

Захарова И.Б.¹, Водяницкая С.Ю.², Подшивалова М.В.¹, Кругликов В.Д.², Архангельская И.В.², Викторов Д.В.¹

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAE* NON-O1/NON-O139, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БАЛЛАСТНЫХ ВОД СУДОВ И АКВАТОРИИ ПОРТОВ РОСТОВСКОЙ ОБЛАСТИ

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400131, г. Волгоград, ²ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону

В данной работе приведены результаты анализа присутствия в геномах штаммов *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139, выделенных из судовых балластных вод и прибрежной зоны Таганрогского залива, нуклеотидных последовательностей интегронов класса 1 (In1) и интегративных конъюгативных элементов семейства SXT/R391. Интактный фрагмент 3'-консервативного сегмента In1 (*qacEdelta1-sul*) детектирован в 3 штаммах (33, 59, 182), тогда как в штаммах *V. cholerae* 28 и 52 выявлены вероятные изменения последовательности-мишени (дупликация и делеция соответственно). Фрагмент гена интегразы *int_{SXT}* SXT/R391 обнаружен в 7 из 10 исследованных штаммов. Группы штаммов № 27, 36, 38, 117 и № 59, 182 принадлежат к двум более часто встречаемым генотипам и идентичны в пределах групп по исследованным генетическим маркерам, тогда как остальные изоляты характеризуются уникальными генотипами, что указывает на их различные источники происхождения.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139; балластные воды судов; интегроны класса 1; SXT/R391—элемент.

Для цитирования: Эпидемиология и инфекционные болезни. 2015; 20 (3): 47–50.

Zakharova I.B.¹, Vodyanitskaya S.Yu.², Podshivalova M.V.¹, Kruglikov V.D.², Arkhangelskaya I.V.², Viktorov D.V.¹

MOLECULAR GENETIC CHARACTERIZATION OF *VIBRIO CHOLERAE* NON-O1/NON-O139 STRAINS ISOLATED FROM SHIP BALLAST AND PORT SURFACE WATER IN ROSTOV REGION

¹Volgograd Anti-Plague Research Institute of Federal Service on Customers' Rights Protection and Human Well-being Surveillance, 7, Golubinskaya Str., Volgograd, Russian Federation, 400131

²Rostov-on-Don Institute for Plague Control of Federal Agency for Consumer Rights Protection and Human Welfare Supervision, 117/40, M. Gorkogo Str., Rostov-on-Don, Russian Federation, 344002

In the given paper there are presented the results of analysis for presence in genomes of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated from ships' ballast water and the coastal zone of Taganrog Gulf class 1 integrons (In1) and SXT/R391 integrative conjugative elements. The intact sequence of In1 3'-conservative segment (*qacEdelta1-sul*) was detected in 3 strains (no. 33, 59, 182), whereas in strains *V. cholerae* no. 28 and 52 there were revealed the probable changes of target sequence (duplication and deletion, respectively). The fragment of SXT/R391 integrase *int_{SXT}* gene was detected in 7 of 10 strains tested. Group of strains no. 27, 36, 38, 117 and 59, 182 belong to 2 most common identified genotypes, while the rest isolates are characterized by unique genotypes that indicates to different source of their origins.

Key words: *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139, ships' ballast water, class 1 integron,

Citation: *Epidemiologiya i Infektsionnye Bolezni*. 2015; 20(3): 47–50. (In Russ.)

В системе эпидемиологического надзора по холере одно из ведущих мест занимают исследования открытых водоемов. В процессе проведения мониторинга поверхностных водоемов и хозяйственно-бытовых стоков на наличие возбудителей холеры в водных объектах Ростовской области обнаруживаются *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 серогрупп, а также имеют место случаи выделения штаммов от больных острыми кишечными инфекциями (ОКИ), вибрионосителей и лиц, контактировавших с ними.

Обнаружение штаммов обуславливает необходимость выяснения основных причин и условий, способствующих появлению и распространению вибрионов в поверхностных водоемах. Многочисленными исследованиями установлена связь между обнаружением вибрионов и сбросом в водоемы недостаточно очищенных хозяйственно-бытовых, производственных и ливневых сточных вод, а также загрязнениями, поступающими с прибрежных территорий населенных пунктов, не имеющих канализации. Определенное значение в распространении вибрионов принадлежит морскому транспорту, который заносит с балластными водами различные виды морских обитателей, в том числе вирусы и бактерии, патогенные для человека. Так, занос возбудителя холеры в

страны Южной Америки в 1991 г. эксперты ВОЗ полностью связывают с морскими судами.

Холерные вибрионы non-O1/non-O139 сегодня являются предметом пристального внимания исследователей и практических эпидемиологов, учитывая то обстоятельство, что их штаммы являются по сути природными резервуарами генов, расширяющих патогенный и эпидемический потенциал и способных передаваться *V. cholerae* O1 и O139 серогрупп. Так, штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139 могут служить источником для вибрионов эпидемически значимых серогрупп новых, ранее не встречавшихся у них комбинаций генов устойчивости к антимикробным соединениям [1].

В Ростовской области в течение 2010–2014 гг. ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора и Управление Роспотребнадзора по Ростовской области ведут исследования балластных вод судов, прибывающих в порты Ростовской области из-за рубежа, на наличие холерных вибрионов. За период 2010–2014 гг. исследовано 285 проб балластной воды, возбудители холеры обнаружены не были, однако в 76 (26,66 %) пробах были выделены штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139.

В данной работе проведен сравнительный анализ ге-

Таблица 2

Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Последовательность 5'-3'	Мишень*
qacEdI	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Ген устойчивости к четвертичным аммониевым соединениям qacEdelta1 3'-консервативного сегмента интегронов InI (accession no. X15370, 211-230)
sul	GCAAGGCGGAAACCCGCC	Ген устойчивости к сульфонидамидам <i>sulI</i> 3'-консервативного сегмента интегронов <i>InI</i> (accession no. X12869, 1360-1341)
SXT-F	TTATCGTTTCGATGGC	Ген интегразы <i>int</i> SXT-элемента (accession no. AF099172, 129-144 и 915-931)
SXT-B	GCTCTCTTGTCCGTTC	

Примечание. * – указаны позиции праймеров на последовательностях *InI* и SXT, представленных в Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

SXT/R391 исследовали в ПЦР с использованием набора генспецифических праймеров, перечисленных в табл. 2. Амплификацию участка 3'-консервативного сегмента интегронов *InI* (праймеры qacEdI-sul) и фрагмента гена интегразы *int_{SXT}* (праймеры SXT-F – SXT-B) проводили по программе: прогрев 95°C 5 мин, 40 циклов (94°C – 30 с, 57°C – 30 с, 72°C – 60 с), финальная элонгация 72°C 10 мин, температура отжига праймеров составляла 58 и 55°C соответственно. Продукты ПЦР анализировали в 1,5% агарозных гелях.

Результаты и обсуждение

Множественная устойчивость к антибиотикам у *V. cholerae* может формироваться в результате горизонтального генетического переноса, опосредованного трансмиссивными плазмидами, интегронами, а также трансмиссивными интегративными элементами (ICE).

Интегроны, локализованные на хромосомах либо

Таблица 3

Характеристика штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139 по генетическим маркерам множественной антибиотикорезистентности

Штамм <i>V. cholerae</i> non-O1/non-O139	Генетический маркер			Генотип
	qacEdelta1-sul	qacEdelta1-sul рекомбинированный	int _{SXT}	
27	-	-	+	A
28	+	+	+	B
32	-	-	-	C
33	+	-	+	D
36	-	-	+	A
38	-	-	+	A
52	-	+	+	E
59	+	-	-	F
117	-	-	+	A
182	+	-	-	F

нотипов штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139, выделенных из судовых балластных вод и прибрежной зоны Таганрогского залива в 2013 г., по маркерам множественной антибиотикорезистентности, связанным с мобильными генетическими элементами холерного вибриона, с целью доказательства заносного характера обнаруживаемых в балластных водах судов штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139.

Материалы и методы

В исследование были взяты 10 штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139: 7 штаммов, изолированных из балластных вод морских судов, прибывших в порты Ростовской области, и 3 штамма, изолированных в рекреационной зоне Таганрога (табл. 1). Отбор проб проводился сотрудниками лаборатории санитарной охраны территории ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора предложенными ими способами в зависимости от конструкции судна: через специальные лючки, смотровые крышки балластных емкостей, замерные отверстия балластных цистерн с помощью насоса [2].

Выделение и идентификация штаммов проведены сотрудниками лаборатории микробиологии холеры Ростовского-на-Дону противочумного института в соответствии с МУК 4.2.2218-07 [3]. Дифференциацию водных штаммов холерных вибрионов от *V. cholerae* O1 и O139 проводили с использованием моноклональных антител в реакции слайд-агглютинации.

Исследование на генетические маркеры множественной антибиотикорезистентности проведены в Волгоградском противочумном институте. Для выделения геномных ДНК 200 мкл бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl, pH 7,2 плотностью $2 \cdot 10^9$ м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-HCl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мг на 1 мл желатина, 0,9% Nonidet P-40, 0,9% твин-20, 150 мкг/мл протеиназы K), инкубировали при 65°C 120 мин и прогревали при 96°C 30 мин для инактивации фермента. Далее пробы центрифугировали (10 000 об/мин, 1 мин), 10 мкл супернатанта использовали при постановке ПЦР.

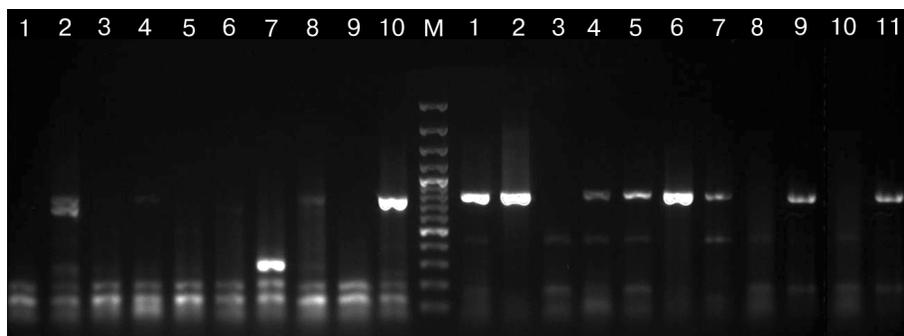
Наличие в геномах исследуемых штаммов нуклеотидных последовательностей интегронов класса 1 (*InI*) и интегративных конъюгативных элементов семейства

Таблица 1

Исследуемые штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139

Штамм	Дата забора	Место забора (судно, порт)	Источник выделения
27	09.08.13	Волго-Балт 220, Таганрог	Балластные воды судов
28	16.08.13	Волго-Балт 220, Таганрог	
32	23.08.13	Сандра 2, Таганрог	
33	24.08.13	ВФ Танкер 4, Таганрог	
38	01.09.13	ВФ Танкер 4, Таганрог	Азовское море
36	01.09.13	Астон Трэвелер, Ростов	
52	22.09.13	ВФ Танкер 8, Таганрог	
59	20.05.13	Пляж "Тополь", Таганрог	
117	10.06.13	Акватория порта Таганрог	
182	01.07.13	Пляж "Маяковка", Таганрог	
		Таганрог	

Примечание. Штаммы № 27 и 28 выделены с одного и того же судна «Волго-Балт 220», штаммы № 33 и 38 – с одного и того же судна «ВФ Танкер 4».



Детекция последовательностей интегронов класса 1 (треки 1–10, левая часть рисунка) и ICE элемента семейства SXT/R391 (треки 1–11, правая часть рисунка) в штаммах *V. cholerae* non-o1/non-o139. Обозначения: 1 – 27, 2 – 28, 3 – 32, 4 – 33, 5 – 36, 6 – 38, 7 – 52, 8 – 59, 9 – 117, 10 – 182, 11 – *V. cholerae* B-191, М – ДНК-лестер 100 bp (100–500 bp).

внехромосомных элементах способны включать в свой состав индивидуальные генные кассеты по механизму сайтспецифической рекомбинации. Структурно интегроны состоят из центрального варибельного региона, несущего вставки генных кассет, и фланкирующих его 5'- и 3'-консервативные сегменты. Общими элементами интегронов являются ген *intI*, кодирующий интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ, сайт рекомбинации *attI* и промотор *P_c*, обеспечивающий транскрипцию внедренных генных кассет. В составе каждой из генных кассет присутствует сайт узнавания интеграз

attC (59 bp-элемент). Область кассетной вставки *InI* может включать от одной до десяти кодирующих последовательностей генов устойчивости к антимикробным соединениям различных классов (бета-лактамы, аминогликозиды, хлорамфеникол, сульфонамиды, макролиды, фосфомицин, линкомицин, рифампицин, отдельные антисептики) [4].

ICE (SXT-элементы) – крупные (60–100 kbp) транспозоноподобные структуры, интегрированные в определенные хромосомные локусы возбудителя холеры, способные к вырезанию и конъюгативному переносу, однако не способные к автономной репликации. Наряду с генами транспозаз и генами *Tra⁺*-фенотипа, в составе различных типов ICE обнаружены гены резистентности к триметоприму (*dfp*), стрептомицину (*strA*, *strB*), сульфаметоксазолу (*sul2*) и хлорамфениколу (*floR*) [5].

Результаты проведенного ПЦР-анализа приведены на рисунке. Полноразмерные специфические фрагменты последовательностей 3'-консервативного сегмента интегронов класса 1 (гены *qacEdelta1-sul*, размер ампликона 800 bp) детектированы в 4 исследуемых штаммах (№ 28, 33, 59, 182), причем в штамме *V. cholerae* 28 выявлен дополнительный ампликон размером порядка 700 bp, что может свидетельствовать о дупликации тар-

Таблица 4

Анализ транспортных связей судов, из балласта которых выделены штаммы *V. cholerae* non-O1/non-O139

Номер штамма	Дата отбора пробы	Место отбора (наименование судна, флаг государства)	Порт убытия	Порт прибытия	Объем балласта на борту, т	Место смены балласта (координаты)
27	09.08.13	“Волго-Балт 220”, Белиз	Немрут, Турция	Таганрог, РФ	1200	Эгейское море (38°52,2'N–26°48,9'E; 40°00,4'N–29°09,3'E) Мраморное море (41°13,2'N–29°07,9'E), Черное море (44°55,9'N–36°12,6'E), Азовское море (45°56,1'N–36°58,3'E)
28	16.08.13	“Волго-Балт 220”, Белиз	Керчь, Украина	Таганрог, РФ	2380	Черное море (44°26,8'N–35°40,9'E), Азовское море (45°43,6'N–36°55,2'E)
32	23.08.13	“Сандра 2”, Сент-Китс и Невис	Самсун, Турция	Таганрог, РФ	800	Азовское море (45°27,3'N–36°45,5'E; 45°59,7'N–37°03,8'E)
33	24.08.13	“ВФ Танкер 4”, Россия	Керчь, Украина	Таганрог, РФ	3500	Черное море (45°05,9'N–36°31,2'E; 45°07,5'N–36°29,8'E), Черное море (45°12,1'N–36°29,9'E; 45°25,6'N–36°43,6'E), Азовское море (45°25,8'N–36°55,2'E; 46°19,0'N–37°14,0'E)
36	01.09.13	“Астон Трэвелер”, Россия	Бандырма, Турция	Ростов, РФ	600	Мраморное море (40°58,2'N–28°54,8'E; 41°18,0'N–29°16,0'E), Черное море (44°50,4'N–36°29,5'E; 45°38,7'N–36°52,6'E), Нулевой км реки Дон
38	01.09.13	“ВФ Танкер 4”, Россия	Керчь, Украина	Таганрог, РФ	3000	Черное море (45°06,0'N–36°31,4'E; 45°28,3'N–36°46,8'E), Азовское море (45°36,0'N–36°51,0'E; 46°06,2'N–37°07,0'E)
52	22.09.13	ВФ Танкер 8, Россия	Керчь, Украина	Таганрог, РФ	3000	Азовское море (46°01,0'N–37°04,8'E)

гетной последовательности вследствие рекомбинационных событий. Результат амплификации с праймерами *qacEdelta1-sul* ДНК штамма *V. cholerae* 52, где детектируется фрагмент 300 bp (трек 7, левая часть), может быть следствием делеции во внутренней области 3'-консервативного сегмента.

Специфический фрагмент интегразы *int_{SXT}* размером 870 bp обнаружен в 7 из 10 исследованных штаммов вибрионов non-O1/non-O139, что свидетельствует о наличии в их геномах ICE-элемента семейства SXT/R391 (см. рисунок, правая часть электрофореграммы). В качестве положительного контроля был использован штамм *V. cholerae* B-191 O139-серогруппы, несущий ICE элемент семейства SXT/R391, принадлежащий к варианту SXT^{MO10} [6].

Данные о выявленных генотипах исследованных штаммов по анализируемым маркерам суммированы в табл. 3. Как следует из полученных результатов, группы штаммов № 27, 36, 38, 117 и № 59, 182 принадлежат к двум более часто встречаемым генотипам и идентичны в пределах групп по исследованным генетическим маркерам, тогда как остальные изоляты характеризуются уникальными генотипами.

Таким образом, судя по результатам проведенного анализа, единый (но независимый друг от друга) источник происхождения могут иметь группы штаммов № 27, 36, 38, 117 (балластные воды и акватория порта) и № 59, 182 (пляжи). Штаммы № 28, 32, 33, 52, выделенные из образцов балластных вод судов, характеризуются уникальными генотипами по анализируемым маркерам, что указывает на их различные источники происхождения и отличия от штаммов, выделенных на пляжах и в акватории порта.

Анализ транспортных связей судов (табл. 4) с выделенными штаммами, характеризующимися уникальными генотипами, показал, что холерные вибрионы могут быть поэтапно занесены в акватории портов Средиземного и Черного морей из других акваторий. Порты Средиземного и Черного морей могут быть «реципиентами» балласта судов, прибывших из стран, неблагополучных по холере, и «донорами» для судов, следующих в Азовское море. Подтверждением этому служит наличие различных генетических маркеров у штаммов № 27 и 28, выделенных с одного и того же судна «Волго-Балт 220» в разные сроки, и штаммов № 33 и 38, изолированных с одного и того же судна «ВФ Танкер 4» в августе и сентябре 2013 г.

Несмотря на проводимые балластные операции, наличие схожих по генотипу штаммов в водном балласте судов и в акватории Азовского моря может свидетельствовать, что рекомендуемый Конвенцией способ смены балласта D-1 при переходе из одной акватории в другую на судах смешанного «река – море» плавания малоэффективен. По мнению Н.В. Сустретовой, даже при троекратной смене балласта в танках образуются застойные зоны и полной смены воды не происходит [7].

Таким образом, результаты проведенного генетического анализа штаммов *V. cholerae* non-O1/non-O139, изолированных в прибрежной зоне Таганрогского залива и выделенных из судовых балластных вод, подтверждают заносной характер последних, что свидетельствует о выявлении нового объекта эпидемиологического над-

зора при холере в Российской Федерации, мероприятия для которого предложены нами ранее [8].

ЛИТЕРАТУРА

- Rodríguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56(5): 2619–26.
- Водяницкая С.Ю., Лях О.В. Разработка способов отбора балластной воды на судах смешанного «река-море» плавания для исследования на холеру. *Здоровье населения и среда обитания.* 2014; 1: 37–40.
- Методические указания «Лабораторная диагностика холеры (МУК 4.2.2218-07)». М.; 2007.
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev. Microbiol.* 2006; 4: 608–20.
- Wozniak R., Fouts D., Spagnoletti M., 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.
- Подшивалова М.В., Кузюткина Ю.А., Захарова И.Б., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В. Характеристика антибиотико-резистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT типа. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2014; 18 (3): 34–9.
- Сустретова Н.В. Обеспечение экологической безопасности балластных вод на судах смешанного плавания «река-море»: Дисс. ... канд. техн. наук. Н. Новгород; 2011.
- Водяницкая С.Ю., Лях О.В., Ломов Ю.М., Рыжков Ю.В., Иванова Н.Г., Иванова А.И. и др. Противоэпидемические (профилактические) мероприятия при выделении возбудителей холеры из судовых балластных вод. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика.* 2014; 2 (75): 40–4.

Поступила 11.03.15

REFERENCES

- Rodríguez-Blanco A., Lemos M., Osorio C. Integrating conjugative elements as vectors of antibiotic, mercury, and quaternary ammonium compound resistance in marine aquaculture environments. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56 (5): 2619–26.
- Vodyanitskaya S.Yu., Lyakh O.V. Developing methods of ballast water sampling from the tanks of “River-Sea” type vessels aimed at the *Vibrio cholerae* analysis. *Zdorov'e naseleniya i sreda obitaniya.* 2014; 1: 37–40. (in Russian)
- Guidelines “Laboratory Diagnosis of Cholera (MUK 4.2.2218-07)”. Moscow; 2007. (in Russian)
- Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Rev. Microbiol.* 2006; 4: 608–20.
- Wozniak R., Fouts D., Spagnoletti M. 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.
- Podshivalova M.V., Kuzyutina Yu.A., Zakharova I.B., Lopasteyskaya Ya.A., Viktorov D.V. Characterization of drug resistant *Vibrio cholerae* strains carrying the SXT-type integrative conjugative elements. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni.* 2014; 18 (3): 34–9. (in Russian)
- Sustretova N.V. *Ensuring Ecological Safety of Ballast from the Tanks of “River-Sea” Type Vessels: Diss.* Nizhniy Novgorod; 2011. (in Russian)
- Vodyanitskaya S.Yu., Lyakh O.V., Lomov Yu.M., Ryzhkov Yu.V., Ivanova N.G., Ivanova A.I. et al. Epidemiological (preventive) measures in the allocation of cholera from ships’ ballast water. *Epidemiologiya i vaksino profilaktika.* 2014; 2 (75): 40–4. (in Russian)

Received 11.03.15