «Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04)». М.; 2004.
11. Jain M., Kumar P., Goel A.K., Kamboj D.V., Singh L. Class I integrons and SXT elements conferring multidrug resistance in *Vibrio cholerae* O1 strains associated with a recent large cholera outbreak in Orissa, Eastern India. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32: 459—60.
12. Ramachandran D., Bhanumathi R., Singh D. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 346—51.
13. Wozniak R.A., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G. et al. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5 (12): e1000786. doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.
14. Bordeleau E., Brouillette E., Robichaud N., Burrus V. 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*. *Environ. Microbiol.* 2010; 12 (2): 510—23.

REFERENCES

1. Baranwal S., Dey K., Ramamurthy T., Nair G.B., Kundu M. Role of active efflux in association with target gene mutations in fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Vibrio cholerae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46: 2676—8.
2. Krishna B.V., Patil A.B., Chandrasekhar M.R. Fluoroquinolone-resistant *Vibrio cholerae* isolated during a cholera outbreak in India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2006; 100: 224—6.
3. Amita S. R., Thungapathra M., Ramamurthy T., Nair G.B. Class I integrons and SXT elements in El Tor strains isolated before and after 1992 *Vibrio cholerae* O139 outbreak, Calcutta, India. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9: 500—2.
4. Ceccarelli D., Bani S., Cappuccinelli P., Colombo M.M. Prevalence of aadA1 and dfrA15 class I integron cassettes and SXT circulation in *Vibrio cholerae* O1 isolates from Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 58: 1095—7.
5. Hochhut B., Lotfi Y., Mazel D., Faruque S.M., Woodgate R. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 2991—3000.
6. Ehara M., Nguyen B.M., Nguyen D.T., Toma C., Higa N., Iwanaga M. Drug susceptibility and its genetic basis in epidemic *Vibrio cholerae* O1 in Vietnam. *Epidemiol. and Infect.* 2004; 132 (4): 595—600.
7. Iwanaga M., Toma C., Miyazato T., Insisiengmay S., Nakasone N. Antibiotic resistance conferred by a class I integron and SXT constin in *Vibrio cholerae* O1 strains isolated in Laos. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 2364—9.
8. Sjölund-Karlsson M., Reimer A., Folster J., Walker M., Dahourou G., Batra D.G. et al. Drug-resistance mechanisms in *Vibrio cholerae* O1 outbreak strain, Haiti, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 17: 2151—4.
9. Beaber J.W., Hochhut B., Waldor M.K. Genomic and functional analyses of SXT, an integrating antibiotic resistance gene transfer element derived from *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 2002; 184: 4259—69.
10. Методические указания "Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам" (МУК 4.2.1890-04). Moscow; 2004. (in Russian)
11. Jain M., Kumar P., Goel A.K., Kamboj D.V., Singh L. Class I integrons and SXT elements conferring multidrug resistance in *Vibrio cholerae* O1 strains associated with a recent large cholera outbreak in Orissa, Eastern India. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2008; 32: 459—60.
12. Ramachandran D., Bhanumathi R., Singh D. Multiplex PCR for detection of antibiotic resistance genes and the SXT element: application in the characterization of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2007; 56: 346—51.
13. Wozniak R.A., Fouts D.E., Spagnoletti M., Colombo M.M., Ceccarelli D., Garriss G. et al. Comparative ICE genomics: insights into the evolution of the SXT/R391 family of ICEs. *PLoS Genet.* 2009; 5 (12): e1000786. doi: 10.1371/journal.pgen.1000786.
14. Bordeleau E., Brouillette E., Robichaud N., Burrus V. 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*. *Environ. Microbiol.* 2010; 12 (2): 510—23.

Поступила 16.04.14

Received 16.04.14

Сведения об авторах

Кузютина Юлия Александровна, науч. сотр. лаб. функциональной геномики; **Захарова Ирина Борисовна**, канд. биол. наук, доцент, ст. науч. сотр. лаб. генетики; **Лопастейская Яна Анатольевна**, науч. сотр. лаб. функциональной геномики; **Викторов Дмитрий Викторович**, доктор биол. наук, доцент, зав. отделом биохимии возбудителей особо опасных инфекций.