

ГЕНО-ФЕНОТИПИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ ВИРУЛЕНТНОСТИ И АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ МИКРОБИОТЫ ВЫСОКИХ ШИРОТ

А.Л. Панин¹, Л.А. Краева^{1,2}, В.Б. Сбойчаков², Н.Е. Гончаров¹, А.Б. Белов²

¹ФГУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»

²ФГБВОУ ВПО «Военно-медицинская академия имени С.М. Кирова»

В наши дни микробная экология переживает революцию, которая, несомненно, отразится на науке об экосистемах. Быстрое накопление молекулярных данных раскрывает огромное микробное разнообразие, большое количество некультивируемых микробных групп и новые микробные функции. Огромное количество данных требует применения теории для обеспечения организации, структуры, механистического понимания и, в итоге, предсказательной силы, имеющей практическую ценность [3].

Цель данной работы: провести анализ и систематизировать научные данные в отношении маркеров вирулентности и антибиотикорезистентности микробиоты высоких широт.

Бактерии-криофилы довольно часто проявляют феномен паразитизма, что выражается в упрощенном образе жизни: наличии белков адгезии, существенном сокращении или отсутствии наборов генов для биосинтеза аминокислот, кофакторов, нуклеотидов, липидов и витаминов. В этом и заключается отличие от других бактериальных геномов. Столь малый геном в сочетании с отсутствием биосинтетических возможностей и механизмов репарации ДНК, но наличием белков адгезии у обитателей многолетнемёрзлых грунтов из таксона *Parcubacteria* [1,16] может указывать на эктосимбиотический или паразитический образ жизни путём прикрепления к поверхности иных микробных клеток, которые имеют механизмы доступа к питательным и энергетическим источникам [16]. Вероятно, по такому механизму выживают и могут существовать в суровых полярных регионах возбудители сапрозоонозов в цианобактериальных плёнках и их матах [7]. Такие симбиотические формы существования могут быть одной из форм жизни в экстремальной криогенной среде [6, 15].

По нашему мнению, наличие факторов патогенности микробиоты окружающей среды в отношении человеческой популяции является одним из важных показателей нарушения экологической устойчивости природной среды в результате вредного воздействия на неё антропогенной нагрузки.

Целесообразно рассмотреть на примере возбудителей сапрозоонозов клеточные и молекулярные механизмы, сохраняющие, поддерживающие и увеличивающие вирулентность патогенов в криогенной среде. Горизонтальный перенос генов (ГПГ) у психрофилов протекает гораздо интенсивнее, чем у мезофилов. Приобретение «островов высокой патогенности» у *Yersinia pseudotuberculosis* наиболее эффективно происходит при низких (от +4° до +12°С) температурах [20]. Такой перенос генов играет значимую роль в микробиоте экосистемы Земли. Важным резервуаром генов является иммобилизованная в вечной мерзлоте ДНК, которую потенциально можно получить через ГПГ – процесс, в котором организм передаёт генетический материал организму-непотомку из микроорганизмов, сохранившихся при таянии льда. Метагеномный анализ ДНК из сообществ микробов в образцах льда возрастом 100000–800000 лет позволил выявить массу разнообразных ортологов (гомологи генов, которые разошлись в результате видообразования) для ныне существующих метаболических генов [10].

Таким образом, в геологическом прошлом процесс таяния полярного льда мог обеспечить возможность для крупномасштабного ГПГ с преобразованием микробной филогении, изменяя направление их развития с ускорением темпа эволюции микроорганизмов.

Следующим фактором вирулентности облигатно- и условно-патогенных бактерий является многообразие систем захвата железа. Многие микроорганизмы при снижении концентрации железа в почве синтезируют сидерофоры (внеклеточные низкомолекулярные агенты). С их помощью данные бактерии создают комплексы с железом и проводят его перенос в клетку [8]. По своей химической природе сидерофоры являются фенолятами, выделяемыми некоторыми энтеробактериями. В частности, таковым является иерсиниабактин – высокоаффинная железо-хелатирующая система иерсиний. Системный комплекс, обеспечивающий биосинтез, транспорт и стабилизацию иерсиниабактина, расположен в большом хромосомном участке (the high pathogenicity island, HPI)

и несёт гены болезнетворности и мобильности [11]. Сидерофоры нужны для выживания бактерий, в том числе для психрофилов, в условиях недостатка железа, как в организме многоклеточного хозяина, так и в окружающей среде. Они действуют как антибиотики и факторы роста. Так штамм *Pseudomonas fluorescens* способен продуцировать сидероформный компонент, ингибирующий рост *Erwinia caratovora* путём хелатирования железа [18].

Гены, обеспечивающие захват железа из гемоглобина и его утилизацию, являются важными факторами патогенности, способствуя генерализации инфекции. У патогенных иерсиний кластер генов, регулирующих производство сидерофора, находится в структуре мобильного генетического сегмента – НРІ. Этот генетический элемент весьма широко представлен не только у иерсиний, но и среди вирулентных штаммов энтеробактерий. НРІ активно участвует в патогенезе инфекций мочевыводящих путей, вызванных *Escherichia coli*; инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи (ИСМП) с участием таких родов, как *Citrobacter*, *Salmonella*, *Serratia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* [2].

Итак, НРІ обнаруженный вначале у типичных психрофилов, характерен и для высоко патогенных видов энтеробактерий, обуславливающих ИСМП. Примером дальнейшего изучения НРІ является открытие YAPI, нового острова патогенности, влияющего на особенности патогенеза псевдотуберкулёза [12]. Показано, что *Y. pseudotuberculosis* производит суперантиген (Y. pseudotuberculosis-derived mitogen, YPM), ответственный за поликлональную активацию Т-лимфоцитов и гиперпродукцию провоспалительных цитокинов. Большая часть штаммов (98 %), выделенных от больных псевдотуберкулёзом на Дальнем Востоке России, в Японии и Южной Корее, содержат этот суперантиген, вызывающий системное поражение тканей и органов.

Важной информацией является дифференциация биотипа *Yersinia enterocolitica* 1A от патогенных биотипов *Y. enterocolitica* путем выявления активности β-глюкозидазы. Во-первых, эти иерсинии весьма часто выделяются из объектов окружающей среды; во-вторых, давно и безрезультатно решается вопрос об их патогенности для людей и животных.

Диагностическая ценность молекулярно-генетических исследований при иерсиниозах впервые доказана ещё в 1997 году [5]. В частности – скрининговая ПЦР-диагностика полевого материала на иерсиниозы, молекулярно-генетический мониторинг на основе О-генотипирования и молекулярно-генетическая структура *Y. pseudotuberculosis* в Иркутской области [4], определение генов вирулентности у *Y. enterocolitica* и *Y. pseudotuberculosis* с исследованием распределения генов вирулентности. Все это показывает значение молекулярной диагностики в изучении возбудителей иерсиниозов. Постоянно проводятся работы, повышающие эффективность метода – оценка различных методов обогащения для обнаружения патогенных иерсиний с помощью ПЦР в реальном времени. Молекулярно-генетические методы используются для исследования материалов из полярных зон, для множественного обнаружения генов устойчивости к антибиотикам в образцах ледникового льда [26].

Рядом исследователей дана характеристика атипичных изолятов *Y. intermedia* и определение двух новых биотипов *Y. aleksiciae* sp. nov. и *Y. similis* sp. nov. [25], выделение и характеристика *Y. ruckeri* при гибели карпов в прудах на юге России, при раневой инфекции человека [14], диагностика и антибиотикорезистентность штаммов *Y. ruckeri*, выделенных из форелевых рыбоводных хозяйств Болгарии [22]; инфекция *Y. ruckeri* у лососевых рыб, характеристика и определение нового вида *Y. wautersii*, описание *Y. entomophaga* sp. nov., выделенного из новозеландской личинки *Costelytra zealandica*, *Y. nurmi* sp. nov., *Y. pekkanenii* sp. nov., *Y. massiliensis* sp. nov. [21].

Идентификация патогенных штаммов внутри серогрупп *Y. pseudotuberculosis* и наличие непатогенных штаммов, выделенных от животных и окружающей среды, сравнение систем идентификации и дифференциации видов в роде *Yersinia*, в частности *Y. wautersii* следует по-прежнему классифицировать как «корейскую группу» комплекса *Y. pseudotuberculosis*, а не как отдельный вид.

Определённые надежды вызвало описание нового гена подтипа термостабильного энтеротоксина (ystB) *Y. enterocolitica*: нуклеотидная последовательность и распределение генов yst. Однако эти гены оказались неактивными при +37°C и не имеют клинического значения.

Иерсинии представляют идеальную модель для общебиологических исследований и обобщений: внешние белки иерсиний и их роль в модуляции сигнальных ответов и в патогенезе клетки-хозяина; гены, связанные с вирулентностью, адгезия и инвазия некоторых штаммов *Y. enterocolitica-like*, предполагают её патогенный потенциал.

Несомненно, что использование базы данных профилей масс-спектров бактерий рода *Yersinia*, при MALDI ToF масс-спектрометрии ускоряет и объективизирует исследования.

Антарктиду часто воспринимают как последний нетронутый континент на Земле [17]. Эта территория с зонами человеческой колонизации, сосредоточенными вокруг научно-исследовательских станций, и большими популяциями мигрирующих птиц и животных также обладает большим потенциалом в отношении картирования и понимания распространения зоонозных взаимодействий на ранних стадиях. Однако на сегодняшний день исследования резистентности «местных» бактерий к антибиотикам в Антарктиде ограничены. Имеются лишь косвенные доказательства более высоких концентраций резистентных штаммов вокруг исследовательских станций. Объективная оценка уровня антибиотикорезистентности в Антарктике на сегодняшний день практически невозможна из-за большого разнообразия используемых стандартов и методологий отчетности и слабого географического охвата. Представители рода *Serratia* также выделяются в полярных регионах, некоторые из них вызывают инфекционные осложнения, связанные с оказанием медицинской помощи, проявляя экстремальную резистентность к антибиотикам [9, 13, 19].

В последние годы описаны множественные случаи загрязнения пластиковыми отходами практически всех океанов. Уровень частиц микропластика, накапливающихся в Антарктике, намного выше, чем ожидалось. Скорее всего, пластик проникает в Антарктиду через Антарктическое циркумполярное течение, исторически считавшееся почти непроходимым. Показано, что микропластик также может служить переносчиком распространения множественной устойчивости к антибиотикам в морской среде Антарктики [19]. Частицы микропластика способны адсорбировать большое количество генетического материала. Многие гены устойчивости к антибиотикам, обнаруженные в бактериях высоких широт, могли быть привнесены из природных микробиоценозов и претерпели дальнейшую эволюцию.

Пристальное внимание приобретают исследования бактерий с множественной лекарственной устойчивостью, выделенных от пернатых [9]. Так, ряд штаммов *E. coli*, изолированных в естественных и орнитогенных биоценозах Арктического региона, обладал резистентностью к ряду антибиотиков, не находясь в зоне антропогенного влияния [13]. Таким образом антибиотикорезистентность может рассматриваться как проблема глобального распространения на примере некоторых антарктических орнитофильных энтеробактерий.

При исследовании криозон получены фармакологические препараты. В частности, из бактерий вечной мерзлоты получен препарат Tn5045, новый интегрон-содержащий антибиотик и транспозон устойчивости к хроматам [23]. Исследование генетических структур и биологических свойств древнейшей плазмиды мультирезистентности pKLN80, выделенной из бактерии вечной мерзлоты, позволяет восстановить истоки феномена устойчивости к антибиотикам.

Весьма актуальным является изучение эволюции и экологии генов резистентности к антибиотикам [8], в частности – развитие устойчивости к антибиотикам грамотрицательных бактерий (*Enterobacteriaceae*), перенос бактерий с множественной лекарственной устойчивостью между смешанными экологическими нишами. Последнее можно рассматривать как интерфейс между людьми, животными и окружающей средой. Определенный интерес представляют доказательства циркуляции резистентных к противомикробным препаратам штаммов между людьми и животными. Нуждается в изучении функциональная характеристика бактерий, выделенных из древней арктической почвы, распределение генов устойчивости к антибиотикам в ледниковой среде [24].

Итак, работая с полярной микробиотой, особенно с древней арктической почвой и материалами из Арктики и Антарктики, становится понятной история развития устойчивости к современным антибиотикам. Несмотря на достигнутые успехи в этиологической расшифровке заболеваемости иерсиниозами и другими сапрозоонозами, остаются нерешенными вопросы малой доли высеваемости патогенных возбудителей из объектов окружающей среды, что связано с методологическими проблемами, в том числе при проведении микробиологического сопровождения санитарно-гигиенических и противозидемических (профилактических) мероприятий и осуществления стратегии мониторинга при проведении данных работ.

Таким образом, необходимо учитывать наличие факторов патогенности микробиоты криогенной окружающей среды в отношении человеческой популяции конкретных регионов, как один из показателей характеристики нарушения экологической устойчивости природной среды в результате вредного воздействия на неё антропогенной нагрузки, интенсивно возрастающей в современных условиях глобализации.

Литература

1. Бурганская, Е.И. Аноксигенные нитчатые фототрофные бактерии в микробных сообществах минерализованных водных экосистем / Е.И. Бурганская: Дисс... канд. биол. наук. – М., 2020. – 169 с.
2. Гончаров, А.Е. Идентификация фрагмента острова высокой патогенности иерсиний у госпитальных штаммов энтеробактерий / А.Е. Гончаров, В.Ю. Хорошилова, Л.П. Зуева // Профилактическая и клиническая медицина. – 2013. – № 1, т. 13. – С. 66–68.
3. Гуреева, М.В. Экология микроорганизмов / М.В. Гуреева, М.Ю. Грабович. – Воронеж, 2021: изд. дом ВЛГУ. – 107 с.
4. Климов, В.Т. Молекулярно – генетический мониторинг на основе ПЦР O – генотипирования / В.Т. Климов, М.В. Чеснокова // Молекулярная генетика. – 2007. – № 4. – С. 14–17.
5. Королюк, А.М. Диагностическая ценность ПЦР при иерсиниозах / А.М. Королюк, Н.В. Михайлов, И.В. Мирошниченко // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов, паразитологов. – М., 1997. – С. 180–181.
6. Крыленков, В.А. Микробиота земной криосферы / В.А. Крыленков, А.Е. Гончаров // СПб.: Фолиант, 2019. – 448 с.
7. Сбойчаков, В.Б. Цианобактерии как биологические индикаторы глобального потепления / В.Б. Сбойчаков, А.Л. Панин // Актуальная биотехнология. – 2020. – № 3 (34). – С. 465–469.
8. Ahmed, E. Siderophores in environmental research: roles and applications / E. Ahmed, S.J.M. Holmstrom // Microbial biotechnology. – 2014. – Vol.7, № 3. – P. 196–208.
9. Aminov, R.I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes / R.I. Aminov, R.I. Mackie // FEMS microbiology letters. – 2007. – Vol. 271, № 2. – P. 147–161.
10. Bidle, K.D. Fossil genes and microbes in the oldest ice on Earth / K.D. Bidle, S. Lee, D.R. Marchant, P.G. Falkowski // Proceedings of the National Academy of Science. – 2007. – Vol. 104, № 33. – P.13455–13460.
11. Carniel, E. The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptakeisland / E. Carniel // Microbes Infect. – 2001. – Vol. 3, № 7. – P. 561–569.
12. Collyn, F. YAPI, a new Yersinia pseudotuberculosis pathogenicity island / F. Collyn, A. Billault, C. Mullet // Infect. Immunol. – 2004. – Vol. 72. – P. 4784–4790.
13. Dandachi, I. Prevalence and Characterization of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacilli Isolated From Lebanese Poultry: A Nationwide Study / I. Dandachi, E.S. Sokhn, E.A. Dahdouh et al. // Frontiers in Microbiology. – 2018. – № 3(23). – P.550. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00550>
14. De Keukeleire, S. Yersinia ruckeri, an unusual microorganism isolated from a human wound infection / S. De Keukeleire // New Microbes New Infect. – 2014. – Vol.2, № 4. – P. 134–135. doi: 10.1002/nmi2.56.
15. Frank-Fahle, B.A. Microbial functional potential and community composition in permafrost-affected soils of the NW Canadian Arctic / B.A. Frank-Fahle, E. Yergeau, C.W. Greer // PLoS One. – 2014. – Vol.9, № 1. – e84761. Doi: [org/10.1371/journal.pone.0084761](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084761).
16. Frey, B. Microbial diversity in European alpine permafrost and active layers / B. Frey, T. Rime, M. Phillips // FEMS microbiology ecology. – 2016. – Vol. 92, – № 3. P. 1–35.
17. Hwengwere, K. Antimicrobial resistance in Antarctica: is it still a pristine environment? / K. Hwengwere, H. Paramel, K.A. Hughes et al. // Microbiome. – 2022. – Vol. 10(71). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01250-x>.
18. Ishimaru, C.A. High-affinity iron uptake systems present in Erwinia carotovora subsp. carotovora include the hydroxamate siderophore aerobactin / C.A. Ishimaru, J.E. Loper // Journal of bacteriology. – 1992. – T. 174, № 9. – P. 2993–3003.
19. Lagana, P. First insights from bacteria associated to a polystyrene piece from King George Island (Antarctica) / P. Lagana, G. Caruso, I. Corsi et al. // International Journal of Hygiene and Environmental Health. – 2019. – vol.222, № 1. – P. 89–100.
20. Lesic, B. A natural system of chromosome transfers in Yersinia pseudotuberculosis / B. Lesic, M. Zouine, M. Ducos-Galand // PLoS genetics. – 2012. – Vol.8, № 3. Doi: [10/1128/mBio.01875–14](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.101875).
21. Merhej, V. Yersinia massiliensis sp. nov., isolated from fresh water // V. Merhej // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2008. – Vol. 58. – P. 779–784.
22. Orozova, P. Diagnostics and antibiotic resistance of Yersinia ruckeri strains isolated from trout fish farms in Bulgaria / P. Orozova, P.V. Chikova, I. Sirakov // International Journal of Development Research. – 2015. – Vol. 5, № 1. – P. 3013–3019.
23. Petrova, M. Tn5045, a novel integron-containing antibiotic and chromate resistance transposon isolated from a permafrost bacterium / M. Petrova, Z. Gorlenko, S. Mindlin // Research in microbiology. – 2011. – Vol. 163, № 3. – P. 337–345.
24. Segawa, T. Distribution of antibiotic resistance genes in glacier environments / T. Segawa, N. Takeuchi, A. Rivera // Environmental microbiology reports. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. 127–134. Doi: [11.1111/1758-2229.12011](https://doi.org/10.1111/1758-2229.12011).
25. Spraguet, L.D. Yersinia similis sp. nov. / L.D. Spraguet // Int. J. of Syst. and Evol. Microb. – 2008. – Vol. 58. – P. 952–958.
26. Ushida, T. Application of real-time PCR array to the multiple detection of antibiotic resistant genes in glacier ice samples / K. Ushida, T. Segawa, S. Kohshima // The Journal of general and applied microbiology. – 2010. – Vol. 56, № 1. – P. 43–52. Doi: [10.2323/jgam.56.43](https://doi.org/10.2323/jgam.56.43).