

Н.Н.Тетерятникова, И.Б.Захарова, М.В.Подшивалова, А.В.Романова, Я.А.Лопастейская,
Д.В.Викторов, В.В.Алексеев

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ ИНТЕГРОНОВ КЛАССА 1 У *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

ФГУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт»

Для детекции интегროнов класса 1 у *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* использована ПЦР с праймерами, специфичными фланкирующим последовательностям области вставки генных кассет и 3'-консервативному сегменту интегროнов. Последовательности 3'-сегмента *In1* обнаружены у половины исследованных штаммов *B. pseudomallei*. Размер области кассетной вставки интегროнов у *B. pseudomallei* составил 2300 п.н. (1 штамм), 500 и 900 п.н. (1 штамм) и 120 п.н. (2 штамма). Секвенирование ампликонов 3'-сегмента показало наличие генов *qacEdelta1* и *sul1* – детерминант устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям и сульфонидам соответственно.

Ключевые слова: *Burkholderia pseudomallei*, интегроны, антибиотикорезистентность.

N.N.Teteryatnikova, I.B.Zakharova, M.V.Podshivalova, A.V.Romanova, Ya.A.Lopasteiskaya, D.V.Viktorov,
V.V.Alekseev

Molecular Detection of Class 1 Integrons in *Burkholderia pseudomallei*

Volgograd Anti-Plague Research Institute

PCR with primers specific to flanking sequences of gene cassette insertion region and 3'-conservative segment of integrons was used for class 1 integron detection in *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei* and *B. thailandensis*. The sequences of *In1* 3'-conservative segment were detected in the majority of investigated strains of *B. pseudomallei*. The length of integron cassette insertion region in *B. pseudomallei* was estimated as 2300 bp (1 strain), 500 and 900 bp (1 strain) and 120 bp (2 strains). The sequence analysis of 3'-segment amplicons showed the presence of *qacEdelta1* and *sul1* – the determinants of resistance to quaternary ammonium compounds and sulfonamides, respectively.

Key words: *Burkholderia pseudomallei*, integrons, antimicrobial resistance.

Аккумуляция единичных генов антибиотикорезистентности в интегронах – генетических элементах, способных включать в свой состав экзогенные кодирующие последовательности по механизму сайт-специфической рекомбинации и обеспечивать их экспрессию, является важнейшим молекулярно-генетическим механизмом формирования множественной устойчивости к антибиотикам у ряда бактериальных патогенов [2, 5, 6].

Общими элементами структуры интегროнов, охарактеризованных к сегодняшнему дню, являются наличие гена *intI*, кодирующего интегразу семейства тирозиновых рекомбиназ, сайта рекомбинации *attI* и промоторной последовательности *Pc*, обеспечивающей транскрипцию генных кассет в составе интегрона [5, 6]. Последовательности генных кассет содержат *attC* сайт (59-be, 59 base element) – несовершенный инвертированный повтор протяженностью 57–141 п.н. с консервативными краевыми участками, служащий сайтом узнавания интеграз [5, 6]. Существующая классификация интегროнов основана на различиях в последовательностях генов *intI*; в соответствии с ней выделяют 7 классов данных генетических элементов. По характеру геномной локализации интегроны разделяют на «мобильные», входящие в состав IS-элементов, транспозонов, конъюгативных плазмид, и так называемые суперинтегроны – протяженные участки хромосом, содержащие генные

кассеты различных функциональных групп [5]. В процессы аккумуляции и горизонтального переноса генов устойчивости к антибиотикам у бактерий вовлечены преимущественно «мобильные» интегроны 1–5-го классов [5, 6].

Важным биологическим свойством патогенных буркгольдерий (возбудители мелиоидоза и сапа – *Burkholderia pseudomallei*, *B. mallei*) является высокая природная резистентность к широкому спектру антимикробных соединений [3, 7]. Наличие этого свойства создает значительные трудности для успешного лечения вызываемых ими заболеваний. Необходимо отметить, что биологические основы полирезистентности патогенных *Burkholderia* на сегодняшний день являются малоизученными.

Исследования систем генетического обмена патогенных *Burkholderia* [1] доказывают принципиальную возможность горизонтального переноса и наследования этими микроорганизмами R-детерминант в составе мобильных генетических элементов. Очевидно, что детекция и структурно-функциональный анализ данных последовательностей является актуальным направлением исследований как в плане более полного понимания биологических основ устойчивости возбудителей мелиоидоза и сапа к антимикробным соединениям, так и в аспектах совершенствования схем лечения инфекций и создания систем геномного сканирования штаммов патогенных буркгольдерий с

Праймеры, использованные в работе

Праймер*	Последовательность 5'-3'	Мишень**
in-F	GGCATCCAAGCAGCAAGC	5'-консервативный сегмент интегронов In1 (accession no. U12338, 1416-1433)
in-B	AAGCAGACTTGACCTGAT	3'-консервативный сегмент интегронов In1 (accession no. U12338, 4831-4814)
qacEd1	ATCGCAATAGTTGGCGAAGT	Ген устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям qacEdelta1 3'-консервативного сегмента интегронов In1 (accession no. X15370, 211-230)
sul	GCAAGGCGGAAACCCGCC	Ген устойчивости к сульфонидам sul 3'-консервативного сегмента интегронов In1 (accession no. X12869, 1360-1341)

* Праймеры синтезированы на базе НПК «Синтол» (Россия) по последовательностям, приведенным в работе L.Bass *et al.* [2].

** Указаны позиции праймеров на последовательностях интегронов In1, представленных в Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

целью решения практических задач генодиагностики, молекулярно-эпидемиологического мониторинга и прогнозирования возможных эпидситуаций, вызванных антибиотикорезистентными штаммами. Цель данной работы, таким образом, заключалась в выявлении последовательностей интегронов класса I в геномах штаммов исследуемых видов *Burkholderia* с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) и их первичной структурной характеристике.

Материалы и методы

В работе использованы 11 штаммов *B. pseudomallei*, 3 штамма *B. mallei*, 3 штамма *B. thailandensis* из коллекции ФГУЗ ВолгоградНИПЧИ. Культуры микроорганизмов выращивали на Nutrient agar (Difco) в течение 24–48 ч при 37 °С. 200 мкл бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl (pH 7,2) плотностью $2 \cdot 10^9$ м.к./мл, инактивированной в соответствии с МУ 1.3.1794-03, смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мг/мл желатина, 0,9 % Nonidet P-40, 0,9 % Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 65 °С 120 мин и прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента. Далее пробы центрифугировали (10000 об./мин, 1 мин), 10 мкл супернатанта использовали при постановке ПЦР. Праймеры для ПЦР-детекции последовательностей *In1* приведены в таблице.

ПЦР проводили на ДНК-амплификаторе «Терцик» (ДНК-Технологии, Россия) с использованием стандартных реагентов фирмы «ИнтерЛабСервис» (Россия). Область кассетной вставки *In1* амплифицировали с использованием праймеров inF–inB по программе: прогрев 95 °С 1 мин, 35 циклов (94 °С 30 с, 55 °С 30 с, 72 °С 45 с), финальная элонгация 72 °С 5 мин. Амплификацию участка 3'-консервативного сегмента *In1* (праймеры qacEd1-sul) проводили по аналогичной программе, температура отжига праймеров составляла 58 °С. Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозном геле.

Продукты амплификации секвенировали на секвенаторе ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США), используя наборы BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение

Первичный ПЦР-скрининг интегронов I класса с использованием пары праймеров qacEd1-sul показал присутствие последовательностей 3'-консервативного сегмента *In1* в геномах большинства исследуемых штаммов *B. pseudomallei* (рис. 1). Размер ампликонов qacEd1-sul составил порядка 800 п.н., что, в целом, соответствовало ранее полученным данным о структуре 3'-сегментов данных генетических элементов [2, 5, 6].

Последующий анализ области кассетной вставки интегронов в ПЦР с праймерами inF-inB продемонстрировал наличие ампликонов различного размера в геномах 4 штаммов возбудителя мелиоидоза (рис. 2). В штамме *B. pseudomallei* 56830 размер области кассетной вставки интегрона составил 2300 п.н., тогда как в штамме *B. pseudomallei* C141 области кассетной вставки *In1* соответствовало 2 ампликона размером 500 и 900 п.н. Еще в двух исследованных штаммах *B. pseudomallei* размер амплифицируемого региона составил 120 п.н., что, вероятно, следует объяснять отсутствием внедренных генных кассет в структуре интегронов у данных изолятов.

Секвенирование ампликонов qacEd1-sul и последующий анализ сиквентов на предмет наличия кодирующих участков (ORF, open reading frame) продемонстрировали 2 наиболее вероятных варианта ORF, ориентированных в направлении 5' - 3' - ис-

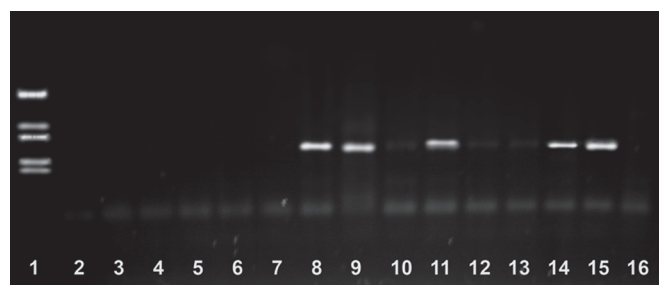


Рис. 1. Амплификация последовательности 3'-консервативного сегмента интегронов *In1* в штаммах буркхольдерий с праймерами qacEd1-sul:

1 – ДНК-маркер, 2000, 1000, 900, 700, 450 п.н.; 2 – *B. thailandensis* E251; 3 – *B. thailandensis* E264; 4 – *B. thailandensis* E299; 5 – *B. mallei* 10230; 6 – *B. mallei* B-120; 7 – *B. mallei* П-5; 8 – *B. pseudomallei* 56770; 9 – *B. pseudomallei* 57576; 10 – *B. pseudomallei* 56830; 11 – *B. pseudomallei* 111; 12 – *B. pseudomallei* 114; 13 – *B. pseudomallei* 135; 14 – *B. pseudomallei* 140; 15 – *B. pseudomallei* 107; 16 – *B. pseudomallei* 100

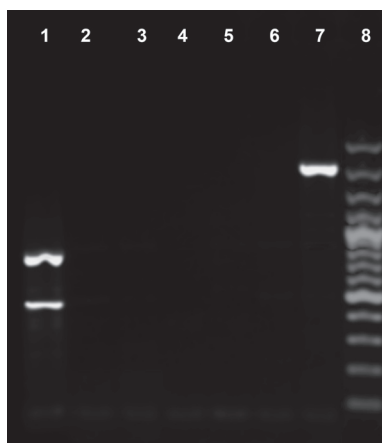


Рис. 2. Амплификация области кассетной вставки интегронов *In1* в штаммах *B. pseudomallei* с праймерами inF-inB:

1 – *B. pseudomallei* C141; 2 – *B. pseudomallei* 111; 3 – *B. pseudomallei* 114; 4 – *B. pseudomallei* 135; 5 – *B. pseudomallei* 139; 6 – *B. pseudomallei* 140; 7 – *B. pseudomallei* 56830; 8 – GeneRuler Plus леддер (Fermentas), 3000, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100 п.н.

следующей последовательности. Дальнейший анализ обозначенных ORF с применением алгоритма BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) показал их высокую гомологию консервативным структурным компонентам 3'-сегмента интегронов класса 1 – генам *qacEdelta1* и *sulI* – детерминантам устойчивости к четвертичным аммонийным соединениям и сульфонамидам соответственно.

Таким образом, проведенное исследование показало, что в геномах штаммов возбудителя мелиоидоза имеются последовательности интегронов класса 1. Установленный в рамках данной работы факт присутствия интегронов *In1* у *B. pseudomallei* свидетельствует о принципиальной осуществимости механизма аккумуляции и наследования генных кассет антибиотикорезистентности в составе данных генетических элементов и формировании, таким образом, штаммов с фенотипом множественной антибиотикоустойчивости. Отрицательный результат ПЦР с праймерами *qacEd1-sul* у ряда штаммов с детектированной областью кассетной вставки интегронов, возможно, опосредован вторичными рекомбинационными событиями на участках 3'-консервативного сегмента, нарушающими сайты связывания с праймерами. В частности, подобные модификации структуры 3'-консервативного сегмента *In1* были описаны у *Proteus mirabilis* [8].

Вопрос о характере геномной локализации выявленных генетических элементов требует дальнейших исследований. Отметим, что на сегодняшний день у микроорганизмов рода *Burkholderia* интегроны класса 1 были выявлены в составе конъюгативных плазмид отдельных эпидемических штаммов *B. cepacia* [4], а в исследованных нами штаммах возбудителя мелиоидоза ранее были отмечены криптические плазмиды различного размера [1]. Структурный анализ и генетическое картирование регионов кассетных вставок интегронов также являются задачами дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Меримова Л.К., Антонов В.А., Замараев В.С., Викторов Д.В. Мобилизация криптических плазмид возбудителя мелиоидоза в гетерологичные виды микроорганизмов. Мол. генет. микробиол. вирусол. 2000; 2:37–40.
2. Bass L., Liebert C.A., Lee M.D., Summers A.O., White D.G. Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 1999; 43:2925–9.
3. Brett P.J., Woods D.E. Pathogenesis of and immunity to melioidosis. Acta Trop. 2000; 74:201–10.
4. Crowley D., Daly M., Lucey B., Shine P., Collins J., Cryan B. et al. Molecular epidemiology of cystic fibrosis-linked *Burkholderia cepacia* complex isolates from three national referral centres in Ireland. J. Appl. Microbiol. 2002; 92:992–1004.
5. Fluit A.C., Schmitz F.J. Resistance integrons and super-integrons. Clin. Microbiol. Infect. 2004; 10:272–8.
6. Mazel D. Integrons: agents of bacterial evolution. Nature 2006; 4:608–20.
7. Vorachit M., Chongtrakool P., Arkomsean S., Boonsong S. Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei*. Acta Trop. 2000; 74:139–44.
8. Zong Z., Partridge S., Iredell J. A *bla*VEB-1 variant, *bla*VEB-6, associated with repeated elements in a complex genetic structure. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53:1693–7.

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

1. Merinova L.K., Antonov V.A., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. [Mobilization of a cryptic plasmid from the melioidosis pathogen in heterologous species of microorganisms]. Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. 2000; 2:37–40.

Authors:

Tetryatnikova N.N., Zakharova I.B., Podshivalova M.V., Romanova A.V., Lopasteiskaya Ya.A., Viktorov D.V., Alekseev V.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. Golubinskaya St., 7, Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., Романова А.В., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 09.11.10.