

Г.А.Ерошенко, Г.Н.Одинокоев, Л.В.Анисимова, Н.Ю.Шавина,
Н.А.Виноградова, В.В.Кутырев

АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВЫЕ ШТАММЫ ВОЗБУДИТЕЛЯ ЧУМЫ И РАЗРАБОТКА СПОСОБА ИХ ДЕТЕКЦИИ МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

ФГУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов

В работе приведены данные об антибиотикоустойчивых штаммах *Yersinia pestis*, выделенных из клинических источников и от животных, и показаны причины их резистентности к различным лекарственным препаратам. Сообщается о разработке двух ПЦР для выявления генов устойчивости к антибиотикам, эффективность которых подтверждена при использовании коллекции антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis*.

Ключевые слова: возбудитель чумы, антибиотикоустойчивость, гены, детекция, полимеразная цепная реакция.

Штаммы *Yersinia pestis*, циркулирующие в естественных условиях в природных очагах чумы, как правило, чувствительны к действию антибиотиков [7, 14, 16]. Так проведенное Е. Hernandez *et al.* [7] изучение чувствительности 94 штаммов *Y. pestis*, выделенных в разных регионах, к 24 различным антибиотикам, показало, что все изоляты были чувствительны к изученным антибиотикам, включая флуорхинолоны, аминогликозиды и доксициклин. Наиболее активными в отношении *Y. pestis* оказались флуорхинолоновые антибиотики, цефалоспорины третьего поколения и аминогликозиды.

Впервые для лечения чумы в качестве антимикробных агентов были применены сульфонамид (1938 г.) и стрептомицин (1946 г.) [13]. Их использование привело к резкому падению смертности среди заболевших чумой. В настоящее время для лечения этой болезни широко применяются антибиотики стрептомицин, тетрациклин и хлорамфеникол. Основным из них является стрептомицин, однако из-за ограниченного доступа к стрептомицину в некоторых странах вместо него применяют гентамицин или гентамицин в сочетании с тетрациклином. Хлорамфеникол является препаратом выбора для лечения чумы, осложненной менингитом или плевритом, так как в этих случаях другие антибиотики менее эффективны [2, 9, 12]. Альтернативными лекарственными препаратами для чумы являются флуорохинолоны, а для ее профилактики используют сульфонамид, триметоприм-сульфаметоксазол и тетрациклин [5].

В 1995 г. на о. Мадагаскар от больного человека был изолирован штамм *Y. pestis* с множественной лекарственной устойчивостью (MDR – multi-drug resistance) к препаратам, используемым для лечения (стрептомицин, хлорамфеникол, тетрациклин), профилактики (сульфонамид, тетрациклин), а также к препаратам резерва (канамицин, ампициллин, спектиномицин) [5]. Как оказалось, детерминанты устойчивости к антибиотикам были локализованы на конъюгативной плазмиде rIP1202 (150 т.п.н.), принадлежавшей группе несовместимости Inc6-C. Устойчивость к ампициллину была вызвана наличием TEM-1 пенициллиназы (*bla*_{TEM-1}), хлорамфе-

николу – хлорамфеникол ацетилтрансферазы I типа (*catI*), к канамицину – 3'-O-аминогликозид фосфотрансферазы I типа [*aph*(3')-II], к сульфонамиду – лекарственно-устойчивой дегидроптероат синтазы (*sulI*), и к стрептомицину – 3'-9-O-аминогликозид аденилтрансферазы (*ant3'9*) [4, 5]. Устойчивость к тетрациклину была обусловлена эффлюксом [*tet*(D)]. Плазида rIP1202 могла с высокой частотой передаваться между штаммами возбудителя чумы [4–6, 8].

В том же году на о. Мадагаскар был выделен еще один клинический антибиотикоустойчивый штамм *Y. pestis*, содержащий другую конъюгативную плазмиду rIP1203 (40 т.п.н.), с высоким уровнем резистентности к стрептомицину, которая также могла с высокой частотой передаваться штаммам чумного микроба. Плазида rIP1203 содержала два гена *strA* (801 п.н.) и *strB* (804 п.н.), кодирующих аминогликозид 3'-O- и 6-O-фосфотрансферазные активности [5]. В течение последующих трех лет (1996–1998 гг.) на о. Мадагаскар были выделены два клинических изолята, один из них отличался устойчивостью к ампициллину, а другой – к хлорамфениколу [3]. Затем в столице острова (г. Антананариву) были изолированы три штамма *Y. pestis*: один с устойчивостью к тетрациклину (от крысы) и два – к ампициллину (от блох) [3].

В 2004 г. rIP1202 – подобная конъюгативная плазида была обнаружена в Восточном Китае у штамма холерного вибриона *V. cholerae* O139, устойчивого, по крайней мере, к 6 антибиотикам – ампициллину, стрептомицину, гентамицину, хлорамфениколу и триметоприм-сульфаметаксозолу. Идентичность MDR плазмид *Y. pestis* и *V. cholerae* составила 99,99 % [11]. Анализ MDR штаммов *V. cholerae* O139, изолированных в Восточном Китае с 1994 по 2006 год, выявил значительный рост изолятов, содержащих rIP1202-подобную плазмиду, – от 7,69 до 92,16 % [11].

Плазмиды с практически идентичными плазмидами rIP1202 последовательностями были выявлены у штаммов *Salmonella enterica* серотипа Newport у патогенных для рыб штаммов *Yersinia ruckeri*, а также у многочисленных энтеробактериальных патогенов,

изолированных из розничных мясных продуктов в 2002–2005 гг. в США [15]. Все эти данные свидетельствуют о возрастающем распространении rIP1202-подобных MDR плазмид среди зоонозных патогенных бактерий, а также о возникновении в природе резервуара MDR подвижных генетических элементов, которые могут передаваться возбудителям опасных и особо опасных инфекционных болезней.

Появление в природе атипичных антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* представляет серьезную проблему для здравоохранения, поскольку это может привести к повышению процента летальности среди заболевших чумой. К тому же именно MDR штаммы могут быть использованы в качестве биологического агента в актах биотерроризма [10]. Все это требует проведения мониторинга выделяемых штаммов *Y. pestis* по их антибиотикоустойчивости, а также разработки современных и эффективных методов идентификации MDR штаммов.

В настоящее время для выявления штаммов *Y. pestis*, резистентных к лекарственным препаратам, используются микробиологические методы, которые занимают достаточно продолжительное время, что затрудняет своевременный выбор лекарственного препарата для лечения больного человека. Развитие высокоэффективных технологий современной молекулярной микробиологии позволяет осуществлять выявление лекарственной устойчивости у штаммов *Y. pestis* на качественно новом уровне. Большой эффективностью и быстротой получения результатов отличается метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), предназначенный для детекции различных генов. До сих пор этот метод использовали для выявления у возбудителя чумы генов вирулентности или видоспецифических участков ДНК.

Целью нашего исследования была разработка способа выявления у штаммов *Y. pestis* генов, кодирующих устойчивость к некоторым антибиотикам, на основе метода ПЦР.

Материалы и методы

В работе использовано 49 штаммов *Y. pestis* основного и неосновных подвидов различного происхождения. Штаммы культивировали на агаре или в бульоне LB при 37 °С. ДНК штаммов выделяли общепринятым способом [1]. Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: 1 цикл – 94 °С 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С 45 с, 60 °С 1 мин, 72 °С 45 с и завершающий цикл 72 °С 3 мин. Определение наличия продукта ПЦР-амплификации осуществляли методом электрофореза в 1–2 % агарозном геле [1].

Результаты и обсуждение

В связи с широким распространением у патогенных бактерий множественной устойчивости, вызванной плазмидой rIP1202, нами был проведен

компьютерный анализ генов антибиотикорезистентности этой плазмиды, полная нуклеотидная последовательность которой представлена в базе данных NCBI GenBank. Выявлено наличие двух генов *strA* и *strB*, кодирующих устойчивость к стрептомицину (Sm), двух генов *tetA* и *tetC* – к тетрациклину (Tc) и гена *cat* – к хлорамфениколу (Cm), а также других генов. Были определены размеры генов и их локализация на rIP1202: *strA* (размер гена 804 п.н.), положение гена 34715–35518 от начала последовательности плазмиды; *strB* (837 п.н.), положение гена 35519–36354; *tetA* (1185 п.н.), положение гена 1477544–148728; *tetR* (657 п.н.), положение гена 148824–149480; *cat* (660 п.н.), положение гена 40829–41483. Все перечисленные гены из состава плазмиды rIP1202 кодируют резистентность к антибиотикам, широко применяемым для лечения чумы.

На следующем этапе для выявления этих генов у штаммов *Y. pestis* нами были рассчитаны праймеры, последовательности которых представлены в табл. 1. Локализация некоторых праймеров указана на рис. 1 (А, Б, В). Кроме праймеров на гены антибиотикоустойчивости rIP1202, были также рассчитаны праймеры на ген канамицинустойчивости *npt* (796 п.н.), кодируемый транспозоном Tn5, часто встречающимся среди членов семейства Enterobacteriaceae (табл. 1).

Для изучения эффективности разработанных праймеров были использованы природные штаммы *Y. pestis* основного и неосновных подвидов, а также коллекция антибиотикоустойчивых штаммов, хранящихся в Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб» (табл. 2). Среди штаммов, резистентных к антибиотикам, присутствовали: четыре канамицинустойчивых штамма *Y. pestis*: KM219, KM244, KM245 и KM258, полученные путем введения в геном исходных штаммов транспозона Tn5, кодирующего устойчивость к канамицину; два тетрациклинустойчивых штамма – PKR133 (Tc^r) и Java (Tc^r); два устойчивых к хлорамфениколу штамма KM131 и KM221,

Таблица 1

Последовательности рассчитанных праймеров на гены антибиотикоустойчивости

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'
strA-S	CATTCTGACTGGTTGCCTG
strA-As	ATTGCGGGACACCACATCA
strB-S	ACCTGTTCTCATTGCGGAC
strB-As	GAAAGGCACCCATAAGCGT
tetA-S	TACAGTGCCGTGCCAATCA
tetA-As	TCTGCCGTTTGTCAATTGCG
tetR-S	ATGAGACAGGGATTGACGG
tetR-As	TGACTGACCGCTGAAATCG
cat-S	ATTCACATTCTGCCCGCC
cat-As	ATCAGCACCTTGTGCGCTT
Tn5(Kan)-S	ATTCGGCTATGACTGGGCA
Tn5(Kan)-As	ATGTTTCGCTTGGTGGTTCG

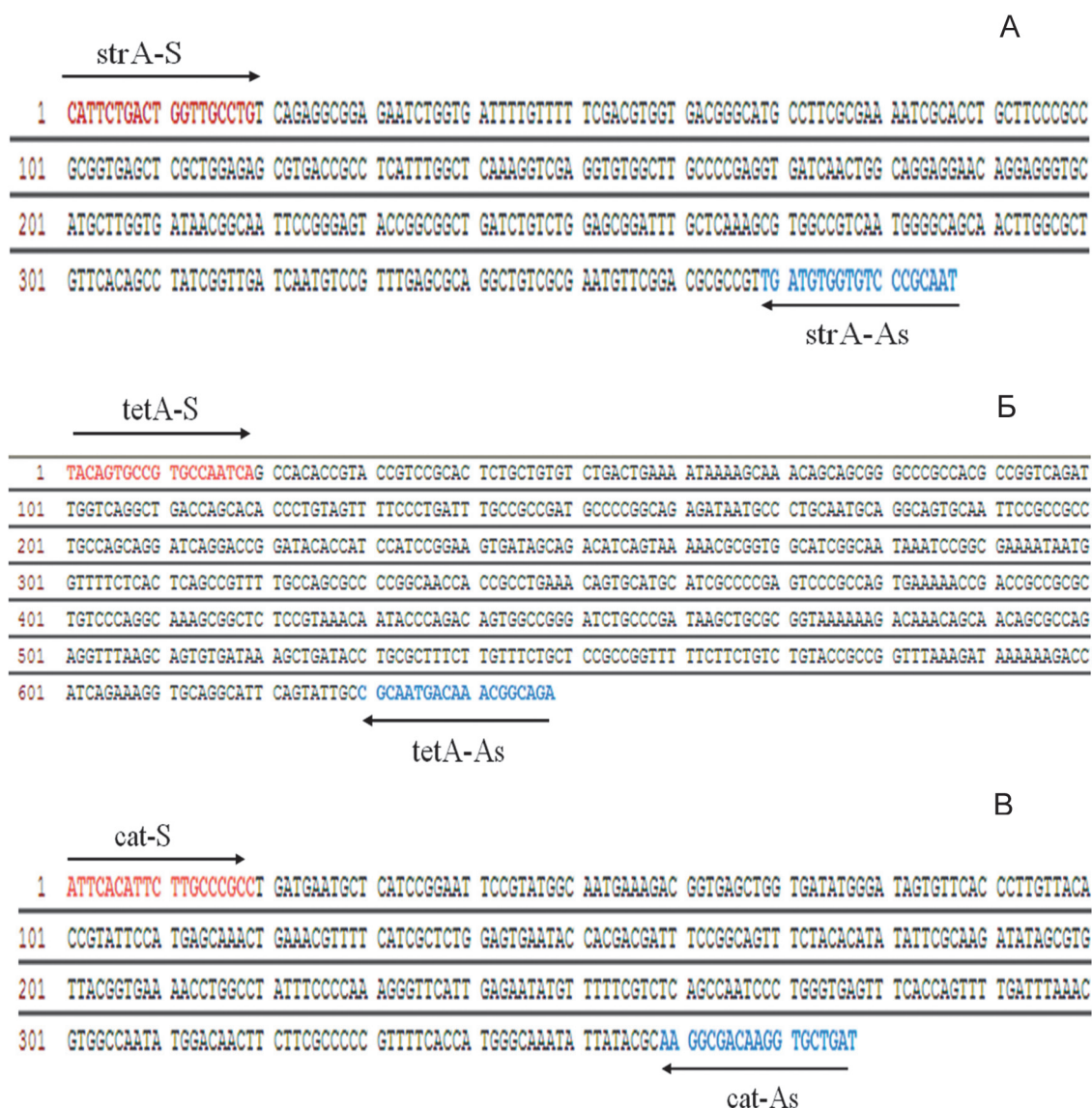


Рис. 1. Нуклеотидные последовательности фрагментов генов *strA* (А), *tetA* (Б) и *cat* (В) плазмиды pIP1202. Указано положение прямого и обратного праймеров

сконструированных за счет введения плазмиды Flac::Tn9, содержащей транспозон Tn9 с генами устойчивости к Cm, а также резистентные к стрептомицину штаммы KM118, KM122, KM677, И-2998 (Sm^r), A-250 (Sm^r), полученные путем направленной селекции на средах со стрептомицином или под действием ультрафиолета.

При изучении коллекции природных и антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis*, использованных в этой работе, с помощью праймеров, сконструированных на ген *cat* плазмиды pIP1202, был получен положительный сигнал амплификации у штаммов *Y. pestis* KM131 и KM221, устойчивых к хлорамфениколу (табл. 2). В ПЦР у этих штаммов выявляли амплификаты, которые имели размер 377 п.н., что соответствовало ожидаемому (рис. 2).

Устойчивость к хлорамфениколу у Cm^r штаммов *Y. pestis* KM131 и KM221 обусловлена введенной в

них плазмидой F⁺lac::Tn9. По данным проведенного нами компьютерного анализа, ген устойчивости к хлорамфениколу, расположенный в Tn9, имеет практически идентичную последовательность гену *cat*, локализованному на плазмиде pIP1202. Такую же последовательность, по данным NCBI GenBank, имеет и ген *cat*, расположенный на плазмиде pIP1206 штамма *Escherichia coli* 1540, транспозоне Tn-Cam204 и плазмиде pO111, включенных в геном других штаммов *E. coli*. Это означает, что разработанная нами ПЦР на ген *cat* будет эффективна для выявления генов устойчивости к хлорамфениколу (и Cm^r штаммов *Y. pestis*), расположенных на мобильных генетических элементах разного происхождения.

С праймерами на гены *strA* и *strB*, а также на *tetA* и *tetR* (плазмида pIP1202) ни с одним из исследованных природных и авторских антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* не получено по-

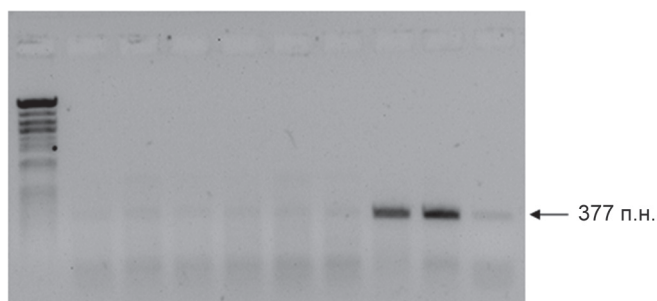
Таблица 2

Выявление антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* с помощью разработанных ПЦР

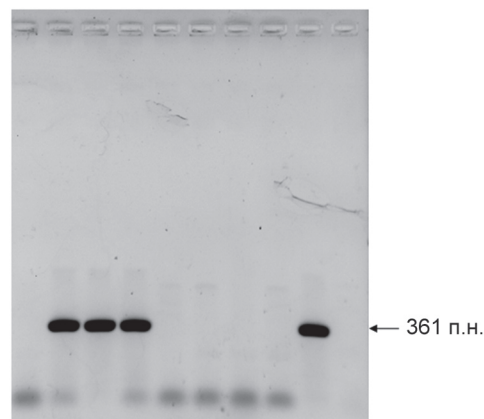
№	Название штамма	Антибио- тикоустой- чивость	Наличие гена <i>cat</i> (Cm ^r)	Наличие гена <i>npt</i> (Km ^r)
<i>Антибиотикоустойчивые штаммы</i>				
1–4	KM219, KM244, KM245, KM 258	Km ^r	–	+
5–9	KM677, KM118, KM122, И2998, А 250	Sm ^r	–	–
10–11	KM131, KM 221	Cm ^r	+	–
12–13	PKR133 (Tc ^r), Java (Tc ^r)	Tc ^r	–	–
<i>Природные штаммы</i>				
14–49	PKR133, 15 Hamburg, Sonche, Exu 21, Exu 33, KM 776, KM 567, A-1792, M-956, A-1793, A-161, M-519, A-1825, A-1836, A-100, 231исх, 353,1203, A-1486, И-1270, 7896, 3544 Арм., 1146, 818, A1633, A1724, A1725, 2183, 2817, KM 683, A1802, A1815, A1817, KM 684, И-3069, И-3071	–	–	–

ложительного результата, что свидетельствовало об отсутствии у них генов, идентичных таковым, расположенным на плазмиде pIP1202, и о наличии у них других механизмов резистентности к Sm и Tc. Несмотря на то, что проведенное нами компьютерное моделирование комплементарности сконструированных праймеров последовательностям генов *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR* свидетельствует об их эффективности для выявления этих генов, тем не менее, для подтверждения возможности их использования на практике необходимы бактериальные штаммы, содержащие мобильные генетические элементы с генами резистентности к Sm и Tc, гомологичными генам pIP1202. Эффективность разработанных праймеров на эти гены предстоит выяснить в дальнейшем.

Нами была также разработана ПЦР для выявления гена *npt* устойчивости к канамицину, локализо-

Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *Y. pestis* с праймерами на ген *cat* устойчивости к хлорамфениколу:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – Маркер молекулярных масс λ /Ava; 2 – KM219; 3 – KM244; 4 – KM245; 5 – KM258; 6 – PKR133 (Tc^r); 7 – Java; 8 – KM131; 9 – KM221; 10 – отрицательный контроль. Стрелкой указан размер амплификата

Рис. 3. ПЦР анализ штаммов *Y. pestis* с праймерами на ген *npt* устойчивости к канамицину:

Штаммы *Y. pestis*: 1 – KM122; 2 – KM245; 3 – KM244; 4 – KM258; 5 – Java (Tc^r); 6 – KM118; 7 – KM677; 8 – KM221; 9 – KM219; 10 – отрицательный контроль. Стрелкой указан размер амплификата

ванного на транспозоне Tn5, который встречается у разных представителей семейства *Enterobacteriaceae*. С помощью разработанной ПЦР были получены положительные сигналы у штаммов KM219, KM244, KM245, KM258, устойчивых к канамицину (табл. 2, рис. 3). В ПЦР выявлялись амплификаты ожидаемого размера – 361 п.н.

Ген *npt* устойчивости к канамицину, расположенный на транспозоне Tn5, часто встречается у бактерий и носит разные названия – *nptII*, *aph* и *npt*, но, по данным NCBI GenBank, имеет идентичную последовательность и одинаковые размеры независимо от его источника, из чего следует, что разработанная нами ПЦР позволит провести идентификацию гена *npt* устойчивости к канамицину, имеющего разное происхождение.

Таким образом, разработаны ПЦР, выявляющие гены устойчивости к хлорамфениколу (*cat*) и канамицину (*npt*), у штаммов возбудителя чумы. Созданные ПЦР могут найти свое применение при проведении мониторинга антибиотикоустойчивых штаммов возбудителя чумы. В дальнейшем предстоит расширить круг выявляемых генов антибиотикоустойчивости, что необходимо для быстрой идентификации резистентных штаммов *Y. pestis*.

Работа выполнена по государственному контракту № 56-Д от 29.06.2010 г. в рамках реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2013 годы)».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984. 479 с.
2. Becker T.M., Poland J.D., Quan T.J. et al. Plague meningitis a retrospective analysis of cases reported in the United States, 1970–1979. West. J. Med. 1987; 147:554–7.
3. Chanteau S., Retsitorahina M., Rahalison et al. Current epidemiology of human plague in Madagascar. Microbes Infect. 2000; 2:25–31.
4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G. et al. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferrable plasmid. N.

Engl. J. Med. 1997; 337:677–80.

5. Galimamnd M., Carniel E., Courvalin P. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 2006; 50(10):3233–6.

6. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C. et al. Transferable plasmid-mediated streptomycin resistance in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. Emerg. Infect. Dis. 2001; 7(1):43–8.

7. Hernandez E., Giradet M., Ramissie F. et al. Antibiotic susceptibilities of *Yersinia pestis* to 24 antimicrobial agents. J. Antimicrob. Chemother. 2003; 52:1029–31.

8. Hinnebusch B.J., Rosso M.-L., Schwan J.L., Carniel E. High-frequency conjugative transfer of antibiotic resistance genes to *Yersinia pestis* in the flea midgut. Mol. Microbiol. 2002; 2:349–54.

9. McCrumb F.R., Mercurier S., Robic J. et al. Chloramphenicol and terramycin in the treatment of pneumonic plague. Am. J. Med. 1953; 14:284–93.

10. Navais E. Problems associated with potential massive use of antimicrobial agents as prophylaxis or therapy of a bioterrorist attack. Clin. Microbiol. Infect. 2002; 8:534–9.

11. Pan J.-C., Ye R., Wang H.-Q. et al. *Vibrio cholerae* O139 multi-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. Antimicrob. Agents. Chemother. 2008; 52(11):3829–36.

12. Plague Manual: Epidemiology, Distribution, Surveillance and control. WHO/CSR/EDC/99.2 [cited 2010 Oct 14]. Available from: http://www.who.int/csr/resources/publications/plague/WHO_CDS_CSR_EDC_99_2_EN

13. Pollitzer R. Plague (WHO monograph series no. 22). Geneva: World Health Organization; 1954. 698 p.

14. Smith M.D., Vinh D.X., Hoa N.T.T. et al. In vitro antimicrobial susceptibilities of strains of *Yersinia pestis*. Antimicrob. Agent. Chemother. 1995; 39:2553–4.

15. Weich T.J., Fricke W.F., McDermott P.F. et al. Multiple Antimicrobial Resistance in plague: an emerging public health risk. PLoS ONE. 2007; 3:e309.

16. Wong J.D., Barash J.D., Sandfort R.F. et al. Susceptibilities of *Yersinia pestis* strains to 12 antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 2000; 44(7):1995–6.

G.A.Eroshenko, G.N.Odinokov, L.V.Anisimova, N.Yu.Shavina, N.A.Vinogradova, V.V.Kutyrev

Antibiotic-Resistant Strains of Plague Agent and Development of Procedure for Their Detection by PCR Method

Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov

The data of antibiotic-resistant strains of *Yersinia pestis* isolated from clinical sources and animals are shown in the present study. Highlighted are the reasons of their resistance to different drugs. Represented are two PCRs developed for detection of antibiotic resistance genes, their efficiency has been confirmed using collection of antibiotic-resistant strains of *Y. pestis*.

Key words: plague agent, antibiotic resistance, genes, detection, polymerase chain reaction.

References (Presented are the Russian sources in the order of citation in the original article)

1. Maniatis N., Fritsch E., Sambrook D. [Genetic Engineering Techniques. Molecular Cloning]. Moscow: Mir; 1984. 479 p.

Authors:

Eroshenko G.A., Odinokov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. Universitetskaya St., 46, Saratov, 410005, Russia. E-mail: microbe@san.ru

Об авторах:

Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: microbe@san.ru

Поступила 07.12.10.