

УДК 579.843.1:575.25.:612.017.4:002.5/6

РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ICE ЭЛЕМЕНТОВ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ
У *V. CHOLERAЕ*

С.О. Водопьянов, А.С. Водопьянов, И.П. Олейников, С.В. Титова

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора,
Ростов-на-Дону, Россия

С помощью виртуальной ПЦР *in silico* проведен анализ локальной базы данных 395 полногеномных нуклеотидных последовательностей *Vibrio cholerae* на наличие ICE элемента. Результат свидетельствовал о широком распространении ICE элемента у токсигенных и атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* серовара O1. При этом все ICE элементы успешно типировались: три основных типа – «индийский», «мозамбикский» или «SXT». При этом до 40 % атоксигенных штаммов O1 серовара и неO1/неO139 несли ICE элемент. При анализе с помощью ПЦР *in vitro* коллекции 222 штаммов *Vibrio cholerae* серовара O1 показано наличие ICE элемента и определены его типы у токсигенных штаммов, выделенных в последние годы на территории Российской Федерации. Все атоксигенные O1, O139 и неO1/неO139 штаммы, выделенные на территории РФ, лишены ICE элемента, что отличает их от штаммов, циркулирующих в эндемичных по холере регионах. Это наблюдение позволяет рассматривать наличие ICE элемента как новый эпидемиологический маркер «заносных штаммов» атоксигенных холерных вибрионов.

Ключевые слова: *Vibrio cholerae*, ICE элемент, ПЦР.

S.O. Vodop'yanov, A.S. Vodop'yanov, I.P. Oleynikov, S.V. Titova □ PREVALENCE OF ICE ELEMENTS OF DIFFERENT TYPES IN *V. CHOLERAЕ* □ Rostov-on-Don Anti-Plague Institute of Rospotrebnadzor, Rostov-on-Don, Russia.

With the help of a virtual PCR *in silico* analysis of the local database 395 genome-nucleotide sequences of *Vibrio cholerae* in the presence of ICE element. The results showed widespread ICE member from toxigenic strains and nontoxigenic *Vibrio cholerae* O1 serotype. Thus all elements of ICE successfully typed three basic types – «Indian», «Mozambique», or «the SXT». In this case up to 40 % nontoxigenic strains O1 serovar and nonO1/nonO139 carried ICE element. When analyzed by PCR *in vitro* collection of 222 strains of *Vibrio cholerae* O1 serotype shows the presence of ICE element and determine its type in toxigenic strains isolated in recent years in the Russian Federation. All nontoxigenic O1, O139 and nonO1/nonO139 strains isolated in Russia, deprived of ICE element that differs from strains circulating in endemic cholera areas. This observation allows us to consider the presence of ICE element as a new epidemic marker «of invasive strains of» nontoxigenic *Vibrio cholerae*.

Key words: *Vibrio cholerae*, ICE element, PCR.

Integrative Conjugative Elements (ICEs) представляют собой мобильные генетические элементы размером от 79 до 108 kb, способные интегрироваться в состав хромосомы хозяина и передаваться путем конъюгации. Эти элементы содержат свыше 50 генов, включая гены, детерминирующие процесс конъюгации, интеграции, продукцию токсинов, устойчивости к антибиотикам, тяжелым металлам, ДНК-азы и др. ICE-подобные элементы обнаружены у многих видов бактерий, включая *Photobacterium damsela*, *Shewanella putrefaciens* и *Providencia alcalifaciens* [13]. Первый элемент этого типа был выявлен у штамма *Providencia rettgeri*, выделенного в 1967 году [7, 10]. Данные ретроспективного анализа, приведенные разными группами авторов, показали, что вибрионы ориентировочно приобрели ICE элемент путем горизонтального переноса от гетерологичных микроорганизмов в период 1978–1984 годов [7, 10, 13].

У холерного вибриона первый ICE был описан в 1992 году под названием SXT/R391 элемента. В последующем разные группы авторов у разных штаммов описали несколько типов ICE. В настоящее время по итогам секвенирования предложено несколько классификаций ICE, выделяющих свыше десяти основных типов [10, 13].

В настоящее время подавляющее большинство вспышек холеры во всем мире вызвано токсигенными штаммами, содержащими ICE

элементы разных типов. Это способствовало началу изучения этой структуры и у нас в стране [3, 5]. Это делает целесообразным введение анализа на наличие ICE элемента в практику молекулярного мониторинга за холерой.

Цель исследования – с помощью компьютерного анализа базы данных полногеномных сиквенсов *V. cholerae* O1 и неO1/неO139 и ПЦР на коллекции штаммов различного происхождения оценить возможность использования детекции ICE элемента и его типирования в практике эпиднадзора за холерой.

Материалы и методы. ПЦР *in silico* проводили согласно описанному алгоритму [1] с использованием локальной базы данных неполных геномов *Vibrio cholerae* (созданная локальная база данных последовательностей ДНК неполных геномов штаммов возбудителя холеры, находившихся в *Genbank* на момент проведения работы). Глубину секвенирования и репрезентативность данных анализировали с помощью авторской программы *SegAnalyzer*. Созданная локальная база данных содержала информацию о 395 структурах штаммов *V. cholerae*, выделенных в различных регионах мира, полностью отвечавших всем критериям полноты секвенирования. Для анализа *in silico* и постановки ПЦР *in vitro* использовали систему описанных в литературе праймеров (пара родových для выявления ICE элемента) и трех пар видовых (для выявления «индийского», «мозамбикского» и «SXT» типов) [12].

Коллекция изученных штаммов включала 222 культуры сероваров O1, O139 и неO1/неO139, выделенных в различные сроки в различных регионах РФ и мира. Культивирование штаммов, выделение ДНК, проведение ПЦР и учет результатов проводили так, как описано ранее [2]. Синтез праймеров проводила НПФ «Евроген» (Москва).

Результаты исследования. Результаты виртуальной ПЦР *in silico* на наличие ICE элемента и его типов, проведенной на локальной базе из 395 полногеномных нуклеотидных последовательностей *Vibrio cholerae* сероваров O1 и не O1/не O139, представлены в табл. 1. Полученные данные свидетельствуют о широком распространении ICE элемента у токсигенных и атоксигенных штаммов *Vibrio cholerae* серовара O1. При этом все ICE элементы успешно типировались использованной системой праймеров на три основных типа – «индийский», «мозамбикский» и «SXT». Эти данные согласуются с мнением о существовании трех типов ICE элемента [9, 11] и позволят упростить молекулярное генотипирование при практическом использовании метода.

Отсутствие ICE элемента у части изученных токсигенных штаммов можно объяснить их ранним сроком выделения до наступления этапа приобретения ICE элемента [2, 5]. Интересно, что 40 % атоксигенных штаммов O1 серовара и штаммы неO1/неO139 несли ICE элемент. Однако в случае штаммов неO1/неO139 ICE элемент не удалось протипировать как представителя одного из трех основных типов. Эти данные согласуются с результатами, полученными при изучении полногеномных сиквенов «гаитянских штаммов», показавших существование у таких штаммов нового типа этой генетической структуры [6].

Результаты следующего этапа работы – анализ с помощью ПЦР коллекции штаммов, выделенных на территории РФ, для выявления и типирования ICE элемента – приведены в табл. 2. Токсигенные штаммы, лишенные ICE элемента, были выделены в период эпидемических осложнений 1965–1974 годов, то есть до момента приобретения этой генетической структуры холерным вибрионом [9, 10]. Все токсигенные штаммы последующих сроков изоляции содержали ICE. При этом все выявленные нами ICE элементы, обнаруженные у O1 ctx+tcpA+ штаммов, были успешно идентифицированы до вида, что совпа-

ло с нашими данными типирования *in silico* и свидетельствует о достаточной разрешающей способности использованного нами метода типирования при анализе на три основных типа.

Все атоксигенные O1, O139 и неO1/неO139 штаммы, выделенные на территории РФ, лишены ICE элемента, что отличает их от штаммов, циркулирующих в эндемичных по холере регионах, где, по данным типирования *in silico*, 40 % штаммов содержит анализируемый фрагмент ДНК. Это наблюдение позволяет рассматривать наличие ICE элемента как новый эпидемический маркер «заносных штаммов» холерных вибрионов. Полученный результат совпадает с данными недавнего исследования, когда из 10 изученных неO1/неO139 штаммов, выделенных из судовых балластных вод, у 7 культур был обнаружен специфический фрагмент интегразы, что прямо свидетельствовало о наличии ICE элемента. Это позволило авторам сделать вывод о заносной природе подобных штаммов [3].

Интересные результаты получены при анализе распределения типов ICE элемента у токсигенных штаммов, выделенных в РФ и сопредельной территории в последние десятилетия (табл. 3). Практически все крупные эпидемические вспышки были вызваны штаммами с одним типом ICE элемента. Единственное исключение – крупная вспышка в Дагестане 1994 года, когда была отмечена циркуляция токсигенных культур с двумя типами ICE элемента. Это может свидетельствовать о наличии двух независимых заносов инфекции, что согласуется с мнением о сложном характере эпидемического процесса в Дагестане в период 1994 года с многочисленными заносами инфекции [4]. Отмечена тенденция смены возбудителя: так, если ранние заносы 1993–1998 годов были обусловлены штаммами с ICE элементом «мозамбикского типа», то начиная с 2001 года в нашей стране выделяют только штаммы с ICE элементом «индийского типа». Эта тенденция может свидетельствовать о большем эпидемическом потенциале штаммов с ICE элементом «индийского типа». Косвенным подтверждением этого предположения может быть факт продолжающейся циркуляции токсигенных штаммов, лишенных ICE элемента, на эндемичной территории без их выноса на сопредельные регионы и серьезных эпидемических осложнений [8].

Таблица 1. Результаты ПЦР *in silico* на 395 полногеномных нуклеотидных последовательностях *Vibrio cholerae* O1 и неO1/неO139 на наличие ICE элемента и его типов

Свойства	Всего структур	ICE–	ICE+	Тип ICE «индийский»/ «мозамбикский»/«SXT»
O1 всего	321	115	206	159/44/3
O1 ctx+	286	94	192	149/42/1
O1 ctx–	35	21	14	10/2/2
неO1/неO139 всего	74	45	29	
неO1/неO139 ctx+	12	12	–	
неO1/неO139 ctx–	62	33	29	–/–/–

Таблица 2. Результаты анализа коллекции штаммов *Vibrio cholerae* в ПЦР на определение наличия ICE и его типов

№	Генотип	Число штаммов	Наличие ICE элемента		Тип ICE элемента
			+	–	
1	O1 ctx+tcpA+	104	89	15	«индийский» – 24; «мозамбикский» – 65
2	O1 ctx–tcpA+	27	0	27	
3	O1 ctx–tcpA–	77	0	77	
4	O139 ctx–tcpA–	8	0	8	
5	неO1/неO139	6	0	6	
	Всего	222	89	133	

Таблица 3. Типы ICE элемента у O1 ctx+tcpA+ штаммов *V. cholerae*, выделенных в различных регионах

№	Регион, дата выделения	Число штаммов	Тип ICE элемента
1	Дагестан, 1993	10	«мозамбикский» – 10
2	Дагестан, 1994	45	«мозамбикский» – 43; «индийский» – 2
3	Крым, 1994	2	«мозамбикский» – 2
4	Дагестан, 1998	7	«мозамбикский» – 7
5	Казань, 2001	6	«индийский» – 6
6	Крым, 2010	3	«мозамбикский» – 3
7	Мариуполь, 2011	10	«индийский» – 10
8	Штаммы, выделенные в РФ в 2005–2014	6	«индийский» – 6

На основании проделанной работы можно сделать **выводы**, что ICE элемент является информативным генетическим маркером токсигенных штаммов *V. cholerae*, а для молекулярного типирования ICE элемента достаточно определения двух основных типов. Кроме того, отсутствие ICE элемента у атоксигенных штаммов *V. cholerae*, выделенных в Российской Федерации, позволит использовать выявление ICE элемента как признак, характерный для «заносных» штаммов.

ЛИТЕРАТУРА (п. 6–13 см. References)

- Водопьянов А.С. Алгоритм компьютерного VNTR-типирования на основе неполных секвенсов ДНК штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных на Гаити в 2010 / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников, Б.Н. Мишанькин // Здоровье населения и среда обитания. 2013. № 3 (240). С. 28–31.
- Водопьянов А.С. и др. INDEL- и VNTR-типирование штаммов *Vibrio cholerae*, выделенных в 2013 году из объектов окружающей среды на территории Российской Федерации / А.С. Водопьянов, С.О. Водопьянов, И.П. Олейников [и др.] // Здоровье населения и среда обитания 2015. № 5 (266). С. 41–44.
- Захарова И.Б. и др. Молекулярно-генетическая характеристика штаммов *Vibrio cholerae* NON-O1/NON-O139, выделенных из балластных вод судов и акватории портов Ростовской области / И.Б. Захарова, С.Ю. Водяницкая, М.В. Подшивалова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни 2015. № 3. С. 47–50.
- Онищенко Г.Г. и др. Холера в Дагестане: прошлое и настоящее / Г.Г. Онищенко, Е.Н. Беляев, Э.А. Москвитина [и др.]. Под общей редакцией заслуженного деятеля науки РФ, доктора медицинских наук профессора Г.М. Мединского. Ростов-на-Дону: изд-во «Полиграф», 1995. С. 33–77.
- Подшивалова М.В. и др. Характеристика антибиотикорезистентных штаммов *Vibrio cholerae*, несущих интегративные конъюгативные элементы SXT-типа / М.В. Подшивалова, Ю.А. Кузютина, И.Б. Захарова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. 2014. № 3. С. 34–39.

REFERENCES

- Vodop'janov A.S., Vodop'janov S.O., Olejnikov I.P., Mishan'kin B.N. Algoritim komp'yuternogo VNTR-tipirovaniya na osnove nepolnykh sikvensov DNK shtammov *Vibrio cholerae*, vydelennykh na Gaiti v 2010 [Computer VNTR-typing algorithm based on the partial sequence data of *vibrio cholera* strains from Haitian outbreak (2010)]. *Zdorov'e naselenija i sreda obitaniya*, 2013, no. 3 (240), pp. 28–31 (in Russian).
- Vodop'janov A.S., Vodop'janov S.O., Olejnikov I.P., Mishan'kin B.N., Kruglikov V.D., Arhangel'skaja I.V., Zubkova D.A., Ezhova M.I. INDEL- i VNTR-tipirovanie shtammov *Vibrio cholerae*, vydelennykh v 2013 godu iz objektov okruzhajushchej sredy na territorii Rossijskoj Federatsii [INDEL- i VNTR-typing *Vibrio cholerae* strains, isolated in 2013 from the environment objects in the Russian Federation]. *Zdorov'e naselenija i sreda obitaniya*, 2015, no. 5 (266), pp. 41–44 (in Russian).
- Zakharova I.B., Vodjanitskaja S.Ju., Podshivalova M.V., Kruglikov V.D., Arkhangel'skaja I.V., Viktorov D.V. Mo-

- lekuljarno-geneticheskaja charakteristika shtammov *Vibrio sholerae* NON-O1/NON-O139, vydelennykh iz ballastnykh vod sudov i akvatorii portov Rostovskoj oblasti [Molecular genetic characterization of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 strains isolated from ship ballast and port surface water in Rostov region]. *Epidemiologija i infeksionnye bolezni*, 2015, no. 3, pp. 47–50 (in Russian).
- Onishchenko G.G., Beljaev E.N., Moskvitina E.A., Reza-jkin V.I., Lomov Ju.M., Medinskij G.M. Cholera v Dagestane: proshloe i nastojashchee. [Cholera in Dagestan: Past and Present]. Under the general editorship of the honored worker of science of RF, doctor of medical sciences, Professor G.M. Medinskij. Rostov-on-Don: «Poligraf» Publ., 1995, pp. 33–77 (in Russian).
- Podshivalova M.V., Kuzjutina Ju.A., Zakharova I.B., Lopastejskaja Ja.A., Viktorov D.V. Charakteristika antibiotikorezistentnykh shtammov *Vibrio cholerae*, nesushchih integrativnye konjugativnye elementy SXT-tipa [Characteristics of antibiotic resistant strains of *Vibrio cholerae* carrying SXT type integrative conjugative elements]. *Epidemiologija i infeksionnye bolezni*, 2014, no. 3, pp. 34–39 (in Russian).
- Ceccarell D. et al. A new integrative conjugative element detected in Haitian isolates of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 / D. Ceccarell, M. Spagnoletti, N.A. Hasan [et al.] // *Res Microbiol.* 2013. November. № 164 (9). pp. 891–893.
- Daliaa A.B. et al. A globally distributed mobile genetic element inhibits natural transformation of *Vibrio cholerae* / A.B. Daliaa, K.D. Seed, S.B. Calderwood, A. Camilli // *PNAS*. August 18, 2015. Vol. 112. № 33. pp. 10485–10490.
- Klinzing D. et al. Hybrid *Vibrio cholerae* El Tor Lacking SXT Identified as the Cause of a Cholera Outbreak in the Philippines / D. Klinzing, S.Y. Choi, N.A. Hasan [et al.] // *mbio.asm.org* March/April 2015. Vol. 6. Iss. 2. e00047–15.
- Marin M.A. et al. Worldwide Occurrence of Integrative Conjugative Element Encoding Multidrug Resistance Determinants in Epidemic *Vibrio cholerae* O1 / M.A. Marin, E.L. Fonseca, B.N. Andrade [et al.] // *PLOS ONE*. URL: www.plosone.org September. 2014. Vol.9. Iss. 9. e108728.
- Mutreja A. et al. Evidence for multiple waves of global transmission within the seventh cholera pandemic / A. Mutreja, D.W. Kim, N. Thomson [et al.] // *Nature*. 2011. № 477 (7365). pp. 462–465.
- Spagnoletti M. et al. Acquisition and Evolution of SXT-R391 Integrative Conjugative Elements in the Seventh-Pandemic *Vibrio cholerae* Lineage whole-genome sequence data / M. Spagnoletti, D. Ceccarelli, A. Rieux [et al.] // *mbio.asm.org* July/August 2014. Vol. 5. Iss. 4. e01356–14.
- Spagnoletti M. et al. Rapid detection by multiplex PCR of Genomic Islands, prophages and Integrative Conjugative Elements in *V. cholerae* 7th pandemic variants / M. Spagnoletti, D. Ceccarelli, M.M. Colombo // *J. Microbiological Methods*. № 88 (2012). pp. 98–102.
- Wozniak R.A.F. et al. Comparative ICE Genomics: Insights into the Evolution of the SXT/R391 Family of ICEs / R.A.F. Wozniak, D.E. Fouts, M. Spagnoletti [et al.] // *PLoS Genetics* URL: www.plosgenetics.org December 2009. Vol. 5. Iss. 12. e1000786.

Контактная информация:

Водопьянов Сергей Олегович,
тел.: +7 (903) 402-11-63,
e-mail: serge100v@gmail.com

Contact information:

Vodop'yanov Sergey,
phone: +7 (903) 402-11-63,
e-mail: serge100v@gmail.com

