

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

КОНСТРУИРОВАНИЕ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ТИПИРОВАНИЯ ГЕНОВ β -ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ ВИДОВ РОДА *BURKHOLDERIA*

ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт», Волгоград

Сконструирован набор олигонуклеотидных праймеров для проведения экспресс-оценки наличия детерминант устойчивости к β -лактамам у изолятов патогенных буркхольдерий методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с одновременным определением принадлежности выявленных β -лактамаз к определенному молекулярному классу. ПЦР с праймерами, специфичными последовательностям генов металло- β -лактамаз (класс В β -лактамазы), и оксациллиназ семейства D-ala карбоксипептидаз (класс D β -лактамазы) позволяет дифференцировать между собой виды *Burkholderia* группы «pseudomallei».

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

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

Design of Primers for Detection and Typing of β -Lactamase Genes from Pathogenic Species of *Burkholderia*

Volgograd Anti-Plague Research Institute, Volgograd

The set of oligonucleotide primers was designed to identify β -lactam-resistance determinants in isolates of pathogenic *Burkholderia* using PCR. Simultaneously identified was certain molecular class of detected β -lactamases. PCR with primers specific to metallo- β -lactamase (class B) and oxacillinase of D-ala carboxypeptidase family (class D of β -lactamase) gene sequences allowed to differentiate among «pseudomallei» group of *Burkholderia* species.

Key words: *Burkholderia*, β -lactamases, molecular typing, polymerase chain reaction.

Возбудители особо опасных инфекций – сапа (*Burkholderia mallei*) и мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – аэробные грамотрицательные неферментирующие бактерии, принадлежащие к роду *Burkholderia* β -подкласса протеобактерий семейства *Burkholderiaceae*. В настоящее время род *Burkholderia* включает более 50 видов микроорганизмов и представляет собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. Характерным биологическим свойством патогенных буркхольдерий и близких им микроорганизмов является высокая природная резистентность к широкому спектру антимикробных соединений, что создает значительные трудности для эффективного лечения соответствующих заболеваний.

В геномах патогенных буркхольдерий первично аннотированы многочисленные последовательности β -лактамаз классов А, В и D [7, 8]. Очевидно, что исследование данных детерминант важно как в плане более полного понимания механизмов антибиотикоустойчивости буркхольдерий, так и в аспекте совершенствования схем лечения вызываемых ими инфекций, генодиагностики и молекулярно-эпидемиологического мониторинга штаммов возбудителей.

Материалы и методы

Дизайн праймеров осуществлен на основе кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β -лактамаз, представленных в общедоступных генетических базах данных.

Принадлежность генов β -лактамаз буркхольде-

рий к различным молекулярным классам оценена с помощью базы данных InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan). Определение консервативных и переменных фрагментов сиквенсов проведено с использованием процедуры множественного выравнивания по алгоритму W.Clustal [10]. Консервативные аминокислотные мотивы β -лактамаз анализировали средствами сервера ТМНММ v. 2.0 (www.cbs.dtu.dk/services/ТМНММ).

Подбор праймеров, комплементарных консервативным фрагментам нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз, проведен с использованием программы FastPCR v. 6.1.72 (PrimerDigital Ltd.). Предварительная верификация полученных вариантов праймеров проведена на геномных сиквенсах бактерий с использованием сервиса PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

Для выделения ДНК использовали штаммы *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, *B. cepacia* и ряда гетерологичных видов микроорганизмов из коллекции ФКУЗ Волгоградский НИПЧИ. Культуры микроорганизмов 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 (рН 7,2) плотностью $2 \cdot 10^9$ м.к./мл смешивали с равным объемом лизирующего буфера (20 мМ трис-НСl, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 0,2 мг/мл желатина, 0,9 % Nonidet P-40, 0,9 % Твин 20, 150 мкг/мл протеиназы К), инкубировали при 65 °С 120 мин, прогревали при 96 °С 30 мин для инактивации фермента, центрифугировали (10000 об./мин, 1 мин) и хранили до использования при –20 °С.

Аmplификацию проводили на приборе С1000

Характеристика сконструированных олигонуклеотидных праймеров для детекции и типирования генов β-лактамаз патогенных буркхольдерий

Праймер	Последовательность, 5' – 3'	Генетическая мишень	Локализация	Размер ампликона, п.н.
<i>bm1F1</i> <i>bm4R1</i>	ttcccgcgatccgcctgatga cttggtccgagcatccatgc	Ген β-лактамазы класса А <i>Burkholderia mallei</i> 10247 (Genbank access. CP000547 локус BMA10247_A1040)	41–61 нуклеотид 700–720 нуклеотид	680
<i>bm1F2</i> <i>bm14R2</i>	acgttctcggcgcgacggaaac ccgatgatgtttcagtagccgtg	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia mallei</i> ATCC 23344 (Genbank access. CP000011 локус BMA_A0168)	10–32 нуклеотид 337–361 нуклеотид	352
<i>bps1F3</i> <i>bps1R3</i>	acggcaattctcattgcga ctcgtcagggttcgctccggagt	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_2313)	9–29 нуклеотид 713–735 нуклеотид	727
<i>bps1F4</i> <i>bps8R4</i>	cgcatctgtttctggtggtcat tctgcagcgacgacgcatcca	Ген β-лактамазы класса D <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_2455)	27–50 нуклеотид 445–466 нуклеотид	440
<i>bps3F5</i> <i>bps8R5</i>	tctgtggctgctgcgacgagat gcacagccagttcgcgagtcga	Ген β-лактамазы класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локус BURPS1106B_A3704)	132–155 нуклеотид 299–321 нуклеотид	190

(«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 реакционной смеси входили праймеры в конечной концентрации 15 пМ, 1 ед. *DiaTaq* ДНК-полимеразы и 1-ПЦР-буфер с дНТФ и MgCl₂ (ИнтерЛабСервис, Россия). Анализируемые препараты геномной ДНК вносили в реакционную смесь в объеме 1 мкл. Продукты ПЦР анализировали с помощью электрофореза в 1,5 % агарозном геле и визуализировали окрашиванием бромистым этидием.

Результаты и обсуждение

Выбор кодирующих последовательностей генов *Burkholderia*, гомологичных генам β-лактамаз был проведен на основе анализа девяти первично аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственного непатогенного вида *B. thailandensis* (Genbank access. CP000011, CP000545, CP000547, CP000525, CP000572, CP000124, CP000570, BX571965, CP000085), 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.jvci.org/projects>).

В результате было выбрано 118 кодирующих последовательностей β-лактамаз, формирующих 5 групп гомологии и относящихся к молекулярным классам А

(1 группа), В (3 группы) и D (1 группа). Далее было сгенерировано 42 пары олигонуклеотидных праймеров, комплементарных консервативным фрагментам генов β-лактамаз, входящих в данные группы гомологии. Анализ специфичности всех предварительных вариантов олигонуклеотидов *in silico* в PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) позволил сформировать набор из 5 пар олигонуклеотидов, комплементарных фрагментам генов классов А, В и D буркхольдерий и имеющих практически идентичную температуру отжига (таблица).

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 отдаленной 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*.

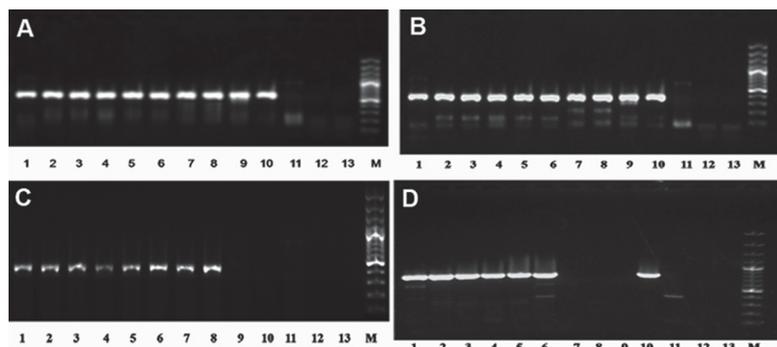


Рис. 1. Детекция генов β-лактамаз классов А, В и D буркхольдерий в ПЦР с праймерами *bm1F1-bm4R1* (А), *bm1F2-bm14R2* (В), *bps1F3-bps1R3* (С) и *bps1F4-bps8R4* (D):

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* 11-54; 10 – *B. cepacia* 25416; 11 – *P. aeruginosa* 215; 12 – *V. cholerae* O139 Bengal; 13 – *V. cholerae* O1 E1 Tor B-139; М – ДНК леддер с шагом 100 п.н. (100–1000 п.н.).

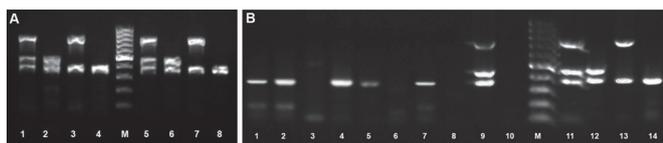


Рис. 2. Детекция генов β-лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*:

A: 1 – *B. pseudomallei* 56830; 2 – *B. thailandensis* E264; 3 – *B. mallei* П-5; 4 – *B. cepacia* 25416; 5 – *B. pseudomallei* 139; 6 – *B. thailandensis* E299; 7 – *B. mallei* 10230; 8 – *B. cepacia* 3189.
 B: 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* П-5; 14 – *B. cepacia* 25416; M – ДНК лидер с шагом 100 п.н. (100–1000 п.н.)

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. Для постановки ПЦР в мультилокусном варианте данные три пары праймеров были использованы в эквимольном количестве (по 5 пМ).

Результаты ПЦР (рис. 2, А) продемонстрировали одновременную детекцию трех 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 1 генетического локуса с праймерами *bm1F2-bm14R2* в штаммах *B. cepacia*. 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 (рис. 2, В).

Антибиотики β-лактаманной группы, в частности, цефалоспориновые и карбапенемовые соединения, стандартно используются в существующих схемах экстренной и пролонгированной терапии мелиоидоза и сапа. Опыт их применения в лечении больных мелиоидозом демонстрирует заметное число случаев развития резистентности возбудителя в ходе лечения и фатального исхода заболевания [2, 4, 5, 12]. Участие и роль собственных β-лактамаз мелиоидозного и сапного микробов в развитии устойчивости к антибиотикам β-лактаманной группы чрезвычайно мало освещены в современной научной периодике. 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, например клавулановой кислоте [3, 11].

Ранее были сконструированы праймеры, использованные для амплификации, последующего клонирования и функциональной характеристики

генов пенициллиназы (*penA*) и оксациллиназы (*oxa*) возбудителя мелиоидоза [3, 6, 9]. Предложенные авторами олигонуклеотиды фланкировали полную кодирующую последовательность соответствующих генов и использовались для их клонирования и оценки характера мутационных изменений при формировании резистентности к ампициллину, оксациллину и цефтазидиму. Единого набора олигонуклеотидных праймеров для детекции последовательностей β-лактамаз классов А (пенициллиназы), В (металло-β-лактамазы) и D (оксациллиназы, цефалоспориноазы) у патогенных видов рода *Burkholderia* до настоящего времени не разработано.

Результаты, полученные в настоящей работе, демонстрируют перспективность использования сконструированного набора праймеров для исследования распространенности β-лактамаз молекулярных классов А, В и D в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и родственных буркхольдерий, а также разработки систем генетической паспортизации штаммов возбудителей с целью решения практических задач генной диагностики и молекулярного типирования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ambler R. The structure of β-lactamases. Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.) 1980; 289:321–31.
2. Chaowagul W. Recent advances in the treatment of severe melioidosis. Acta Trop. 2000; 74:133–7.
3. Cheung T., Ho P., Yuen K., Chau P. Cloning and expression of class A β-lactamase gene *bla*_{BPS} in *Burkholderia pseudomallei*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002; 46:1132–5.
4. Dance D.A., Wuthiekanun V., Chaowagul W., Suputtamongkol Y., White N.J. Development of resistance to ceftazidime and co-amoxiclav in *Pseudomonas pseudomallei*. J. Antimicrob. Chemother. 1991; 28:321–4.
5. Dance D.A., Wuthiekanun V., Chaowagul W., White N.J. The antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas pseudomallei*. Emergence of resistance in vitro and during treatment. Antimicrob. Chemother. 1989; 24:295–309.
6. Ho P., Cheung T., Yam W., Yuen K. Characterization of a laboratory-generated variant of BPS β-lactamase from *Burkholderia pseudomallei* that hydrolyses ceftazidime. Antimicrob. Chemother. 2002; 250:723–6.
7. Holden M.T., Titball R.W., Peacock S.J., Cerdeno-Tarraga A.M., Atkins T. et al. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei*. Proc. Natl Acad. Sci USA. 2004; 101:14240–5.
8. Nierman W.C., DeShazer D., Kim H.S., Tettelin H., Nelson K.E. Structural flexibility in the *Burkholderia mallei* genome. Proc. Natl Acad. Sci USA. 2004; 101:14246–51.
9. Niomsup P., Wuthiekanun V. Cloning of the class D β-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and resistant strains. J. Antimicrob. Chemother. 2002; 50:445–55.
10. Thompson J., Higgins D., Gibson T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673–80.
11. Tribuddharat C., Moore R.A., Baker P., Woods D.E. *Burkholderia pseudomallei* class A beta-lactamase mutations that confer selective resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition. Antimicrob. Agents Chemother. 2003; 47:2082–7.
12. White N.J., Dance D.A., Chaowagul W., Wattanagoon Y., Wuthiekanun V., Pitakwatchara N. Halving of mortality of severe melioidosis by ceftazidime. Lancet. 1989; 2(8665):697–701.

Authors:

Romanova A.V., Zakharova I.B., Zamaraev V.S., Viktorov D.V. Volgograd Research Anti-Plague Institute. 7, Golubinskaya St., Volgograd, 400131, Russia. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru

Об авторах:

Романова А.В., Захарова И.Б., Замараев В.С., Викторов Д.В. Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт. 400131, Волгоград, ул. Голубинская, 7. E-mail: vari2@sprint-v.com.ru