

*О.В.Васильева, А.С.Волынкина, И.В.Кузнецова, С.В.Писаренко, А.Н.Куличенко*

## **МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММА SHIGELLA SONNEI-2013, ВЫДЕЛЕННОГО ПРИ ВСПЫШКЕ ДИЗЕНТЕРИИ В РЕСПУБЛИКЕ АБХАЗИЯ В 2013 ГОДУ**

Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт

*Цель.* Изучить молекулярно-генетические свойства штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного во время вспышки дизентерии в Республике Абхазия в 2013 г. *Материалы и методы.* Генетическое типирование исследуемого штамма осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 7 консервативных генов «домашнего хозяйства» *adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, *gyrB*. Секвенированные фрагменты ДНК сравнивали с референсными последовательностями из базы данных *Escherichia coli* MLST. Филогенетический анализ проводили с помощью метода UPGMA и компьютерной программы START 2. Полногеномное секвенирование выполняли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием фрагментных библиотек (shot-gun). Картирование ридов проводили в программе GS Reference Mapper. *Результаты.* Определен сиквенс-тип исследуемого штамма — ST-152, являющийся одним из распространенных генотипов для *S. sonnei*. Показана высокая степень сходства полученных контигов с последовательностью хромосомы и плазмид А, В, С и Е штаммов *S. sonnei* 53G и *S. sonnei* Ss046. Выявлены контиги с высоким процентом сходства с последовательностью плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30). В геноме штамма *S. sonnei*-2013 обнаружены нуклеотидные последовательности 136 генов, расположенных на плазмиде pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30). Обнаружены гены, контролирующие биосинтез пилей IV типа, участвующих в адгезии к абиотическим поверхностям и формировании биопленки. *Заключение.* Выявлены структурные особенности штамма, обусловленные наличием фрагментов плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

Журн. микробиол., 2018, № 1, С. 72—76

Ключевые слова: дизентерия, *S. sonnei*, MLST-генотипирование, полногеномное секвенирование

*O.V.Vasileva, A.S.Volynkina, I.V.Kuznetsova, S.V.Pisarenko, A.N.Kulichenko*

## **MOLECULAR-GENETIC CHARACTERISTICS OF SHIGELLA SONNEI-2013 STRAIN ISOLATED DURING THE OUTBREAK IN DYSENTERY IN THE REPUBLIC ABKHAZIA IN 2013**

Stavropol Research Institute for Plague Control, Russia

*Aim.* Study of molecular-genetic properties of *Shigella sonnei*-2013 strain isolated during the outbreak in dysentery in the republic Abkhazia in 2013. *Materials and methods.* Genetic typing of the tested strains using multilocus sequence typing (MLST). Analyzed of nucleotide sequence fragments 7 of conservative «housekeeping» genes *adk*, *fumC*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*, *gyrB*. Sequenced of DNA fragments compared with reference sequences from database of *Escherichia coli* MLST. Phylogenetic analysis was performed using UPGMA method and computer program START 2. Whole-genome sequencing performed on a genetic analyzer Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) using fragment libraries (shot-gun). Aligning reads have been carried out with the program GS Reference Mapper. *Results.* Defined sequence — type of the studied strain — ST-152, one of the most common genotypes for *S. sonnei*. Demonstrated the high degree of similarity obtained contig to the sequences of the chromosome and plasmids А, В, С и Е strains *S. sonnei* 53G and *S. sonnei* Ss046. Identified contigs with a high percentage similarity to the sequence of virulence plasmid pO26-Vir of *E. coli* O26:H11 (H30). In the genomic *S. sonnei*-2013 revealed nucleotide sequence of 136 genes were found located on the pO26-Vir strain of *E. coli*

O26:H11 (H30). Discovered genes controlling biosynthesis of type IV pili involved in adhesion to abiotic surfaces and biofilm formation. *Conclusion.* Identified structural peculiarities of strain induced by fragments of virulence plasmid pO26-Vir strain *E. coli* O26:H11 (H30).

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No.1, P. 72—76

Key words: dysentery, *S. sonnei*, MLST genotyping, whole-genome sequencing

## ВВЕДЕНИЕ

В конце ноября 2013 г. в г. Ткуарчал была зафиксирована вспышка кишечной инфекции. Всего с 24.11.2013 г. по 20.12.2013 г. зарегистрировано 1260 больных, в том числе 390 детей в возрасте до 14 лет и 870 взрослых. Причиной вспышки было бактериальное загрязнение водозабора на р. Геджирке, являющейся источником питьевого водоснабжения для города. Результаты лабораторных исследований показали, что этиологическим фактором заболевания явилась *Shigella sonnei*. Особенностью вспышки была реализация водного пути передачи инфекции, как правило, не являющегося основным для *S. sonnei*.

Цель работы — изучить молекулярно-генетические свойства штамма *Shigella sonnei*-2013, выделенного во время вспышки дизентерии в Республике Абхазия в 2013 г.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

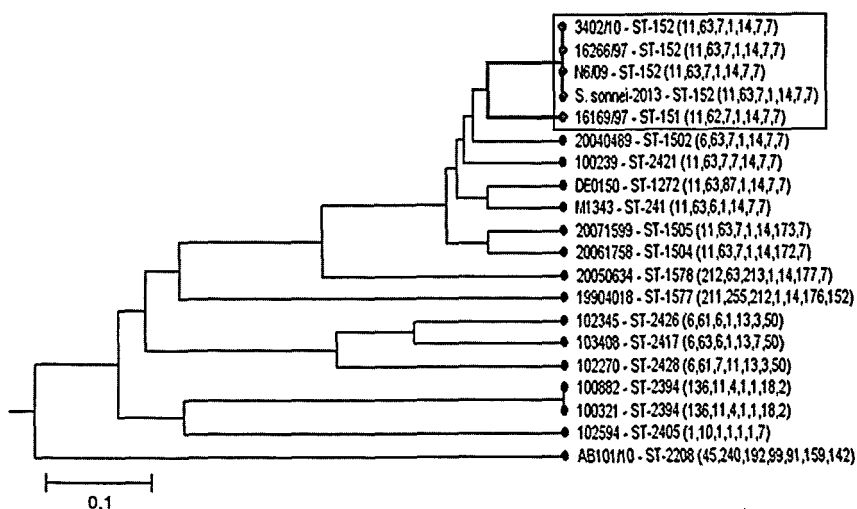
Выделение и исследование возбудителя шигеллеза проводили в соответствии с [2], определение чувствительности выделенных штаммов шигелл к антибактериальным препаратам — в соответствии с [1].

Генетическое типирование исследуемого штамма осуществляли методом мультилокусного сиквенс-типирования (MLST). Анализировали нуклеотидные последовательности фрагментов 7 консервативных генов «домашнего хозяйства»: *adk* — adenylate kinase, *fumC* — fumarate hydratase, *gyrB* — DNA gyrase, *icd* — isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase, *mdh* — malate dehydrogenase, *purA* — adenylosuccinate dehydrogenase, *recA* — ATP/GTP binding motif. Секвенированные фрагменты ДНК сравнивали с референсными значениями из базы данных *E. coli* MLST, доступной на сайте <http://mlst.ucc.ie>, и использовали для проведения филогенетического анализа.

Полногеномное секвенирование выполняли на генетическом анализаторе Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM™) с использованием соответствующих фрагментных библиотек (shot-gun). Выделение ДНК штаммов для получения геномных библиотек проводили с использованием набора для выделения геномной ДНК бактерий ChargeSwitch gDNA Mini Bacteria Kit («Invitrogen», США) в соответствии с протоколом производителя. При сборке контигов (фрагментов геномной последовательности) и определении их взаимного расположения использовали программу Newbler Assembler 2.9 (454 Life Science).

Достоверность наличия целевого фрагмента в геноме оценивали, анализируя специфичность картирования ридов на референсную последовательность плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26, депонированную в базе данных NCBI (FJ 386569).

Специфичным считали картирование, при котором наблюдается равномерное покрытие ридами более 90% референсной последовательности. При



Дендрограмма филогенетического родства штамма *S. sonnei*-2013.

этом различия консенсусной и референсной нуклеотидных последовательностей генов-мишеней не должны превышать 3%. Картирование ридов проводили в программе GS Reference Mapper.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Этиологическим агентом эпидемической вспышки ОКИ в г. Ткуарчал была *S. sonnei* (штамм *S. sonnei*-2013) с типичными морфологическими и биохимическими свойствами.

Изоляты *S. sonnei*-2013 чувствительны к антибактериальным препаратам: левомицетину, ципрофлоксацину, ломефлоксацину, цефотаксиму, цефтриаксону, фуразолидону и дизентерийному бактериофагу.

Проведено мультилокусное сиквенс-типирование исследуемого штамма. Установлены аллельные типы исследуемых генов: *adk* — 11, *fumC* — 63, *icd* — 7, *mdh* — 14, *purA* — 7, *recA* — 7, *gyrB* — 7, нуклеотидные замены на исследуемых локусах не выявлены. В результате анализа определен сиквенс-тип исследуемого штамма — ST-152, один из распространенных генотипов для *S. sonnei* [3]. Штаммы с ST-152 были выделены в Германии в 2009 г. и в Китае в 2009 — 2010 гг. Данные о российских штаммах шигелл в базе данных *E. coli* MLST отсутствуют. В соответствии с полученными сведениями, с помощью метода UPGMA и компьютерной программы START 2 построена дендрограмма, отображающая степень филогенетического родства штаммов рода *Shigella* (рис.).

Геном исследованного штамма *S. sonnei*-2013 представлен 410 контигами общим размером 4 471 773 п.н. Сравнение контигов с базой нуклетидных последовательностей NT проводили с помощью ресурса BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). Анализ показал высокую степень сходства (99%) полученных контигов с последовательностью хромосомы и плазмид А, В, С и Е штаммов *S. sonnei* 53G и *S. sonnei* Ss046. Однако были выявлены контиги с высоким процентом сходства с последовательностью плазмиды вирулентности pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

*E. coli* O26:H11 штамм H30 впервые описан в 1977 году Konowalchuk J. et al. [6] и отнесен к шига-токсинпродуцирующим штаммам (STEC), являющим-

ся актуальной проблемой общественного здравоохранения во многих странах мира. Штаммы группы STEC могут вызывать заболевания с различными клиническими проявлениями: от колита и гемоколита без внекишечных осложнений до «геморрагического» колита с развитием гемолитико-уремического синдрома [4, 7, 10].

Штамм *E. coli* O26:H11 (H30) содержит 6 плазмид, наибольшая из них — pO26-Vir размером 168 kb включает 196 генов, ряд транспозонов и вставочных элементов. Плазида состоит из двух регионов. Первый включает гены вирулентности, второй — гены переноса и гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа. Вирулентный регион плазмиды pO26-Vir включает ген *toxВ*, ген серин-протеазы *espP*, каталазы-пероксидазы *katP* и кластер гемолизина (*hlyA-D*). Регион, содержащий гены переноса, состоит из генов *traL-traV* протяженностью 111,774 — 134,889 bp [9]. Регион, контролирующий биосинтез пилей IV типа, состоит из 10 тесно связанных между собой генов (*pilL-pilV*) [8].

С целью выявления генов плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30) в геноме штамма *S. sonnei*-2013 проведено картирование ридов на специфичные нуклеотидные последовательности генов плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30).

В геноме штамма *S. sonnei*-2013 обнаружены нуклеотидные последовательности 136 генов, расположенных на плазмиде pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30), из них 74 с предполагаемыми функциями и 62 с известными. К последним относятся 14 генов, расположенных в *tra* кластере (гены переноса *traL-traW*) и 10 генов, регулирующих биосинтез пилей IV типа (*pilL-pilV*) (табл.), и 38 генов, отвечающих за репликацию, транскрипцию, трансляцию, конъюгацию, стабилизацию плазмиды и другие функции. Покрытие всех выявленных локусов ридами является специфичным, риды картировались на 100 % длины референсных последовательностей генов-мишеней.

Следует отметить, что в геноме *S. sonnei*-2013 отсутствуют гены *toxВ*, *espP*, *katP*, *hlyA-D*, входящие в вирулентный регион плазмиды pO26-Vir, но имеются гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа (*pilL-pilV*). Пили IV типа присутствуют у некоторых патогенных бактерий (энтеротоксигенных, энтеропатогенных, энтероаггративных *E. coli*) и являются одним из факторов патогенности, обеспечивающим прикрепление к клеткам кишечного эпителия. Пили IV участвуют в адгезии к абиотическим поверхностям и формировании биопленки [5].

Анализ результатов секвенирования показал высокую степень сходства нуклеотидной последовательности хромосомной ДНК с последовательностями ранее секвенированных штаммов, опубликованными в базе данных GeneBank. В связи с этим, результаты MLST-типирования, основанного на секвенировании участков хромосомных генов, не позволили выявить значительные отли-

Гены плазмиды pO26-Vir штамма *E. coli* O26:H11 (H30), выявленные в геноме *S. sonnei*-2013

Наименование целевого участка	Число специфично картированных ридов	% от общего числа картированных ридов
Гены <i>Tra</i> кластера		
L, J, V, L, M, N, O, P, Q, R, S, T, U, W	30 172	60,0
Гены, регулирующие биосинтез пилей IV типа		
<i>pilN</i>	3628	7,2
<i>pilV</i>	3505	7,0
<i>pilR</i>	2948	5,9
<i>pilO</i>	2427	4,8
<i>pilU</i>	1481	2,9
<i>pilS</i>	1468	2,9
<i>pilL</i>	1345	2,7
<i>pilT</i>	1235	2,5
<i>pilP</i>	998	2,0
<i>pilM</i>	862	1,7

чия данного штамма от ранее описанных. При анализе данных полногеномного секвенирования выявлены структурные особенности генома — наличие фрагментов плазмиды вирулентности pO26-Vir E. coli (H30), обусловивших отличительные особенности штамма.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Определение чувствительности к антибактериальным препаратам. Методические указания МУК 2.4.1890-04. М., 2010.
2. Методические указания по микробиологической диагностике заболеваний, вызванных энтеробактериями. МУ 04-723/3. М., 1984.
3. Cao Y. et al. Multi-locus sequence typing (MLST) and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction (REP-PCR), characterization of Shigella spp. over two decades in Tianjin China. Int. J. Mol. Epidemiol. Genetics. 2012, 3 (4): 321-332.
4. Hiruta N., Murase T., Okamura N. An outbreak of diarrhea due to multiple antimicrobial-resistant Shiga toxin-producing Escherichia coli O26:H11 in a nursery. Epidemiol. Infect. 2000, 127 (127): 221-227.
5. Klausen M. et al. Biofilm formation by Pseudomonas aeruginosa wild-type, flagella, and type IV pili mutants. Mol. Microbiol. 2003, 48 (6): 1511-1524.
6. Konowalchuk J., Speirs J.I., Stavric S. Vero response to a cytotoxin of Escherichia coli. Infect. Immun. 1997, 18 (3): 775-779.
7. Misselwitz J. et al. Cluster of hemolytic-uremic syndrome caused by Shiga toxin-producing Escherichia coli O26:H11. Pediatr. Infect. Dis. 2003, 22 (4): 349-354.
8. Srimanote P., Paton A.W., Paton J.C. Characterization of a novel type I pilus locus encoded on the large plasmid of locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic Escherichia coli strains that are virulent for humans. Infect. Immun. 2002, 70 (60): 3094-3100.
9. Pina M. et al. The complete DNA sequence and analysis of the virulence plasmid and of five additional plasmids by Shiga toxin-producing Escherichia coli O26:H11 strain H30. Intern. J. Med. Microbiol. 2011, 301: 192-203.
10. Werber D. et al. A multistate outbreak of Shiga toxin-producing Escherichia coli O26:H11 infections in Germany, detected by molecular subtyping surveillance. J. Infect. Dis. 2002, 186 (3): 419-422.

Поступила 05.09.17

Контактная информация: Васильева О.В.,  
355035, Ставрополь, ул. Советская, 13-15, р.т. (8652)26-03-12

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

Л.В.Пузырева<sup>1</sup>, Л.А.Родькина<sup>2</sup>, А.В.Мордык<sup>1</sup>, В.Д.Конченко<sup>2</sup>, Л.М.Далабаева<sup>2</sup>

### АНАЛИЗ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ С ИССЛЕДОВАНИЕМ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА МАТЕРИАЛА У ВИЧ-ИНФИЦИРОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

<sup>1</sup>Омский государственный медицинский университет, <sup>2</sup>Инфекционная клиническая больница № 1, Омск

*Цель.* Изучение частоты, характеристики инфекций нижних дыхательных путей и результатов микробиологических исследований биоматериала у ВИЧ-инфицированных пациентов. *Материалы и методы.* Использовались материалы Инфекционной клинической больницы № 1 г. Омск за 5 лет (2012 — 2016). *Результаты.* Из пролеченных 1926 ВИЧ-инфицированных инфекций нижних дыхательных путей встретились у 538 пациентов. На долю бактериальных пневмоний приходилось 45,2%, летальность при которых составила 18,1%. Был проведен анализ результатов микробиологических исследований биоматериалов у ВИЧ-инфицированных пациентов. Из мокроты наиболее часто выделялись Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Enterococcus faecalis и другие микроорганизмы. Частой находкой в биоматериале были Streptococcus viridans и грибы рода Candida.