

К.А.Никифоров, Л.В.Анисимова, Г.Н.Одинокоев, А.В.Фадеева, Л.А.Новичкова, Г.А.Ерошенко,  
В.В.Кутырев

## КОНСТРУИРОВАНИЕ КОМПЛЕКТА ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ГЕНОВ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ У ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ НА ПРИМЕРЕ ШТАММОВ *YERSINIA PESTIS*, *VIBRIO CHOLERAЕ*, *ESCHERICHIA COLI*

ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов,  
Российская Федерация

Для быстрого и эффективного выявления антибиотикоустойчивых штаммов возбудителей опасных бактериальных инфекций с помощью ПЦР сконструирован комплект праймеров для детекции генов устойчивости к стрептомицину (*strA*, *strB*), тетрациклину (*tetA*, *tetR*), хлорамфениколу (*catA*), канамицину (*npt*, *aphA*), ванкомицину (*sanA*), полимиксину (*pmrD*). Эффективность сконструированных праймеров подтверждена на выборке из 40 штаммов *Yersinia pestis*, 49 штаммов *Vibrio cholerae* и двух штаммов *Escherichia coli* из Государственной коллекции патогенных бактерий при РосНИПЧИ «Микроб». У штаммов возбудителя чумы выявлены гены антибиотикоустойчивости – *ntp* и *catA*; у штаммов возбудителя холеры – *strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA* и *tetR*; у патогенного штамма кишечной палочки O157:H7 – *strA*, *tetR*, *ntp* и *aphA*. Установлена универсальность рассчитанных праймеров для детекции генов антибиотикоустойчивости у этих видов патогенных бактерий.

*Ключевые слова:* антибиотикоустойчивость, гены, полимеразная цепная реакция, возбудители опасных инфекций.

К.А.Nikiforov, L.V.Anisimova, G.N.Odinokov, A.V.Fadeeva, L.A.Novichkova, G.A.Eroshenko, V.V.Kutyrev

## Development of a Set of Primers for Drug-Resistance Genes Detection in the Agents of Dangerous Bacterial Infections as Exemplified by *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

A set of primers for detection of genes encoding resistance to streptomycin (*strA*, *strB*), tetracyclin (*tetA*, *tetR*), chloramphenicol (*catA*), kanamycin (*npt*, *aphA*), vancomycin (*sanA*), polymyxin (*pmrD*) has been developed with the aim of rapid and effective detection of drug-resistant strains of dangerous bacterial infections agents. Efficacy of constructed primers has been confirmed against a panel of 40 *Yersinia pestis*, 49 *Vibrio cholerae*, and 2 *Escherichia coli* strains from the State collection of pathogenic bacteria of the RAPI "Microbe". Drug-resistance genes *ntp* and *catA* have been detected in plague agent strains, *strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA* and *tetR* – in cholera agent; *strA*, *tetR*, *ntp* and *aphA* – in pathogenic strain *E. coli* O157:H7. Determined is universal character of the designed primers for drug-resistance genes detection in these pathogenic bacteria species.

*Key words:* drug-resistance, genes, polymerase chain reaction, dangerous infections agents.

Широкое применение антибиотиков для лечения опасных бактериальных инфекций приводит к отбору и распространению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Примером этому явилась произошедшая в 2011 г. в Европе вспышка кишечной инфекции, обусловленная антибиотикоустойчивой энтерогеморрагической кишечной палочкой *Escherichia coli* O104:H4, вызвавшей инфицирование нескольких тысяч человек со значительным количеством летальных исходов. Другим примером опасного штамма бактерий с множественной лекарственной устойчивостью является *E. coli* O157:H7, который был впервые выявлен в 1982 г. Эшерихиоз O157:H7 вызывает вспышечные и спорадические случаи инфекции, преимущественно протекающей в виде геморрагического колита, который может осложняться гемолитическим уремическим синдромом [3, 6]. В настоящее время инфекции, обусловленные *E. coli* O157:H7, регистрируются практически повсеместно, а штаммы этой группы обладают множественной лекарственной устойчивостью к различным лекарственным препаратам.

Неоднократно выявлялись и антибиотикоустойчивые штаммы возбудителей особо опасных инфекций, в том числе *Yersinia pestis* и *Vibrio cholerae*. В 1995 г. на о. Мадагаскар от больного человека был изолирован штамм возбудителя чумы *Y. pestis* 17/95 с множественной лекарственной устойчивостью к хлорамфениколу, канамицину, ампициллину, стрептомицину, спектиномицину, тетрациклину, миноциклину, сульфониламидам и другим антибиотикам. Детерминанты устойчивости к антибиотикам были локализованы на конъюгативной плазмиде pIP1202 (150 т.п.н.), которая могла с высокой частотой передаваться между штаммами возбудителя чумы [4]. В 1995 г. на этой же территории был выделен и другой клинический штамм *Y. pestis* с высоким уровнем резистентности к стрептомицину, который содержал конъюгативную плазмиду pIP1203 (40 т.п.н.) с генами *strA* (801 п.н.) и *strB* (804 п.н.) [5].

В 2004 г. pIP1202-подобная плаزمиды (устойчивость к стрептомицину, гентамицину, тетрациклину, хлорамфениколу, и триметоприму-сульфаметоксазолу) была обнаружена уже у штамма *V. cholerae*

O139 в Восточном Китае. В 2006 г. 92,16 % изолятов *V. cholerae* O139 в Восточном Китае содержали эту плазмиду. В 2002–2005 гг. идентичные плазмиды выявлены в изолятах *Salmonella enterica*, *Yersinia ruckeri* и у штаммов энтеробактерий, выделенных в США [7]. Появление в природе устойчивых к антибиотикам патогенных бактерий и быстрое распространение среди них генов резистентности к лекарственным препаратам требуют разработки простых и эффективных методов их идентификации.

Ранее нами были сконструированы праймеры для детекции генов антибиотикоустойчивости *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR*, *cat*, *npt*, которые были апробированы на коллекции авторских антибиотикорезистентных штаммов *Yersinia pestis* из ГКПБ при РосНИПЧИ «Микроб» [1].

Целью этой работы было конструирование праймеров на другие гены антибиотикоустойчивости и исследование эффективности всего комплекта праймеров для выявления генов резистентности к лекарственным препаратам у штаммов возбудителей опасных инфекций *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*.

### Материалы и методы

В работе использовано 40 штаммов *Y. pestis*, 49 штаммов *V. cholerae* и 2 штамма *E. coli*. Штаммы культивировали на агаре или бульоне LB при 37 °С. ДНК штаммов выделяли стандартным методом [2] и анализировали в ПЦР с помощью рассчитанных нами праймеров на гены антибиотикоустойчивости (таблица). Полимеразную цепную реакцию проводили по следующей программе: 1 цикл – 94 °С в течение 5 мин, затем 35 циклов при 94 °С – 45 с, 56 °С – 1 мин, 72 °С – 45 с и завершающий цикл 72 °С в течение 3 мин. Определение наличия амплифицированного фрагмента осуществляли методом электрофореза в 1–2 % агарозном геле.

### Результаты и обсуждение

Ранее нами на последовательности генов антибиотикорезистентности, кодируемых плазмидой pIP1202 (*strA*, *strB*, *tetA*, *tetR*, *catA*) и транспозоном Tn5 (*npt*), представленных в базе данных NCBI GenBank, был сконструирован набор праймеров, эффективность которых проверена на коллекции антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* из ГКПБ при РосНИПЧИ «Микроб» [1]. Гены устойчивости к канамицину (*npt*) были выявлены у 4 штаммов *Y. pestis*, а к хлорамфениколу – у 2. В связи с небольшой выборкой доступных нам антибиотикоустойчивых штаммов *Y. pestis* эффективность других сконструированных праймеров на гены *strA*, *strB*, *tetA*, *tetR* не была определена.

В данной работе эффективность этих праймеров проверена на штаммах других возбудителей опасных бактериальных инфекций – *V. cholerae* и патогенной *E. coli*. Это стало возможным в связи с тем, что у различных бактерий распространены одни и те же гены устойчивости, передаваемые в результате горизонтального переноса генетической информации с помощью содержащих эти гены мобильных генетических элементов – плазмид, транспозонов. В рамках этого исследования нами также сконструированы новые праймеры на другие гены: ген устойчивости к ванкомицину *sanA* (транспозон Tn1546), ген *aphA* (устойчивость к канамицину за счет аминогликозид 3'-фосфотрансферазной активности, транспозон Tn903), ген *pmrD* (устойчивость к полимиксину, *E. coli* O104:H4). Эффективность всего комплекта ранее и вновь сконструированных праймеров была проверена на выборке штаммов *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*.

В коллекции авторских антибиотикоустойчивых и природных штаммов *Y. pestis* различного происхождения с помощью вновь сконструированных праймеров гены *sanA*, *aac3-VI*, *pmrD* и *aphA* выявить не

Последовательности использованных в работе праймеров для детекции генов антибиотикоустойчивости

Ген	Праймеры	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Размер амплификата, п.н.	Источник
<i>strA</i> (pIP1202)	<i>strA</i> -S <i>strA</i> -As	CATTCTGACTGGTTGCCTG ATTGCGGGACACCACATCA	387	[1]
<i>strB</i> (pIP1202)	<i>strB</i> -S <i>strB</i> -As	ACCTGTTCTCATTGCGGAC GAAAGGCACCCATAAGCGT	105	[1]
<i>tetA</i> (pIP1202)	<i>tetA</i> -S <i>tetA</i> -As	TACAGTGCCGTGCCAATCA TCTGCCGTTTGTCAATGCCG	648	[1]
<i>tetR</i> (pIP1202)	<i>tetR</i> -S <i>tetR</i> -As	ATGAGACAGGGATTGACGG TGACTGACCGCTGAAATCG	364	[1]
<i>catA</i> (pIP1202)	<i>cat</i> -S <i>cat</i> -As	ATTCACATCTTGCCCGCC ATCAGCACCTTGTCGCCTT	377	[1]
<i>npt</i> (Tn5)	Tn5(Kan)-S Tn5(Kan)-As	ATTCGGCTATGACTGGGCA ATGTTTCGCTTGGTGGTCCG	361	[1]
<i>sanA</i> (Tn1546)	<i>sanA</i> (Vank)-S <i>sanA</i> (Vank)-As	TTGCTGCTGTTGACTGTG ATAATGCCCGCTCACAGT	421	Данная работа
<i>pmrD</i> ( <i>E. coli</i> O104:H4)	<i>pmrD</i> (Pol)-S <i>pmrD</i> (Pol)-As	AATGCAATGGAATGGCTGG TTTCCCTGCCGCTTACA	246	Данная работа
<i>aphA</i> (Tn903)	<i>aphA</i> (Kan)-S <i>aphA</i> (Kan)-As	ACAGCCGGTATAAAGGGA TTTCGCAATCCACATCGG	333	Данная работа

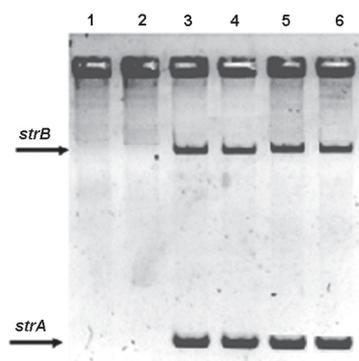


Рис. 1. ПЦР-анализ штаммов *V. cholerae* разных серогрупп с праймерами на гены *strA* и *strB* устойчивости к стрептомицину. Штаммы *V. cholerae*: 1 – P8845 (неO1/неO139, Ростовская область); 2 – M259 (неO1/O139, Саратовская область); 3 – 7007-62 (неO1/неO139, зарубежный); 4 – 218-68 (неO1/неO139, зарубежный); 5 – SG24 (O139, зарубежный); 6 – 8502/66 (O1, биовар эльтор, зарубежный)

удалось, что, как и в ранее проведенном исследовании, объясняется небольшим количеством имевшихся в нашем распоряжении антибиотикорезистентных штаммов *Y. pestis* [1].

Эффективность разработанного комплекта праймеров проверена также на 49 природных штаммах *V. cholerae* разного происхождения. Были исследованы штаммы *V. cholerae* неO1/неO139, изолированные в Астраханской (14 штаммов), Ростовской (5), Саратовской (5) областях, Республике Калмыкия (5) и дальнем зарубежье (15), а также штаммы O1 (3) и O139 (2) серогрупп из дальнего зарубежья.

Среди 15 штаммов неO1/неO139 серогруппы из дальнего зарубежья (Юго-Восточная Азия) выявлено 4 штамма с генами устойчивости к антибиотикам: стрептомицину (гены *strA*, *strB*), стрептомицину и канамицину (*strA*, *strB*, *npt*, *aphA*), стрептомицину, канамицину и тетрациклину (*strA*, *strB*, *npt*, *aphA*, *tetA*, *tetR*), стрептомицину (*strA*, *strB*), что коррелировало у этих штаммов с наличием резистентности к соответствующим антибиотикам. Гены *strA* и *strB* устойчивости к стрептомицину выявлены и у штамма O1 серогруппы биовара эльтор и двух штаммов O139 серогруппы O139 зарубежного происхождения (рис. 1).

Среди 22 штаммов *V. cholerae* неO1/неO139, выделенных в России, генов устойчивости к антибиотикам с помощью сконструированного комплекта праймеров не выявлено, что связано с отсутствием их распространенности у этих циркулирующих пре-

имущественно в водной среде вибрионов.

Генов устойчивости к ванкомицину, полимиксину и гентамицину нам не удалось выявить ни у одного из изученных штаммов *V. cholerae*.

Комплект сконструированных праймеров был использован и для изучения патогенного штамма *E. coli* O157:H7 и лабораторного штамма *E. coli* K12, широко применяемого в практике научно-исследовательских работ. Установлено наличие у штамма O157:H7 генов устойчивости к ванкомицину – *sanA*, полимиксину – *pmrD* в монолокусных ПЦР, и обоих генов одновременно – в мультилокусной ПЦР (рис. 2, а). В геноме штамма *E. coli* O157:H7 также присутствовали гены *strA* и *tetR* устойчивости к стрептомицину и тетрациклину (рис. 2, б). У штамма *E. coli* K12 все эти гены отсутствовали (рис. 2, а, б). Также были обнаружены гены устойчивости к канамицину: *npt* (неомицинфосфотрансфераза) и *aphA* (аминогликозид 3'-фосфотрансфераза).

Таким образом, нами разработан комплект праймеров на ряд генов антибиотикоустойчивости, эффективность которого проверена на штаммах возбудителей опасных инфекций *Y. pestis*, *V. cholerae* и патогенных *E. coli*. Показана эффективность и универсальность рассчитанных праймеров на гены *strA*, *strB*, *tetR*, *tetA*, *pmrD*, *sanA*, *npt*, *cat*, *aphA*, которые выявляются у штаммов разных патогенных видов *Y. pestis*, *V. cholerae* и *E. coli*. В дальнейшем предстоит расширить комплект сконструированных праймеров и проверить его универсальность для детекции генов антибиотикоустойчивости у других бактериальных патогенов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ерошенко Г.А., Одинокоев Г.Н., Анисимова Л.В., Шавина Н.Ю., Виноградова Н.А., Кутырев В.В. Антибиотикоустойчивые штаммы возбудителя чумы и разработка способа их детекции методом полимеразной цепной реакции. *Пробл. особо опасных инф.* 2011; 1(107):33–7.
2. Организация работ лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 1.3.2569-09.
3. Ряпис Л.А., Филатов Н.И., Сомова Н.Я., Сизых Е.В., Герасимов А.И., Светоч Э.А., Степашин Ю.Г., Баннов В.А., Ерусланов Б.В., Борзинов В.А., Храмов М.В., Гусев В.В. Характеристика штаммов *Escherichia coli* O157:H7, изолированных на территориях Центрального Федерального округа. *Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунобиол.* 2005; 1:7–11.
4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a transferrable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.
5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M.,

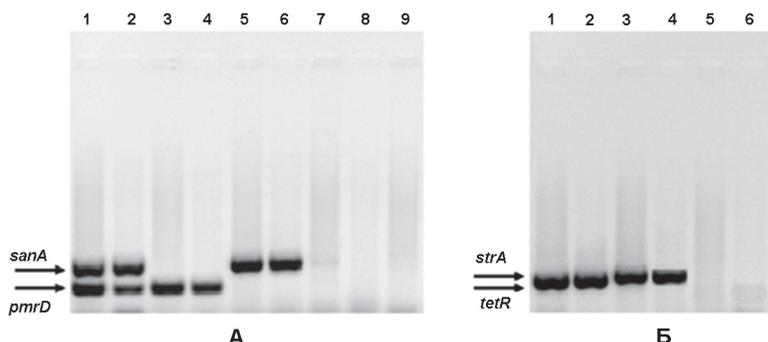


Рис. 2. ПЦР-анализ штаммов *E. coli* O157:H7 и K12 на гены антибиотикоустойчивости:

А. *E. coli* O157:H7: 1, 2 – *sanA* и *pmrD* (устойчивость к ванкомицину и полимиксину в мультилокусной ПЦР); 3, 4 – *pmrD* (к полимиксину); 5, 6 – *sanA* (к ванкомицину в монолокусных ПЦР); *E. coli* K12: 7 – *sanA* и *pmrD*; 8 – *pmrD*; 9 – *sanA*. Б. *E. coli* O157:H7: 1, 2 – *strA* (устойчивость к стрептомицину); 3, 4 – *tetR* (устойчивость к тетрациклину) в монолокусных ПЦР; *E. coli* K12: 5 – *strA*; 6 – *tetR*

Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.

6. Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa K., Ishii K., Yokoyama K., Han C.G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001; 8(1):11–22.

7. Pan J.C., Ye R., Wang H.Q., Xiang H.Q., Zhang W., Yu X.F., Meng D.M., He Z.S. *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(11):3829–36.

#### References

1 Eroshenko G.A., Odinkov G.N., Anisimova L.V., Shavina N.Yu., Vinogradova N.A., Kutyrev V.V. [Drug-resistant strains of plague agent and development of their detection method using polymerase chain reaction]. *Probl. Osobo Opasn. Infek.* 2011; 1(107):33–7.

2. [Organization of work of the laboratories using methods of nucleic acids amplification while working with material containing microorganisms of I–IV pathogenicity groups]. MR 1.3.2569-09.

3. Ryapis L.A., Filatov N.I., Somova N.Ya., Sizykh E.V., Gerasimov A.I., Svetoch E.A., Stepashin Yu.G., Bannov V.A., Eruslanov B.V., Borzinov V.A., Khramov M.V., Gusev V.V., [Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 strains isolated in the territory of Central Federal District]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2005; 1:7–11.

4. Galimand M., Guiyoule A., Gerbaud G., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Multidrug resistance in *Yersinia pestis* mediated by a

transferrable plasmid. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337:677–80.

5. Guiyoule A., Gerbaud G., Buchrieser C., Galimand M., Rahalison L., Chanteau S., Courvalin P., Carniel E. Transferable plasmid-mediated resistance to streptomycin in a clinical isolate of *Yersinia pestis*. *Emerging Infect. Dis.* 2001; 7(1):43–8.

6. Hayashi T., Makino K., Ohnishi M., Kurokawa K., Ishii K., Yokoyama K., Han C.G., Ohtsubo E., Nakayama K., Murata T., Tanaka M., Tobe T., Iida T., Takami H., Honda T., Sasakawa C., Ogasawara N., Yasunaga T., Kuhara S., Shiba T., Hattori M., Shinagawa H. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res.* 2001; 8(1):11–22.

7. Pan J.C., Ye R., Wang H.Q., Xiang H.Q., Zhang W., Yu X.F., Meng D.M., He Z.S. *Vibrio cholerae* O139 multiple-drug resistance mediated by *Yersinia pestis* pIP1202-like conjugative plasmids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52(11):3829–36.

#### Authors:

Nikiforov K.A., Anisimova L.V., Odinkov G.N., Fadeeva A.V., Novichkova L.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru

#### Об авторах:

Никифоров К.А., Анисимова Л.В., Одинокоев Г.Н., Фадеева А.В., Новичкова Л.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru

Поступила 10.04.14.