

УДК 616.932:579.25

## Способ одновременного выявления штаммов *Vibrio cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в режиме реального времени

© 2018 А.А. КРИЦКИЙ, Н.Б. ЧЕЛДЫШОВА, С.П. ЗАДНОВА\*, Н.А. ПЛЕХАНОВ, Н.И. СМИРНОВА

Российский научно-исследовательский противочумный институт “Микроб”, Саратов, 410005

e-mail: rusrapi@microbe.ru\*

Поступила 26.12.2017 г.

Принята в печать 14.02.2018 г.

Разработан метод, позволяющий одновременно выявлять штаммы *V. cholerae* и определять наличие в их геноме генов устойчивости к четырем антибиотикам, используемым для лечения холеры (тетрациклину, триметоприму, хлорамфениколу и ципрофлоксацину) при помощи мультиканальной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Чувствительность метода составляет  $1 \cdot 10^3$  КОЕ/мл как в чистой культуре, так и при анализе имитированного клинического материала и проб из внешней среды. Эффективность ПЦР подтверждена при анализе 60 природных штаммов *V. cholerae*, изолированных в разные годы от людей и из внешней среды. Установлено, что все изученные штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенные до 1993 г., не содержат тестируемых генов лекарственной устойчивости. В то же время 18 токсигенных клинических штаммов (90%), завезенных в Россию в 1993–2010 гг., отличаются множественной лекарственной устойчивостью: в их геноме выявлены гены резистентности к триметоприму (*dfrA1*) и хлорамфениколу (*floR*), а 11 штаммов содержат дополнительно ген *tetR*, определяющий устойчивость к тетрациклину. Кроме того, в последние годы (Калмыкия, 2011–2013 гг.) обнаруживаются нетоксигенные клинические и водные штаммы *V. cholerae*, несущие ген *qnrVC* (*qnrVC1*), ответственный за резистентность к ципрофлоксацину.

**Ключевые слова:** гены лекарственной устойчивости, мультиканальная ПЦР в режиме реального времени, *Vibrio cholerae*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79

Холера – тяжелая особо опасная инфекционная болезнь человека, которая при отсутствии лечения может иметь летальный исход. Возбудителем холеры являются токсигенные штаммы *Vibrio cholerae* O1 серогруппы (классического и Эль Тор биоваров) и O139 серогруппы. Начиная с 1961 г. и по настоящее время, продолжается седьмая пандемия холеры, вызванная штаммами *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор. В 90-х годах прошлого столетия возникли и повсеместно рас-

пространились генетически измененные штаммы (или геноварианты) *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор [1–4]. Указанные штаммы в отличие от типичных вибрионов Эль Тор, вызвавших начало текущей пандемии, имеют повышенную вирулентность, что выражается в более тяжелых проявлениях болезни и высоких показателях смертности. Еще одной важной особенностью геновариантов является множественная устойчивость к различным лекарственным препаратам [5–7].

**Список сокращений:** АБП – антибактериальный препарат; КОЕ – колониеобразующая единица; ПЦР – полимеразная цепная реакция; Сip – ципрофлоксацин; Ст – хлорамфеникол; dNTP – дезоксирибонуклеозидтрифосфат(ы); Тс – тетрациклин; Тр – триметоприм.

Штаммы указанных геновариантов не только циркулируют на эндемичных по холере территориях в странах Азии, Африки и Карибского бассейна, но и могут быть завезены в различные страны, в том числе в Россию. Начиная с 1993 г, все вспышки и единичные случаи холеры в Российской Федерации были вызваны именно такими штаммами [8]. Единичные геноварианты выделяются также и из открытых водоемов нашей страны при проведении мониторинговых исследований. Из внешней среды в большом количестве изолируются также нетоксигенные штаммы *V. cholerae*, способные вызывать кишечные инфекции и содержащие в ряде случаев дополнительные гены патогенности, а также имеющие различную устойчивость к антибактериальным препаратам. С 2007 по 2016 гг. было выделено более 700 таких штаммов [9].

Схема лечения холеры в первую очередь включает регидратационную терапию, а в тяжелых случаях и химиотерапию антибактериальными препаратами. При этом используют медикаменты групп тетрациклинов, фторхинолоны и триметоприм (последний входит в состав комбинированных препаратов, таких как сульфаметоксазол/триметоприм и котримоксазол). Фторхинолоны как препараты резерва применяют в случае выявления штаммов с множественной лекарственной устойчивостью.

Противомикробные препараты позволяют сократить продолжительность и тяжесть заболевания, но их использование приводит к возникновению устойчивых изолятов. Проблема возникновения лекарственно-устойчивых штаммов патогенных микроорганизмов на сегодняшний

день является одной из наиболее важных в современном здравоохранении. Особенно остро эта проблема стоит в терапии особо опасных карантинных инфекций, в том числе холеры. По данным ВОЗ, среди патогенных бактерий, включая и *V. cholerae*, отмечается неуклонный рост устойчивости к АБП (Глобальная стратегия ВОЗ по сдерживанию устойчивости к противомикробным препаратам. WHO/CDS/CSR/DRS/2001.2 ([http://www.who.int/drugresistance/WHO\\_Global\\_Strategy-Russian.pdf](http://www.who.int/drugresistance/WHO_Global_Strategy-Russian.pdf))). В связи с этим для проведения эффективной терапии больных холерой, а также получения сведений об устойчивости к лекарственным препаратам завозимых и выделяемых при мониторинговых исследованиях штаммов *V. cholerae* необходим быстрый доступ к достоверной информации о присутствии в геноме патогена генов лекарственной устойчивости.

Цель настоящего исследования состояла в разработке способа одновременного выявления штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы и определения наличия в их геноме генов устойчивости к терапевтически важным лекарственным препаратам. Для этого была использована мультимаркертная полимеразная цепная реакция с детекцией результатов в режиме реального времени.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

### Бактериальные штаммы и условия культивирования

В работе были использованы 68 природных штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории России и за рубежом в различные годы (табл. 1).

Таблица 1

### Определение чувствительности к антибактериальным препаратам и наличия генов лекарственной устойчивости у штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы Эль Тор биовара с помощью ПЦР

#### Sensitivity to antibacterial preparations and occurrence of drug resistance genes in *V. cholerae* strains of O1 serogroup El Tor biovar determined by PCR

| Обозначение штамма | Место, год и источник выделения     | Наличие гена <i>ctxA</i> | Чувствительность к АБП |     |    |    | Наличие генов лекарственной устойчивости |             |                                |             |              |
|--------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|-----|----|----|--|-------------|--------------------------------|-------------|--------------|
|                    |                                     |                          | Tc                     | Cip | Cm | Tr | <i>rfbE</i>                              | <i>tetR</i> | <i>qnrVC</i> ( <i>qnrVC1</i> ) | <i>floR</i> | <i>dfrA1</i> |
| ATCC14033          | Синайский полуостров, 1910, человек | –                        | S                      | S   | S  | S  | +  | –           | –                              | –           | –            |
| МАК757             | Остров Целебес, 1937, человек       | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | –           | –                              | –           | –            |
| CW6                | Индия, 1966, вода                   | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | –           | –                              | –           | –            |
| 34 Каюм            | Афганистан, 1966, человек           | –                        | S                      | S   | S  | S  | +  | –           | –                              | –           | –            |

Таблица 1 (продолжение)

| Обозначение штамма             | Место, год и источник выделения   | Наличие гена <i>ctxA</i> | Чувствительность к АБП |     |    |    | Наличие генов лекарственной устойчивости |             |                                   |             |              |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|------------------------|-----|----|----|--|-------------|-----------------------------------|-------------|--------------|
|                                |                                   |                          | Tc                     | Cip | Cm | Tr | <i>rfbE</i>                              | <i>tetR</i> | <i>qnrVC</i><br>( <i>qnrVC1</i> ) | <i>floR</i> | <i>dfrA1</i> |
| M818, M886, M1051              | РФ, Астрахань, 1970, человек      | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M642                           | РФ, Астрахань, 1975, человек      | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1394                          | РФ, Калмыкия, 1979, вода          | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1335, M1397, M1398            | РФ, Астрахань, 1981, вода         | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1399, M1400                   | РФ, Астрахань, 1982, вода         | -                        | S                      | R   | S  | S  | +  | -           | +                                 | -           | -            |
| M1401                          | РФ, Астрахань, 1982, вода         | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| 25, 33, 95, 113, 121, 317      | Гвинея, 1986, человек             | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| 99, 190                        | Гвинея, 1986, вода                | +                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1402                          | РФ, Астрахань, 1988, вода         | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1264, M1272, M1298, M1299     | РФ, Краснодар, 1993, человек      | +                        | R                      | S   | R  | R  | +  | +           | -                                 | +           | +            |
| M1270, M1271                   | РФ, Казань, 1993, человек         | +                        | R                      | S   | R  | R  | +  | +           | -                                 | +           | +            |
| M1275, M1278, M1279, M1297     | РФ, Дагестан, 1993, человек       | +                        | R                      | S   | R  | R  | +  | +           | -                                 | +           | +            |
| M1295, M1293                   | РФ, Дагестан, 1994, человек       | +                        | S                      | S   | S  | R  | +  | -           | -                                 | -           | +            |
| M1286, M1287, M1288,           | РФ, Дагестан, 1994, человек       | +                        | S                      | S   | R  | R  | +  | -           | -                                 | +           | +            |
| M1269                          | РФ, Магнитогорск, 1994, человек   | +                        | R                      | S   | R  | R  | +  | +           | -                                 | +           | +            |
| P17644                         | РФ, Ачинск, 1997, человек         | +                        | S                      | S   | R  | R  | +  | -           | -                                 | +           | +            |
| M1318, M1329, M1330, M1336     | РФ, Астрахань, 1998–2000, вода    | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1384, M1385, M1386            | РФ, Астрахань, 2001, вода         | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1427                          | РФ, Астрахань, 2003, вода         | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| M1429                          | РФ, Башкирия, 2004, человек       | +                        | S                      | S   | R  | R  | +  | -           | -                                 | +           | +            |
| P18778, P18793, P18796, P18806 | РФ, Ростов-на-Дону, 2005, человек | -                        | S                      | S   | S  | S  | +  | -           | -                                 | -           | -            |
| P18899                         | РФ, Мурманск, 2006, человек       | +                        | S                      | S   | R  | R  | +  | -           | -                                 | +           | +            |
| L3226                          | РФ, Москва, 2010, человек         | +                        | S                      | S   | R  | R  | +  | -           | -                                 | +           | +            |

Таблица 1 (окончание)

| Обозначение штамма | Место, год и источник выделения | Наличие гена <i>ctxA</i> | Чувствительность к АБП |     |    |    | Наличие генов лекарственной устойчивости |             |                       |             |              |
|--------------------|---------------------------------|--------------------------|------------------------|-----|----|----|--|-------------|-----------------------|-------------|--------------|
|                    |                                 |                          | Tc                     | Cip | Cm | Tr | <i>rfbE</i>                              | <i>tetR</i> | <i>qnrVC (qnrVC1)</i> | <i>floR</i> | <i>dfrA1</i> |
| M1501              | РФ, Калмыкия, 2011, человек     | –                        | S                      | R   | S  | S  | +  | –           | +                     | –           | –            |
| M1518              | РФ, Калмыкия, 2012, вода        | –                        | S                      | R   | S  | S  | +  | –           | +                     | –           | –            |
| M1524              | РФ, Калмыкия, 2013, вода        | –                        | S                      | R   | S  | S  | +  | –           | +                     | –           | –            |
| M1522              | РФ, Казань, 2014, вода          | –                        | S                      | S   | S  | S  | +  | –           | –                     | –           | –            |

Обозначения: S – чувствительность; R – резистентность; *rfbE* – ген, входящий в оперон *rfb*, кодирующий биосинтез O1 антигена; *tetR* – ген устойчивости к тетрациклину; *qnrVC (qnrVC1)* – ген устойчивости к ципрофлоксацину; *floR* – ген устойчивости к хлорамфениколу; *dfrA1* – ген устойчивости к триметоприму.

Designations: S, sensitivity; R, resistance; *rfbE*, gene, a part of *rfb* operon encoding O1 antigen biosynthesis; *tetR*, gene of tetracycline resistance; *qnrVC (qnrVC1)*, gene of ciprofloxacin resistance; *floR*, gene of chloramphenicol resistance; *dfrA1*, gene of trimethoprim resistance.

Кроме того, использовали штаммы других микроорганизмов – *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Salmonella typhi*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* (Государственная коллекция патогенных бактерий РосНИПЧИ «Микроб» (Саратов)), которые хранились в лиофилизованном состоянии. Культивирование бактерий осуществляли на агаре LB (Sigma, США) при температуре 37 °С.

#### Определение чувствительности культур микроорганизмов к антибактериальным препаратам

Чувствительность культур к АБП определяли диско-диффузионным методом в соответствии с МУК 4.2.2495-09 «Определение чувствительности возбудителей опасных бактериальных инфекций (чума, сибирская язва, холера, туляремия, бруцеллез, сап, мелиоидоз) к антибактериальным препаратам». Использовали препараты антибиотиков фирмы HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия) и НИЦФ (Санкт-Петербург). Диски содержали АБП в следующих количествах (на 1 диск): хлорамфеникол – 30 мг, тетрациклин – 30 мкг, триметоприм – 25 мкг, ципрофлоксацин – 30 мкг.

#### Выделение ДНК

Очищенную ДНК получали с использованием коммерческого набора Axy Prep Bacterial Genomic DNA Miniprep Kit (Ахуген, США) в соответствии с протоколом производителя. Предварительно бактериальные суспензии обрабатывали 0,01% раствором мертиолята натрия (Sigma-Aldrich, США) и прогревали при 56 °С в течение 30 мин.

#### Полимеразная цепная реакция

ПЦР проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen Inc, GMBH, Германия) с праймерами и *TaqMan*-зондами, синтезированными в компании «Синтол» (Россия).

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Определение токсигенности штаммов *V. cholerae*, использованных в работе

На первом этапе работы все исследуемые штаммы *V. cholerae* биовара Эль Тор были протестированы на наличие гена *ctxA*, кодирующего токсическую А-субъединицу холерного токсина, при помощи ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени. Праймеры и зонд для фрагмента гена *ctxA* были рассчитаны нами ранее [10]. По результатам проведенного исследования было показано, что 34 из 60 изученных штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор содержали ген *ctxA*, т.е. были токсигенными. В то же время 26 штаммов, выделенных как от людей, так и из внешней среды были лишены гена *ctxA* и относились к нетоксигенным (см. табл.1).

##### Определение чувствительности штаммов *V. cholerae* к антибактериальным препаратам

Далее у всех использованных штаммов диско-диффузионным методом определяли чувствительность к наиболее часто применяемым для лечения холеры АБП (хлорамфеникол, тетрациклин, триметоприм, ципрофлоксацин). В результате анализа показано, что 20 типичных штаммов

(91%) из выделенных в 1966–1988 гг. были чувствительны к тестируемым АБП. Исключение составили два нетоксигенных штамма *V. cholerae* M1399 и M1400, изолированные в 1982 гг. из внешней среды в Астрахани, которые оказались устойчивы к ципрофлоксацину (см. табл. 1).

Согласно данным литературы штаммы *V. cholerae* Эль Тор с множественной (>3) лекарственной устойчивостью были зарегистрированы в 90-х годах прошлого столетия [11, 12]. Действительно, согласно полученным нами сведениям токсигенные штаммы *V. cholerae* Эль Тор, завезенные в Краснодар, Казань и Дагестан в 1993 г., были устойчивы к тетрациклину, хлорамфениколу и триметоприму. Интересно, что завезенные в более поздние годы клинические штаммы, включая и современные изоляты, уже были чувствительны к тетрациклину. Исключение составил только штамм M1269 (Магнитогорск, 1994), который был устойчив к данному антибиотику. Штаммы, изолированные в 1993–2010 гг. были также устойчивы к триметоприму и хлорамфениколу. Исключение составили два штамма – M1293 и M1295 (Дагестан, 1994), которые были устойчивы к триметоприму, но чувствительны к левомецетину (хлорамфеникол). Необходимо отметить, что в Дагестане в 1994 г. холера была вызвана штаммами *V. cholerae* Эль Тор с разной чувствительностью к хлорамфениколу. Одна группа штаммов (M1286, M1287, M1288) была устойчива к данному антибиотику, другая (M1293, M1295) – чувствительна (см. табл. 1). Возможно, это связано с тем, что холера в Дагестане в 1994 г. была вызвана штаммами, завезенными паломниками с разных эндемичных территорий [13].

Все нетоксигенные штаммы, выделенные как из внешней среды, так и от больных в 1998–2014 гг., были чувствительны к изученным АБП. Однако в Калмыкии в 2011–2013 гг. были выделены штаммы, устойчивые к фторхинолону поколения II – ципрофлоксацину (см. табл. 1).

### Выбор ДНК-мишеней и разработка программы амплификации

В настоящее время описано несколько механизмов формирования лекарственной устойчивости у бактерий. В распространении генов лекарственной устойчивости участвуют такие структуры, как плазмиды, инсерционные последовательности (IS-элементы), транспозоны и интегроны с генными кассетами. Важная роль принадлежит и другим сложно организованным структурам – интегративным конъюгатив-

ным (ICE) и мобилизуемым (IME) элементам, геномным островам. Возбудитель холеры постоянно приобретает гены лекарственной устойчивости посредством внедрения мобильных генетических элементов. В его геноме выявляются плазмиды, интегроны 1-го и 2-го классов, а также SXT-(Sulfamethoxazole-Trimethoprim)элемент [14, 15]. При этом часто гены, определяющие устойчивость к конкретному препарату, могут входить в состав разных генетических элементов. Например, ген *dfrA* (*dfrA1*), определяющий устойчивость к триметоприму/сульфаметоксазолу, выявляется в SXT-элементе, IncC-плазмидах и интегронах 1-го и 2-го классов [16, 17]. Кассета с генами *qnrVC*, обеспечивающая устойчивость к ципрофлоксацину, может локализоваться как на плазмидах, так и в SXT-элементе [18, 19].

Учитывая, что адекватный выбор средств лечения холеры может быть сделан только на основе предварительного определения чувствительности выделенных штаммов холерного вибриона к АБП, нами был сконструирован набор праймеров и зондов для ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени для одновременного выявления штаммов *V. cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости. Благодаря режиму реального времени мы планировали сократить срок определения генов лекарственной устойчивости до 3–4 ч при одновременном выявлении всех четырех генов устойчивости. Для сравнения, анализ с помощью дискового метода, метода Е-тестов, методов разведения в жидкой питательной среде или в агаре требует от 18 до 48 ч, а использование монолокусных ПЦР-тест-систем с электрофоретической детекцией резистентности только к одному антибиотику – от 5 до 8 ч [20]. Следует отметить, что в нашем случае вероятность ложноположительных результатов сведена к минимуму (при конструировании праймеров и зондов проанализированы нуклеотидные последовательности более 100 штаммов *V. cholerae* и подобраны специфические праймеры и зонды, а также условия ПЦР). Кроме того, исключая из определения этап электрофоретического разделения ДНК, мы уменьшаем возможность контаминации ПЦР-смеси.

В качестве мишени для детекции возбудителя был использован участок гена *rfbE* (*vc0244*) из кластера *rfb*, кодирующего биосинтез O1-антигена [21], что позволило выявлять штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы. Вибрионы O139 серогруппы, явившиеся причиной крупных вспышек холеры в 1992–1993 гг., решено было не идентифицировать,

так как в настоящее время штаммы этой серогруппы не завозятся в Россию, а вызывают локальные вспышки только на территории Индии.

Для определения устойчивости штаммов к лекарственным препаратам были выбраны АБП, которые наиболее часто используют для лечения холеры, а именно – тетрациклин, триметоприм, хлорамфеникол (левомицетин) и ципрофлоксацин. В качестве ДНК-мишени, кодирующей резистентность к тетрациклину, был выбран ген *tetR*, для выявления устойчивости к хлорамфениколу – участок гена *floR*, триметоприму – *drfA1*, фторхинолонам – *qnrVC* (*qnrVC1*).

Для каждого гена при помощи онлайн программы IDPrimerQuest были рассчитаны пара праймеров и гидролизный зонд. При подборе праймеров и зондов особое внимание уделялось их соответствию требованиям, предъявляемым к дизайну олигонуклеотидов для Taqman-систем. Всего было рассчитано пять пар праймеров и зондов с детекцией на пяти различных каналах (табл. 2).

Реакционная смесь для проведения разработанного варианта амплификации содержала следующие компоненты: 8 пмоль/мкл каждого праймера, 4 пмоль/мкл зонда; 1,5 ед. *Taq*-полимеразы; 2,5 мкл 10-кратного ПЦР-буфера (рН 8,4), 25 мМ раствор  $MgCl_2$ , 2 мМ dNTP (все компоненты производства “Синтол”); 5 мкл образца ДНК и деионизованную воду – до конечного объема 25 мкл.

Программа амплификации включала следующие стадии: 1 цикл – 95 °С, 5 мин; 35 циклов: 95 °С – 15 с, 60 °С – 60 с с детекцией флуоресцентного сигнала на стадии отжига одновременно по пяти каналам в одной пробирке. Как видно из табл. 2, детекцию продукта амплификации проводили на индивидуальном для каждого гена канале: *tetR* на канале Red, *drfA* (*drfA1*) – Orange, *floR* – Crimson, *qnrVC* (*qnrVC1*) – Yellow и *rfbE* на канале Green.

Таким образом, предложенный способ был разработан так, чтобы позволить одновременно выявлять штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы и устанавливать присутствие в их геноме генов устойчивости к терапевтически важным лекарственным препаратам методом ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Разработанный метод использует пять наборов специфических праймеров и зондов.

#### Определение специфичности и эффективности разработанных наборов праймеров и зондов

Для оценки специфичности праймеров и зондов были использованы пять токсигенных штаммов *V. cholerae* серогруппы O1 классического биовара (M29, 16002В, Дакка 3, Дакка 35, В1307), *V. cholerae* O139 (P16064), два штамма *V. cholerae* неO1/неO139 (1332-69, 13030), два штамма *E. coli* (M17 и 6), *K. pneumoniae* штамм 1, *Shigella sonnei*

Таблица 2

#### Праймеры и гидролизные зонды, сконструированные для детекции генов лекарственной устойчивости

##### Primers and hydrolysis probes constructed for detection of drug resistance genes

| Праймер, зонд   | Последовательность 5'→3'   | Канал детекции |
|---|--|----------------|
| <i>tetR-F</i><br><i>tetR-R</i><br><i>tetR</i> -зонд       | TCAGTGATAAAGTGTCAAGCA<br>AGTTTGC GTGTCGTCAG<br>(Cy5)-TTGCAGCCGAATACAGTGATCCGT-(BHQ2)           | Red            |
| <i>qnrVC1-F</i><br><i>qnrVC1-R</i><br><i>qnrVC1</i> -зонд | CAAACCTCCGCGATACACAA<br>CGCATTCTCTGAACTCGATACC<br>(R6G)-TGTAGACTGTTCTTTTCATTGAACGAGGTGA-(BHQ1) | Yellow         |
| <i>drfA1-F</i><br><i>drfA1-R</i><br><i>drfA1</i> -зонд    | GAATGGAGTTATCGGGAATGG<br>TCTTGCGTCCAACCAACA<br>(ROX)-GGAGTGCCAAAGGTGAACAGCT-(BHQ2)             | Orange         |
| <i>floR-F</i><br><i>floR-R</i><br><i>floR</i> -зонд       | GGGTTTACACTGTCCGGCTTTA<br>TTCCGCTTGGCCTATGA<br>(Cy5,5)-CGGTATGGGCACCTTCTTCGTCTT-(RTQ2)         | Crimson        |
| <i>rfbE-F</i><br><i>rfbE-R</i><br><i>rfbE</i> -зонд       | ACTTATGTTGCCTCGGTTAATA<br>GTAGAGACTCACCTTCGATTTTC<br>(FAM)- ATAGTCCAGTGTGGTTCGTTACCC-(BHQ1)    | Green          |

(ATCC 25931), *Salmonella typhi* (ATCC H901), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) и *Salmonella enteritidis* (ВОЗ) (табл. 3). Как известно, штаммы классического биовара не содержат гены лекарственной устойчивости [15]. Действительно, в данных штаммах детектировался только ген *rfbE* и отсутствовали все другие тестируемые гены лекарственной устойчивости (см. табл. 3).

В то же время при проведении ПЦР со штаммами *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhi* и *Shigella sonnei* были получены отрицательные результаты при определении участка гена *rfbE*, что подтверждает специфичность подобранных праймеров и зонда. Штамм *V. cholerae* O139 содержал только ген *floR*. Полученные нами сведения соответствуют данным литературы, согласно которым токсигенные штаммы O139 серогруппы содержат SXT-элемент, определяющий устойчивость одновременно к четырем АБП – сульфаметоксазолу (*sulII*), триметоприму (*dfr18*), хлорамфениколу (*floR*) и стрептомицину (*strB*) [22]. Однако ген устойчивости к триметоприму у штаммов O139 серогруппы (*dfr18*) отличается по структуре

от гена *dfrA1* вибрионов Эль Тор и предлагаемой нами системой данный аллель гена не выявлялся.

Участки генов *floR* и *qnrVC* (*qnrVC1*) в использованных штаммах *V. cholerae* неO1/неO139 серогруппы, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. typhi* и *Shigella sonnei* обнаружены не были. Однако в геноме штамма *K. pneumoniae* 1 были выявлены гены *tetR* и *dfrA1*, а в геноме штамма *E. coli* 6 – ген *tetR* (см. табл. 3). Полученные данные, во-первых, позволяют сделать вывод о широком распространении в настоящее время генов устойчивости к тетрациклину и триметоприму среди различных групп микроорганизмов. Во-вторых, они свидетельствуют, что сконструированные праймеры и зонды для выявления участков генов *tetR* и *dfrA1* могут быть использованы для детекции данных генов не только у холерного вибриона, но и у других микроорганизмов.

Чувствительность анализа чистой культуры штаммов *V. cholerae* с помощью сконструированной панели составила  $1 \cdot 10^3$  КОЕ/мл.

Далее разработанный набор был протестирован с использованием 60 природных штаммов *V. cholerae* O1 серогруппы биовара Эль Тор

Таблица 3

## Результаты определения специфичности разработанной ПЦР

## Specificity of developed PCR

| Штамм                                   | Место, год, источник выделения штамма | Наличие генов лекарственной устойчивости |             |                                   |             |              |
|---|---------------------------------------|--|-------------|-----------------------------------|-------------|--------------|
|   |                                       | <i>rfbE</i>                              | <i>tetR</i> | <i>qnrVC</i><br>( <i>qnrVC1</i> ) | <i>floR</i> | <i>dfrA1</i> |
| <i>V. cholerae</i> O1 M29               | РФ, Астрахань, 1942, человек          | +  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>V. cholerae</i> O1 16002B            | Индия, 1944, человек                  | +  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>V. cholerae</i> O1 Дакка 3, Дакка 35 | Пакистан, 1958, человек               | +  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>V. cholerae</i> O1 B1307             | Пакистан, 1964, человек               | +  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>V. cholerae</i> O139 P16064          | РФ, Азов, 1993, человек               | –  | –           | –                                 | +           | –            |
| <i>V. cholerae</i> неO1/неO139 1332-69  | Судан, 1967, н/и                      | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>V. cholerae</i> неO1/неO139 13030    | РФ, Астрахань, 1976 н/и               | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>Salmonella typhi</i> ATCC H901       | РФ, 1918, н/и                         | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>S. enteritidis</i> ВОЗ               | н/и, 1956, н/и                        | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>S. typhimurium</i> ATCC 14028        | н/и                                   | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>E. coli</i> M17                      | РФ, Саратов, н/и, вода                | –  | –           | –                                 | –           | –            |
| <i>E. coli</i> 6                        | РФ, Саратов, 2016, человек            | –  | +           | –                                 | –           | –            |
| <i>K. pneumoniae</i> 1                  | РФ, Саратов, 2016, человек            | –  | +           | –                                 | –           | +            |
| <i>Shigella sonnei</i> ATCC 25931       | Панама, н/и, человек                  | –  | –           | –                                 | –           | –            |

Примечание: н/и – источник выделения неизвестен. Обозначения генов лекарственной устойчивости см. в табл. 1.

Footnote: н/и, source is unknown. Designations of drug resistance genes are given in Table 1.

(см. табл. 1). Среди них 2 штамма относились к предпандемическим (АТСС 14033, МАК 757), 12 – к токсигенным типичным штаммам, изолированным в начале и первые годы текущей пандемии (1966–1986 гг.) и 20 – к токсигенным штаммам геновариантов, завезенным в 1993–2010 гг. Еще 26 штаммов, выделенных как от человека, так и из воды открытых водоемов, были атоксигенными (см. табл. 1).

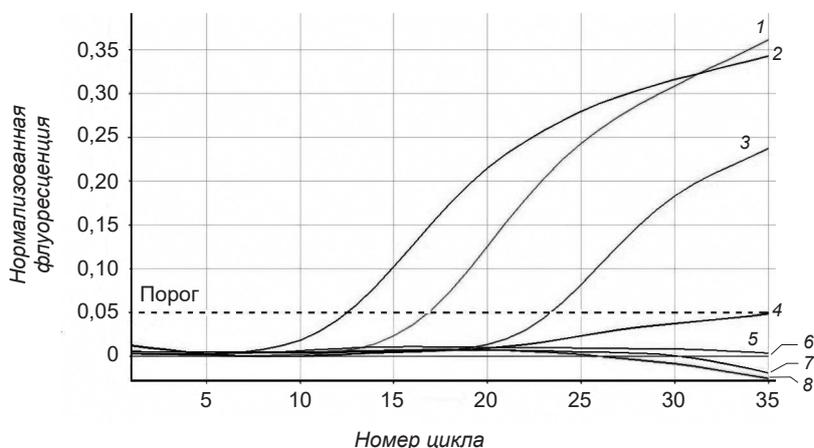
Клинические штаммы *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенные до 1993 г., были лишены генов *floR*, *dfrA1*, *qnrVC* (*qnrVC1*), а также гена *tetR* (см. табл. 1). Полученные результаты ПЦР соответствуют данным диско-диффузионного метода и литературным сведениям о высокой чувствительности к АБП предпандемических и клинических штаммов *V. cholerae* O1 биовара Эль Тор, выделенных в данный период текущей пандемии [11, 23]. В то же время 88% (14 из 16) клинических штаммов *V. cholerae* Эль Тор, выделенных после 1993 г., несли гены *floR* и *dfrA1* (возможно, из-за наличия в геноме SXT-элемента). На рисунке приведены результаты определения гена *floR* в некоторых типичных штаммах и штаммах геновариантов. Видно, что данный ген обнаружен у штаммов M1264, M1279, Л3226 (сигнал выше порогового), а у штаммов M818, 113, M1293, P18796, M1501 (сигнал ниже порогового) он не выявлен.

У 11 из 16 штаммов, выделенных после 1993 г., с помощью разработанной системы ПЦР был обнаружен также ген *tetR* (см. табл. 1). Однако у штаммов геновариантов, выделенных в современный период (2004–2010 гг.) данный ген отсутствует.

Все нетоксигенные штаммы были лишены генов *floR*, *dfrA1* и *tetR*. В то же время в геноме двух штаммов, выделенных из речной воды в Астрахани в 1982 г., был обнаружен ген *qnrVC* (*qnrVC1*), ответственный за резистентность к ципрофлоксацину. Данный ген был также детектирован у одного клинического (2011 г.) и двух водных (2012–2013 гг.) штаммов, изолированных в современный период в Калмыкии (см. табл. 1).

Кроме того, нами были проведены исследования по использованию сконструированного набора для анализа контаминированных возбудителем холеры проб из внешней среды (речная вода, пищевые продукты) и образцов, имитирующих клинический материал (1%-ный жидкий картофельный крахмал). Все пробы, в том числе и пробы внешней среды, стерилизовали автоклавированием при  $126 \pm 2$  °С. Пробы содержали суспензии *V. cholerae* в концентрации от  $1 \cdot 10^9$  до  $1 \cdot 10^2$  КОЕ/мл. В результате установлено, что чувствительность набора при изучении данных образцов составляет  $1 \cdot 10^3$  КОЕ/мл (данные не приведены). Учитывая, что клинический материал и пробы внешней среды могут быть контаминированы другими микроорганизмами, содержащими гены устойчивости к АБП, предлагаемый вариант ПЦР необходимо проводить только с подозрительными на холерный вибрион колониями.

Таким образом, разработан способ, позволяющий методом мультиплексной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени выявлять штаммы *V. cholerae* O1 серогруппы и определять присутствие в их геноме генов лекарственной устойчивости к четырем препаратам,



Накопление флуоресцентного сигнала амплифицируемого продукта (ген *floR*) у штаммов *V. cholerae* (детекция по каналу Crimson): 1 – M1264, 2 – M1279, 3 – Л3226, 4 – M818, 5 – 113, 6 – M1293, 7 – P18796, 8 – M1501

Accumulation of fluorescent signal of amplified product (gene *floR*) in *V. cholerae* strains (detected by Crimson channel): 1 – M1264, 2 – M1279, 3 – Л3226, 4 – M818, 5 – 113, 6 – M1293, 7 – P18796, 8 – M1501

используемым для лечения холеры (хлорамфеникол, триметоприм, тетрациклин и ципрофлоксацин). Чувствительность сконструированного набора праймеров и зондов составляет  $1 \cdot 10^3$  КОЕ/мл. Эффективность разработанного способа подтверждена при анализе 60 природных штаммов *V. cholerae*, выделенных в разные годы от людей и из внешней среды.

## ЛИТЕРАТУРА

- Nair G.B., Faruque S.M., Bhuiyan N.A., et al. Sack New variants of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor with attributes of the classical biotype from hospitalized patients with acute diarrhea in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(9), 3296–3299. doi: 10.1128/jcm.40.9.3296-3299.2002
- Nair G.B., Qadri F., Holmgren J., et al. Cholera due to altered El Tor strains of *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(11), 4211–4213. doi: 10.1128/jcm.01304-06
- Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.*, 2010, 18, 46–54. doi: 10.1016/j.tim.2009.10.003
- Mutreja A., Kim D.W., Thomson N.R., et al. Evidence for several waves of global transmission within the seventh cholera pandemic. *Nature*, 2011, 477(7365), 462–465. doi: 10.1038/nature10392
- Taneja N., Mishra A., Sangar G., et al. Outbreaks caused by new variants of *Vibrio cholerae* O1 El Tor, India. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, 15(2), 352–354. doi: 10.3201/eid1502.080943
- Grim C.J., Choi J., Chun J., et al. Occurrence of the *Vibrio cholerae* seventh pandemic VSP-I island and a new variant. *OMICS*, 2010, 14(1), 1–7. doi: 10.1089/omi.2009.0087
- Carignan B.M., Brumfield K.D., Son M.S. Single nucleotide polymorphisms in regulator-encoding genes have an additive effect on virulence gene expression in a *Vibrio cholerae* clinical isolate. *mSphere*, 1(5):e00253-16. doi: 10.1128/mSphere.00253-16
- Смирнова Н.И., Горяев А.А., Заднова С.П. и др. Генетическая характеристика клинических штаммов *Vibrio cholerae*, завезенных на территорию Российской Федерации в современный период. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.*, 2011, (3), 3–10.
- Москвитина Э.А., Тюленева Е.Г., Самородова А.В. и др. Эпидемиологическая обстановка по холере в мире и России в 2007 – 2016 гг., прогноз на 2017 г. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, 1, 13–20. doi:10.21055/0370-1069-2017-1-13-20
- Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Тучков И.В., Смирнова Н.И. Разработка алгоритма определения уровня экспрессии генов *ctxA* и *toxR* *Vibrio cholerae* методом ОТ-ПЦР с гибридационно – флюоресцентным учетом результатов в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*, 2017, (3), 53–57. doi: 10.21055/0370-1069-2017-3-53-57
- Осин А.В., Нефедов К.С., Ерошенко Г.А., Смирнова Н.И. Сравнительный анализ геномов холерных вибрионов эльтор, выделенных до начала и в разные периоды седьмой пандемии холеры. *Генетика*, 2005, 41(1), 53–62.
- Yamamoto T., Nair G.B., Albert M.J., et al. In vitro susceptibility of *Vibrio cholerae* O1 and O139 to antimicrobial agents and appearance of drug resistance plasmids in *Vibrio cholerae*. In Proceedings of the 30th US–Japan Joint Conference on Cholera. US–Japan Cooperative Medical Science Program for Cholera and Related Diarrheal Diseases Panel: Fukuara, Japan. 1994, 52–57.
- Онищенко Г.Г., Беляев Е.Н., Москвитина Э.А., Резайкин В.И., Ломов Ю.М., Мединский Г.М. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее. Ростов н/Д: Полиграф. 1995. 120 с.
- Ильина Т.С. Мобильные ISCR-элементы: структура, функции и роль в создании, наращивании и распространении блоков бактериальных генов множественной резистентности к антибиотикам. *Мол. генет. микробиол. вирусол.*, 2012, (4), 3–13.
- Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzi S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.*, 2011, 60(4), 397–407. doi: 10.1099/jmm.0.023051-0
- Dalsgaard A., Forslund A., Sandvang D. et al. *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. *J. Antimicrob. Chemother.* 2001 Dec;48(6), 827–838. doi: 10.1093/jac/48.6.827
- Pugliese N., Maimone F., Scrascia M., et al. SXT-related integrating conjugative element and IncC plasmids in *Vibrio cholerae* O1 strains in Eastern Africa. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009, 63(3), 438–442. doi: 10.1093/jac/dkn542
- Chattaway M.A., Aboderin A.O., Fashae K., et al. Fluoroquinolone-Resistant Enteric Bacteria in Sub-Saharan Africa: Clones, Implications and Research Needs. *Front. Microbiol.*, 2016, 22(7), 558. doi: 10.3389/fmicb.2016.00558
- Manzo L.M., Issaka B.B., Seidou I., Zanguina J. Antibiotic Resistance Mechanisms Focusing on Quinolones Resistance in *Vibrio cholerae*. *Int. J. Infect.* 2017, 4(3):e40622. doi: 10.5812/iji.40622
- Blackstone G.M., Nordstrom J.L., Bowen M.D., et al. Use of a real time PCR assay for detection of the *ctxA* gene of *Vibrio cholerae* in an environmental survey of Mobile Bay. *J. Microbiol. Methods*, 2007, 68(2), 254–259. doi: 10.1016/j.mimet.2006.08.006
- Kumar P., Jain M., Goel A.K., et al. A large cholera outbreak due to a new cholera toxin variant of the *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype in Orissa, Eastern India. *J. Med. Microbiol.*, 2009, 58 (Pt 2), 234–238. doi: 10.1099/jmm.0.002089-0

22. Hochhut B., Lotfi Y., Mazei D., et al. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT Constins. *Antimicrob. Agent Chemother*, 2001, 45(11), 2991–3000. doi: 10.1128/aac.45.11.2991-3000.2001
23. Заднова С.П., Смирнова Н.И. Выявление генов антибиотикоустойчивости в штаммах *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.*, 2015, (3), 3–10.

## A Method for Simultaneous Detection of *Vibrio cholerae* Strains and Drug Resistance Genes in their Genome by Means of Real-Time PCR

A.A. KRITSKII, N.B. CHELDYSHOVA, S.P. ZADNOVA\*, N.A. PLEKHANOV, and N.I. SMIRNOVA

*The Russian Research Anti-Plague Institute Microbe, 410005, Saratov Russia*

*e-mail: rusrapi@microbe.ru\**

Received December 26, 2017

Accepted February 14, 2018

**Abstract**—A method for simultaneous detection of the occurrence of *V. cholerae* strains and of the presence of drug resistance genes in their genomes applying PCR with real-time results registration has been developed. The resistance to four antibiotics used for the cholera treatment (tetracycline, trimethoprim, chloramphenicol and ciprofloxacin) was analyzed. The sensitivity of the panel was  $1 \cdot 10^3$  CFU/ml in both pure cultures, imitated clinical material and environmental samples. The efficiency of the PCR was confirmed by the analysis of 60 natural *V. cholerae* strains isolated in different years from patients and environment. It was established that all the studied *V. cholerae* O1 biovar El Tor strains isolated before 1993 do not contain the tested drug resistance genes. At the same time, 18 toxigenic clinical strains (90%) imported within 1993–2010 are characterized by a multiple drug resistance; their genomes have the genes of resistance to trimethoprim (*dfrAI*) and chloramphenicol (*floR*), whereas 11 strains among them additionally contain the *tetR* gene providing the tetracycline resistance. Apart from this, non-toxigenic clinical and aqueous *V. cholerae* strains carrying the *qnrVC* (*qnrVC1*) gene responsible for the resistance to ciprofloxacin have been detected during the last few years (Kalmykia, 2011–2013).

*Key words:* drug resistance genes, multiplex real-time PCR, *Vibrio cholerae*.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79