

DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-79-86

УДК 616.932:579.25

А.С. Гладких, И.С. Федотова, Л.В. Миронова

СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПРОФИЛЯ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ У ШТАММОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* С ПОМОЩЬЮ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока», Иркутск, Российская Федерация

Цель работы заключалась в конструировании и опытно-экспериментальных исследованиях набора реагентов для выявления спектра генов, детерминирующих резистентность к антибактериальным препаратам у штаммов *Vibrio cholerae*. **Материалы и методы.** В работу были взяты штаммы *V. cholerae*, выделенные от людей и из объектов окружающей среды во время эпидемиологических осложнений и в благополучный по холере период. Чувствительность к антимикробным препаратам оценивали диско-диффузионным методом. Полногеномное секвенирование проведено на приборе Illumina MiSeq. Профиль генов резистентности определяли на основании сравнения с базой данных ResFinder. Проведены оптимизация температурного режима, состава реакционных смесей, подбор параметров реакции, определены специфичность, чувствительность и воспроизводимость сконструированного прототипа тест-системы. **Результаты и выводы.** Для взятых в работу штаммов определен спектр устойчивости к антибиотикам и профиль генов резистентности. Для разработки мультиплексной ПЦР выбраны наиболее распространенные в популяциях *V. cholerae* гены, обуславливающие устойчивость к тетрациклину (*tetA*), стрептомицину (*strA*), флорфениколу/хлорамфениколу (*floR*) и триметоприму/сульфаметоксазолу (две формы гена дигидрофолатредуктазы: *dfrA1* и *dhfR*), а также ген интегразы SXT-элемента (*int*). В реакции специфично выявляются маркеры в соответствии с геномным профилем резистентности, что коррелирует с фенотипическим проявлением устойчивости, определенным диско-диффузионным методом. Чувствительность разработанной панели праймеров и зондов для штаммов *V. cholerae* составила 10^3 – 10^4 КОЕ/мл. Таким образом, учитывая специфичность, быстроту и простоту постановки реакции, разработанная система праймеров и зондов может быть успешно применена для предварительной оценки резистентности штаммов *V. cholerae* к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, гены антибиотикорезистентности, SXT-элемент, ПЦР-тест-система.

Корреспондирующий автор: Гладких Анна Сергеевна, e-mail: angladkikh@gmail.com.

Для цитирования: Гладких А.С., Федотова И.С., Миронова Л.В. Способ определения профиля генов антибиотикорезистентности у штаммов *Vibrio cholerae* с помощью ПЦР в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021; 2:79–86. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-79-86

Поступила 21.08.2020. Отправлена на доработку 15.09.2020. Принята к публ. 05.10.2020.

A.S. Gladkikh, I.S. Fedotova, L.V. Mironova

Method for Determining the Profile of Antibiotic Resistance Genes in the *Vibrio cholerae* Strains by RT-PCR

Irkutsk Anti-Plague Research Institute of Siberia and Far East, Irkutsk, Russian Federation

Abstract. The aim of the work was to design and carry out experimental studies of a set of reagents to identify the spectrum of genes that determine the resistance of the *Vibrio cholerae* strains to antibacterial drugs. **Materials and methods.** *V. cholerae* strains isolated from humans and environmental objects during epidemiological complications and the cholera-free period were included in the study. Sensitivity to antimicrobial drugs was evaluated by the disk diffusion method. Whole genome sequencing was performed on an Illumina MiSeq. The profile of resistance genes was determined based on a comparison with the ResFinder database. The temperature regime, the composition of the reaction mixtures, and the reaction parameters were optimized; the specificity, sensitivity and reproducibility of the constructed prototype test system were measured. **Results and discussion.** The spectrum of antibiotic resistance and the profile of resistance genes were determined for the studied strains. To develop multiplex PCR, we selected the most common in the *V. cholerae* populations genes, which are responsible for resistance to tetracycline (*tetA*), streptomycin (*strA*), florfenicol/chloramphenicol (*floR*) and trimethoprim/sulfamethoxazole (two variants of the dihydrofolate reductase gene: *dfrA1* and *dhfR*), as well as SXT element integrase gene (*int*). In the reaction, markers were specifically detected in accordance with the genomic resistance profile, which correlates with the phenotypic manifestation of resistance determined by the disco-diffusion method. The sensitivity of the developed panel of primers and probes for *V. cholerae* strains was 10^3 – 10^4 CFU/ml. Therefore, taking into account the specificity, rapidity and simplicity of the reaction, the developed system of primers and probes can be successfully applied for a preliminary assessment of the resistance of the *V. cholerae* strains to antimicrobial agents.

Key words: *Vibrio cholerae*, antibiotic resistance genes, SXT element, PCR test system.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Anna S. Gladkikh, e-mail: angladkikh@gmail.com.

Citation: Gladkikh A.S., Fedotova I.S., Mironova L.V. Method for Determining the Profile of Antibiotic Resistance Genes in the *Vibrio cholerae* Strains by RT-PCR. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; 2:79–86. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2021-2-79-86

Received 21.08.2020. Revised 15.09.2020. Accepted 05.10.2020.

Gladkikh A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6759-1907>
Fedotova I.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9890-0960>

Mironova L.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8481-6442>

Антибиотикотерапия – основной метод, применяемый для лечения инфекционных заболеваний, однако в последние годы эффективность многих препаратов снижается или сводится к нулю из-за развития у микроорганизмов стойкой резистентности к ним. За относительно короткий в эволюционном плане период благодаря высокой адаптивности микроорганизмы приобрели механизмы, позволяющие избегать летальных воздействий антимикробных веществ. Механизмы устойчивости к антибиотикам многообразны и сложны и в наиболее общем виде могут быть классифицированы на четыре группы: а) модификация сайтов-мишеней антибиотиков; б) снижение проникающей способности внешних мембран клеток (уменьшение числа белков-поринов); в) активное выведение противомикробных веществ из клетки посредством эффлюксных насосов; г) адаптивные изменения метаболических путей клетки через модификацию регуляторных сетей. Устойчивость к каждому антимикробному классу обычно достигается путем вовлечения нескольких биохимических механизмов [1].

Приобретению лекарственной устойчивости способствуют хромосомные мутации или развитие генетической резистентности путем приобретения конъюгативных плазмид, конъюгативных транспозонов, интегров или способных к самостоятельному переносу хромосомных интегрирующих элементов. По оценкам исследователей, при анализе доступных бактериальных геномов выявлено около 20 тыс. генов (г-гены), потенциально связанных с антибиотикорезистентностью, однако число детерминант с экспериментально подтвержденной ассоциацией с антибиотиками значительно ниже [2, 3].

Холера – острое инфекционное антропонозное заболевание, характеризующееся эпидемическим распространением, вызываемое *Vibrio cholerae* O1 и O139 серогрупп. Холера клинически проявляется от вибрионосительства и бессимптомных форм до тяжелого синдрома дегидратации вследствие потери жидкости с водянистыми испражнениями и рвотными массами, приводящего к летальному исходу. Антибиотикотерапия позволяет сократить сроки и тяжесть протекаемого заболевания: при этом рекомендованы медикаменты групп тетрациклинов, фторхинолоны и триметоприм (последний входит в состав комбинированных препаратов, таких как ко-тримоксазол и бисептол).

По данным ВОЗ, *V. cholerae* входит в группу микроорганизмов, для которых отмечается неуклонный рост устойчивости к антимикробным препаратам. Если на ранних этапах текущей пандемии возникновение лекарственной устойчивости было предопределено спонтанными мутациями, то в настоящее время большая часть генов устойчивости привносится в геном посредством мобильных генетических элементов, в частности SXT [4, 5]. В настоящее время SXT-элементы обнаруживаются практически у всех клинических штаммов и некоторых штаммов, изоли-

рованных из объектов окружающей среды, и характеризуются вариабельным генным составом [6].

Выявление в кратчайшие сроки этиологического агента болезни и спектра его резистентности к антибактериальным препаратам определяет тактику лечения и способствует благоприятному исходу болезни. Следует сказать, что, несмотря на наличие на отечественном рынке тест-систем для идентификации *V. cholerae*, в их составе отсутствуют компоненты, позволяющие установить профиль антибиотикорезистентности.

Цель работы заключалась в конструировании и опытно-экспериментальных исследованиях набора реагентов для выявления спектра генов, детерминирующих резистентность к антибактериальным препаратам у штаммов *V. cholerae*.

Материалы и методы

В работу взято 15 штаммов *V. cholerae*, выделенных на территории Сибири и Дальнего Востока, 10 из которых выделены от людей и объектов окружающей среды во время эпидосложнений по холере, штамм *V. cholerae* И-1299 выделен от вибрионосителя. Помимо этого использованы штаммы представителей семейств *Vibrionaceae* и *Enterobacteriaceae*, возбудители острых кишечных инфекций: *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginoliticus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella typhimurium*. Штаммы культивировали на щелочном агаре при температуре 37 °С. Характеристика штаммов представлена в табл. 1.

Определение чувствительности штаммов к антимикробным препаратам. Чувствительность культур к антимикробным препаратам определяли диско-диффузионным методом. Штаммы культивировали на агаре Мюллера – Хинтона, использовали диски, пропитанные антибиотиками, произведенные НИЦФ (Санкт-Петербург, Россия). Учет результатов проводили путем измерения зон задержки роста, согласно МУК 4.2.2495-09 для штаммов р. *Vibrio* и МУК 4.2.1890-04 для штаммов сем. *Enterobacteriaceae*.

Полногеномное секвенирование и поиск детерминант антибиотикорезистентности в геномах. Выделение ДНК проводили набором Quigen (Германия), подготовку геномных библиотек осуществляли с помощью набора Nextera XT (Illumina, США), полногеномное секвенирование проведено на приборе Illumina MiSeq. Первичный процессинг сырых данных осуществляли программным комплексом прибора, сборка *de novo* произведена геномным ассемблером SPAdes v.3.13.0 [7]. Профиль устойчивости к антибиотикам определялся с помощью BLASTN-поиска против базы данных ResFinder [8].

Подбор праймеров и зондов и параметров реакции ПЦР в режиме реального времени. Последовательности искомым генов были изолированы из полногеномных сборок каждого штамма с

Таблица 1 / Table 1

Характеристика штаммов, взятых в исследование
Characteristics of the strains taken in the study

Штамм Strain	Серогруппа Serogroup	Серовариант Serovariant	Профиль генов патогенности Pathogenicity gene profile	Место, год и объект выделения штамма Site, year and origin of the strain
<i>V. cholerae</i> И-1263	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Иркутск, 1997 г., человек Irkutsk, 1997, human
<i>V. cholerae</i> И-1300	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Южно-Сахалинск, 1999 г., человек Yuzhno-Sakhalinsk, 1999, human
<i>V. cholerae</i> И-1334	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Владивосток, 1999 г., человек Vladivostok, 1999, human
<i>V. cholerae</i> И-1181	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Новосибирск, 1994 г., человек Novosibirsk, 1994, human
<i>V. cholerae</i> И-1316	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Южно-Сахалинск, 1999 г., вода Yuzhno-Sakhalinsk, 1999, water
<i>V. cholerae</i> И-1330	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Владивосток, 1999 г., вода Vladivostok, 1999, water
<i>V. cholerae</i> И-1187	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Барнаул, 1994 г., человек Barnaul, 1994, human
<i>V. cholerae</i> И-1183 <i>V. cholerae</i> И-1184 <i>V. cholerae</i> И-1185	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁺	Омск, 1994 г., человек Omsk, 1994, human
<i>V. cholerae</i> И-1299	O1	Oгава Ogawa	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁻	Южно-Сахалинск, 1999 г., человек Yuzhno-Sakhalinsk, 1999, human
<i>V. cholerae</i> 1-17	O1	Инаба Inaba	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁻	Иркутск, 2017 г., вода Irkutsk, 2017, water
<i>V. cholerae</i> И-1447	O1	Инаба Inaba	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁻	Иркутск, 2010 г., вода Irkutsk, 2010, water
<i>V. cholerae</i> И-1467	O1	Инаба Inaba	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁻	Иркутск, 2011 г., вода Irkutsk, 2011, water
<i>V. cholerae</i> 22-19	не O1/O139 non O1/O139	—	<i>cxtA</i> ⁺ <i>tcpA</i> ⁻	Иркутск, 2019 г., вода Irkutsk, 2019, water
<i>S. typhimurium</i> 14	—	—	н/д n/d	ЦНИИЭ, Москва, 1976 г., н/д CRIE Moscow, 1976, n/d
<i>V. alginoliticus</i> 5-14-B	—	—	н/д n/d	Владивосток, 2014 г., человек Vladivostok, 2014, human
<i>V. paragemoliticus</i> 226-12-B	—	—	<i>tdh</i> ⁺	Владивосток, 2012 г., человек Vladivostok, 2012, human
<i>E. coli</i> 18/51	—	—	н/д n/d	н/д n/d
<i>Sh. dysenteriae</i> 19	—	—	н/д n/d	н/д n/d

Примечание: н/д – нет данных.

Note: n/d – no data..

помощью авторских bash-скриптов. Выравнивание последовательностей с целью поиска консервативных участков, пригодных для конструирования праймеров и зондов, проведено в программе MEGA X [9]. Помимо ассемблированных геномов в элаймент включены последовательности генов резистентности к антибактериальным препаратам из БД ResFinder [8]. Подбор праймеров и зондов производился средствами программного обеспечения FastPCR Professional v.6.6.35 [10]: дизайн и первичную оценку компонентов осуществляли в модуле PCR Primer Design; проведение мультиплексной реал-тайм ПЦР *in silico* проводили в модуле *in silico* PCR; тестирование наборов праймеров на образование димерных фрагментов осуществляли в модуле Primers List Analysis.

Проведение ПЦР с электрофоретическим учетом и в режиме реального времени. ДНК выделяли набором «РибоПреп» (Россия) согласно инструкции производителя. В реакциях ПЦР использовали реактивы компании «Синтол» (Россия), праймеры и зонды, синтезированные компанией Beagle (Россия). Оптимизацию температурного режима для повышения специфичности реакции проводили путем постановки реакции с электрофоретическим учетом результатов на приборе BioRad C1000. Подбор параметров реакции и оптимизация реакционных смесей проведены на приборе Rotor-Gene Q 5plex (Qiagen Inc., GMBH, Германия). Учет результатов проводили по каналам для красителей FAM, R6G, ROX, Cy5. В первую позицию ротора помещали пробирку отрицательного контроля, не содержащую ДНК ни

одного из штаммов, для установления порога фоновой флуоресценции. Учет результатов проводили пороговым методом, фиксируя значение цикла в точке пересечения кривой флуоресценции порогового уровня. При учете результатов устанавливали линейную шкалу учета значений, порог флуоресценции – 0,05 для красителей FAM, R6G, Cy5 и 0,1 для красителя ROX, корректировку уклона, динамический фон и устранение выбросов – 5 %.

Чувствительность реакции оценивали путем проведения реакции ПЦР в режиме реального времени с ДНК штаммов И-1187 и И-1263 с концентрациями клеток от 10^9 до 10^1 КОЕ/мл. Приготовление суспензии 10^9 проводили согласно 5 ЕД ОСО мутности (ГИСК им. Тарасевича, Россия), далее готовили серию 10-кратных разведений, точность которых оценивали трехкратными контрольными посевами на пластинки щелочного агара с подсчетом числа выросших колоний через 18 ч инкубации при 37 °С. Воспроизводимость реакций проверяли трехкратной постановкой всех проводимых тестов.

Результаты и обсуждение

Фенотипические проявления устойчивости и профиль антибиотикорезистентности. При учете антибиотикограмм определен спектр резистентности к антибиотикам у штаммов, взятых в

исследование (табл. 2). При сканировании геномов через БД Resfinder определен профиль резистентности для выборки исследуемых штаммов *V. cholerae* (табл. 2). Все штаммы, выделенные во время эпидемии по холере, содержат в составе геномов набор генов резистентности. *V. cholerae* И-1299, а также четыре штамма, выделенные из воды в период эпидемии по холере, не несут искомого гена. В отсутствие генов резистентности штаммы *V. cholerae* были чувствительны ко всем применяемым препаратам.

Определение набора мишеней для выявления детерминант антибиотикорезистентности и конструирование праймеров и зондов. Для разработки мультиплексной ПЦР согласно литературным данным и результатам собственных исследований были выбраны наиболее распространенные в популяциях *V. cholerae* гены, обуславливающие устойчивость к тетрациклину (*tetA*), стрептомицину (*strA*), флорфениколу/хлорамфениколу (*floR*) и триметоприму/сульфаметоксазолу (две формы гена дигидрофолатредуктазы: *dfrA1* и *dhfr*), – последняя характерна для штаммов, циркулирующих на территории Китая), а также ген интегразы (*int*) – маркер наличия SXT-элемента в геноме. При составлении элаймента обнаружена гетерогенность последовательностей

Таблица 2 / Table 2

Фенотипический и геномный профиль устойчивости к антимикробным препаратам штаммов *V. cholerae*, взятых в исследование
Phenotypic and genomic antimicrobial resistance profile of *V. cholerae* strains taken in the study

Наименование и номер штамма Strain's name and number	Антимикробный препарат* Antibiotic*						Генный профиль резистентности к антибиотикам согласно БД ResFinder Resistance gene profile according ResFinder DB
	Л L	НК NA	С S	Т T	Т/С T/S	Ц C	
<i>V. cholerae</i> И-1263 <i>V. cholerae</i> И-1187 <i>V. cholerae</i> И-1185	R**	R	R	S	R	S	<i>int, strA, strB, catB9, floR, sul2, dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1300 <i>V. cholerae</i> И-1334	R	S	R	R	R	S	<i>int, strA, strB, floR, catB9, sul2, tet(A), dhfr</i>
<i>V. cholerae</i> И-1316	R	R	R	R	R	S	<i>int, strA, strB, floR, catB9, sul2, tet(A), dhfr</i>
<i>V. cholerae</i> И-1181	R	R	R	R	R	S	<i>int, aadA1, strA, strB, floR, catB9, sul1, sul2, tet(A), dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1183	R	S	R	R	R	S	<i>int, aadA1, strA, strB, floR, catB9, sul1, sul2, tet(A), dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1184	I	S	R	R	R	S	<i>int, aadA1, strA, strB, floR, catB9, sul1, sul2, tet(A), dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1330	S	R	R	R	S	S	<i>int, strA, strB, catB9, sul2, tet(A)</i>
<i>V. cholerae</i> И-1299 <i>V. cholerae</i> И-1447	S	S	S	S	S	S	<i>catB9</i>
<i>V. cholerae</i> И-17 <i>V. cholerae</i> И-1467 <i>V. cholerae</i> 22-19 <i>S. typhimurium</i> 14 <i>V. alginoliticus</i> 5-14-B <i>V. paragemoliticus</i> 226-12-B <i>E. coli</i> 18	S	S	S	S	S	S	–
<i>Sh. dysenteriae</i> 19	R	S	R	S	S	S	-

Примечание:

*Л – левомицетин, НК – налидиксовая кислота, С – стрептомицин, Т – тетрациклин, Т/С – триметоприм/сульфаметоксазол, Ц – ципрофлоксацин.

**R – резистентный, S – чувствительный, I – промежуточный.

Note:

*L – chloramphenicol, NA – nalidixic acid, S – streptomycin, T – tetracycline, T/S – trimethoprim/sulfamethoxazole, C – ciprofloxacin.

**R – resistant, S – sensitive, I – intermediate.

Таблица 3 / Table 3

Специфичные праймеры и зонды
Specific primers and probes

Имя Name	Последовательность (5' → 3') Sequence (5' → 3')	Длина праймера, н. Primer length, nucl.	Длина ампликона, н. Amplicon length, nucl.	Температура, °C Tm, °C
teta_f	tcatcatgcaactgtcggaca	22	201	56.3
teta_r	cggcaatcattccgagcatga	21		57.6
teta_pr	FAM-actcgcccaggcaatgatcacggcc-BHQ-1	26		68.3
stra_f	caatgccgtcaatcccgactt	21	231	57.5
stra_r	tcggcatagcgcgtctgtgt	21		58.1
stra_pr	FAM-tcgacctggggcggtcggaacagca-BHQ-1	26		68.8
dfra_f	gagttatcgggaatggccctgat	23	336	58
dfra_r	cacctccggctcgatgtcta	21		57.8
dfra_pr	R6G-acgtgttacgaccgcatactttcggt-BHQ-1	26		62
dhfr_f	tctgaaggatgtttcgtgcat	23	287	56.8
dhfr_r	tggaaattgccgctgatatgaa	23		56.6
dhfr_pr	ROX-tgagctcctggtgcttgatagccgat-BHQ-2	26		62.8
int_f	tggatagactctgccgtaagc	22	316	57.7
int_r	cgtgtcatttagcaccgagt	22		57.3
int_pr	Cy5-taacgctgccgctgggatcacagcaa-BHQ-3	26		65.9
flor_f	atccaactcacgttgagcctcta	23	351	57
flor_r	tccaagaactcgcgatcaa	21		57.6
flor_pr	Cy5-ccgacgcgccactgctgaagta-BHQ-3	24		65.3

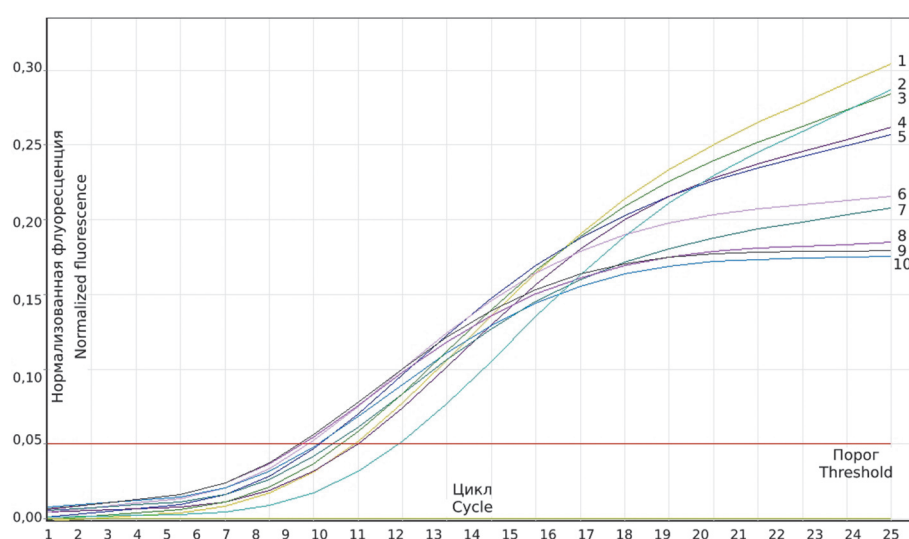
гена интегразы. На основании элайментов генов-мишеней, полученных из геномных сборок, и последовательностей БД Resfinder разработаны праймеры и зонды к указанным генам; учитывая вариабельность гена интегразы, праймеры и зонд были подобраны на консервативный участок гена (табл. 3), проведен расчет температур отжига. Проверка с помощью компонента программы Primer dimer analysis показала, что разработанные праймеры не образуют устойчивых димеров, при проведении *in silico* ПЦР перекрестных реакций не происходило.

Определение специфичности разработанного набора праймеров и подбор оптимальных параметров реакции. Тестирование синтезированных праймеров для оценки их специфичности методом ПЦР с детекцией в формате электрофореза с градиентом температур от 50 до 60 °C показало, что при температуре 60 °C синтезируется только продукт ожидаемой длины и отсутствуют дополнительные полосы неспецифической амплификации. Данная температура выбрана как оптимальная для этапа отжига праймеров и синтеза цепи.

Для выявления детерминант антибиотикорезистентности в режиме реального времени вместе с праймерами использовали синтезированные зонды. Прототип тест-системы на основе ПЦР в режиме реального времени включал следующие компоненты в количестве на одну постановку: 2,5 мкл 10x ПЦР-буфера; 2,5 мкл 2,5 mM dNTP (дезоксинуклеотидтрифосфатов); 2,5 мкл 25 mM раствора MgCl₂;

0,5 мкл SynTaq ДНК-полимеразы (5 Е/мкл); деионизованная вода до 25 мкл; смесь праймеров в концентрации 10 пкмоль/мкл по 0,5 мкл каждого и зонды в концентрации 10 пкмоль/мкл по 0,2 мкл; 5 мкл образца ДНК в количестве 10 нг на реакцию. Подобранные оптимальные сочетания мультиплекс-смесей для учета по нескольким каналам детекции одновременно: пробирка 1 включает в себя компоненты для поиска мишеней *strA*, *floR*, *int*, пробирка 2 – мишеней *tetA*, *dfrA*, *dhfR*. Реакцию проводили по следующей программе: 95 °C – 5 мин, 10 циклов без детекции сигнала флуоресценции (60 °C – 30 с, 95 °C – 15 с) и 25 циклов с детекцией сигнала флуоресценции (60 °C – 30 с (детекция), 95 °C – 15 с). Длительность реакции амплификации составила 66 мин.

При тестировании прототипа тест-системы получены положительные значения C_T для штаммов, содержащих искомые гены на основании анализа полногеномных последовательностей (рисунок, табл. 4). Наличие гена и, как следствие, положительная реакция в ПЦР коррелировали с профилем резистентности, полученным на основании учета результатов диско-диффузионного теста. Специфичность реакции оценена по отсутствию пороговых значений флуоресценции для штаммов, в геноме которых гены резистентности не представлены. Штамм *Sh. dysenteriae* также обнаружил наличие гена *srtA*, что коррелировало с устойчивостью к стрептомицину. Чувствительность разработанной панели праймеров и зондов составила 10³–10⁴ КОЕ/мл.



Результаты обнаружения гена *int* в ПЦР в режиме реального времени (канал учета Cy5):

1 – *V. cholerae* И-1181; 2 – *V. cholerae* И-1344; 3 – *V. cholerae* И-1300; 4 – *V. cholerae* И-1184; 5 – *V. cholerae* И-1183; 6 – *V. cholerae* И-1185; 7 – *V. cholerae* И-1263; 8 – *V. cholerae* И-1316; 9 – *V. cholerae* И-1330; 10 – *V. cholerae* И-1187

Results of *int* gene detection in real-time PCR (Cy5 detection channel):

1 – *V. cholerae* И-1181; 2 – *V. cholerae* И-1344; 3 – *V. cholerae* И-1300; 4 – *V. cholerae* И-1184; 5 – *V. cholerae* И-1183; 6 – *V. cholerae* И-1185; 7 – *V. cholerae* И-1263; 8 – *V. cholerae* И-1316; 9 – *V. cholerae* И-1330; 10 – *V. cholerae* И-1187

ПЦР-анализ отличается высокой точностью, чувствительностью, простотой постановки и высокой скоростью получаемого результата, в его основе лежит поиск заданных генных детерминант, дифференцирующих организм и/или определяющих те или иные его свойства. В лабораторной диагностике инфекционных заболеваний, как правило, ПЦР-тест-системы направлены на идентификацию и типирование возбудителя, а также определение детерминант патогенности. Разработанная система праймеров и зондов позволяет одновременно детектировать наличие SXT-элемента путем поиска гена интегразы (*int*) и определять профиль маркеров устойчивости. Выявляемые в составе прототипа тест-системы маркеры входят в состав известных вариантов SXT согласно классификации M. Spagnoletti *et al.* [11]. Помимо SXT-кассеты искомые маркеры могут быть локализованы и в составе конъюгативных плазмид и

интегрона класса I [12], учитывая общность структуры генов независимо от их локализации, они также могут быть выявлены ходе ПЦР.

Известно, что антибиотикорезистентность выявляется как у клинических, так и у водных штаммов *V. cholerae* вне зависимости от географического происхождения и места выделения [5]. При этом один изолят может содержать до 40 различных генов, обеспечивающих устойчивость к 22 антибиотикам, представляющим девять различных классов антимикробных препаратов [13]. Сконструированная в работе система праймеров и зондов позволяет одновременно детектировать в геноме *V. cholerae* присутствие SXT-элемента и пять маркеров устойчивости к антибиотикам. Искомые гены определяют устойчивость к актуальным в терапии препаратам: триметоприму, хлорамфениколу, стрептомицину и тетрациклину, входящим в десятку антимикробных препаратов, к которым

Таблица 4 / Table 4

Результаты определения генного профиля антибиотикорезистентности на основании разработанного набора праймеров и зондов

The results of determining the gene profile of antibiotic resistance based on the developed set of primers and probes

Штамм Strain	<i>int</i> Cy5	<i>strA</i> FAM	<i>tetA</i> FAM	<i>floR</i> ROX	<i>dfrA</i> R6G	<i>dhfR</i> ROX	Генный профиль Gene profile
<i>V. cholerae</i> И-1263 <i>V. cholerae</i> И-1187 <i>V. cholerae</i> И-1185	+	+	–	+	+	–	<i>int, strA, strB, floR, dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1300 <i>V. cholerae</i> И-1334 <i>V. cholerae</i> И-1316	+	+	+	+	–	+	<i>int, strA, strB, floR, tet(A), dhfR</i>
<i>V. cholerae</i> И-1181 <i>V. cholerae</i> И-1183 <i>V. cholerae</i> И-1184	+	+	+	+	+	–	<i>int, strA, strB, floR, tet(A), dfrA1</i>
<i>V. cholerae</i> И-1330	+	+	+	–	–	+	<i>int, strA, strB, tet(A)</i>
<i>V. cholerae</i> И-1299 <i>V. cholerae</i> И-1447 <i>V. cholerae</i> И-17 <i>V. cholerae</i> И-1467 <i>V. cholerae</i> 22-19 <i>S. typhimurium</i> 14 <i>V. alginoliticus</i> 5-14-B <i>V. paragoniticus</i> 226-12-B <i>E. coli</i> 18	–	–	–	–	–	–	
<i>Sh. dysenteriae</i> 19	–	+	–	–	–	–	нет данных, предположительно наличие гена <i>strA</i> no data, presumably presence of <i>strA</i> gene

на сегодняшний день наиболее часто детектируется устойчивость [13]. Ранее российскими авторами была разработана тест-система для одновременной детекции четырех маркеров антибиотикорезистентности у штаммов *V. cholerae*: гены *tetR*, *qnrVC*, *dfrA* и *floR*, определяющие устойчивость к тетрациклину, фторхинолонам, триметоприму и хлорамфениколу соответственно [14]. Следует отметить, что разработанная в рамках настоящей работы тест-система способна выявить также детерминанты устойчивости к стрептомицину *srtA*, вторую аллель гена дегидрофолатредуктазы (*dhfR*) и ген интегразы мобильного элемента SXT. Подобранные олигонуклеотиды и зонды обнаружили высокую воспроизводимость и специфичность при мультиплексировании.

За устойчивость к хлорамфениколам у штаммов *V. cholerae* ответственны гены *floR* и *catB*, однако присутствие последнего у штаммов, взятых в исследование, не обеспечивало наличие признака фенотипической устойчивости. В то время как при отсутствии гена *floR* у штамма, выделенного во время вспышки холеры во Владивостоке, отмечалась утрата устойчивости к хлорамфениколу [15].

В качестве мишеней разработанной системы праймеров и зондов используются два маркера гена дегидрофолатредуктазы (*dfrA1* и *dhfR*), последний характерен для штаммов, изолируемых на территории Китая [16], таким образом, помимо диагностической ценности, выявление гена *dhfR* позволяет сделать предположение о происхождении штамма.

На примере выборки штаммов *V. cholerae*, выделенных в разные годы в разных очагах, а также из объектов окружающей среды, показана корреляция наличия генной детерминанты с проявлениями резистентности к определенному препарату. В случае некоторых антибиотиков, механизм устойчивости к которым достигается включением нескольких биохимических механизмов, наличие гена не всегда ведет к прямому проявлению устойчивости культурой микроорганизмов при воздействии низких доз препарата, однако предполагается, что наличие определенного гена приводит к адаптации к действию антибиотика даже при изначальном проявлении чувствительности [17]. В связи с этим понимание генного профиля штамма становится необходимым для предсказания ответной реакции возбудителя на назначаемый антимикробный препарат.

Таким образом, учитывая специфичность, быстроту и простоту постановки реакции ПЦР и учет результатов в режиме реального времени, разработанная система праймеров и зондов может быть успешно применена для предварительной оценки резистентности выделенных штаммов *V. cholerae* к антимикробным препаратам.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Статья выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная система хими-

ческой и биологической безопасности Российской Федерации (2015–2020 гг.)».

Список литературы

1. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0016-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
2. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(3):417–433. DOI: 10.1128/MMBR.00016-10.
3. Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug. Resist.* 2018; 11:1645–1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.
4. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4):e00088-17. DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
5. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine.* 2020; 38(Suppl 1):A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
6. Burrus V., Marrero J., Waldor M.K. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid.* 2006; 55(3):173–83. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.01.001.
7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Prjibelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
8. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11):2640–4. DOI: 10.1093/jac/dks261.
9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6):1547–9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
10. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K.I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics.* 2017; 109(3–4):312–9. DOI: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
11. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., Fondi M., Taviani E., Fani R., Colombo M.M., Colwell R.R., Balloux F. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014; 5(4):e01356-14. DOI: 10.1128/mBio.01356-14.
12. Kitaoka M., Miyata S.T., Unterwiesing D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(Pt 4):397–407. DOI: 10.1099/jmm.0.023051-0.
13. Verma J., Bag S., Saha B., Kumar P., Ghosh T.S., Dayal M., Senapati T., Mehra S., Dey P., Desigamani A., Kumar D., Rana P., Kumar B., Maiti T.K., Sharma N.C., Bhadra R.K., Mutreja A., Nair G.B., Ramamurthy T., Das B. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116(13):6226–31. DOI: 10.1073/pnas.1900141116.
14. Крицкий А.А., Челдышова Н.Б., Заднова С.П., Плеханов Н.А., Смирнова Н.И. Способ одновременного выявления штаммов *Vibrio cholerae* и определения в их геноме генов лекарственной устойчивости с помощью ПЦР в режиме реального времени. *Биотехнология.* 2018; 34(2):70–9. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79.
15. Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Bochalgin N.O., Mironova L.V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 78:104096. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104096.
16. Wang R., Yu D., Yue J., Kan B. Variations in SXT elements in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in China. *Sci. Rep.* 2016; 6:22733. DOI: 10.1038/srep22733.
17. Osman K.M., Kappell A.D., Elhadidy M., ElMougy F., Abd El-Ghany W.A., Orabi A., Mubarak A.S., Dawoud T.M., Hemeg H.A., Moussa I.M.I., Hessain A.M., Yousef H.M.Y. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5859. DOI: 10.1038/s41598-018-23962-7.

References

1. Munita J.M., Arias C.A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiol. Spectr.* 2016; 4(2):VMBF-0016-2015. DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
2. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(3):417–433. DOI:

- 10.1128/MMBR.00016-10.
3. Aslam B., Wang W., Arshad M.I., Khurshid M., Muzammil S., Rasool M.H., Nisar M.A., Alvi R.F., Aslam M.A., Qamar M.U., Salamat M.K.F., Baloch Z. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infect. Drug. Resist.* 2018; 11:1645–1658. DOI: 10.2147/IDR.S173867.
 4. Partridge S.R., Kwong S.M., Firth N., Jensen S.O. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 2018; 31(4):e00088-17. DOI: 10.1128/CMR.00088-17.
 5. Das B., Verma J., Kumar P., Ghosh A., Ramamurthy T. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae*: Understanding the ecology of resistance genes and mechanisms. *Vaccine.* 2020; 38(Suppl 1):A83-A92. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.06.031.
 6. Burrus V., Marrero J., Waldor M.K. The current ICE age: biology and evolution of SXT-related integrating conjugative elements. *Plasmid.* 2006; 55(3):173–83. DOI: 10.1016/j.plasmid.2006.01.001.
 7. Bankevich A., Nurk S., Antipov D., Gurevich A.A., Dvorkin M., Kulikov A.S., Lesin V.M., Nikolenko S.I., Pham S., Pribelski A.D., Pyshkin A.V., Sirotkin A.V., Vyahhi N., Tesler G., Alekseyev M.A., Pevzner P.A. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J. Comput. Biol.* 2012; 19(5):455–77. DOI: 10.1089/cmb.2012.0021.
 8. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., Vestergaard M., Rasmussen S., Lund O., Aarestrup F.M., Larsen M.V. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 2012; 67(11):2640–4. DOI: 10.1093/jac/dks261.
 9. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 2018; 35(6):1547–9. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
 10. Kalendar R., Khassenov B., Ramankulov Y., Samuilova O., Ivanov K.I. FastPCR: An *in silico* tool for fast primer and probe design and advanced sequence analysis. *Genomics.* 2017; 109(3–4):312–9. DOI: 10.1016/j.ygeno.2017.05.005.
 11. Spagnoletti M., Ceccarelli D., Rieux A., Fondi M., Taviani E., Fani R., Colombo M.M., Colwell R.R., Balloux F. Acquisition and evolution of SXT-R391 integrative conjugative elements in the seventh-pandemic *Vibrio cholerae* lineage. *mBio.* 2014; 5(4):e01356-14. DOI: 10.1128/mBio.01356-14.
 12. Kitaoka M., Miyata S.T., Unterweger D., Pukatzki S. Antibiotic resistance mechanisms of *Vibrio cholerae*. *J. Med. Microbiol.* 2011; 60(Pt 4):397–407. DOI: 10.1099/jmm.0.023051-0.
 13. Verma J., Bag S., Saha B., Kumar P., Ghosh T.S., Dayal M., Senapati T., Mehra S., Dey P., Desigamani A., Kumar D., Rana P., Kumar B., Maiti T.K., Sharma N.C., Bhadra R.K., Mutreja A., Nair G.B., Ramamurthy T., Das B. Genomic plasticity associated with antimicrobial resistance in *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019; 116(13):6226–31. DOI: 10.1073/pnas.1900141116.
 14. Kritsky A.A., Cheldyshova N.B., Zadnova S.P., Plekhanov N.A., Smirnova N.I. [A method for the simultaneous detection of *Vibrio cholerae* strains and determination of drug resistance genes in their genome using real-time PCR]. *Biotechnologiya. [Biotechnology].* 2018; 34(2):70–9. DOI: 10.21519/0234-2758-2018-34-2-70-79.
 15. Gladkikh A.S., Feranchuk S.I., Ponomareva A.S., Bochalgin N.O., Mironova L.V. Antibiotic resistance in *Vibrio cholerae* El Tor strains isolated during cholera complications in Siberia and the Far East of Russia. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 78:104096. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104096.
 16. Wang R., Yu D., Yue J., Kan B. Variations in SXT elements in epidemic *Vibrio cholerae* O1 El Tor strains in China. *Sci. Rep.* 2016; 6:22733. DOI: 10.1038/srep22733.
 17. Osman K.M., Kappell A.D., Elhadidy M., ElMougny F., Abd El-Ghany W.A., Orabi A., Mubarak A.S., Dawoud T.M., Hemeg H.A., Moussa I.M.I., Hessain A.M., Yousef H.M.Y. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Sci. Rep.* 2018; 8(1):5859. DOI: 10.1038/s41598-018-23962-7.

Authors:

Gladkikh A.S., Fedotova I.S., Mironova L.V. Irkutsk Research Anti-Plague Institute of Siberia and Far East. 78, Trilissera St., Irkutsk, 664047, Russian Federation. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.

Об авторах:

Гладких А.С., Федотова И.С., Миронова Л.В. Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Сибири и Дальнего Востока. Российская Федерация, 664047, Иркутск, ул. Трилисера, 78. E-mail: adm@chumin.irkutsk.ru.