

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашрафян Л.А., Киселев В.И. Опухоли репродуктивных органов (этиология и патогенез). — М., 2008.
2. Берштейн Л. М. // *Практ. онкол.* — 2004. — Т. 5, № 1. — С. 1—8.
3. Киселев В. И., Сидорова И.С., Унанян А.П., Муйжнек Е.Л. Гиперпластические процессы органов женской репродуктивной системы: теория и практика. — М.: ИД «МЕДПРАКТИКА — М», 2011. — 468 с.
4. Сухих Т. Г., Чернуха Г. Е., Сметник В. П. // *Акуш. и гин.* — 2005. — № 5. — С. 25—29.
5. Ткаченко Л. В., Свиридова Н. И. // *Вестник Волгоградского медицинского университета* — 2007. — № 4 (24). — С. 3—7.
6. Ткаченко Л. В., Свиридова Н. И., Исаева Л. В., Богатырева Л. Н. // *Уральский медицинский журнал* — 2011. — № 4 (82). — С. 72—75.
7. Чернуха Г.Е. // *Акуш. и гин.* — 2009. — № 4. — С. 11—15.

8. Чиссов В. И., Старинский В. В., Петрова Г. В. Злокачественные новообразования в России в 2006 г. (Заболеваемость и смертность). — М., 2008.

9. Шешукова Н. А., Макаров И. О., Фомина М. Н. // *Акуш. и гин.* — 2011. — № 4. — С. 16—21.

10. Alteri D. C. // *Oncogene.* — 2003. — Vol. 22. — P. 85—86.

11. International collaborations in cancer control and the Third international Cancer Control Congress. Timori Milan. — 2009. — Vol. 95. — P. 579—596.

12. Zheng W., Xie D., Cerhan J. R., et al. // *Epidemiol Biomarkers Prev.* — 2001. — Vol. 10. — P. 89—94.

Контактная информация

Свиридова Наталья Ивановна — к. м. н., ассистент кафедры акушерства и гинекологии ФУВ, Волгоградский государственный медицинский университет, e-mail: ObGyn07@yandex.ru

УДК 579.84.014: 577.152

МОЛЕКУЛЯРНОЕ ТИПИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ β -ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ ВИДОВ *BURKHOLDERIA*

И. Б. Захарова, А. В. Романова, Н. Н. Тетерятникова, В. С. Замараев, Д. В. Викторов

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

Предложена схема молекулярного типирования генов устойчивости к β -лактамам патогенных буркхольдерий, основанная на генспецифической полимеразной цепной реакции и высокоразрешающем анализе плавления ампликонов. Предложенный подход позволяет определять принадлежность β -лактамаз к молекулярным классам А, В, D и проводить скрининг мутационных изменений генов β -лактамаз у штаммов, резистентных к β -лактамным соединениям.

Ключевые слова: *Burkholderia*, β -лактамазы, молекулярное типирование, полимеразная цепная реакция, высокоразрешающее плавление.

MOLECULAR TYPING AND POLYMORPHISM ANALYSIS OF β -LACTAMASE GENES IN PATHOGENIC *BURKHOLDERIA* SPECIES

I. B. Zakharova, A. V. Romanova, N. N. Teteryatnikova, V. S. Zamaraev, D. V. Viktorov

A scheme for molecular typing of β -lactamase genes in pathogenic *Burkholderia* based on specific PCR and high resolution melting of amplicons has been proposed. The proposed approach allows a detection of molecular class A, B, D β -lactamases and screening for β -lactamase mutations in resistant strains.

Key words: *Burkholderia*, β -lactamase, molecular typing, polymerase chain reaction, high resolution melting.

Характерным биологическим свойством буркхольдерий (*Burkholderia cepacia*, возбудителя сапа *B. mallei* и мелиоидоза *B. pseudomallei*) и близких им микроорганизмов является высокая природная резистентность к широкому спектру антимикробных соединений, что создает значительные трудности для эффективного лечения соответствующих заболеваний [1, 2].

Антибиотики β -лактаманного ряда стандартно используются в терапии инфекций, вызванных патогенными буркхольдериями. В секвенированных геномах патогенных буркхольдерий первично аннотированы многочисленные

последовательности генов β -лактамаз классов А, В и D [7]. Исследование данных детерминант важно как в плане более полного понимания механизмов антибиотикоустойчивости буркхольдерий, так и в аспекте совершенствования схем генодиагностики и молекулярно-эпидемиологического мониторинга полирезистентных штаммов.

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Разработка технологии молекулярного типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий и скрининга мутационных изменений генов β -лактамаз на ос-

нове мультипраймерной полимеразной цепной реакции (ПЦР) и анализа плавления ДНК-ампликонов с высоким разрешением.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн праймеров осуществлен на основе кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β-лактамаз, представленных в общедоступных генетических базах данных. Определение консервативных и переменных фрагментов нуклеотидных последовательностей генов β-лактамаз проведено с использованием процедуры множественного выравнивания по алгоритму ClustalW [9]. Подбор праймеров, комплементарных консервативным фрагментам генов, проведен с использованием программы FastPCR v.6.1.72 (PrimerDigital Ltd.). Предварительная верификация праймеров на геномных последовательностях бактерий проведена по алгоритму PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

В работе использованы штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* и ряда гетерологичных видов микроорганизмов, предоставленные коллекционным центром Волгоградского научно-исследовательского противочумного института. Бактериальные культуры выращивали на Nutrient agar (Difco) в течение 24–48 ч при 37 °С. Для выделения геномной ДНК 200 мкл бактериальной суспензии в 0,15 М NaCl pH 7,2 плотностью 2×10^9 мк/мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-HCl, 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, прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента, центрифугировали (10000 об./мин, 1 мин) и хранили до использования при -20 °С.

Для постановки ПЦР и анализа кривых плавления ДНК-фрагментов использовали амплификаторы С1000 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. Объем реакционной смеси на 1 пробу составлял 25 мкл. В состав ПЦР сме-

си 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 с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

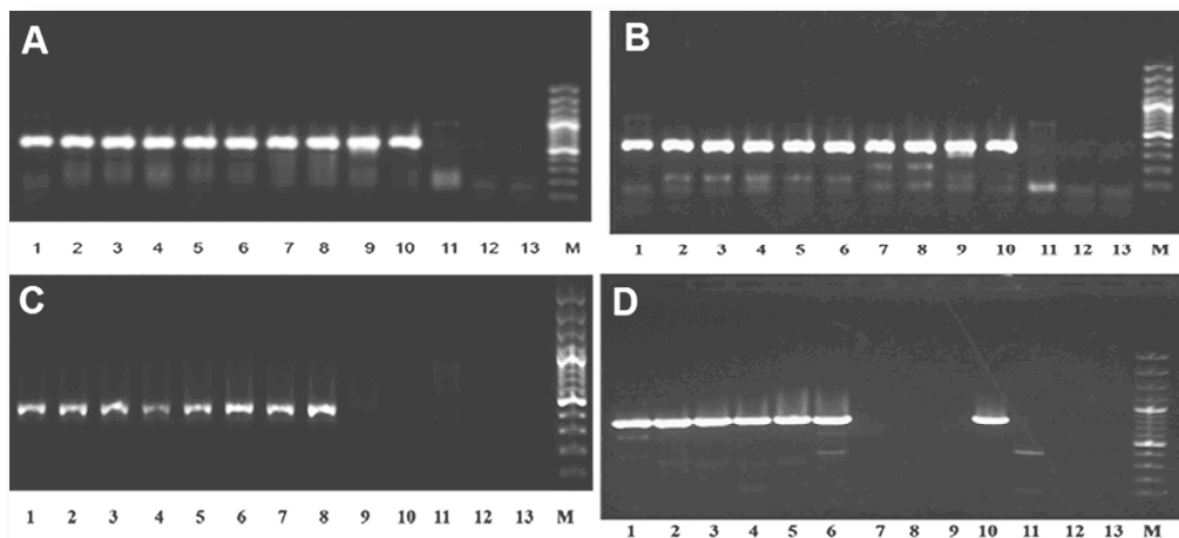
На основе анализа девяти первично аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственного непатогенного вида *B. thailandensis* (Genbank CP000011, CP000545, CP000547, CP000525, CP000572, CP000124, CP000570, BX571965, CP000085), а также 12 неаннотированных геномов данных видов микроорганизмов, представленных в GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных J. Craig Venter Institute (<http://gsc.jcvi.org/projects>) выбраны 118 кодирующих последовательностей β-лактамаз, формирующих 5 групп гомологии и относящихся к молекулярным классам А (1 группа), В (3 группы) и D (1 группа), к консервативным фрагментам которых были сконструированы 5 пар комплементарных праймеров (табл.).

Результаты ПЦР-детекции последовательностей β-лактамаз различных молекулярных классов в препаратах геномной ДНК штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, родственных видов буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов приведены на рис. 1.

Фрагмент гена *penA* размером 680 п.н. (праймеры *bm1F1-bm4R1*) 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 отда-

Праймеры для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий

Праймер	Последовательность, 5' — 3'	Генетическая мишень	Размер ампликона, п.н.
<i>bm1F1</i> <i>bm4R1</i>	TTCCCGCGATCCGCTGATGA CTTGTTGCCGAGCATCCATGC	β-лактамаза класс А, Genbank CP000547 локус BMA10247_A1040	680
<i>bm1F2</i> <i>bm14R2</i>	ACGTTCCTCGGCGGACGAAAC CCGGATGATGTTTCGAGTAGCCGTG	β-лактамаза класс В, Genbank CP000011 локус BMA_A0168	352
<i>bps1F3</i> <i>bps1R3</i>	ACGGCAATTCCTCCATTGCGA CTCGTCAGGGTTGCGTCCGGAGT	β-лактамаза класс В, Genbank PRJNA16181 локус BURPS1106B_2313)	727
<i>bps1F4</i> <i>bps8R4</i>	CGCATTCGTTTTGCTGGGTTGCAT TCTGCAGCGACGACCCGATCCA	β-лактамаза класс D Genbank PRJNA16181 локус BURPS1106B_2455	440
<i>bps3F5</i> <i>bps8R5</i>	TCTGTGGCTGCTGCGGACGAGAT GCACAGCCAGTTTCGCGAGTCCGA	β-лактамаза класс В Genbank PRJNA16181 локус BURPS1106B_A3704	190



Штаммы: 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 eltor B-139; M — ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100 — 1000 п.н.).

Рис. 1. Детекция генов β -лактамаз классов А, В и D буркхольдерий в ПЦР с праймерами *bm1F1-bm4R1* (А), *bm1F2-bm14R2* (В), *bps1F3-bps1R3* (С) и *bps1F4-bps8R4* (D)

ленной гетерологии (*V. cholerae*, *P. aeruginosa*). Ген β -лактамазы класса D (праймеры *bps1F4-bps8R4*, размер ампликона 440 п.н.) был детектирован в исследуемых штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*.

Исследование кривых плавления продуктов ПЦР с каждой из пар праймеров проведено с использованием препаратов геномных ДНК 14 коллекционных штаммов *B. pseudomallei* дикого типа и 5 мутантных штаммов с высоким уровнем резистентности к цефалоспорином III поколения (МПК > 256 мкг/мл). На рис. 2 приведены результаты определения различий в температурах плавления ампликонов, полученных в ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, специфичными фрагменту гена металло- β -лактамазы (класс В).

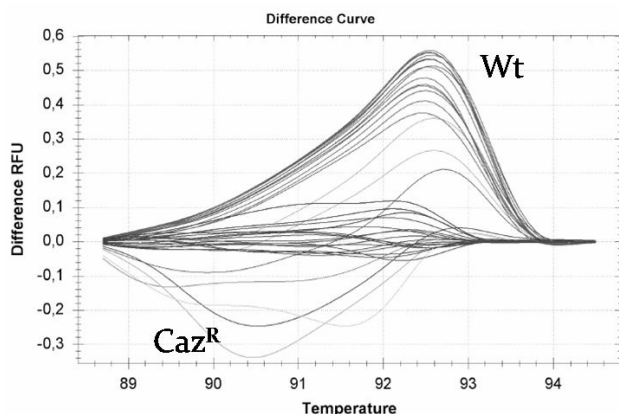


Рис. 2. Температурный сдвиг кривых плавления фрагментов гена металло- β -лактамазы (класс В), амплификация с праймерами *bps1F3-bps1R3*. Wt — исходные штаммы *B. pseudomallei*, *Caz^R* — штаммы *B. pseudomallei*, резистентные к цефтазидиму

Из приведенных данных видно, что резистентные к цефтазидиму штаммы характеризуются сходным сдвигом температуры плавления данного ампликона, что, по-видимому, является результатом однотипных нуклеотидных замен в анализируемой последовательности. По нашему мнению, данный методический подход весьма удобен для предварительного масштабного скрининга кандидатных мутантных последовательностей с целью их дальнейшего секвенирования и определения типа мутационных изменений.

Антибиотики β -лактаманного ряда, в частности цефалоспорины и карбапенемы, широко используются в схемах экстренной и пролонгированной терапии мелиоидоза и сапа, однако опыт их применения демонстрирует заметное число случаев развития резистентности возбудителя в ходе лечения [3, 5]. Ранее сообщалось, что возрастание резистентности *B. pseudomallei* к β -лактамам может быть обусловлена как расширением спектра ферментной инактивации, так и снижением чувствительности лактамаз микроба к ингибиторам [4, 10].

В ряде исследований, опубликованных ранее, была разработана методология амплификации, последующего клонирования и функциональной характеристики генов пенициллиназы (*penA*) и оксациллиназы (*oxa*) возбудителя мелиоидоза [4, 6, 8]. Предложенные авторами олигонуклеотиды фланкировали полную кодирующую последовательность генов и использовались для их клонирования и оценки характера мутационных изменений при формировании резистентности к ампициллину, оксациллину и цефтазидиму. Единого методического подхода для детекции последовательностей β -лактамаз классов А (пенициллиназы), В (металло- β -лактамазы) и D (оксациллиназы, цефа-

лоспориказы) у патогенных видов рода *Burkholderia* до настоящего времени разработано не было.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в данной работе, демонстрируют перспективность использования предложенного технологического подхода для исследования распространенности β -лактамаз молекулярных классов А, В и D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий, разработки систем генетической паспортизации штаммов возбудителей с целью решения практических задач генной диагностики и молекулярного типирования, а также экспресс-детекции возможных мутаций в генах β -лактамаз, приводящих к формированию высокого уровня устойчивости к антибиотикам β -лактаминового ряда.

ЛИТЕРАТУРА

1. Викторов Д. В., Захарова И. Б., Меринова Л. К. и др. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. — 2006. — № 1. — С. 7—11.
2. Меринова О. А., Молчанова Е. В., Захарова И. Б. и др. // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. — 2011. — № 3. — С. 72—75.
3. Chaowagul W. // Acta Trop. — 2000. — Vol. 74. — P. 133—137.

4. Cheung T., Ho P., Woo P., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2002. — Vol. 46. — P. 1132—1135.
5. Dance D. A., Wuthiekanun V., Chaowagul W., et al. // J. Antimicrob. Chemother. — 1991. — Vol. 28. — P. 321—324.
6. Ho P., Cheung T., Yam W., et al. // J Antimicrob Chemother. — 2002. — Vol. 50. — P. 723—726.
7. Holden M. T., Titball R. W., Peacock S. J., et al. // Proc Natl Acad Sci USA. — 2004. — Vol. 101. — P. 14240—14245.
8. Niumsup P., Wuthiekanun V. // J Antimicrob Chemother. — 2002. — Vol. 50. — P. 445—455.
9. Thompson J., Higgins D., Gibson T. // Nucleic Acids Res. — 1994. — Vol. 22. — P. 4673—4680.
10. Tribuddharat C., Moore R. A., Baker P., et al. // Antimicrob. Agents Chemother. — 2003. — Vol. 47. — P. 2082—2087.

Контактная информация

Замараев Валерий Семенович — д. м. н., профессор кафедры молекулярной биологии и генетики, Волгоградский государственный медицинский университет, главный научный сотрудник лаборатории функциональной геномики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, e-mail: vszamaraev@mail.ru

УДК 616 — 002.5

ОСОБЕННОСТИ КЛИНИЧЕСКОГО ТЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО МЕНИНГИТА В ВОЛГОГРАДСКОЙ ОБЛАСТИ

А. С. Борзенко, С. Г. Гагарина, Э. Н. Шмелев, А. А. Калуженина

Волгоградский государственный медицинский университет

Настоящее исследование посвящено вопросам выявления, особенностям клинического течения туберкулезного менингита и менингоэнцефалита в Волгоградской области в современных условиях. Разработан алгоритм выявления и диагностики туберкулеза центральной нервной системы в общей лечебной сети.

Ключевые слова: туберкулез, менингит.

FEATURES OF A CLINICAL COURSE AND DIAGNOSTICS OF TUBERCULAR MENINGITIS IN THE VOLGOGRAD REGION

A. S. Borzenko, S. G. Gagarina, E. N. Shmelev, A. A. Kaluzhenina

The present research is devoted to issues of identification and clinical course of tubercular meningitis and meningoencephalitis in the Volgograd region in modern conditions. An algorithm of identification and diagnostics of central nervous system tuberculosis for general medical clinical department is developed.

Key words: tuberculosis, meningitis.

Туберкулез мозговых оболочек относится к одной из наиболее тяжелых форм туберкулеза. При поздней диагностике и несвоевременно начатом лечении летальность остается высокой (47,1 %). Основой «профилактики» туберкулезного менингита и менингоэнцефалита является их раннее выявление и лечение [3]. Ранняя диагностика туберкулеза мозговых оболочек зависит от настороженности врачей общей лечебной сети, так как

большинство больных (60 %) впервые госпитализируются в инфекционные и общесоматические стационары [1, 2].

ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Изучить особенности клинического течения, диагностики туберкулезного менингита в современных условиях и выработать алгоритм его выявления в общей лечебной сети.