

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ КОНЪЮГАЦИОННОЙ ПЕРЕДАЧИ ПЛАЗМИДЫ RTS1::TN9 ОТ *ESCHERICHIA COLI* ШТАММАМ *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* И *BURKHOLDERIA CEPACIA*

**Е. В. Молчанова, Н. П. Агеева**

Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт,  
Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра молекулярной биологии и генетики

Показана возможность и определены условия передачи плазмиды Rts1::Tn9 от *E. coli* штаммам *B. cepacia* и *B. thailandensis* с частотой  $n \times 10^{-8}$  на клетку реципиента. Полученные варианты с плазмидной устойчивостью к антибиотикам характеризовались снижением уровня вирулентности для золотистых хомячков и цитопатогенности для растения *Peireskia aculeata*.

**Ключевые слова:** конъюгация, Rts1::Tn9, *E. coli*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, плазмидная устойчивость, транспозон, *Burkholderia*.

## STUDY OF POSSIBILITY OF CONJUGATION TRANSFER OF THE PLASMID RTS1::TN9 FROM *ESCHERICHIA COLI* TO *BURKHOLDERIA THAILANDENSIS* AND *BURKHOLDERIA CEPACIA* STRAINS

**E. V. Molchanova, N. P. Ageeva**

A possibility of transfer of Rts1::Tn9 plasmid from *E. coli* to *B. cepacia* and *B. thailandensis* strains at a frequency of  $n \times 10^{-8}$  was shown; its conditions were defined. The obtained strains with plasmid antibiotic resistance were characterized by a decrease in the virulence level for golden hamsters and cytopathogenic effect on *Peireskia aculeata* plant.

**Key words:** conjugation, Rts1::Tn9, *E. coli*, *B. thailandensis*, *B. cepacia*, plasmid resistance, transposon, *Burkholderia*.

Представители рода буркхольдерий *B. cepacia* и *B. thailandensis* обладают высокой природной резистентностью к антибактериальным препаратам и способны вызывать инфекции у больных с различными иммунодефицитными состояниями [1, 7]. Геномы данных видов представлены несколькими хромосомными репликационными и включают собственные плазмиды и фаги. Это обуславливает, с одной стороны, значительные возможности для адаптации в различных неблагоприятных условиях, с другой — определяет избирательность в восприятии данных элементов при горизонтальном переносе. Ранее была описана конъюгационная передача для плазмид Р1 группы несовместимости (RP4, RP1, R68, RK2, R18) штаммам различных видов буркхольдерий, где были отражены данные о различии в реципиентной способности, экспрессии маркеров плазмид и условия их включения в хромосомный репликационный [4, 5].

Большая низкокопийная температурочувствительная по репликации и конъюгации плаزمиды Rts1, обуславливающая резистентность к канамицину, исходно выделенная из клинического изолята *Proteus vulgaris*, относится к Т-группе. На основании секвенирования ее геномной последовательности была установлена высокая гомологичность с плазмидами Р1 в системе инициации репликации и в структуре модулей [8]. Репликационный содержит гены детерминации резистентности к канамицину, шесть различных последовательностей IS элементов и три транспозона, составляющих 28644 п.н., 13 % от ее генома. Кроме того, на

плазмиду возможен перенос дополнительных мобильных элементов, определяющих устойчивость к другим антибактериальным препаратам, что делает ее интересной в качестве инструмента для изучения рекомбинационных систем.

Множественная антибиотикорезистентность возбудителей инфекционных заболеваний, и в частности буркхольдерий, представляет реальную проблему для эффективной терапии. В связи с этим, исследование горизонтального переноса мобильных генетических элементов (транспозонов, плазмид) является актуальной задачей и способствует раскрытию механизмов формирования лекарственной устойчивости.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Определение возможности конъюгационной передачи плазмиды Rts1::Tn9 от *E. coli* штаммам *B. thailandensis* и *B. cepacia* и изучение особенностей наследования и экспрессии детерминант резистентности.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

**Штаммы и питательные среды.** В работе были использованы штаммы *B. thailandensis* 295 и *B. cepacia* AB 1934 дикого типа, а также штамм *E. coli* KS 707 (Rts1::Tn9). Для культивирования бактерий использовали L-агар и L-бульон («Difco», США).

**Определение минимальных подавляющих концентраций (МПК) антибиотиков.** МПК офлоксацина (Ofx), ципрофлоксацина (Cip), канамицина (Kan), хлорамфе-

никола (Cml), полимиксина (PIm) определяли методом серийных разведений на плотных питательных средах.

**Конъюгация.** Бульонные культуры донора *E. coli* KS 707 (Rts1::Tn9) и реципиентов инкубировали при 28, 32 °С соответственно, в течение 18 ч, конъюгацию проводили согласно методике, описанной ранее [4, 5]. При этом использовали селективную среду с канамицином (300 мкг/мл) для отбора рекомбинантных клонов и полимиксином (500 мкг/мл) для контрселекции донора. Об эффективности конъюгационной передачи плазмиды судили по числу выросших рекомбинантных устойчивых к канамицину клонов в пересчете на клетку реципиента.

У вариантов, наследовавших плазмиду, определяли уровень приобретенной резистентности к антибиотикам, детерминированной генами плазмиды и транспозона (канамицин, хлорамфеникол) и перекрестной устойчивости к другим препаратам, наличие фенотипа температурочувствительности и стабильности плазмиды Rts1::Tn9 в новом хозяине.

**Интеграция Tn9 в хромосому.** Поскольку плаزمида Rts1::Tn9 имеет температурочувствительный по репликации фенотип, позволяющий исключать ее из клеток при повышенной температуре [8], штаммы *B. thailandensis* 295 и *B. cepacia* AB 1934, несущие указанную плазмиду, культивировали при 42 °С на среде с хлорамфениколом. Из клонов, выросших в указанных условиях, отбирали варианты, проявлявшие признаки ауксотрофности. В каждом случае анализировали не менее 2000 клонов.

**Определение вирулентности и цитопатогенности.** Вирулентность в *B. thailandensis* изучали на золотистых хомячках при внутрибрюшинном заражении дозами  $1 \times 10^6$  —  $1 \times 10^9$  м.к. и учитывали динамику гибели в группах. Вирулентные свойства оценивали по LD<sub>50</sub>, рассчитанной по Керберу.

Уровень цитопатогенного эффекта обоих видов определяли, используя растение *P. aculeata*. На поврежденную скальпелем нижнюю сторону листовой пластинки наносили 0,01 мл микробной взвеси в концентрации  $1 \times 10^9$  м.к./мл, через 48 ч оценивали цитопатогенный эффект по зоне почернения листовой пластинки, мацерации и изъязвления [3].

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Штаммы *B. cepacia* AB 1934 и *B. thailandensis* 295 воспринимали Rts1::Tn9 с частотой  $4 \times 10^{-8}$  на клетку реципиента. Рекомбинантные клоны характеризовались повышенным уровнем устойчивости к канамицину (в 3 раза) и хлорамфениколу (в 6 раз), который практически не отличался от такового *E. coli* KS 707 (Rts1::Tn9), что указывало на высокую степень фенотипической экспрессии данных детерминант резистентности в новых хозяевах. Кроме того, штаммы, несущие плазмиду, приобретали определенной степени перекрестную устойчивость к другим антибиотикам, в частности к офлоксацину и ципрофлоксацину (табл. 1). Данная связь

зависимой перекрестной резистентности фторхинолонов-хлорамфеникола была отмечена нами ранее при получении антибиотикоустойчивых вариантов данных видов буркхольдерий [2].

Таблица 1

### Резистентность исходных и генетически измененных штаммов буркхольдерий к антибиотикам

Штамм	МПК антибиотиков, мкг/мл			
	Ofx	Cip	Kan	Cml
<i>B. thailandensis</i> 295	12	5	100	50
<i>B. thailandensis</i> 295 Rts1::Tn9	15	10	300	300
<i>B. cepacia</i> AB 1934	10	2,5	100	50
<i>B. cepacia</i> AB 1934 Rts1::Tn9	15	5	300	300

Плазмида сохраняла температурочувствительный фенотип в новых хозяевах, R+ варианты *B. cepacia* AB 1934 и *B. thailandensis* 295 обладали способностью к росту на среде с хлорамфениколом (300 мкг/мл) при 32 °С, но не при 42 °С.

При хранении полученных R+ штаммов обоих видов микроорганизмов на питательном агаре без селективного давления антибиотика спонтанной утраты плазмиды не наблюдали.

Наследование плазмид, в том числе и буркхольдериями, как правило, сопровождается снижением уровня вирулентности [2]. Данная тенденция была отмечена и в наших экспериментах. У мутантов *B. cepacia* AB 1934 и *B. thailandensis* 295, наследовавших плазмиду Rts1::Tn9, наблюдали заметное снижение цитопатогенного эффекта, а у R+ вариантов *B. thailandensis* 295 — снижение вирулентности (табл. 2).

Таблица 2

### Вирулентность и цитопатогенность исходных и генетически измененных штаммов буркхольдерий

Штаммы	LD <sub>50</sub> для золотистых хомячков, м.к.	Степень цитопатогенного эффекта, <i>P. aculeata</i>
<i>B. thailandensis</i> 295	$1 \times 10^7$	++
<i>B. thailandensis</i> 295 (Rts1::Tn9)	$1 \times 10^{8-9}$	+
<i>B. cepacia</i> AB 1934	$1 \times 10^9$	+
<i>B. cepacia</i> AB 1934 (Rts1::Tn9)	не определяли	-

Культивирование штаммов, несущих плазмиду, при 42 °С дало возможность селекционировать 2 вари-

анта *B. ceracia* AB 1934 и 8 вариантов *B. thailandensis* 295, которые характеризовались утратой резистентности к канамицину, но сохраняли уровень устойчивости к хлорамфениколу и одновременно приобретали аукоотрофность, что указывало на интеграцию Tn9 в хромосому. Определение их питательных потребностей по схеме Холлидея показало, что включение транспозона индуцировало мутации зависимости от пролина или глутамина. С течением времени часть SmIR-клонов ревертировала к прототрофности, что, вероятно, объясняется перемещением транспозона по хромосоме.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе показана возможность и определены условия передачи в процессе конъюгации плазмиды Rts1::Tn9 от *E. coli* KS 707 (Rts1::Tn9) штаммам *B. ceracia* AB 1934 и *B. thailandensis* 295 с частотой  $6 \times 10^{-8}$  на клетку реципиента. Получены генетически измененные штаммы с плазмидной антибиотикоустойчивостью, детерминанты которой эффективно экспрессируются в новом хозяине, повышая устойчивость штаммов к канамицину и хлорамфениколу в 3—6 раз. Трансконъюганты показали снижение уровня вирулентности для золотистых хомячков и цитопатогенности для *P. aculeata*. Показана возможность интеграции Tn9 в хромосому.

Таким образом, можно сделать вывод, о том, что плаزمида Rts1::Tn9, также, как и плазмиды P-1 группы совместности, может быть использована в генетических исследованиях буркхольдерий.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воронина О. Л., Чернуха М. Ю., Шагинян И. А. и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2013. — № 2 — С. 22—30.
2. Калинкина Е. В., Агеева Н. П., Меринова О. А. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. — 2008. — № 96 — С. 32—35.
3. Молчанова Е. В., Агеева Н. П. Патент на изобретение № 2485182 Способ косвенной оценки вирулентности штаммов патогенных буркхольдерий по признаку цитопатогенности / от 23.01.2012 г.
4. Морозова М. В., Меринова Л. К., Сеимова И. К. и др. // Бюллетень Волгоградского научного центра РАМН. — 2006. — №1. — С. 38—40.
5. Петерс М. К., Шиповская Н. П., Меринова Л. К. // Микробиологический журнал. — 1983. — Т. 45. — В. 3. — С. 11—14.
6. Coenye T., Vandamme P. // Environ. Microbiol. — 2003. — Vol. 5. — P. 719—729.
7. Deshazer D. // FEMS Microbiol. Lett. — 2007. — Vol. 277 (1). — P. 64—69.
8. Murata T., Ohnishi M., Ara T., et al. // J. Bacteriol. — 2002. — Vol. 184. — P. 3194—3202.

## Контактная информация

**Молчанова Елена Владимировна** — к. б. н., с. н. с. коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, ассистент кафедры молекулярной биологии и генетики, ВолгГМУ, e-mail: elenakalinki@yandex.ru

УДК 616.379-008.64-053.71+615.03

## СОВРЕМЕННЫЕ ИНСУЛИНЫ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ДЕТЕЙ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ I ТИПА: «ЗА» И «ПРОТИВ»

**Н. Ю. Отто, Г. Р. Сагитова, М. Я. Ледяев**

*Областная детская клиническая больница им. Н. Н. Силищевой, Астрахань,  
Астраханская государственная медицинская академия,  
Волгоградский государственный медицинский университет*

Одной из сторон улучшения качества жизни пациентов считается адекватно подобранная инсулинотерапия. На основе собственного клинического опыта предлагаются подходы к тактике использования инсулинов, в зависимости от вида препарата, возраста ребенка, койко-дня.

*Ключевые слова:* дети, сахарный диабет I типа, инсулинотерапия.

## PROS AND CONS OF USING MODERN INSULIN IN THE TREATMENT OF CHILDREN WITH TYPE I DIABETES

**N. Yu. Otto, G. R. Sagitova**

Adequately selected insulin therapy is considered to be one of essential points in improving the patients' quality of life. We suggest approaches to tactical use of insulin depending on the type of drug, the age of the child based on our clinical experience.

*Key words:* children, type I diabetes, insulin therapy.

Изучение проблем, связанных, в том числе, и с терапией сахарного диабета, особенно у детей, является государственной и общенациональной задачей [1, 2]. Известно, что причиной заболевания считается абсо-