

## ХАРАКТЕРИСТИКА ИНТЕГРАТИВНЫХ КОНЪЮГАТИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ ШТАММОВ НЕХОЛЕРНЫХ ВИБРИОНОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ НА ТЕРРИТОРИИ ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

**А. А. Замарин<sup>1</sup>, И. Б. Захарова<sup>1,2</sup>, М. В. Подшивалова<sup>1</sup>, Ю. А. Кузютина<sup>1,2</sup>,  
Н. Н. Тетерятникова<sup>1</sup>, Я. А. Лопастейская<sup>1,2</sup>, Д. В. Викторов<sup>1,2</sup>, А. В. Топорков<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,

<sup>2</sup>Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра молекулярной биологии и генетики

В геномах штаммов *Vibrio spp.*, выделенных из воды открытых водоемов Волгоградской области, идентифицированы интегративные конъюгативные элементы семейства SXT/R391. Показана рекомбинантная природа ICE четырех штаммов *Vibrio spp.*

**Ключевые слова:** *Vibrio spp.*, интегративные конъюгативные элементы, ICE, SXT/R391, варибельная ДНК.

## CHARACTERISTICS OF INTEGRATIVE CONJUGATIVE ELEMENTS OF NON-CHOLERAЕ VIBRIO STRAINS IN THE VOLGOGRAD REGION

**A. A. Zamarin<sup>1</sup>, I. B. Zakharova<sup>1,2</sup>, M. V. Podshivalova<sup>1</sup>, Yu. A. Kuzyutina<sup>1,2</sup>,  
N. N. Teteryatnikova<sup>1</sup>, Ya. A. Lopasteyskaya<sup>1,2</sup>, D. V. Viktorov<sup>1,2</sup>, A. V. Toporkov<sup>1,2</sup>**

<sup>1</sup>FSHI «Volograd Plague Control Research Institute» of the Federal Service on Customer Rights Protection and Human Wellbeing Surveillance.

<sup>2</sup>Volograd State Medical University, Department of Molecular Biology and Genetics

Integrative conjugative elements (ICEs) belonging to the SXT/R391 family were identified in *Vibrio spp.* strains isolated from open water in the Volgograd region. Four *Vibrio spp.* strains were found to contain recombinant ICEs.

**Key words:** *Vibrio spp.*, integrative conjugative elements, ICEs, SXT / R391, variable DNA.

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 интегонах, трансмиссивных плаزمидов и интегративных конъюгативных элементах (ICE) [6–8].

Одним из наиболее представительных филогенетических семейств ICE по числу входящих в них генетических элементов является функциональное семейство SXT/R391 [1], получившее свое название по первым идентифицированным представителям. Сравнение полных нуклеотидных последовательностей SXT<sup>MO10</sup> (99.5 т.п.н.) и R391 (89 т.п.н.) показало высокую консервативность групп генов, кодирующих их регуляцию, интеграцию/вырезание и функции конъюгативного переноса. К настоящему времени во всем мире выявлено более 35 SXT-подобных элементов в изолятах *V. cholerae* различных серогрупп и, по меньшей мере,

в 9 других видах рода *Vibrio* [5]. ICE семейства SXT/R391 широко распространены в штаммах рода *Vibrio*, выделенных как от больных, так и из воды открытых водоемов, и обычно ассоциированы с мультирезистентностью к таким антибиотикам, как сульфаметоксазол, триметоприм, аминогликозиды и хлорамфеникол.

Помимо основных, консервативных для ICEs семейства SXT/R391 генов, обеспечивающих процессы интеграции, вырезания и конъюгативного переноса, данные элементы могут содержать дополнительную ДНК, интегрированную в межгенное пространство и отличающуюся у разных ICEs. Варибельная ДНК расположена в 5 горячих точках (HSs) и четырех варибельных регионах (VRs). Функции большинства генов, локализованных в варибельной ДНК, на сегодняшний день неизвестны. Идентифицированные гены кодируют адаптивные системы, такие как комплекс ферментов образования биопленок, ферменты рестрикции-модификации, различные комбинации генов резистентности к антибактериальным препаратам и тяжелым металлам.

Известно, что многие виды рода *Vibrio* могут служить источником для холерных вибрионов новых, ранее не встречавшихся у них комбинаций генов устойчивости к антимикробным соединениям [8]. Ранее нами было показано наличие различных типов SXT в составе геномов штаммов *V. cholerae* различных серогрупп,

выделенных на территории Волгоградской области [2]. В связи с чем было логично оценить распространенность данных генетических элементов среди автохтонной вибриофлоры региональных открытых водоемов.

## ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить распространенность и структурные особенности интегративных конъюгативных элементов в штаммах *Vibrio* spp., выделенных на территории Волгоградской области.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе было исследовано 38 штаммов *Vibrio* spp., выделенных из воды открытых водоемов на территории Волгоградской области в последние годы. Выделение ДНК проводили методом протеиназного лизиса [3]. ПЦР проводили с использованием праймеров, представленных в табл.

В состав реакционной смеси входили праймеры в конечной концентрации 15 пМ, 1 ед. *DiaTaq* ДНК-полимеразы и 1хПЦР-буфер с дНТФ и  $MgCl_2$  (ИнтерЛаб-Сервис, Россия). Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Поиск ICE в геномах исследуемых штаммов проводили методом ПЦР с праймерами, специфичными консервативному гену интегразы *int<sub>SXT</sub>*. Искомый ген был обнаружен в 36 из 38 проанализированных штаммов. Для дальнейшего анализа было выбрано 18 штаммов, различающихся по месту и времени выделения.

Мы провели анализ 5 локусов варибельной ДНК, два из которых: HS1 и VR I — могут нести вставки генов с неизвестными функциями, и три: VR III (*rumAB*), HS5 и HS3 — транспозоноподобную структуру с кластером генов резистентности к триметоприму (*dfr18*), хлорамфениколу (*floR*), стрептомицину (*strAB*) и сульфаметак-

сазолу (*sullI*); ген резистентности к канамицину (*kan*) и триметоприму (*dfrA1*), соответственно.

Аmplификация области вставки горячих точек HS1 между ORF *s043* и *traL* и HS5 между ORF *s026* и *s027* не выявила фрагментов, характерных для SXT<sup>MO10</sup> и R391. Однако в HS1 только у 4 штаммов обнаружено полное отсутствие вставки, в других случаях присутствуют комбинации ампликонов размером 200, 300 и 400 п.н., что свидетельствует о наличии вставок, отличающихся от описанных *orf37-orf38* (1096 п.н.) у R391 и *s043-s044* (998 п.н.) у SXT<sup>MO10</sup> (рис. 1А).

В случае HS5 у всех исследованных изолятов присутствовал ампликон 190 п.н., соответствующий расстоянию между праймерами, а также дополнительные ампликоны размером 250, 300 и 490 п.н. (рис. 1Б), то есть последовательность гена резистентности к канамицину (*kan*) размером 653 п.н., также как и последовательность 4410 п.н. с неизвестной функцией SXT<sup>MO10</sup> не обнаружены.

Исследование варибельного региона VR1 между ORF *attL* и *xis* с парой праймеров *VisLF/VisLR3* выявил у штаммов 305-2, 305-5 и 305-7 фрагмент размером 453 п.н., характерный для SXT<sup>MO10</sup>. У штамма 285-1 имелся ампликон около 150 п.н. У остальных исследованных изолятов фрагментов, интегрированных в межгенное пространство VR1, не обнаружено (рис. 1В).

Наличие генов резистентности в составе исследуемых ICEs анализировали в формате мультилокусной ПЦР с праймерами, специфичными к генам устойчивости к стрептомицину *strB*, сульфаметоксазолу *sullI* и двум генам дигидрофолатредуктазы *dfr18* и *dfrA1*. Для SXT<sup>MO10</sup> и подобных ему ICEs характерно наличие инсерции кластера генов резистентности в локусе *rumB*, тогда как у R391 и ему подобных данный ген является интактным. Анализ оперона *rumAB* показал отсутствие кластера генов антибиотикорезистентности (*strB*, *sul2*, *dfr18*) в ICEs всех исследованных штаммов. В ICE штамма *Vibrio* sp 287-9 обнаружена вставка в HS3, содержащая ген резистентности к триметоприму *dfrA1*

## Последовательности праймеров для ПЦР-анализа

Праймер	Последовательность 5' - 3'	Мишень (ссылка)
SXT-F	TTATCGTTTCGATGGC	ген интегразы <i>int</i> SXT элемента (accession AF099172)
SXT-B	GCTCTTCTTGTCGGTTC	
HS1F	GGCTATTCCACCGGTGGTG	область горячей точки HS1 <i>s043-traL</i> [4]
HS1R	TGCCGATCACTAGCCCAAC	
s026-F	AAGCAATGGAACCGAATCGTT	<i>s026-s027 / kan</i> (accession AY055428, AY055428)
s027-R	ACCATGCATCAGCGGTTAAAG	
VisLF	GAGTACAAATTCCGTTTTAG	варибельный регион VR1 <i>attL-xis</i> [4]
VisLR3	GCATTCTCCTGAAAATCAATG	
sullI-F	GTGCGGATGAAGTCAGCTCC	ген устойчивости к сульфаметоксазолу <i>sullI</i> (accession AY034138)
sullI-R	GGGGCAGATGTGATCGAC	
strB-F	CGCGATAGCTAGATCGCGTT	ген устойчивости к стрептомицину <i>strB</i> (accession AY034138)
strB-R	GACTACCAGCGACCGAAAT	
dfr18-F	CTGCCGTTTTCGATAATGTGG	ген дигидрофолатредуктазы <i>dfr18</i> (accession AY034138)
dfr18-R	GGGTAAGACACTCGTCATGGG	
dfrA1-F	AGTTTACATCTGACAATGAGAACGTAT	ген дигидрофолатредуктазы <i>dfrA1</i> (accession GQ463140)
dfrA1-R	ACCSTTTTGCCAGATTTGGTA	

(рис. 2). В качестве сравнения использовали ДНК штамма *V. cholerae* В-191, несущего SXT<sup>MO10</sup>.

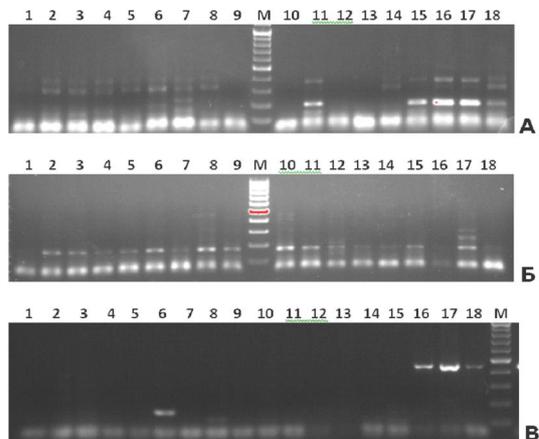


Рис. 1. Амплификация последовательностей интегративных конъюгативных элементов в штаммах *Vibrio* spp.: А — область вставки HS1; Б — область вставки HS5; В — варибельный регион VR1. М — ДНК-маркер (100-1000 п.н.), 1. *Vibrio* sp 255, 2. *Vibrio* sp 257, 3. *Vibrio* sp 261, 4. *Vibrio* sp 270, 5. *Vibrio* sp 284-7, 6. *Vibrio* sp 285-1, 7. *Vibrio* sp 285 -3, 8. *Vibrio* sp 287-1, 9. *Vibrio* sp 287-2, 10. *Vibrio* sp 287-9, 11. *Vibrio* sp 290-5, 12. *Vibrio* sp 291-1, 13. *Vibrio* sp 291-5, 14. *Vibrio* sp 291-6, 15. *Vibrio* sp 298-6, 16. *Vibrio* sp 305-2, 17. *Vibrio* sp 305-5, 18. *Vibrio* sp 305-7

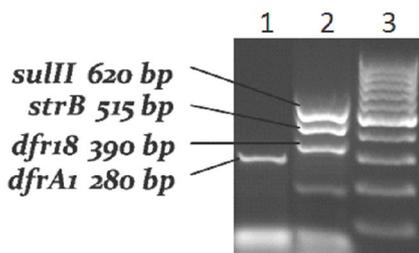


Рис. 2. Амплификация в формате мультилокусной ПЦР генов резистентности ICEs: 1. *Vibrio* sp 287-2, 2. *V. cholerae* В-191, 3. ДНК-маркер (100-1000 п.н.)

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, показано широкое распространение интегративных конъюгативных элементов среди автохтонной вибриофлоры региональных открытых водоемов. Полученные данные позволяют отнести обнаруженные ICEs штаммов *Vibrio* spp, выделенных на территории Волгоградской области, к семейству SXT/R391.

Обнаруженные в данной работе инсерции варибельной ДНК в составе идентифицированных элементов отличаются от описанных ранее. Так, в штаммах *Vibrio* sp. 287-9 и *Vibrio* sp. 305 наряду с геном резистентности к триметоприму *dfrA1*, характерным для SXT<sup>ET</sup> штаммов *V. cholerae* O1, и вставкой генов с неизвестными функциями, типичной для SXT<sup>MO10</sup> штаммов *V. cholerae* O139 соответственно, в других горячих точках присут-

ствуют неканонические последовательности. Данные факты говорят о мозаичной структуре обнаруженных элементов, сформировавшейся в результате рекомбинаций 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. Подавляющее большинство исследованных элементов не несет в своем составе детерминант резистентности к антибактериальным препаратам, однако, эти «пустые» ICEs обладают потенциалом не только для приобретения детерминант резистентности к антибиотикам, но и других генов, в том числе вирулентности, которые могут быть переданы другим штаммам.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Захарова И. Б., Викторов Д. В. Интегративные конъюгативные элементы микроорганизмов (ICEs) // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. — 2015. — Т. 33, № 3. — С. 9—16.
2. Подшивалова М. В., Кузютина Ю. А., Захарова И. Б. и др. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT-типа // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2014. — № 3. — С. 34—39.
3. Тетерятникова Н. Н., Захарова И. Б., Подшивалова М. В. и др. Молекулярная детекция интегров класса 1 у *Burkholderia pseudomallei* // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 2 (108). — С. 46—49.
4. Burrus V., Quezada-Calvillo R., Marrero J., et al. SXT-related integrating conjugative element in New World *Vibrio cholerae* // Appl. Environ. Microbiol. — 2006. — Vol. 72 (4). — P. 3054—3057.
5. Burrus V. Significance of the SXT/R391 family of integrating conjugative elements in *Vibrio cholerae* // Ramamurthy T., Bhattacharya S.K. Epidemiological and molecular aspects on cholera infectious disease. Springer. — 2011. — P. 161—184.
6. MacDonald D., Demarre G., Bouvier M., et al. Structural basis for broad DNA-specificity in integron recombination // Nature. — 2006. — Vol. 440. — P. 1157—1162.
7. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution // Nat. Rev. Microbiol. — 2006. — Vol. 4. — P. 608—620.
8. Rodriguez-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. — Vol. 56 (5). — P. 2619—2626.

## Контактная информация

**Замарин Антон Александрович** — научный сотрудник лаборатории геномики и протеомики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, e-mail: somyatin@mail.ru