

На правах рукописи



Шунова Александра Владимировна

**МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ И ТИПИРОВАНИЕ ХРОМОСОМНЫХ
β-ЛАКТАМАЗ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА**

03.02.03 – микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Волгоград – 2014

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
доцент

Викторов Дмитрий Викторович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук,
профессор кафедры микробиологии
ГБОУ ВПО «Саратовский государственный
медицинский университет имени В. И. Разумовского»
Министерства здравоохранения
Российской Федерации

Швиденко Инна Григорьевна

доктор медицинских наук,
профессор,
заведующего отделом образовательных программ
и подготовки специалистов
ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб»
Роспотребнадзора

Попов Юрий Алексеевич

Ведущая организация:

ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора

Защита состоится «23» декабря 2014 г. в 11:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.008.06 по защите диссертаций на соискание учёной степени кандидата наук, на соискание учёной степени доктора наук при Волгоградском государственном медицинском университете по адресу: 400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке Волгоградского государственного медицинского университета (400131, г. Волгоград, пл. Павших борцов, 1) и с авторефератом на сайтах: <http://www.volgmed.ru>, <http://vak2.ed.gov.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2014 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор социологических наук,
профессор

Ковалёва Марина Дмитриевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Важным биологическим свойством патогенных буркхольдерий (*Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*) является высокая природная устойчивость к широкому спектру антимикробных соединений. Наличие этого свойства обуславливает возникновение трудностей при лечении вызываемых ими заболеваний. На сегодняшний день механизмы развития полирезистентности патогенных *Burkholderia* являются недостаточно исследованными.

В течение последних десятилетий накоплен довольно обширный материал об индивидуальной устойчивости буркхольдерий к антибактериальным препаратам (Антонов Ю.В. и др., 1991; Kenny D. L. et al., 1999; Moore J.E. et al., 2001; Vorachit M. et al., 2000). По данным этих исследований можно сделать вывод о том, что соединения тетрациклинового, фторхинолонового, цефалоспоринового, карбапенемового рядов в опытах *in vitro* проявляют выраженное ингибирующее действие на клетки патогенных видов данной группы микроорганизмов, культивируемых на искусственных питательных средах. Однако применение этих антибактериальных агентов при персистенции бактерий в организме-хозяине нередко оказывается малоэффективным (Azizi Z.A. et al., 2005; Inglis T.J. et al., 1998). Следует отметить, что буркхольдерии при культивировании на питательных средах в селективных условиях, также как и в процессе лечения, быстро приобретают резистентность к различным антибактериальным препаратам, и часто резистентность носит множественный характер (Ho P.L. et al., 2002).

Сложность генетической организации данных микроорганизмов (Holden M.T.G. et al., 2004; Nierman V. et al., 2004; Rodley P.D. et al., 1995) позволяет говорить о высокой способности к адаптации их геномов и предполагать наличие различных молекулярно-генетических механизмов, с помощью которых реализуется лекарственная резистентность. Последнее является основанием для того, чтобы обозначить в качестве одного из приоритетных направлений в изучении патогенных *Burkholderia* исследование фундаментальных основ их устойчивости к антибактериальным агентам, в первую очередь – молекулярно-генетических механизмов формирования резистентности.

Степень разработанности темы. Антибактериальные соединения β -лактамной группы стандартно используются в существующих схемах экстренного и пролонгированного лечения мелиоидоза и сапа. В то же время, опыт их применения в терапии больных мелиоидозом демонстрирует значительное количество случаев развития резистентности возбудителя в ходе лечения и, нередко, фатального исхода заболевания (Chaowagul W. et al.,

2000; Dance D.A.B., 2000; Dance D.A.B. et al., 2004; White N.J., 2003). Значение собственных β -лактамаз мелиоидозного и сапного микробов в развитии устойчивости к антибиотиками β -лактамной группы чрезвычайно мало освещены в современной научной литературе. По мнению некоторых исследователей, возрастание резистентности *B. pseudomallei* к β -лактамам может быть обусловлено расширением спектра ферментной инактивации, а также снижением чувствительности лактамаз микроба к ингибиторам (Cheung T.K.M. et al., 2002; Keith K.E. et al., 2005; Tribuddharat C. et al., 2003).

Изучение последовательностей геномов *B. pseudomallei* и *B. mallei* позволяет судить о генетическом потенциале микроорганизмов для развития устойчивости к β -лактамным соединениям. Структурно-функциональный анализ последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D является актуальным направлением исследований для более полного понимания биологических основ устойчивости возбудителей мелиоидоза и сапа к антимикробным соединениям. Не менее важным является применение результатов такого рода исследования для совершенствования схем лечения инфекций и создания систем геномного сканирования штаммов патогенных буркхольдерий, что позволит решать практические задачи генной диагностики и молекулярно-эпидемиологического мониторинга, а также прогнозировать возможные эпидситуации, вызванные антибиотикорезистентными штаммами буркхольдерий.

Цель работы. Конструирование олигонуклеотидных праймеров для молекулярной детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий и анализ распространённости генов β -лактамаз классов А, В и D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственных видов.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий *in silico* и сконструировать набор олигонуклеотидных праймеров для их детекции в полимеразной цепной реакции (ПЦР).
2. Оценить диагностическую эффективность сконструированных олигонуклеотидов для исследования распространённости генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D в геномах коллекционных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий.
3. Осуществить подбор комбинаций праймеров для детекции и типирования генов хромосомных β -лактамаз патогенных буркхольдерий в формате мультилокусной ПЦР.

4. Разработать алгоритм детекции и типирования нуклеотидных полиморфизмов в генах β -лактамаз патогенных буркхольдерий в формате ПЦР реального времени / плавления ампликонов высокого разрешения (high resolution melting, HRM).

Научная новизна работы. Проведена сравнительная характеристика нуклеотидных последовательностей генов хромосомных β -лактамаз патогенных буркхольдерий и их предполагаемых продуктов с использованием биоинформационного программного обеспечения и предложен набор олигонуклеотидных праймеров для детекции генов β -лактамаз различных молекулярных классов у *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Получены новые данные о распространённости детерминант β -лактамаз молекулярных классов А, В, D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий.

Осуществлён подбор наиболее эффективных комбинаций праймеров для детекции последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий в формате мультилокусной ПЦР.

Разработан алгоритм детекции и типирования нуклеотидных полиморфизмов в генах β -лактамаз патогенных буркхольдерий с использованием технологии ПЦР реального времени и плавления ампликонов высокого разрешения (high resolution melting, HRM).

По материалам проведённых исследований получены 2 патента РФ на изобретения: патент № 2413763 «Инсерционный мутант *Burkholderia pseudomallei* KM31 – модельный штамм для молекулярно-генетического анализа механизмов формирования множественной антибиотикорезистентности у патогенных буркхольдерий» (зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 10.03.2011) и патент № 2474614 «Олигонуклеотидные праймеры для детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий» (зарегистрирован в Госреестре изобретений РФ 10.02.2013).

Теоретическая и практическая значимость работы. Материалы исследований использованы при подготовке проекта методических указаний «Порядок организации и проведения лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза для лабораторий территориального, регионального и федерального уровней», планируемых к утверждению на федеральном уровне.

Набор сконструированных в ходе работы олигонуклеотидных праймеров используется для типирования, сравнительного анализа и

экспресс-оценки спектра резистентности к антибиотикам β -лактамной группы коллекционных и мутантных штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* в лабораториях Волгоградского научно-исследовательского противочумного института и в работе референс-центра по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза.

Методология и методы исследования. Данное исследование основано на проведении сравнительного анализа *in silico* кодирующих последовательностей геномов патогенных буркхольдерий, гомологичных известным генам β -лактамаз. При этом использовались различные базы данных и их инструментарий для проведения оценки выбранных нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. В результате был сгенерирован набор олигонуклеотидных праймеров, который также был исследован *in silico* в отношении возможности детекции генетических последовательностей буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов.

Оценка диагностической эффективности сконструированных олигонуклеотидов была проведена на образцах геномной ДНК с применением микробиологических и молекулярно-генетических методов анализа.

Положения, выносимые на защиту:

1. Гены β -лактамаз буркхольдерий кодируют энзимы, принадлежащие к β -лактамазам молекулярных классов А, В, D и относящиеся к 2 суперсемействам протеинов « β -лактамазы / транспептидазы» и «металло-гидролазы / оксидоредуктазы» и семействам « β -лактамазы / D-ala карбоксипептидазы» (β -лактамазы классов А и D), « β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы», «глиоксалазы II», «PqsE- подобные металло-гидролазы», «алкилсульфатазы» и «Zn металло- β -лактамазы» (β -лактамазы класса В).
2. β -лактамазы класса D встречаются лишь у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а отдельные группы металло- β -лактамаз семейств « β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы» распространены преимущественно у *B. pseudomallei* и *B. mallei*.
3. Сконструированный набор олигонуклеотидных праймеров *bm1F1 - bm4R1*, *bm1F2 - bm14R2*, *bps1F3 - bps1R3*, *bps1F4 - bps8R4*, *bps3F5 - bps8R5* применим для детекции генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий методом полимеразной цепной реакции с одновременным определением их принадлежности к молекулярным классам А, В и D.

4. Олигонуклеотидные праймеры, специфичные генам металло-β-лактамаз (*bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4*) и оксациллиназ (*bm1F2-bm14R2*), позволяют дифференцировать в полимеразной цепной реакции виды буркхольдерий группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*).

5. Высокоразрешающий анализ кривых плавления (HRM) амплифицированных фрагментов генов β-лактамаз молекулярных классов В и D позволяет выявлять аллельные варианты данных детерминант в штаммах буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов, а также осуществлять скрининг вероятных мутантных последовательностей генов β-лактамаз у штаммов с изменённой чувствительностью к препаратам β-лактаминового ряда.

Степень достоверности и апробация результатов. Результаты исследований по теме диссертационной работы были представлены на VI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2006), XIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области (Волгоград, 2008), 66-ой Открытой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины» (Волгоград, 2008), Научно-практической конференции «Инновационные технологии в лабораторной диагностике» (Волгоград, 2009), Научно-практической школе-конференции молодых учёных и специалистов Роспотребнадзора «Современные технологии обеспечения биологической безопасности» (Оболенск, 2010), X Межгосударственной научно-практической конференции «Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ» (Ставрополь, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 11 научных печатных работ, из них три статьи – в изданиях, рекомендованных ВАК, получены два патента на изобретение РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена в классической форме на 113 листах компьютерного текста, состоит из введения, 5 глав, содержащих обзор литературы по проблеме, методическую часть и экспериментальные разделы, заключения, выводов и списка использованной литературы. Диссертация иллюстрирована 18 таблицами и 22 рисунками. Указатель литературы включает 120 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Все штаммы буркхольдерий предоставлены коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Культуры буркхольдерий выращивали на плотных питательных средах, содержащих сердечно-мозговой экстракт (ВНИ «Difco», США) при 37 °С в течение 1-2 суток. Для подтверждения видовой принадлежности культур *B. mallei* и *B. pseudomallei* использовали идентификационные наборы МИКРО – ЛА – ТЕСТ® – НЕФЕРМ тест 24 («Лахема», Чехия) и API 20NE («BioMerieux», Франция). Работа с микроорганизмами проводилась в соответствии с СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

Чувствительность культур микроорганизмов к антимикробным соединениям различных классов определяли диско-диффузионным методом на пластинах агар Мюллер-Хинтон («HiMedia», Индия).

Выделение геномных ДНК из исследуемых штаммов проводили методом протеиназного лизиса по протоколу фирмы Promega (Gene Print STR Systems. Technical Manual.– Promega Corp. – Madison, USA), с некоторыми модификациями. Для выделения ДНК использовали культуры штаммов, выращенные на плотных питательных средах в течение 18 - 24 ч при 37 °С.

Для анализа *in silico* нуклеотидных последовательностей предполагаемых генов β-лактамаз буркхольдерий использовали геномные сиквенсы *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*, представленные в Genbank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Редактирование, первичные манипуляции с нуклеотидными и аминокислотными последовательностями, а также сравнительное сопоставление фрагментов геномных сиквенсов проводили с помощью Open Source пакетов программ Artemis v. 9.0 и ACT v. 6.0, разработанных специалистами Wellcome Trust Sanger Institute (www.sanger.ac.uk).

Принадлежность первично аннотированных и предполагаемых кодирующих последовательностей буркхольдерий к генам β-лактамаз того или иного молекулярного класса оценивали по степени гомологии их транслированных аминокислотных последовательностей с ранее охарактеризованными β-лактамазами различных бактериальных видов, используя алгоритм BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Предполагаемые белковые продукты кодирующих последовательностей *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis*,

гомологичные известным β -лактамазам, дополнительно исследовали на предмет наличия специфических структурных элементов – консервативных аминокислотных мотивов, характерных для β -лактамаз классов А, В и D. Консервативные элементы первичной структуры β -лактамаз анализировали с использованием on-line процедур сервера ТМНММ v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/) и сервиса Protein Motif Search web-сайта Comprehensive Microbial Resource (CMR, cmr.tigr.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi) Института Геномных Исследований TIGR (www.tigr.org).

Для постановки ПЦР и анализа кривых плавления ДНК-фрагментов использовали амплификаторы C1000 и CFX96 («BioRad», США). Программа амплификации для всех пар праймеров состояла из этапов начального прогрева проб при 94 °С – 5 мин, 35 реакционных циклов (денатурация 94 °С – 30 с, отжиг праймеров 59,9 °С – 30 с, удлинение цепи 72 °С – 45 с) и финальной элонгации 72 °С в течение 1 мин.

Объём реакционной смеси на 1 пробу составлял 25 мкл. В состав ПЦР-смеси входили праймеры в конечной концентрации 15 пМ, 1 Ед DiaTaq ДНК-полимеразы и буфер с дНТФ и MgCl₂ («Интерлабсервис», Россия).

Анализ кривых плавления фрагментов генов β -лактамаз проводили с использованием реагента SsoFast™ EvaGreen® Supermix («BioRad», США). Плавление проводили в интервале температур 75 – 95 °С с шагом 0,1 °С.

Продукты ПЦР анализировали в 1,5 % агарозном геле с добавлением раствора бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Электрофорез в агарозном геле проводили с использованием трис-боратного буфера (0,089 М трис-борат, 0,089 М борная кислота, 0,002 М ЭДТА) при напряжённости электрического поля 8 В/см в течение 1 ч. Для визуализации результатов электрофореза использовали систему документации гелей «Gel Doc» («BioRad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Конструирование олигонуклеотидных праймеров для ПЦР-детекции последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркольдерий

Выбор кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β -лактамаз, был проведён на основе анализа девяти аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственно-го непатогенного вида *B. thailandensis*, а также 12 частично аннотированных геномов штаммов данных видов микроорганизмов, представленных в GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и

базе данных геномных проектов J. Craig Venter Institute (<http://gsc.jcvi.org/projects>). Принадлежность аннотированных кодирующих последовательностей (CDS) видов буркхольдерий к генам β -лактамаз оценивали по степени гомологии их транслированных аминокислотных последовательностей с ранее охарактеризованными β -лактамазами различных бактериальных видов, используя алгоритм BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). В результате данного этапа анализа было выделено 118 хромосомных локусов буркхольдерий, содержащих кодирующие последовательности, гомологичные известным генам бактериальных β -лактамаз. Предполагаемые белковые продукты данных CDS *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* были исследованы на предмет наличия специфических структурных элементов – консервативных аминокислотных мотивов, характерных для β -лактамаз классов А, В и D. Данный этап анализа был проведён с использованием сервиса Protein Motif Search web-сайта Comprehensive Microbial Resource (CMR, cmr.tigr.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi), а также инструментария базы данных InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan).

В результате проведённого анализа исследуемые аминокислотные последовательности были отнесены к девяти группам гомологии, включающим энзимы, относящиеся к двум суперсемействам протеинов (β -лактамаз / тран-спептидаз и металло-гидролаз / оксидоредуктаз). Все исследованные аминокислотные последовательности принадлежали к β -лактамазам трёх молекулярных классов по классификации Ambler – ферментам класса А, В и D (Ambler R.P., 1969). Представители металло- β -лактамаз (класс В) формировали несколько групп гомологии, объединяющие ферменты семейств « β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы», «глиоксалазы II», «PqsE- подобные металло-гидролазы», «алкилсульфатазы» и «Zn металло- β -лактамазы».

На основании проведённого анализа для дальнейшего подбора праймеров были определены 5 групп кодирующих последовательностей β -лактамаз, относящихся к различным молекулярным классам, имеющих высокую внутригрупповую степень гомологии и отличающихся друг от друга протяжёнными участками нуклеотидных последовательностей, дающих возможность подбора дифференцирующих специфичных праймеров. Подобранные пары олигонуклеотидов были верифицированы по показателям специфичности в отношении генетических последовательностей буркхольдерий и на предмет возможного образования димеров и других неспецифических вторичных структур при помощи инструмента PrimerBlast

сервера Национального центра биоинформатики США (NCBI, www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast). В результате были определены 5 пар олигонуклеотидов, комплементарных фрагментам генов β -лактамаз классов А, В и D буркхольдерий. Структура и характеристики подобранных праймеров приведены в таблице 1.

Таблица 1

Олигонуклеотидные праймеры для детекции последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий

Праймер	Последовательность, 5' – 3'	Генетическая мишень	Локализация	Размер ампликона п.н.
<i>bm1F1</i>	TTCCCGCGATCCGCCTGATGA	β -лактамаза класса А <i>Burkholderia mallei</i> 10247(Genbank access. CP000547 локусBMA10247_A1040)	41-61 нуклеотид	680
<i>bm4R1</i>	CTTGTTGCCGAGCATCCATGC		700-720 нуклеотид	
<i>bm1F2</i>	ACGTTCCCTCGGCGCGACGGAAAC	β -лактамаза класса В <i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344 (Genbank access. CP000011 локусBMA_A0168)	10-32 нуклеотид	352
<i>bm14R2</i>	CCGGATGATGTTTCGAGTAGCCGTG		337-361 нуклеотид	
<i>bps1F3</i>	ACGGCAATTCCTCCATTGCGA	β -лактамаза класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локусBURPS1106B_2313)	9-29 нуклеотид	727
<i>bps1R3</i>	CTCGTCAGGGTTGCGTCCGGAGT		713-735 нуклеотид	
<i>bps1F4</i>	CGCATTCGTTTTGCTGGGTTGCAT	β -лактамаза класса D <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локусBURPS1106B_2455)	27-50 нуклеотид	440
<i>bps8R4</i>	TCTGCAGCGACGAGCCGATCCA		445-466 нуклеотид	
<i>bps3F5</i>	TCTGTGGCTGCTGCGCGACGAGAT	β -лактамаза класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локусBURPS1106B_A3704)	132-155 нуклеотид	190
<i>bps8R5</i>	GCACAGCCAGTTCGCGAGTCCGA		299-321 нуклеотид	

2. Анализ распространённости β -лактамаз классов А, В и D в геномах патогенных буркхольдерий

Экспериментальная оценка эффективности сконструированных праймеров для детекции последовательностей генов β -лактамаз в ПЦР была проведена на образцах геномной ДНК штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, родственных видов буркхольдерий и некоторых гетерологичных микроорганизмов.

Результаты использования набора сконструированных олигонуклеотидов для ПЦР-детекции последовательностей генов β -лактамаз различных молекулярных классов приведены на рисунках 1 – 5.

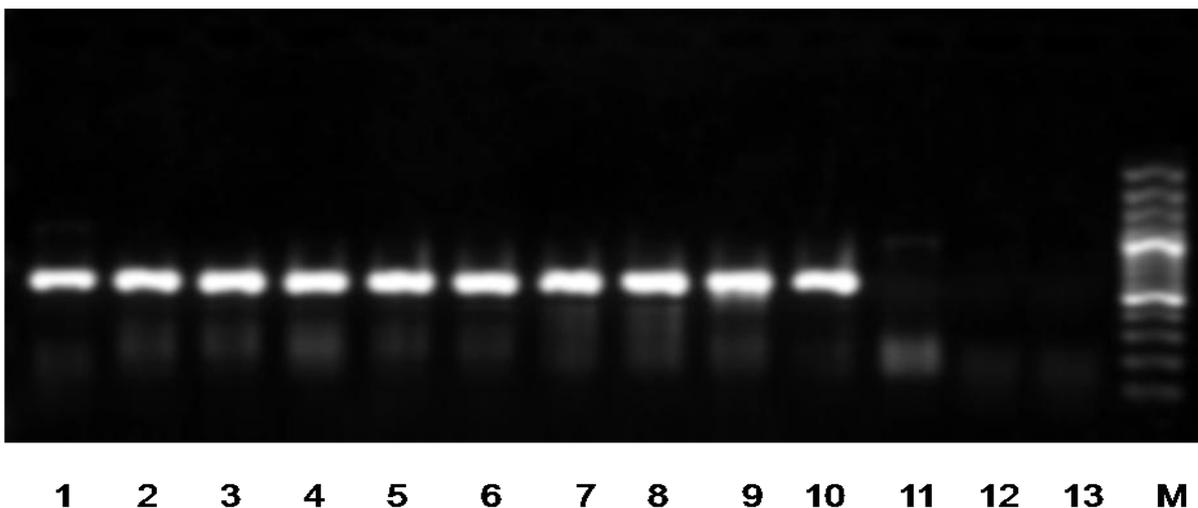


Рис. 1. Детекция гена β -лактамазы класса А в ПЦР с праймерами *bm1F1-bm4R1*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* E299, 9 - *B. mallei* Ц-5, 10 - *B. cepacia* 25416, 11 - *P. aeruginosa* 215, 12 - *V. cholerae* O139 Bengal, 13 - *V. cholerae* O1 El Tor B-139, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

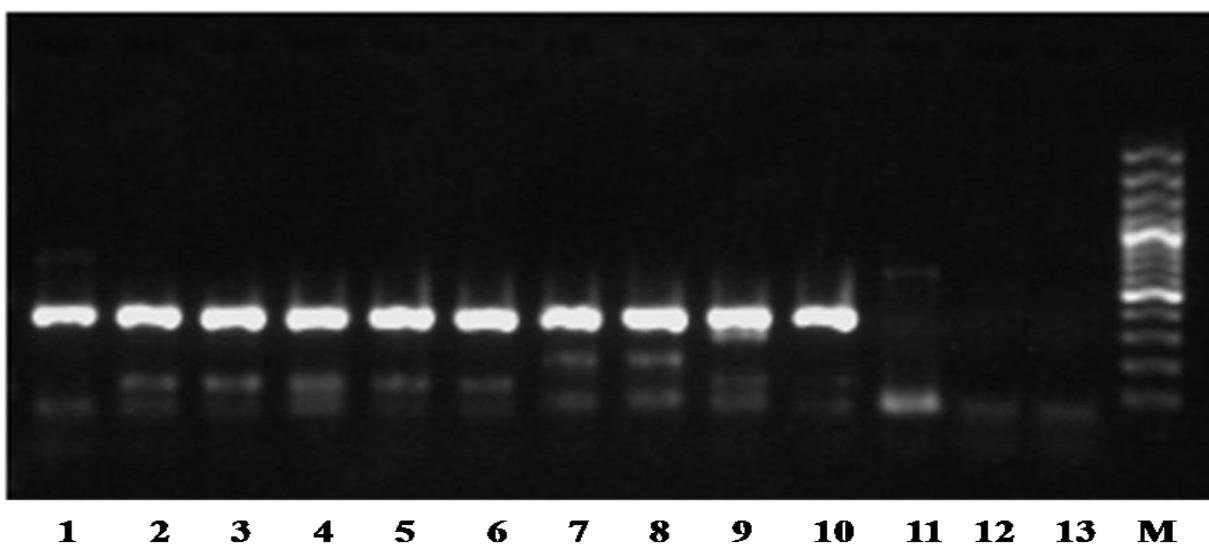


Рис. 2. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* E299, 9 - *B. mallei* Ц-5, 10 - *B. cepacia* 25416, 11 - *P. aeruginosa* 215, 12 - *V. cholerae* O139 Bengal, 13 - *V. cholerae* O1 El Tor B-139, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

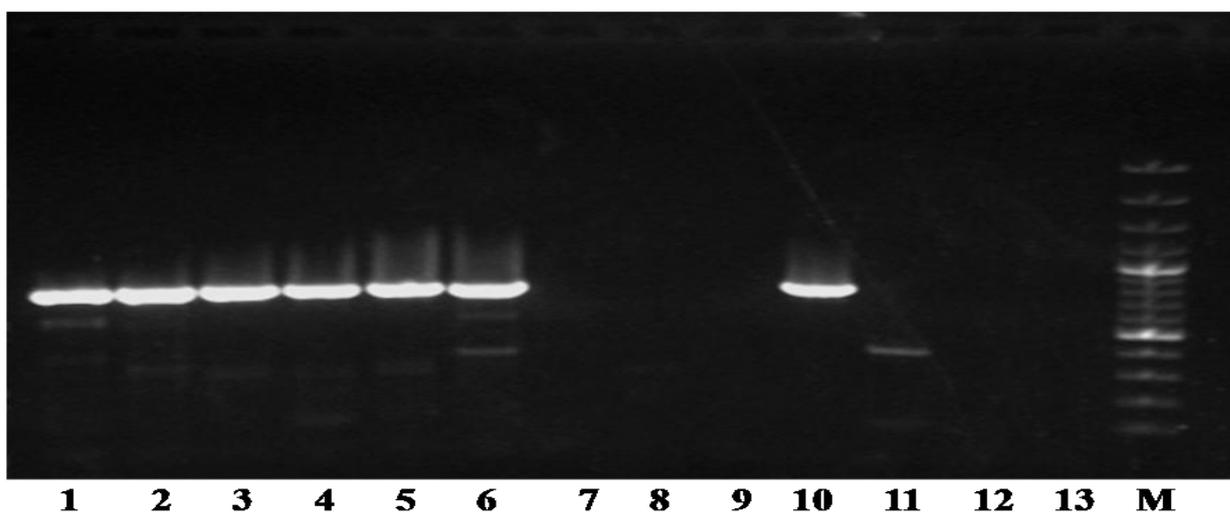


Рис. 3. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* E299, 9 - *B. cepacia* 25416, 10 - *B. mallei* Ц-5, 11 - *P. aeruginosa* 215, 12 - *V. cholerae* O139 Bengal, 13 - *V. cholerae* O1 El Tor B-139, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

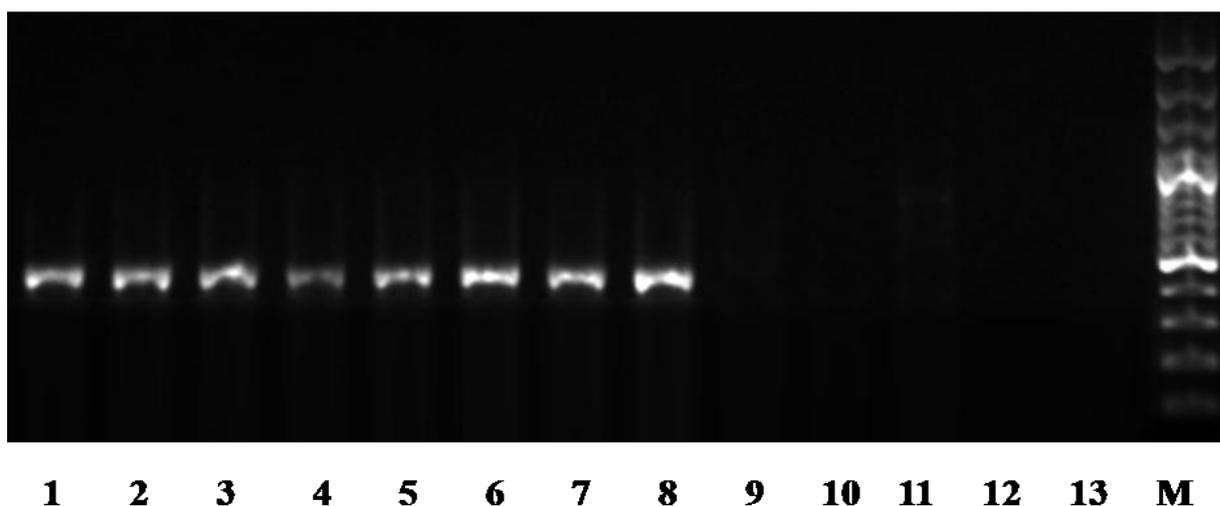


Рис. 4. Детекция гена β -лактамазы класса D в ПЦР с праймерами *bps1F4-bps8R4*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* E299, 9 - *B. mallei* Ц-5, 10 - *B. cepacia* 25416, 11 - *P. aeruginosa* 215, 12 - *V. cholerae* O139 Bengal, 13 - *V. cholerae* O1 El Tor B-139, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

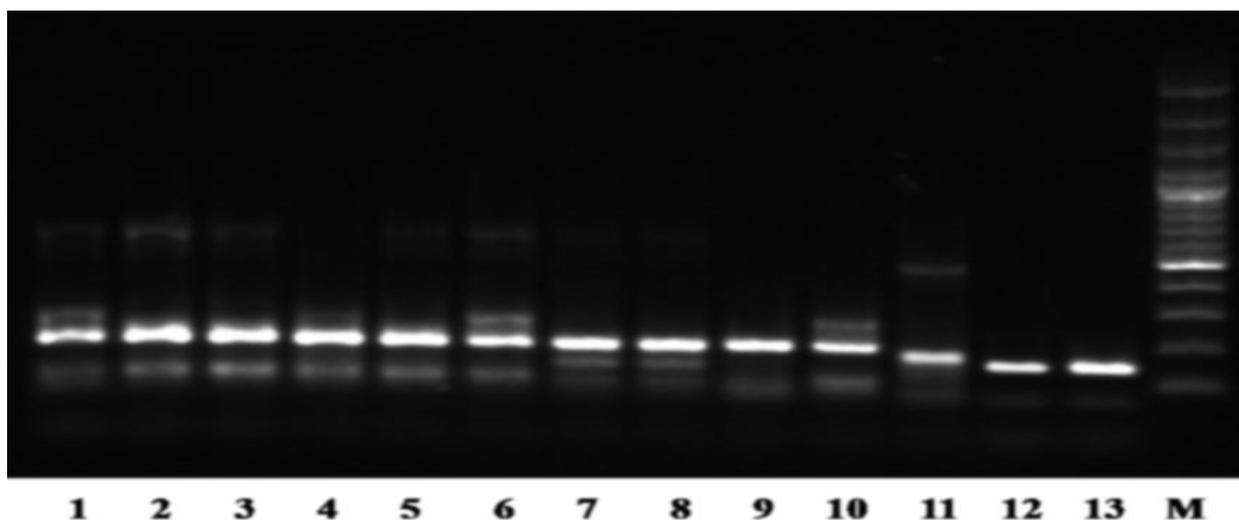


Рис. 5. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bps3F5-bps8R5*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* E299, 9 - *B. mallei* Ц-5, 10 - *B. cepacia* 25416, 11 - *P. aeruginosa* 215, 12 - *V. cholerae* O139 Bengal, 13 - *V. cholerae* O1 El Tor B-139, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

Проведённая серия экспериментов, таким образом, продемонстрировала следующее. Фрагмент гена *penA* размером 680 п.н. (праймеры *bm1F1-bm4R1*) был обнаружен в геномах всех исследованных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia*. Специфический участок гена металло- β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*) размером 352 п.н. обнаружен также только у видов буркхольдерий. Фрагмент гена металло- β -лактамазы класса В (праймеры *bps1F3-bps1R3*) размером 727 п.н. отмечен только в штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Вариант металло- β -лактамазы (праймеры *bps3F5-bps8R5*, размер ампликона 190 п.н.) обнаруживается как у видов буркхольдерий, так и видов отдалённой гетерологии (*V. cholerae*, *P. aeruginosa*). Ген β -лактамазы класса D (праймеры *bps1F4-bps8R4*, размер ампликона 440 п.н.) был детектирован в штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*. Полученные результаты ПЦР-детекции последовательностей генов β -лактамаз различных молекулярных классов обобщены в таблице 2.

Учитывая то обстоятельство, что праймеры, специфичные генам металло- β -лактамаз (*bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4*) и оксациллиназ (*bm1F2-bm14R2*) продемонстрировали возможность дифференциации между видами буркхольдерий, относящихся к группе «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*), представлялось перспективным использовать их в формате мультилокусной ПЦР.

Детекция генов β -лактамаз у различных видов буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов

Праймеры	Виды микроорганизмов					
	<i>B. pseudomallei</i>	<i>B. mallei</i>	<i>B. thailandensis</i>	<i>B. cepacia</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>V. cholerae</i>
β -лактамазы класса А (<i>penA</i>)						
<i>bm1F1</i> <i>bm4R1</i>	+	+	+	+	-	-
β -лактамазы класса В (металло- β -лактамазы)						
<i>bm1F2</i> <i>bm14R2</i>	+	+	+	+	-	-
<i>bps1F3</i> <i>bps1R3</i>	+	+	-	-	-	-
<i>bps3F5</i> <i>bps8R5</i>	+	+	+	+	+	+
β -лактамазы класса D (<i>oxa</i>)						
<i>bps1F4</i> <i>bps8R4</i>	+	-	+	-	-	-

Результаты ПЦР (рисунок 6) продемонстрировали одновременную детекцию трёх генетических локусов с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. pseudomallei*, двух локусов с праймерами *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. thailandensis*, двух локусов с праймерами *bps1F3-bps1R3* и *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. mallei* и одного генетического локуса с праймерами *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. cepacia*.

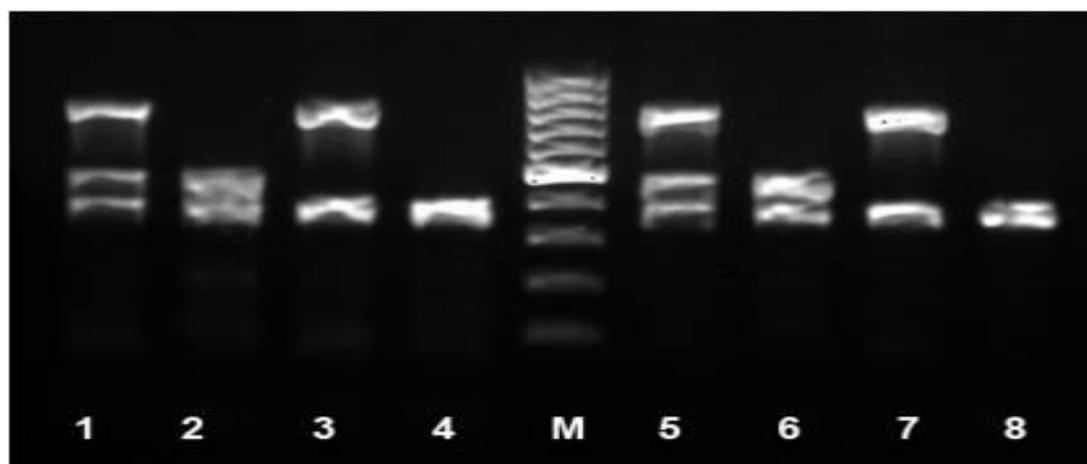


Рис. 6. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. thailandensis* E264, 3 - *B. mallei* Ц-5; 4 - *B. cepacia* 25416, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. thailandensis* E299, 7 - *B. mallei* 10230, 8 - *B. cepacia* 3189, М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

Постановка мультилокусной ПЦР на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геноваров *cepacia*-комплекса подтвердила возможность дифференциации между различными видами рода *Burkholderia* по набору генов β -лактамаз классов В и D (рисунок 7).

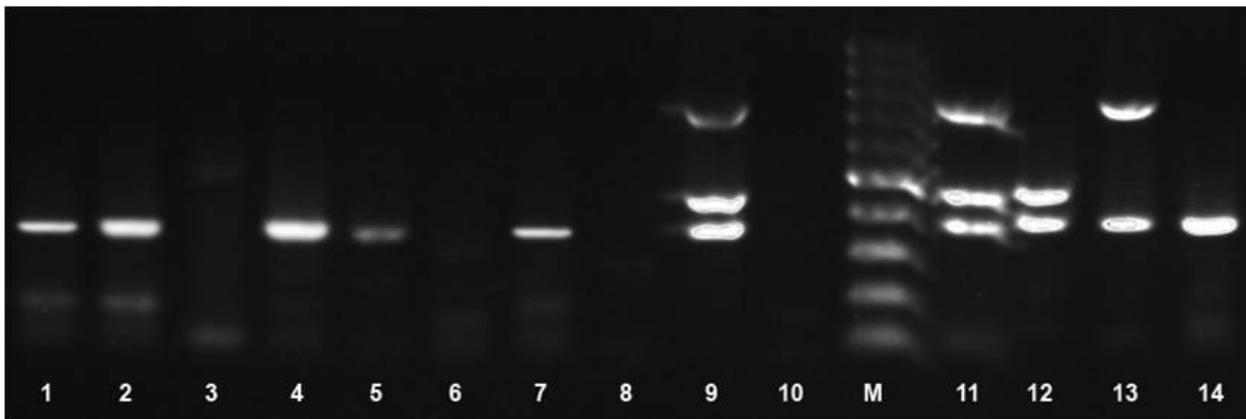


Рис. 7. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 – *B. cepacia* 323, 2 - *B. cepacia* 506, 3 - *B. cepacia* 1934, 4 - *B. cepacia* 25416, 5 - *B. cepacia* 3189, 6 - *B. cepacia* 8235, 7 - *B. cepacia* 8237, 8 - *B. cepacia* 8240, 9 - *B. pseudomallei* C141, 10 – *V. cholerae* O139 Bengal, 11 - *B. pseudomallei* 56830, 12 - *B. thailandensis* E264, 13 - *B. mallei* Ц-5, 14 - *B. cepacia* 25416. М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

Была исследована возможность использования сконструированных олигонуклеотидных затравок для детекции штаммов различных видов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям различных классов, включая препараты β -лактаманного ряда.

Результаты электрофоретического анализа специфических ампликонов генов β -лактамаз классов В и D, полученных в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*, приведены на рисунке 8.

Полученные результаты демонстрируют применимость анализируемого триплета праймеров для детекции и дифференциации не только штаммов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» дикого типа, но и их генетически изменённых вариантов – как мутантных штаммов с повышенным уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов, так и Tn-индуцированных производных со сниженной резистентностью.

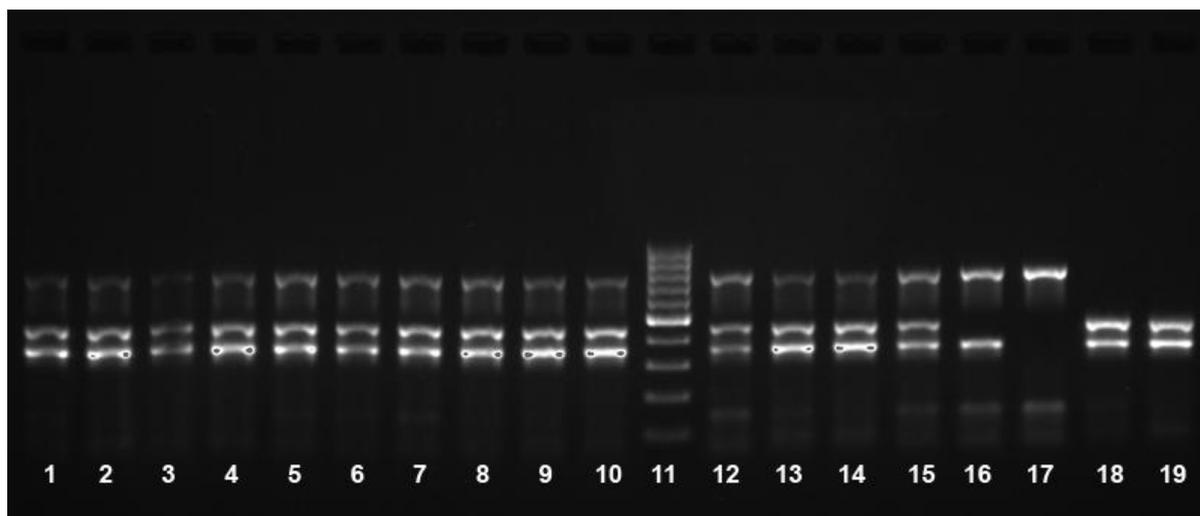


Рис. 8. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm1R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 57576 SMP, 2 - *B. pseudomallei* 57576 SMC, 3 - *B. pseudomallei* 57576 SMO, 4 - *B. pseudomallei* 57576 SMRT21, 5 - *B. pseudomallei* 57576 TTM6-1, 6 - *B. pseudomallei* 57576 TTM6-3, 7 - *B. pseudomallei* 57576 TTM7-1, 8 - *B. pseudomallei* 57576 TTM7-2, 9 - *B. pseudomallei* 57576 TTM9-1, 10 - *B. pseudomallei* 57576 TTM9-2, 11 – ДНК-леддер 100-1000 п.н., 12 - *B. pseudomallei* 56770, 13 - *B. pseudomallei* 56770 SMPC, 14 - *B. pseudomallei* 56770 SMOP, 15 - *B. pseudomallei* 56770 SMCP, 16 - *B. mallei* Ц5, 17 - *B. mallei* Ц5 SMP, 18 - *B. thailandensis* E264, 19 - *B. thailandensis* E264 SMOP.

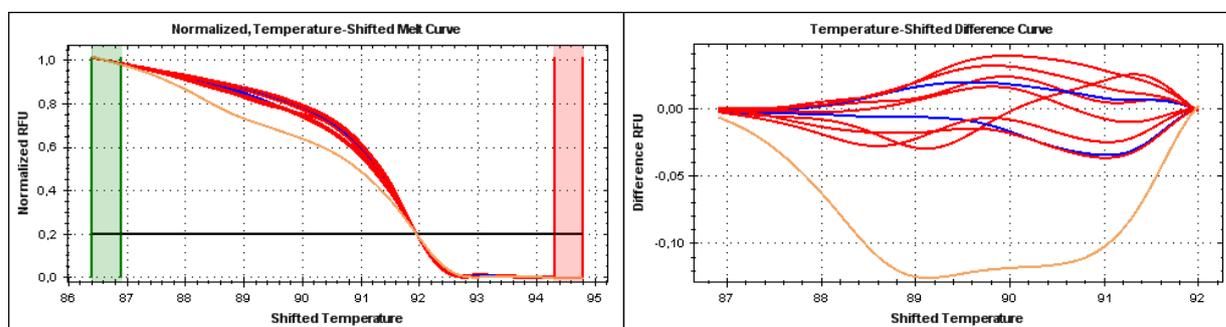
3. Разработка алгоритмов анализа полиморфизма генов β -лактамаз патогенных буркольдерий с использованием технологии плавления ампликонов с высоким разрешением (High Resolution Melting, HRM)

HRM-профилирование ампликонов гена β -лактамазы класса В, амплифицированных в ПЦР с праймерами *bm1F2-bm1R2*, показало наличие трёх аллельных вариантов данного гена в исследованных штаммах *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia* (табл. 3, рис. 9). Наиболее распространённый аллель гена (HRM-кластер 01) был детектирован в штаммах *B. pseudomallei* как юго-восточноазиатского (Вьетнам, Таиланд), так и австралийского происхождения (*B. pseudomallei* 114), а также в штамме возбудителя сапа и типовом штамме рода – *B. ceracia* 25416 (табл. 3). В исследованных штаммах *B. thailandensis* был выявлен другой аллельный вариант гена (HRM-кластер 03), кроме того, в штамме *B. pseudomallei* 56830 был отмечен уникальный аллель данного β -лактамазного гена (HRM-кластер 02), идентичный с наиболее распространённым аллельным вариантом по пику плавления, но дифференцирующийся по термодинамическим характеристикам региона плавления (табл. 3, рис. 9).

Таблица 3

Результаты HRM-анализа фрагмента гена β -лактамазы класса В, амплифицированного в ПЦР с праймерами *bm1F2-bm1R2*

Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	HRM кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	91,8	628,00	02	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	91,8	777,00	01	76,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	92,0	824,00	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	92,2	901,93	01	87,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	92,2	869,00	01	93,0
<i>B. pseudomallei</i> C141	92,0	804,00	01	89,0
<i>B. thailandensis</i> E264	91,8	664,00	03	92,0
<i>B. thailandensis</i> E299	91,8	804,98	03	96,0
<i>B. mallei</i> Ц-5	92,0	802,00	01	96,0
<i>B. cepacia</i> 25416	92,0	967,00	01	95,0



А

В

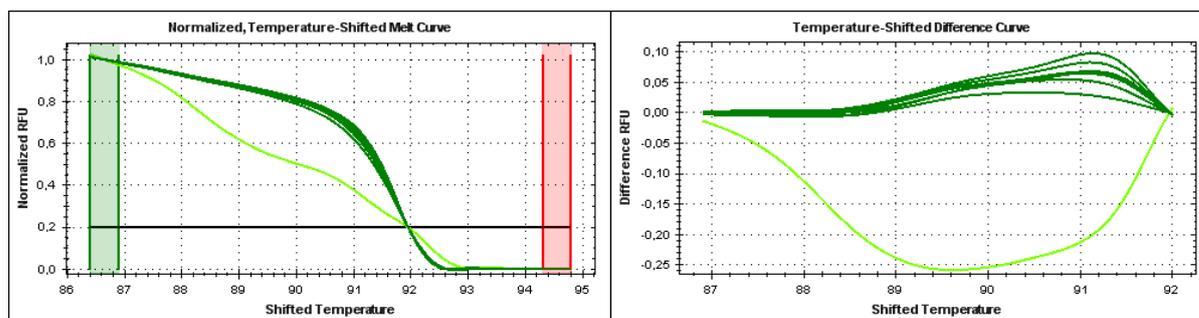
Рис. 9. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm1R2*).

HRM-анализ последовательности гена β -лактамазы класса В, амплифицированной в ПЦР спраймерами *bm1F3-bm1R3*, показал её термодинамическую однородность в исследованных штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*, что даёт основание говорить о высокой мономорфности структуры данной детерминанты у патогенных буркхольдерий (табл. 4, рис. 10).

Таблица 4

Результаты HRM-анализа фрагмента гена β -лактамазы класса В, амплифицированного в ПЦР с праймерами *bm1F3-bm1R3*

Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	HRM кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	93,00	745,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	93,00	918,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	93,00	761,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	93,00	631,46	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	93,00	856,00	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> C141	93,00	867,00	01	97,0
<i>B. mallei</i> Ц-5	93,00	736,00	01	96,0

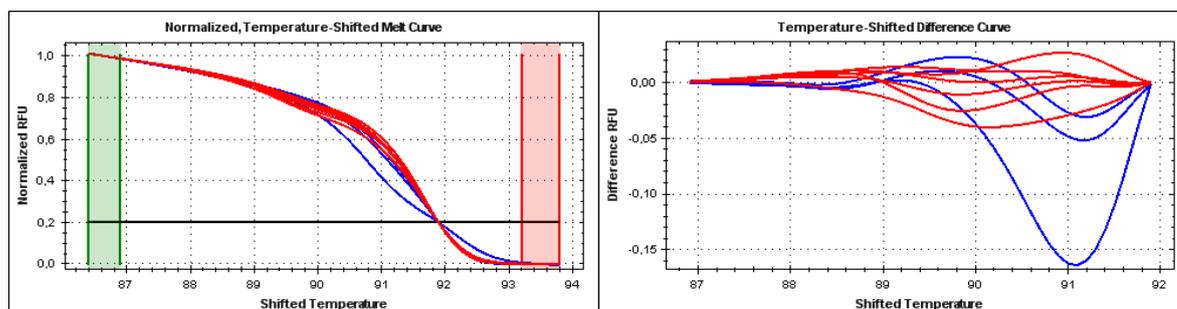


А В
Рис. 10. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*).

HRM-профилирование нуклеотидных последовательностей оксациллиназ (β -лактамазы класса D, *oxa*) продемонстрировало наличие двух аллельных вариантов гена, один из которых характерен для штаммов возбудителя мелиоидоза, а другой встречается у близкородственного *B. thailandensis* (табл. 5). Оба аллельных варианта отчётливо дифференцируются как по пику плавления, так и термодинамике melt-региона (рис. 11).

Таблица 5
Результаты HRM-анализа фрагмента гена β -лактамазы класса D (*oxa*), амплифицированного в ПЦР с праймерами *bm1F4-bm8R4*

Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	92,0	711,0	01	91,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	92,0	835,0	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	92,0	1003,0	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	92,0	900,8	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	92,0	948,0	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> C141	92,0	936,7	01	93,0
<i>B. thailandensis</i> E264	91,4	765,0	02	95,0
<i>B. thailandensis</i> E299	91,6	782,5	02	96,0



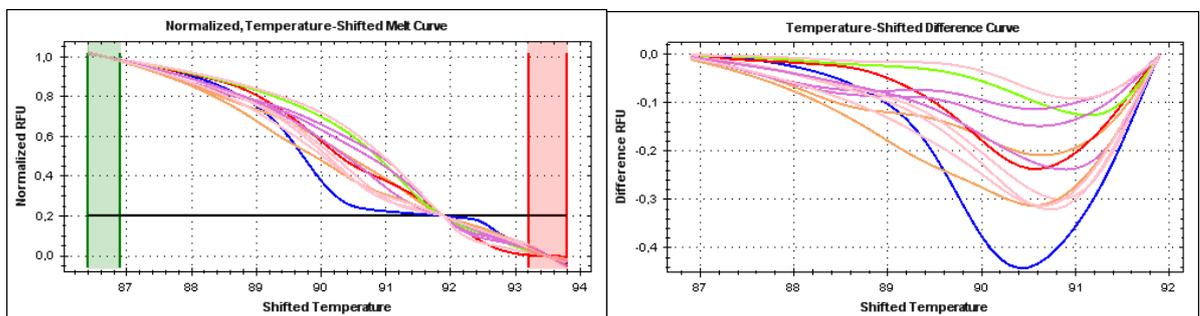
А В
Рис. 11. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса D (праймеры *bm1F4-bm8R4*).

Аmplицированная с праймерами *bm3F5-bm8R5* последовательность гена β -лактамазы класса В оказалась наиболее полиморфной по своей структуре, что подтверждается выявлением семи аллельных вариантов гена (табл. 6). Более распространённые аллельные варианты выявлены в штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis* (HRM-кластеры 01 и 03); уникальные варианты нуклеотидной последовательности анализируемого фрагмента гена детектированы в штаммах *B. mallei*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae*, а также в одном из штаммов возбудителя мелиоидоза (табл. 6, рис. 12). Данная разновидность β -лактамаз, по видимому, существенно различается по нуклеотидному составу как на межвидовом, так и межродовом уровне, что видно из сопоставления их пиков плавления и дифференцирующих melt-регионов (рис. 12).

Таблица 6

Результаты HRM-анализа фрагмента гена β -лактамазы класса В, амплифицированного в ПЦР с праймерами *bm3F5-bm8R5*

Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	89,4	580,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	89,0	460,00	02	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	89,6	627,00	03	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	89,8	768,00	01	92,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	89,6	661,00	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> C141	89,4	675,00	01	97,0
<i>B. thailandensis</i> E264	91,0	619,00	03	96,0
<i>B. thailandensis</i> E299	90,8	619,00	03	89,2
<i>B. mallei</i> Ц-5	89,4	709,00	04	84,0
<i>B. cepacia</i> 25416	90,2	552,00	05	90,3
<i>P. aeruginosa</i> 275	91,0	424,00	06	97,0
<i>V. cholerae</i> O139 Bengal	86,2	622,00	07	97,0



А

В

Рис. 12. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампиконов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*).

4. HRM анализ полиморфизма генов β -лактамаз исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к

При HRM-профилировании ампликона гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*), в сравнении с соответствующими исходными штаммами, вероятные изменения нуклеотидного состава гена были выявлены в мутантных штаммах *B. pseudomallei* 57576 SMCP, *B. pseudomallei* 56770 SMOC, *B. pseudomallei* 56770 SMCP, а также *B. mallei* Ц-5 SMP (табл. 7, рис. 13). В мутантных полирезистентных штаммах, при получении которых были использованы лишь препараты фторхинолонового ряда (за исключением *B. mallei* Ц-5 SMP), а также инсерционных мутантах со сниженной устойчивостью изменений состава нуклеотидной последовательности гена выявлено не было (табл. 7, рис. 13).

Таблица 7

HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*) у исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам

Штамм	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 57576	01	90,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPO	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP	02	88,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21	01	63,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-1	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-3	01	97,9
<i>B. pseudomallei</i> 57576 T TM7-1	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7-2	01	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-1	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-2	01	94,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770	01	93,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC	02	90,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP	03	98,0
<i>B. mallei</i> Ц-5	02	56,0
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMP	04	96,0
<i>B. thailandensis</i> E264	01	96,0
<i>B. thailandensis</i> E264 SMOP	01	96,0

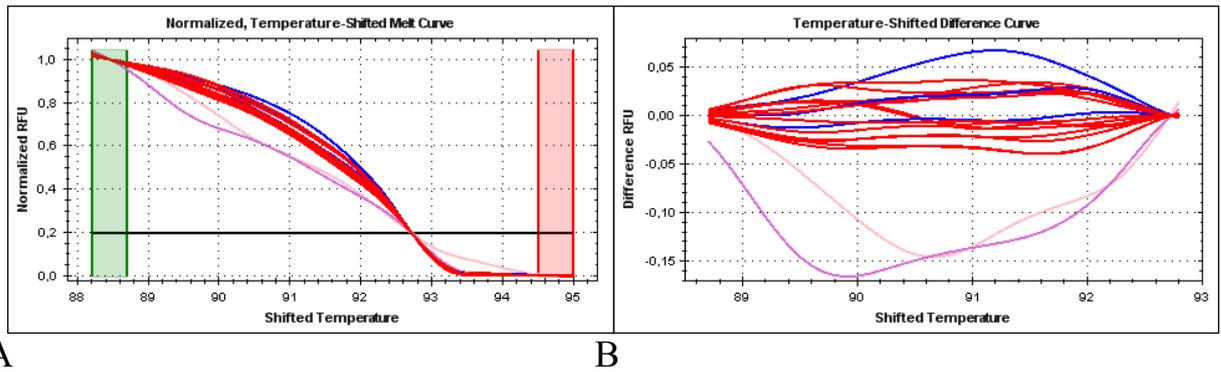


Рис. 13. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm1R2*).

Анализ регионов плавления ампликонов другого варианта гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*) в целом продемонстрировал отсутствие вариабельности структуры ДНК-фрагментов, за исключением штаммов *B. pseudomallei* 56770 SMPCи, аналогично вышеописанным результатам, - *B. mallei* Ц-5 SMP (табл. 8, рис. 14).

Таблица 8
HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*) у исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам

Штамм	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 57576	01	90,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPO	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP	01	88,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21	01	63,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-1	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-3	01	97,9
<i>B. pseudomallei</i> 57576 T TМ7-1	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TТМ7-2	01	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TТМ9-1	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TТМ9-2	01	94,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770	01	93,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC	02	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC	01	90,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP	01	98,0
<i>B. mallei</i> Ц-5	01	56,0
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMP	02	96,0

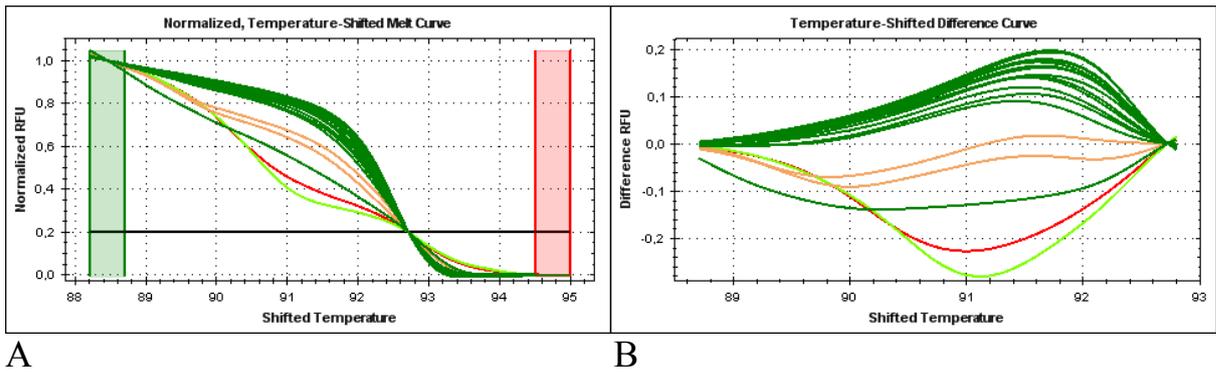


Рис. 14. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*).

Вероятные мутации гена детектированы в штаммах, при получении которых устойчивость к фторхинолонам использована либо как единственный (*B. mallei* Ц-5 SMP), либо первичный (*B. pseudomallei* 56770 SMPC) селективный маркер. Кандидатные мутантные последовательности *oxa* были обнаружены лишь у клонов *B. pseudomallei* 57576 ТТМ9, у остальных производных последовательность гена оказалась мономорфной. HRM-профили *oxa* полирезистентных производных штамма *B. pseudomallei* 56770 были идентичны с *B. pseudomallei* 57576 и его полирезистентными вариантами, melt-регион исходного штамма *B. pseudomallei* 56770 соответствовал другому кластеру (табл. 9, рис. 15).

Таблица 9

HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса D (*oxa*) (праймеры *bm1F4-bm8R4*) у исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам

Штамм	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 57576	01	99,1
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC	01	90,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPO	01	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP	01	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-1	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-3	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 T TTM7-1	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7-2	01	95,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-1	02	99,4
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-2	02	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770	03	85,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC	01	98,2
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP	01	96,0
<i>B. thailandensis</i> E264	04	99,2
<i>B. thailandensis</i> E264 SMOP	04	98,0

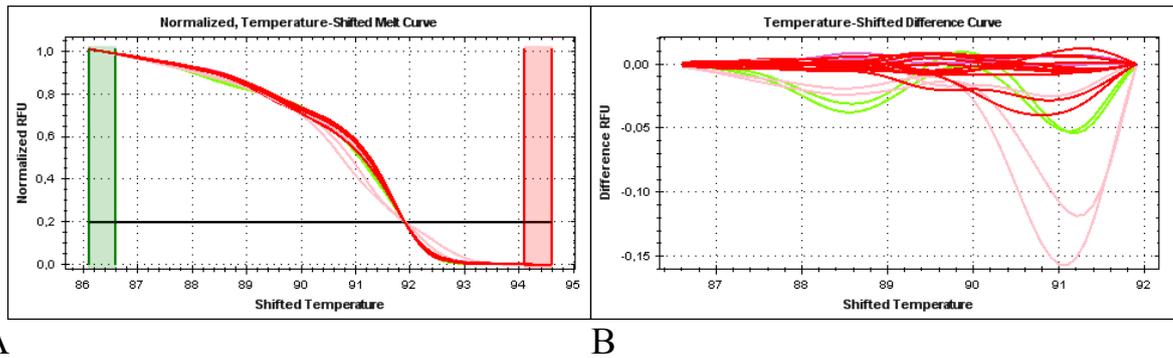
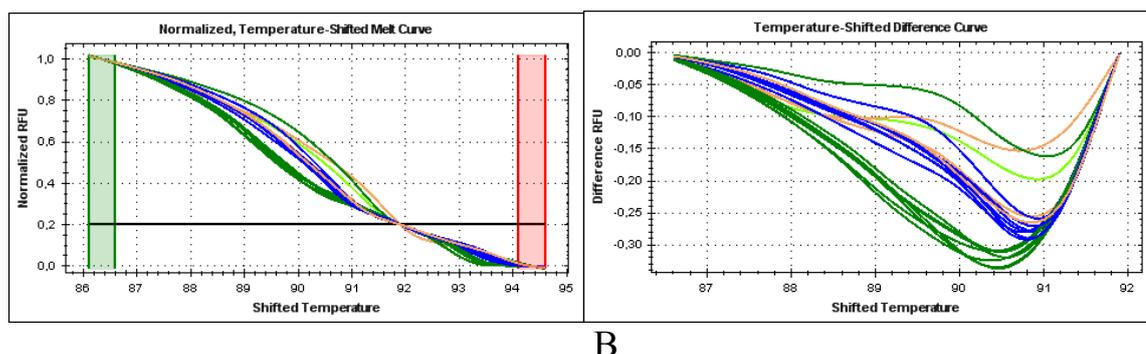


Рис. 15. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса D (*oxa*) (праймеры *bm1F4-bm8R4*).

Результаты HRM-анализа гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*) приведены в таблице 10 и на рисунке 16. HRM-профиль гена у *B. pseudomallei* 57576 образовывал единый кластер с мутантным штаммом *B. mallei* Ц-5 SMP и штаммом *B. thailandensis* E264, для остальных штаммов последовательность гена мономорфна. Выявленные отличия структуры анализируемого фрагмента гена обнаружены у Tn-индуцированных производных со сниженной устойчивостью от полирезистентных вариантов (табл. 10, рис. 16).

Таблица 10
HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*) у исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с измененной чувствительностью к антибиотикам

Штамм	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 57576	02	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC	01	97,6
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPO	01	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-1	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-3	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 T T M7-1	03	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7-2	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-1	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-2	03	98,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770	01	89,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC	01	99,0
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP	01	97,0
<i>B. mallei</i> Ц-5	03	99,0
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMP	02	98,0
<i>B. thailandensis</i> E264	02	99,0
<i>B. thailandensis</i> E264 SMOP	04	99,0



А В
Рис. 16. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*).

Таким образом, результаты проведённых исследований демонстрируют применимость HRM-анализа детектированных в ПЦР с использованием разработанных олигонуклеотидных праймеров последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов В и D для выявления аллельного полиморфизма данных детерминант в штаммах различных видов буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов. Полученные данные также свидетельствуют о принципиальной возможности использования данной аналитической технологии для скрининга вероятных мутантных последовательностей генов β -лактамаз у штаммов *Burkholderia spp.* с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям с целью их дальнейшего секвенирования и идентификации мутационных изменений. Разработанная и апробированная технология молекулярного типирования генов β -лактамаз может, по нашему мнению, найти своё применение для расширенной генетической паспортизации штаммов патогенных буркхольдерий и формирования каталогов геномных портретов изолятов ПБА I – II групп патогенности.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что гены β -лактамаз буркхольдерий кодируют ферменты, принадлежащие к β -лактамазам молекулярных классов А, В, D и относящиеся к двум суперсемействам протеинов « β -лактамазы / транспептидазы» и «металло-гидролазы / оксидоредуктазы» и семействам « β -лактамазы / D-ala карбоксипептидазы» (β -лактамазы классов А и D), « β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы», «глиоксалазы II», «PqsE-подобные металло-гидролазы», «алкилсульфатазы» и «Zn металло- β -лактамазы» (β -лактамазы класса В).
2. В процессе проведённых исследований определено: β -лактамазы класса D встречаются лишь у *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а отдельные группы металло- β -лактамаз семейств « β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы» распространены преимущественно у *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

3. Экспериментально показано, что сконструированный набор олигонуклеотидных праймеров *bm1F1 - bm4R1*, *bm1F2 - bm14R2*, *bps1F3 - bps1R3*, *bps1F4 - bps8R4*, *bps3F5 - bps8R5* применим для детекции генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий методом полимеразной цепной реакции с одновременным определением их принадлежности к молекулярным классам А, В и D.
4. Установлено, что олигонуклеотидные праймеры, специфичные генам металло- β -лактамаз (*bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4*) и оксациллиназ (*bm1F2-bm14R2*), позволяют дифференцировать в полимеразной цепной реакции виды буркхольдерий группы «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*).
5. Исследована возможность применения высокоразрешающего анализа кривых плавления (HRM) амплифицированных фрагментов генов β -лактамаз молекулярных классов В и D для выявления аллельных вариантов данных детерминант в штаммах буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов, а также для скрининга вероятных мутантных последовательностей генов β -лактамаз у штаммов с изменённой чувствительностью к препаратам β -лактаманного ряда.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Романова А.В.** Использование полимеразной цепной реакции для идентификации геномваров *Burkholderia cepacia*. Актуальные проблемы экспериментальной медицины // Материалы VI Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, ноябрь 2006 г., Волгоград – 2006. – с.37-38.
2. Ткаченко Г.А., Антонов В.А., Савченко С.С., **Романова А.В.** Генетическое типирование патогенных буркхольдерий на основе переменных ампликонов (Variable Amplicon Typing). Молекулярная диагностика // Сборник трудов VI Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 28-30 ноября, Москва, 2007 г. Т.1. – с. 416-417.
3. Антонов В.А., Савченко С.С., Алтухова В.В., Ткаченко Г.А., **Романова А.В.**, Замираев В.С., Алексеев В.В. ПЦР-типирование возбудителей сапа и мелиоидоза. Современные технологии в реализации глобальной стратегии борьбы с инфекционными болезнями на территории государств-участников Содружества Независимых Государств // Материалы IX Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ, 30 сентября – 2 октября 2008 г., Волгоград – 2008. – с.25-27.
4. **Романова А.В.**, Савченко С.С. Генетическое типирование патогенных буркхольдерий на основе переменных ампликонов (Variable Amplicon Typing) и количества tandemных повторов (Variable Tandem

Repeats). Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины // Материалы 66-ой научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием, 23-25 апреля 2008 г., Волгоград – 2008. – с.141-142.

5. **Романова А.В.** Идентификация и генетическое типирование бактерий комплекса *Burkholderia ceracia*. Актуальные проблемы экспериментальной медицины // Материалы XIII Региональной конференции молодых исследователей Волгоградской области, 11-14 ноября 2008 г. Волгоград – 2008. – с.52-53.

6. Тетерятникова Н.Н., **Романова А.В.**, Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторов Д.В. Молекулярная детекция и типирование β -лактамаз *Burkholderia spp.* Современные технологии в совершенствовании мер предупреждения и ответных действий на чрезвычайные ситуации в области общественного здравоохранения санитарно-эпидемиологического характера // Материалы XI Межгосударственной научно-практической конференции. ООО «Приволжское издательство», Саратов – 2012. – с.219-221

7. **Романова А.В.**, Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Лопастейская Я.А., Викторов Д.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий. Актуальные проблемы предупреждения и ликвидации последствий чрезвычайных ситуаций в области санитарно-эпидемиологического благополучия населения государств-участников СНГ // Материалы X Межгосударственной научно-практической конференции государств-участников СНГ, Ставрополь – 2010. – с.220-221.

8. **Романова А.В.**, Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторов Д.В. Разработка системы молекулярной детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий. Молекулярная диагностика // Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Москва – 2010. – том I, с.411-413.

9. Тетерятникова Н.Н., Захарова И.Б., Подшивалова М.В., **Романова А.В.**, Лопастейская Я.А., Викторов Д.В., Алексеев В.В. Молекулярная детекция интегронов класса 1 у *Burkholderia pseudomallei* // Проблемы особо опасных инфекций, вып.108, 2011. – с.46-49.

10. **Романова А.В.**, Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторов Д.В. Конструирование праймеров для детекции и типирования β -лактамаз патогенных видов рода *Burkholderia* // Проблемы особо опасных инфекций, 2012, 2(112) с.59-61.

11. Захарова И.Б., **Романова А.В.**, Тетерятникова Н.Н., Замараев В.С., Викторов Д.В. Молекулярное типирование и анализ полиморфизма генов β -лактамаз патогенных видов *Burkholderia* // Вестник ВолгГМУ, 2012, 2(42) с.98-101.