

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
(ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора)

На правах рукописи

Шунова Александра Владимировна

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

03.02.03 – микробиология

Д и с с е р т а ц и я

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук,
доцент Викторов Д.В.

Волгоград – 2014

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1 Характеристика возбудителей сапа и мелиоидоза.....	11
1.2 Устойчивость патогенных буркхольдерий к антимикробным соединениям.....	17
1.3 Механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам β -лактамной группы.....	19
1.4 Бактериальные β -лактамазы: классификация, функциональная роль и молекулярный анализ.....	23
1.5 β -лактамазы патогенных буркхольдерий.....	45
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	50
2.1 Штаммы микроорганизмов рода <i>Burkholderia</i> , использованные в работе, питательные среды и условия культивирования.....	50
2.2 Антимикробные препараты и методы определения чувствительности.....	52
2.3 Выделение геномной ДНК.....	52
2.4 Методы анализа геномных последовательностей.....	53
2.5 Постановка полимеразной цепной реакции.....	54
2.6 Методы детекции продуктов амплификации ДНК.....	55
2.7 Статистическая обработка данных.....	56
ГЛАВА 3. КОНСТРУИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ β-ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ.....	57
3.1 Сравнительная характеристика нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз и их предполагаемых продуктов.....	57
3.2 Выбор консервативных дифференцирующих участков нуклеотидных последовательностей β -лактамаз классов А, В и D и конструирование олигонуклеотидных праймеров для их детекции.....	64

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЕННОСТИ β-ЛАКТАМАЗ КЛАССОВ А, В И D В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ.....	67
4.1 ПЦР-детекция последовательностей генов β-лактамаз в коллекционных штаммах патогенных буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов.....	67
4.2 Анализ эффективности использования сконструированного набора олигонуклеотидов в формате мультилокусной ПЦР.....	71
4.3 Использование сконструированных олигонуклеотидов для молекулярно-генетического анализа штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам.....	73
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕ-НОВ β-ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ПЛАВЛЕНИЯ АМПЛИКОНОВ С ВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ (HIGH RESOLUTION MELTING, HRM).....	76
5.1 HRM-анализ полиморфизма генов β-лактамаз в штаммах буркхольдерий группы «<i>pseudomallei</i>» и гетерологичных микроорганизмов.....	77
5.2 HRM-анализ полиморфизма генов β-лактамаз исходных и мутантных штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам.....	83
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	90
ВЫВОДЫ.....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	101

ВВЕДЕНИЕ

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 анти-

бактериальным агентам, в первую очередь – молекулярно-генетических механизмов формирования резистентности.

Степень научной разработанности темы

Антибактериальные соединения β -лактамной группы, в частности, цефалоспорины и карбапенемы, 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.V., 2000; Dance D.A.V. 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. В геномах патогенных буркхольдерий первично аннотированы многочисленные последовательности генов β -лактамаз молекулярных классов А, В и D. Структурно-функциональный анализ данных последовательностей 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

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

Проведена сравнительная характеристика нуклеотидных последовательностей генов хромосомных β -лактамаз патогенных буркхольдерий и их предполагаемых продуктов с использованием биоинформационного программного обеспе-

чения 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* КМ31 – 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 на-

учно-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-метаболизующие 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-метаболизующие 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. Высокорастворяющий 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

Диссертация выполнена на основе четырёх плановых тем НИР, в одной из которых соискатель являлся ответственным исполнителем. Основные результаты исследований изложены в 11 опубликованных работах, из них 3 – в изданиях, входящих в перечень ВАК, а также двух патентах РФ на изобретение.

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» (Оболensk, 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).

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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика возбудителей сапа и мелиоидоза

Возбудитель сапа (*Burkholderia mallei*) и возбудитель мелиоидоза (*Burkholderia pseudomallei*) – грамотрицательные аэробные неферментирующие бактерии, относятся к роду *Burkholderia*. Буркхольдерии способны использовать нитрат как альтернативный акцептор электронов, продуцируют каталазу, проявляют варьирующую оксидазную активность. *Burkholderia spp.* являются хемоорганотрофами, в качестве единственного источника углерода и энергии способны окислять и ассимилировать различные моно-, дисахариды и многоатомные спирты. Содержание ГЦ-пар в ДНК буркхольдерий колеблется в диапазоне 64,0 – 68,3 %. Типовым видом является *Burkholderia cepacia*. Бактерии данного рода обитают в почве, ризосфере растений, многие виды являются патогенными для растений и животных (Brisse S. et al., 2000).

В 1992 году в род *Burkholderia* было предложено объединить семь видов рода *Pseudomonas* (*P. cepacia*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*, *P. caryophylli*, *P. gladioli*, *P. pickettii* и *P. solanacearum*), которые ранее относились ко II группе рРНК-ДНК гомологии (Palleroni N. et al., 1972; Palleroni N. et al., 1979). Yabuuchi и соавторы выделили данные микроорганизмы в отдельный род на основании сходства последовательностей генов 16S рРНК, степени ДНК-ДНК гомологии, липидных и жирнокислотных спектров, а также ряда фенотипических признаков (Yabuuchi E. et al., 1992). Своё название род получил в честь американского бактериолога W.H.Burkholder, описавшего в 1950 г. микроорганизм – возбудитель бактериальной гнили лука (*P. cepacia*).

В соответствии с современными представлениями, род *Burkholderia* принадлежит семейству *Burkholderiaceae*, входящему в порядок *Burkholderiales* класса *Betaproteobacteria*, и включает в себя более 50 видов микроорганизмов (Garrity G.M. et al., 2002).

Род *Burkholderia* представляет собой достаточно гетерогенную по составу таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. Сравнительный анализ наиболее консервативных последовательностей геномов буркхольдерий (Coenye T. et al., 2001) показывает, что бактерии этого рода формируют несколько филогенетически связанных групп – виды комплекса «*ceracia*», группу «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*), виды, близкие *B. gladioli* (*B. plantarii*, *B. glumae*), а также группу «*graminis*» (*B. graminis*, *B. caledonica*, *B. fungorum*, *B. caribensis* и ряд других видов).

Наиболее высокой генетической гетерогенностью характеризуются микроорганизмы комплекса «*ceracia*» и группы «*graminis*», об этом свидетельствуют результаты риботипирования, анализа полиморфных последовательностей ДНК, изучения полиморфизмов *гесА* и сиквенс-типирования консервативных генов «домашнего хозяйства» (housekeeping genes) (Brisse S. et al., 2000; Mahenthiralingam E. et al., 2000).

В 1995 году были опубликованы результаты физического картирования генома типового штамма *B. ceracia* ATCC25416 (Rodley P.D. et al., 1995). По данным авторов, геном данного штамма имел совокупный размер 8,1 Mbp и представлял собой четыре кольцевых репликона размерами 3,65 Mbp, 3,17 Mbp, 1,07 Mbp и 200 kbp. Было выявлено, что три наиболее крупных репликона являются хромосомными репликонами и несут последовательности генов рибосомальных РНК. Таким образом, геном микроорганизма представлен тремя хромосомами и одной мегаплазмидой (Rodley P.D. et al., 1995).

В 2000 году Songsivilai и Dharakul представили проведённые в рамках Siriraj *Burkholderia pseudomallei* Genome Project результаты исследований геномной организации возбудителя мелиоидоза (Songsivilai S. et al., 2000). По данным этих исследований, геном штамма *B. pseudomallei* K96243 размером 6,5 Mbp состоит из двух кольцевых репликонов размерами 3,6 и 2,9 Mbp, каждый из которых несёт гены рибосомальных РНК. Два хромосомных репликона несколько меньшего размера обнаружены также у близкородственного вида *B. thailandensis* (Songsivilai

S. et al., 2000). Содержание ГЦ-пар в геноме *B. pseudomallei* составляло в среднем 65,7 %, часть предполагаемых кодирующих последовательностей при этом составляла около 89 % от общего объёма генома микроорганизма (Songsivilai S. et al., 2000).

С 2000 года проект по секвенированию и аннотации генома *B. pseudomallei* стал координироваться Wellcome Trust Sanger Institute (Великобритания), а итоги выполнения проекта опубликованы в 2004 году. Было установлено, что геном *B. pseudomallei* (штамм K96243) представлен двумя хромосомами размером 4,07 Мбр и 3,17 Мбр, суммарный размер составляет – 7,24 Мбр. Одной из характерных особенностей геномной структуры *B. pseudomallei* является наличие так называемых «геномных островов» (genomic islands, GI) - участков, которые заметно отличаются по ГЦ-составу от остальной части генома и в сумме составляют 6,1 % генома (Holden M.T.G et al., 2004).

В Institute for Genomic Research (Rockville, США) осуществлялся параллельный проект по секвенированию генома *B. mallei* (штамм *B. mallei* ATCC23344), результаты работ также были представлены в печати в 2004 году (Nierman W. et al., 2004). Выявлено, что геном *B. mallei* состоит из двух кольцевых хромосомных репликонов – 3,5 Мбр и 2,3 Мбр. В составе генома *B. mallei* были обнаружены многочисленные инсерционные последовательности (IS) и простые нуклеотидные повторы, предположительно имеющие отношение к регуляции экспрессии тех или иных генов микроорганизма (Nierman W. et al., 2004).

Мелиоидоз – инфекционное заболевание, распространённое в природе в пределах определённых географических границ (регионы с влажным субтропическим климатом). Само заболевание и свойства его возбудителя *Burkholderia pseudomallei* впервые описаны в 1912 году английским патологом Alfred Whitmore. Окончательное название – мелиоидоз (сапоподобное заболевание) было дано А. Stanton и W. Fletcher в 1921 году (Илюхин В.И., 1999; Илюхин В.И. и др., 1995; Илюхин В.И. и др., 1998; Смирнов В.В. и др., 1990; Whitmore A. et al., 1992).

В течение длительного времени существовало твёрдое убеждение, что ме-

лиоидоз эндемичен лишь для влажных субтропиков стран Юго-Восточной Азии. Регистрация единичных случаев в Австралии, странах Южной Америки и Западной Африки рассматривалась как последствия пребывания людей на эндемичных территориях или ввоза инфицированных животных. Но в 70-х годах XX в. произошло существенное изменение точки зрения по поводу географии и эпидемиологии этой инфекции. Заболевание мелиоидозом людей и животных и выделение культур *B. pseudomallei* из внешней среды в Австралии, Чили, Сальвадоре, Франции (White N.J., 2003), Италии и других странах показали всю серьёзность проблемы диагностики, лечения при почти непредсказуемых последствиях завоза возбудителя в страны с умеренным климатом (White N.J., 2003). За последние годы случаи мелиоидоза зарегистрированы практически во всех странах Западной Европы, включая Скандинавию, среди лиц, побывавших в качестве туристов или специалистов в эндемичных зонах.

При несвоевременно начатой терапии у больных септической и лёгочной формой мелиоидоза летальность превышает 90 %, а при лечении самыми современными препаратами в клинических условиях – более 40 %.

В России и странах бывшего СССР, до сих пор не зарегистрировано ни одного достоверного случая мелиоидоза. Однако существование эндемичных очагов на прилегающих территориях (Иран, Турция, Китай) и наличие обширной сети экономических и культурных контактов со странами Юго-Восточной Азии, Центральной Америки и Африки обуславливают необходимость определённой настороженности со стороны медицинской и ветеринарной служб нашей страны к возможным случаям появления этого заболевания.

Возбудитель мелиоидоза *B. pseudomallei* имеет форму тонкой палочки с закруглёнными концами размером 0,5-0,8 – 2-6 мкм, встречаются также коккобациллярные и нитевидные формы микроба. Спор не образует. Клетки микроорганизма подвижны за счёт наличия нескольких жгутиков на одном конце (Илюхин В.И., 1999; Илюхин В.И. и др., 1995; White N.J., 2003).

B. pseudomallei является факультативным аэробом, растёт при температуре 37 °С на простых питательных средах. Усилению роста способствует добавление

глицерина в питательную среду. В присутствии нитрата способен расти в анаэробных условиях. В отличие от *B. mallei*, растёт при температуре 42 °С. При культивировании в бульоне, к концу первых суток даёт помутнение с образованием нежной слизистой плёнки с более толстым пристеночным ободком. Плёнка быстро увеличивается в объёме (толщина – до 1 мм), приобретает серовато-жёлтый цвет. При старении культуры на дне пробирки образуется слизистый осадок. На плотных питательных средах выявляется морфологическая диссоциация колоний (S и R). S-форма – колонии вначале выпуклые, круглые, прозрачные, с ровными краями, к исходу вторых суток они достигают диаметра 1–3 мм и начинают диссоциировать: поверхность – шероховатая, становятся серовато-белыми с металлическим блеском, теряют прозрачность. В отдельных случаях регистрируется появление мукоидных колоний. При сливном росте наблюдается блестящий, гладкий, непрозрачный, слизистый налёт, приподнимающийся над поверхностью агара. R-форма – серовато-серые непрозрачные колонии с морщинистой поверхностью и неровным зубчатым краем, диаметром 2–4 мм. На скошенном агаре образуется морщинистый, непрозрачный, сухой налёт серовато-белого цвета. При культивировании на среде Эшдауна колонии *B. pseudomallei* приобретают тёмно-красный цвет за счёт сорбции из среды нейтрального красного, вокруг колоний наблюдается зона просветления. *B. pseudomallei* устойчив к гентамицину и полимиксину.

Возбудителя мелиоидоза обладает достаточно сложной антигенной структурой. У микроба выявлены четыре типа антигенов: жгутиковый (H), соматический (O), оболочечный (K) и слизистый (M). В составе соматических O-антигенов имеются компоненты, близкородственные антигенам возбудителя сапа (Илюхин В.И. и др., 1995).

B. pseudomallei является патогенным для человека, обезьян, диких грызунов (хомяков, хорьков, крыс, мышей) и лабораторных животных (кроликов, морских свинок, белых крыс и мышей). При внутрибрюшинном заражении морских свинок (самцов) может наблюдаться скротальная реакция (феномен Штрауса).

Возбудитель мелиоидоза устойчив к высушиванию. При температуре 58 °С погибает в течение 15 минут, на холоде – при температуре минус 4 °С, сохраняет

жизнеспособность до 2–3 недель. Остаётся жизнеспособным в воде до 44 дней, в гниющих материалах – от 8 до 27 дней. Дезинфицирующие средства убивают палочки мелиоидоза в течение одних суток. По многим свойствам (морфологическим, биологическим и особенно антигенным) возбудитель мелиоидоза сходен с бактериями сапа.

На территории России в настоящее время сап официально не регистрируется. Но существует вероятность заноса этой инфекции ввиду того, что возбудитель её постоянно циркулирует в ряде регионов (Монголия, Турция, Иран, страны Персидского залива, Латинская Америка), поражая людей, домашних и диких животных (Смирнов В.В. и др, 1990; Храпова Н.П. и др., 1995).

Возбудитель сапа *B. mallei* вызывает у человека и довольно широкого круга животных тяжёлое инфекционное заболевание (Смирнов В.В. и др, 1990). Случаи внутрилабораторного заражения человека свидетельствуют о его высокой видовой чувствительности к этому возбудителю. Возбудитель сапа патогенен для цельнокопытных животных (лошадей, мулов, ослов), кошек, собак, морских свинок и серых мышей. В экспериментальных условиях наиболее восприимчивыми животными являются кошки, хомяки и морские свинки. Кролики малочувствительны к сапу. Белые мыши и крысы обладают значительной устойчивостью к данному микроорганизму.

Возбудитель сапа представляет собой неподвижные полиморфные тонкие палочки, с закруглёнными концами, прямые или несколько изогнутые, размерами $0,4 \times 3-5$ мкм. Наряду с типичными клетками в молодых культурах могут встречаться очень короткие коккобациллярные, а также булавовидные и ветвящиеся формы (в старых культурах). Спор возбудитель сапа не образует (Смирнов В.В. и др., 1990).

B. mallei относительно устойчива во внешней среде: в воде и различных гниющих субстратах сохраняет жизнеспособность до месяца, в подсохших выделениях больных – до 3 месяцев. При кипячении сапные микробы погибают в течение нескольких минут, при нагревании взвеси чистой культуры при $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ – через 2 ч. и более.

1.2 Устойчивость патогенных буркхольдери к антимикробным соединениям

Возбудитель мелиоидоза характеризуется высокой природной устойчивостью ко многим антибактериальным препаратам, что существенно усложняет лечение заболевания (Антонов В.Ю. и др., 1991; Батманов В.П. и др., 1995; Vorachit M. et al., 2000).

В терапии мелиодозной инфекции в настоящее время широко применяются карбапенемы, цефтазидим, хлорамфеникол, триметоприм и доксициклин (Батманов В.П. и др., 1995; White N.J., 2003). Резистентность к этим препаратам может возникать в процессе их применения при лечении. По данным некоторых исследователей, в её формировании важную роль играют эффлюкс-системы широкого спектра (Chan Y.Y. et al., 2004; Chan Y.Y. et al., 2005; Dance D.A.V. et al., 2004). Нарастание резистентности *B. pseudomallei* к β -лактамным соединениям может быть обусловлено расширением спектра ферментной инактивации, а также – снижением чувствительности лактамаз микроба к ингибиторам, в частности – клавилановой кислоте (Chan Y.Y. et al., 2004; Chan Y.Y. et al., 2005; Godfrey A.J. et al., 1991; Ho P.L. et al., 2002; Keith K.E. et al., 2005; Niusump P. et al., 2002). Кроме того, микроорганизм высокорезистентен к цефалоспорином I поколения, аминоглизидам, макролидам, рифамицину и полимиксину В (Антонов В.Ю. и др., 1991; Батманов В.П. и др., 1995; Chaowagul W. et al., 2000).

Изучение геномных последовательностей *B. pseudomallei* даёт представление о вероятных механизмах его устойчивости к разнообразным антимикробным препаратам. Например, выяснено, что эффлюкс-система AmrAB-OprM возбудителя мелиоидоза играет важную роль в формировании устойчивости к аминоглизидам и макролидам, а инактивация отдельных генов оперона приводит к появлению чувствительности к стрептомицину, тобрамицину, канамицину, гентамицину, эритромицину и кларитромицину (Moore J.E. et al., 2001).

В геноме мелиоидозного микроба идентифицированы несколько последовательностей β -лактамаз классов А, В, и D; функции некоторых из них - PenA и Oxa

(BPSS0946, BPSS1997) экспериментально охарактеризованы (Cheung T.K.M. et al., 2002; Holden M.T.G. et al., 2004; Niusump P. et al., 2002). Есть сведения о наличии у *B. pseudomallei* β -лактамазы класса C (Niusump P. et al., 2002), но при анализе соответствующей последовательности генома установлено, что данный протеин скорее может быть отнесён к группе белков, гомологичных карбоксилэстеразе *EstB Burkholderia gladioli* (Petersen E.I. et al., 2001).

Выявлено, что устойчивость *B. pseudomallei* к катионным пептидам, таким как полимиксин В, по крайней мере частично опосредована структурой LPS (Burtnick M.N. et al., 1999). Мутации в генах *waaF*, *waaE* или *udg*, каждый из которых является частью аппарата биосинтеза LPS, приводят к возрастанию чувствительности микроба к полимиксину (Burtnick M.N. et al., 1999). Помимо этих, обнаружены и другие детерминанты устойчивости к катионным пептидам, например, последовательность BPSL2468, гомологичная эффлюкс-гену *porM Burkholderia vietnamiensis*, ответственному за устойчивость данного микроба к полимиксину.

Известно, что модификации липида А, как один из механизмов устойчивости микроорганизмов к антимикробным пептидам, часто бывают обусловлены функционированием кластера генов *pmr*, регулируемых PhoPQ (Gunn J.S. et al., 1996). Гомологи *pmrF* (BPSL1471) и *pmrA* (BPSS0643) обнаружены у *B. pseudomallei*, но не выяснено окончательно - могут ли только данные последовательности определять модификации коровой части липида, тем более, что аналог PhoPQ-регулона в геноме *B. pseudomallei* обнаружен не был. Вполне вероятно, что устойчивость к катионным пептидам *B. pseudomallei* может определяться присутствием в составе липида А 4-амино-4-деоксиарабинозы и фосфатных групп, как и у *B. ceracia* (Cox A.D. et al., 1995).

По сравнению со штаммами возбудителя мелиоидоза, большинство изолятов *B. mallei*, характеризуется значительно меньшим уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов. В геноме *B. mallei* также обнаружены последовательности, гомологичные детерминантам резистентности различных типов (Nierman W. et al., 2004). Обнаруженные гены антибиотикорезистентности чаще всего

локализованы в регионах генома *B. mallei*, которые, по-видимому, претерпели заметные структурные перестройки в результате инсерционных и рекомбинационных процессов. Данное обстоятельство может свидетельствовать о снижении устойчивости *B. mallei* к тем или иным лекарственным соединениям, в сравнении с *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, вследствие возникших изменений в экспрессии отдельных детерминант резистентности.

1.3 Механизмы устойчивости бактерий к антибиотикам β -лактамной группы

Антимикробные препараты, в отличие от других медикаментов, действуют не на компоненты клеток человеческого организма (рецепторы), а на микроорганизмы. Каждый антибиотик уничтожает или замедляет рост и размножение всех чувствительных к ним бактерий — независимо от того, являются ли они причиной возникновения заболевания у пациента или нет. Поэтому необходимым условием выживания микроорганизмов в изменившейся окружающей среде стало формирование и совершенствование разнообразных и эффективных механизмов устойчивости к антибиотикам. В повседневной клинической практике утвердилось упрощённое понятие термина «резистентность». Возбудитель трактуется как резистентный, если концентрация препарата, необходимая для подавления его роста и размножения, ниже той, которая ожидается *in vivo*. В реальности дело обстоит гораздо сложнее. Клиническая эффективность антибиотика зависит не только от его активности в отношении конкретного возбудителя, но и от состояния собственных защитных сил макроорганизма, ряда фармакокинетических параметров, в частности - способности препарата проникать в очаг инфекции известной локализации и накапливаться там, и других факторов (Warren J.W. et al., 1999).

Устойчивость микроба к антибактериальным препаратам может быть природной и приобретённой, то есть – индуцированной. Если у микроорганизма отсутствует мишень для действия антибиотика или нет возможности взаимодействия с этой мишенью – речь идёт о природной резистентности. Для реализации ан-

тибактериального эффекта β -лактамы антибиотики связываются с расположенными в бактериальных клеточных стенках ферментами: транс- и карбоксипептидазами. У микоплазм, лишённых клеточных стенок, эти ферменты, получившие название пенициллинсвязывающих белков (ПСБ), отсутствуют. Именно поэтому *Mycoplasma spp.* обладает природной устойчивостью к β -лактамам. В клинических условиях обычно не возникает особых сложностей для предсказания природной антибиотикорезистентности возбудителя. Однако возникновение резистентности у ранее чувствительных видов микроорганизмов, в том числе в процессе терапии избранным препаратом, представляет собой одну из сложнейших проблем в лечении инфекционных заболеваний. Приобретённая устойчивость развивается либо при передаче генов, кодирующих резистентность, от резистентных бактерий чувствительным микроорганизмам, либо – вследствие мутаций. Мутационная резистентность возникает спонтанно у единичных представителей популяции бактериальных клеток. В отсутствие антибиотиков резистентные мутанты, в большинстве случаев, не имеют преимуществ перед чувствительными бактериями в борьбе за существование. Ко всему прочему, «обслуживание» приобретённой устойчивости требует дополнительных затрат энергии, питательных веществ и т. д. Назначение антибиотиков приводит к пролиферации устойчивых микроорганизмов и уничтожению чувствительных, в результате чего в перспективе может сформироваться популяция, состоящая практически полностью из резистентных бактерий. Возникновение микроорганизмов данного типа, с приобретённой под влиянием антимикробных соединений устойчивостью, была неоднократно подтверждена у многих бактерий как *in vitro*, так и *in vivo* (Березняков И.Г., 1999).

Антибиотики вносят существенный вклад в селекцию резистентных штаммов/видов микроорганизмов, как при правильном применении антибактериальных препаратов, так и при неоправданном их назначении, неадекватном режиме дозирования, длительности терапии и т. д. Нерациональная антимикробная терапия может вызвать появление значительного числа устойчивых микроорганизмов.

Различают четыре основных механизма, опосредующих приобретённую устойчивость к антибиотикам (Towner K.J., 2001):

- уменьшение проницаемости клеточной стенки, блокада механизмов транспортировки антибиотика внутрь бактериальной клетки, либо активное выведение медикаментов из микроорганизмов;
- изменение мишени действия антибиотика;
- деструкция (разрушение) или инактивация (модификация) антибиотика;
- приобретение нового метаболического пути взамен того, который подавляется антибиотиком.

С точки зрения клинической практики, наиболее важным из них является способность бактерий синтезировать ферменты, разрушающие антибиотики. Бактериальные ферменты, способные разрушать β -лактамы, получили название β -лактамаз. Они представляют собой группу химических соединений, различающихся по ряду параметров: скорости синтеза фермента; спектру действия; плазмидной или хромосомной локализации генов, кодирующих выработку β -лактамаз; способности к сопоставимому или преимущественному гидролизу тех или иных β -лактамов; чувствительности к ингибиторам. Ингибиторы – это вещества β -лактамовой природы с минимальной собственной антибактериальной активностью, способные необратимо связываться с β -лактамазами, подавляя их активность. В последние годы одной из наиболее важных проблем в лечении инфекций, особенно в отделениях реанимации и интенсивной терапии, стало появление энтеробактерий (*Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Proteus spp.*), способных продуцировать β -лактамазы с расширенным спектром действия (БЛРС). Данные ферменты чаще всего являются мутантными вариантами хорошо изученных β -лактамаз, гены которых расположены в плазмидах: TEM-1, TEM-2, SHV-1, редко - OXA-2 или OXA-10 (Сидоренко С.В., 2002; Синопальников А.И. и др., 2003; Ariel C. et al., 1994; Arlet G. et al., 1999).

По сравнению с «нормальными», модифицированные в результате мутаций ферменты характеризуются несколько изменённой химической структурой (за-

мещены от одной до четырёх аминокислот) и перестроенным активным центром. В результате таких перестроек β -лактамазы с расширенным спектром действия способны разрушать не только пенициллины и цефалоспорины I поколения (которые гидролизуются «нормальными» β -лактамазами), но и соединения, принадлежащие ко II и III поколениям цефалоспоринов (Livermore D.M. et al., 1987).

Другой механизм возникновения резистентности связан со способностью микроорганизмов к производству ферментов, модифицирующих антибиотики. В результате подобной модификации, вследствие изменения структуры, антибиотик утрачивает возможность формирования связи со своими мишенями внутри бактериальных клеток и теряют эффективность (Березняков И.Г., 2001). Такой механизм развития резистентности к аминогликозидам характерен для некоторых видов семейства *Enterobacteriaceae*, в этом случае антибиотики инактивируются в процессе аденилирования, ацетилирования или фосфорилирования.

Резистентность микроорганизмов к антибиотикам формируется также в случае, если меняется не антибиотик, а мишень для его воздействия. Широко известный пример подобного вида устойчивости – резистентность *K. pneumoniae* к пенициллину.

Ещё один механизм антибиотикорезистентности — приобретение бактериями способности активно удалять (выкачивать) антимикробные препараты из клеток. Этот механизм характерен для приобретённой устойчивости к тетрациклиновым соединениям. Антибиотики, проникающие внутрь бактерии, изгоняются из неё наружу. Таким образом, они не успевают связаться со своими мишенями (если речь идёт о тетрациклинах, то – с рибосомами) и вызвать антибактериальное действие.

Следующий механизм резистентности — нарушение проницаемости бактериальной клетки для антибиотиков. Мишени для действия β -лактамных антибиотиков – пенициллинсвязывающие белки – у грамположительных микроорганизмов не прикрыты никакими защитными барьерами. У грамотрицательных бактерий, напротив, эти белки прикрываются наружной фосфолипидной мембраной. β -лактамы способны проникать через этот защитный барьер посредством диффузии

через поры, которые образуются «пориновыми» белками. Уменьшение радиуса или количества таких пор обуславливает снижение чувствительности бактерий к антибиотикам. Например, у энтеробактерий утрата белков OmpF и OmpC при назначении цефокситина привела к появлению штаммов микроорганизмов с высоким уровнем резистентности к цефалоспорином (Nikaido H., 1994).

Избегать антибактериального действия антимикробных препаратов микроорганизмы могут и в случае формирования нового метаболического пути взамен того, который подавляется данным соединением. В частности, *S. aureus* в результате мутационного процесса приобрели способность продуцировать дополнительный пенициллинсвязывающий белок. Этого оказалось достаточно и для полноценного синтеза клеточной стенки стафилококков, и для развития резистентности не только к препаратам, стандартно используемым при стафилококковой инфекции: метициллину и оксациллину, но и ко всем β -лактамным антибиотикам.

1.4 Бактериальные β -лактамазы: классификация, функциональная роль и молекулярный анализ

С практической точки зрения при характеристике β -лактамаз необходимо учитывать следующие параметры:

- субстратную специфичность (способность к гидролизу отдельных β -лактамных антибиотиков);
- чувствительность к действию ингибиторов;
- локализацию гена.

β -лактамазы широко распространены в природе, так как они играют важную роль в экологии ряда микроорганизмов. Гены β -лактамаз обнаруживаются в хромосомах многих видов грамотрицательных микроорганизмов в естественных условиях.

Классификация β -лактамаз (по Bush) (Bush K. et al., 2010)

Группа	Класс	Преимущественный субстрат	Ингибирование Клав/ЭДТЭА		Типичные представители
1	C	Цефалоспорины	-	-	AmpC ферменты грамотрицательных бактерий; MIR-1
2a	A	Пенициллины	+	-	Пенициллиназы грамположительных бактерий
2b	A	Пенициллины, цефалоспорины	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	C	Пенициллины, цефалоспорины узкого и широкого спектров, монобактамы	+	-	TEM-3 – TEM-26, SHV-2 – SHV-6, <i>Klebsiella oxytoca</i> K1
2br	A	Пенициллины	+/-	-	TEM-30 – TEM-36, TRC-1
2c	A	Пенициллины, карбенициллин	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Пенициллины, клоксациллин	+/-	-	OXA-1 – OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Цефалоспорины	+	-	Индукцибельные цефалоспориназы из <i>Proteus</i>
2f	A	Пенициллины, цефалоспорины, карбопенемы	+	-	NMC-A из <i>Enterobacter cloacae</i> , Sme-1 из <i>Serratia</i>
3	B	Большинство β -лактамов, включая карбопенемы	-	+	L1 из <i>Xanthomonas maltophilia</i> , CcrA из <i>Bacteroides fragilis</i>
4	ND	Пенициллины	-	-	Пенициллиназы из <i>Pseudomonas cepacia</i>

Не вызывает сомнений, что внедрение в медицинскую практику антибактериальных препаратов коренным образом изменило биологию микроорганизмов. Несмотря на то, что детали этого процесса до конца не изучены, можно предполагать, что некоторые из хромосомных β -лактамаз оказались включёнными в состав подвижных генетических элементов (плазмид и транспозонов). Возникновение селективных преимуществ у микроорганизмов, обладающих этими ферментами,

привело к быстрому распространению β -лактамаз среди клинически значимых патогенных бактерий.

К наиболее часто встречающимся ферментам с хромосомной локализацией генов относятся β -лактамазы класса С (группа 1 по Bush) (Bush K. et al., 2010; Jacoby G.A., 2009). Их гены представлены в хромосомах практически всех грамотрицательных бактерий. Общие свойства данной группы ферментов:

- способность к гидролизу природных и полусинтетических пенициллинов и цефалоспоринов I–III поколения (в том числе – цефамицинов);
- β -лактамазы класса С практически не гидролизуют соединения, которые относятся к цефалоспорином IV поколения и карбапенемам;
- устойчивость к действию ингибиторов.

Гены β -лактамаз этого класса, локализованные в хромосомах, характеризуются некоторыми особенностями экспрессии. Хромосомные β -лактамазы некоторых микроорганизмов (например, *Escherichia coli*) экспрессируются постоянно, но на таком низком уровне, которого недостаточно даже для гидролиза ампициллина. Для других микроорганизмов (например, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morganella* и др.) характерен индуцибельный тип экспрессии. Фермент практически не вырабатывается при отсутствии в среде антибиотиков, но скорость синтеза резко возрастает после контакта бактериальной клетки с некоторыми β -лактамными соединениями. При нарушении механизмов регуляции этого процесса возможна постоянная гиперпродукция фермента. В настоящее время описано уже более 20 β -лактамаз класса С, локализованных на плазмидах. Однако эти ферменты ещё не получили широкого распространения, и уже в ближайшем будущем они могут составить реальную клиническую проблему.

Для хромосомных β -лактамаз *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter diversus* и *Proteus vulgaris*, которые относятся к классу А, также характерны различия в экспрессии (Fiett J. et al., 2000; Paniara O. et al., 2000; Poirel L. et al., 2009). Но микроорганизмы сохраняют чувствительность к некоторым цефалоспорином III поколения даже в случае гиперпродукции этих ферментов. Хромо-

сомные β -лактамазы клебсиелл относят к группе 2be по классификации Bush, а β -лактамазы *C. diversus* и *P. vulgaris* – к группе 2e.

Не совсем ясно, по каким причинам мобилизация генов β -лактамаз класса А на подвижные генетические элементы происходит эффективнее, чем ферментов класса С. Таким образом, есть все основания предполагать, что плазмидные β -лактамазы SHV-1 и их производные, широко распространённые среди грамотрицательных микроорганизмов, произошли от хромосомных β -лактамаз *K. pneumoniae* (Kuzin A.P. et al., 1999).

Первые β -лактамазы класса А грамположительных бактерий, вызвавшие серьёзные клинические проблемы, были обнаружены у стафилококков (группа 2a по Bush). Ферменты этой группы эффективно гидролизуют природные и полусинтетические пенициллины, способны к частичному гидролизу цефалоспоринов I поколения, а также проявляют чувствительность к действию ингибиторов (сульбактаму, тазобактаму и клавуланату). Быстрое внутри- и межвидовое распространение этих ферментов среди грамположительных микроорганизмов обеспечивается плазмидной локализацией их генов. Первая плазмидная β -лактамаза класса А (TEM-1) у грамотрицательных бактерий была описана в начале 60-х годов XX века, вскоре после внедрения в клиническую практику аминопенициллинов. В течение короткого периода времени TEM-1 и два других фермента этого же класса (TEM-2, SHV-1) распространились среди представителей семейства *Enterobacteriaceae* и других грамотрицательных микроорганизмов практически повсеместно, именно благодаря локализации генов этих ферментов в плаزمиде (Heritage J. et al., 1995; M'Zali F.H. et al., 2000; Salverda M.L. et al., 2010). Перечисленные β -лактамазы получили название « β -лактамаз широкого спектра». По классификации Bush β -лактамазы широкого спектра относятся к группе 2b (Bush K. et al., 2010; Pitout J.D.D., 2010). Их важными свойствами, с практической точки зрения, являются:

- способность гидролизовать цефалоспорины I поколения, природные и полусинтетические пенициллины, частично – цефамандол и цефоперазон;

- неэффективность в отношении цефалоспоринов III – IV поколения и карбапенемов;
- чувствительность к действию ингибиторов;
- плазмидная локализация генов.

Интенсивное развитие антибактериальной терапии в период с конца 60-х и до середины 80-х годов XX века привело к внедрению в практику карбокси- и уреидопенициллинов, а также цефалоспоринов трёх поколений. Эти препараты существенно превосходили аминопенициллины по спектру и уровню антибактериальной активности, а также по ряду фармакокинетических характеристик. Кроме этого, к β -лактамазам широкого спектра оказались устойчивыми большинство цефалоспоринов II и III поколения. После их внедрения в клиническую практику в течение некоторого времени среди энтеробактерий практически не отмечали поколений с приобретённой устойчивостью к данной группе антибиотиков. Но уже к началу 80-х годов появились сообщения о регистрации штаммов с плазмидной локализацией детерминант устойчивости к препаратам группы цефалоспоринов II и III поколения (Knothe R. et al., 1983). Связь развития резистентности с продукцией микроорганизмами ферментов, генетически связанных с β -лактамазами широкого спектра (TEM-1 и SHV-1), была достаточно быстро установлена. Новая группа ферментов получила название β -лактамаз расширенного спектра (БЛРС). β -лактамаза TEM-3 была первым идентифицированным ферментом расширенного спектра (Sougakoff W. et al., 1988). К настоящему времени известно около 100 производных фермента TEM-1, которые отличаются от исходного фермента единичными аминокислотными заменами. Замены аминокислот, входящих в состав молекулы β -лактамазы TEM-1, приводящие к формированию нового фенотипа, возникают примерно в 16 случаях из 300. Наиболее часто β -лактамазы типа TEM встречаются среди *E. coli* и *K. pneumoniae*, а также – среди многих представителей *Enterobacteriaceae* и ряда других грамотрицательных микроорганизмов (Edelstein M. et al., 2003; Peralta G. et al., 2007; Schultsz C. et al., 2012; Schwaber M.J. et al., 2007). Менее многочисленны производные фермента SHV-1, их описано около 30, и они также отличаются по структуре от своего

предшественника единичными заменами аминокислот. Ферменты типа SHV чаще всего встречаются у *K. pneumoniae*, но возможны случаи обнаружения и у других грамотрицательных бактерий (Chanawong A. et al., 2000). По классификации Bush β -лактамазы TEM- и SHV-типа относятся к группе 2be (Bush K. et al., 2010). Их можно охарактеризовать следующими практически важными свойствами:

- способность к гидролизу цефалоспоринов I – III и в меньшей степени IV поколения;
- неэффективность в отношении карбапенемов;
- цефамицины (цефокситин, цефотетан и цефметазол) устойчивы к гидролизу;
- чувствительность к действию ингибиторов;
- локализация генов в плазмидах.

Среди β -лактамаз этих двух типов описаны ферменты с необычным фенотипом. Они устойчивы к действию ингибиторов (клавуланата и сульбактама, но не тазобактама), в то же время их гидролитическая активность в отношении большинства β -лактамных соединений ниже, чем у их предшественников (Bret L. et al., 1996; Drawz S.M. et al., 2010; Knox J.P., 1995; Lemozy J. et al., 1995). Ферменты, получившие название ингибитор-устойчивые TEM (inhibitor-resistant TEM – IRT), по классификации Bush включены в группу 2br (Bush K. et al., 2010). Микроорганизмы, которые обладают этими ферментами, проявляют высокую резистентность к действию защищённых β -лактамов, однако являются чувствительными к цефалоспорином III – IV поколения и лишь умеренно устойчивы к цефалоспорином I – II поколения. У некоторых β -лактамаз сочетаются свойства расширенного спектра гидролитической активности и устойчивости к ингибиторам (Chaibi E.B. et al., 1999).

β -лактамазы CTX-типа (цефотаксимазы) представляют собой чётко ограниченную группу, отличающуюся от других ферментов класса A (Edelstein M. et al., 2003). Количество описанных представителей этого типа β -лактамаз постоянно увеличивается. В отличие от TEM- и SHV-производных, предпочтительным субстратом указанных ферментов является не цефтазидим или цефподоксим, а цефо-

таксим. Цефотаксимазы выявляют у различных представителей *Enterobacteriaceae* (в основном – у *E. coli* и *Salmonella enterica*) в географически отдалённых регионах земного шара. В Восточной Европе описано распространение клонально-родственных штаммов *Salmonella typhimurium*, продуцирующих фермент СТХ-М4 (Chen Y., 2005).

По классификации Bush β -лактамазы типа СТХ относятся к группе 2be. Происхождение ферментов СТХ-типа до сих пор не выяснено. Высокая степень сходства обнаруживается с β -лактамазами *K. oxytoca*, *C. diversus*, *P. vulgaris*, *S. fonticola*, имеющими хромосомную локализацию (Delmas J. et al., 2010). Не так давно была установлена значительная степень гомологии с хромосомной β -лактамазой *Kluyvera ascorbata*. Существует группа редко встречающихся ферментов, которые относятся к классу А и обладают фенотипом, характерным для БЛРС (чувствительностью к ингибиторам и способностью гидролизовать цефалоспорины III поколения). Ферменты этой группы (BES-1, FEC-1, GES-1, CME-1, PER-1, PER-2, SFO-1, TLA-1 и VEB-1) выделяли у ограниченного количества штаммов бактерий в различных географических регионах мира от Южной Америки до Японии. Перечисленные ферменты отличаются в основном по предпочтительным субстратам, которые представлены соединениями группы цефалоспоринов III поколения. Большинство из этих ферментов были описаны после публикации работы Bush и соавт., поэтому их положение в классификации не определено (Niusump R. et al., 2002).

К β -лактамазам расширенного спектра относят также ферменты класса D. Их предшественники, β -лактамазы широкого спектра, которые гидролизуют в основном пенициллин и оксациллин и слабо чувствительны к ингибиторам, распространены в основном в Турции и Франции среди *Pseudomonas aeruginosa*. Гены этих ферментов, как правило, имеют плазмидную локализацию. Большинство ферментов, демонстрирующих фенотип расширенного спектра, то есть преимущественный гидролиз цефотаксима и цефтриаксона (OXA-11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 28), происходят от β -лактамазы OXA-10. По классификации Bush β -лактамазы типа OXA относятся к группе 2d (Bush K. et al., 2010).

Выделяют ещё несколько групп ферментов, значительно различающихся по ряду свойств, в том числе и по спектру действия, но их обычно не рассматривают как бета-лактамазы расширенного спектра. Для ферментов из группы 2с основными субстратами являются пенициллины и карбенициллин. Чаще всего они встречаются у *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophilia*, *Vibrio cholerae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, а также – некоторых других грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Гены данных β -лактамаз имеют хромосомную локализацию. Преимущественным субстратом ферментов группы 2е являются цефалоспорины, а хромосомные индуцибельные цефалоспориназы *P. vulgaris* - типичный пример данного типа ферментов. β -лактамазы этой группы описывают также у *Bacteroides fragilis* и, значительно реже – у других видов микроорганизмов. В группу 2f входят такие редкие ферменты класса А, которые способны гидролизовать большинство β -лактамов, включая карбапенемы. По поводу этой группы существуют некоторые разночтения: Livermore относит эти ферменты к β -лактамазам расширенного спектра, другие авторы – нет (Livermore D.M. et al., 1987).

Помимо перечисленных β -лактамаз необходимо отметить две последние группы ферментов, включённых в классификацию Bush. К ферментам третьей группы относятся редкие, но потенциально крайне важные металло- β -лактамазы класса В, регулярно обнаруживаемые среди *Stenotrophomonas maltophilia* и редко встречающиеся у других микроорганизмов (*B. fragilis*, *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* и др.). Отличительной особенностью этих ферментов является способность подвергать гидролизу соединения группы карбапенемов. В четвёртую группу включены плохо изученные пенициллиназы *P. aeruginosa*, ингибируемые клавулановой кислотой.

Частота распространения β -лактамаз расширенного спектра значительно варьирует в различных географических регионах. По данным, полученным в результате многоцентрового исследования "MYSTIC", в европейской части наибольшую частоту выявления БЛРС среди всех изученных штаммов энтеробактерий отмечают в России и Польше (более 30 %) (Goosens H., 2000; Turner P.J.,

2008; Winokur P.L. et al., 2006). В отдельных лечебно-профилактических учреждениях Российской Федерации частота продукции БЛРС среди *Klebsiella spp.* превышает 90 % (Winokur P.L. et al., 2006). Микроорганизмы с различными механизмами устойчивости (устойчивость к фторхинолонам, метициллинрезистентность, гиперпродукция хромосомных бета-лактамаз и др.), имеют неодинаковую распространённость в зависимости от специфики лечебного учреждения.

БЛРС обладают достаточно широким спектром активности: они способны подвергать гидролизу различной степени практически все соединения группы β -лактамных антибиотиков, исключением являются цефамицины и карбапенемы. Но далеко не всегда наличие у бактерии детерминанты устойчивости к какому-либо антимикробному препарату означает неэффективность применения этого препарата в клинической практике. В случае инфицирования микроорганизмами, продуцирующими БЛРС, наиболее остро стоит вопрос о возможности использования в терапии цефалоспоринов III – IV поколения.

Пути решения этой проблемы тесно связаны с вопросами разработки критериев чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к β -лактамным антибиотикам и имеет свою историю (D'Costa V.M. et al., 2011). В начале 80-х годов, вскоре после появления первых представителей этой группы антибиотиков в медицинской практике, Национальный комитет по клиническим лабораторным стандартам США (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) установил критерии чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к цефалоспорином III поколения. Согласно этим критериям: при величине МПК 8 мкг/мл и меньше штаммы энтеробактерий рассматривали как чувствительные, при величине МПК 32 мкг/мл и больше - как резистентные. Но необходимо учитывать, что данные критерии антибиотикочувствительности были созданы по аналогии с критериями, установленными для полусинтетических пенициллинов и ранних поколений цефалоспоринов. Предложенные критерии достаточно удачно учитывали фармакокинетические, микробиологические и клинические параметры этих препаратов, за исключением цефалоспоринов III поколения. В отношении дикой популяции *E. coli* диапазон МПК ампициллина варьирует в пределах

1 – 8 мкг/мл, при парентеральном введении антибиотика и в сыворотке крови достижимы приблизительно такие же концентрации, они же обеспечивают значительную клиническую эффективность его применения. Однако при более высоких значениях МПК ампициллина (выше 32 мкг/мл), чаще всего это связано с продукцией β -лактамаз широкого спектра, отмечают высокую частоту отсутствия терапевтического эффекта.

Несмотря на то, что по ряду свойств цефалоспорины III поколения существенно отличаются от своих предшественников, приведённые выше критерии были приняты и для этих антибиотиков. МПК цефотаксима и цефтриаксона при исследовании дикой популяции *E. coli* колеблется в пределах 0,03 – 0,5 мкг/мл, тогда как максимальные концентрации данных препаратов в сыворотке крови достигают 100 мкг/мл (Chihara S. et al., 2011). Эти антибиотики устойчивы к действию β -лактамаз широкого спектра. Критерии чувствительности грамотрицательных микроорганизмов к цефалоспорином III поколения в течение некоторого времени удовлетворяли практическим запросам, несмотря на их явно недостаточную обоснованность. Сложности появились после формирования новых механизмов устойчивости у грамотрицательных микроорганизмов.

В первых сообщениях исследователи описывали БЛРС как ферменты, проявляющие значительный уровень устойчивости к цефалоспорином III поколения (с величиной МПК > 32 – 64 мкг/мл). Однако к концу 80-х – началу 90-х годов было выявлено, что величины МПК некоторых цефалоспориновых соединений в отношении штаммов, характеризующихся продукцией БЛРС, могут быть в пределах критериев чувствительности (2 – 8 мкг/мл), но всё же выше, чем для «диких» штаммов (0,03 – 0,5 мкг/мл). Наряду с этим, появились сообщения о снижении терапевтического эффекта цефалоспоринов III поколения при заболеваниях, вызванных штаммами бактерий, продуцирующими БЛРС, которые по формальным критериям считают чувствительными (Brun-Buisson C. et al., 1987). Причём при инфекциях мочевыводящих путей эффективность данных препаратов сохранялась, а снижение эффективности антибиотиков касалось только тяжёлых и генерализованных процессов.

В дальнейшем, по данным наблюдений различных авторов были получены достаточно противоречивые сведения. В частности, имеются сообщения о высокой клинической эффективности цефалоспоринов III поколения при лечении инфекций, вызванных продуцирующими БЛРС штаммами (Emery C.L. et al., 1997). В то же время были обобщены некоторые наблюдения исследователей о результатах лечения цефалоспориновыми антибиотиками инфекций, вызванных штаммами *Enterobacteriaceae*, которые продуцируют БЛРС, но относятся к чувствительным или промежуточным по формальным критериям NCCLS (Paterson D.L., 2001). В общем, было описано 32 случая лечения пациентов. Когда возбудитель относился к категории микроорганизмов с промежуточной чувствительностью (МПК = 16 мкг/мл), во всех четырёх случаях было установлено, что лечение цефалоспориновыми соединениями было неэффективным. Когда же возбудитель относился к формально чувствительным (МПК < 8 мкг/мл), неудачи лечения наблюдали лишь в 54 % случаев.

При лечении экспериментальных инфекций, вызванных продуцирующими БЛРС штаммами, также были получены неоднозначные результаты. Исследования фармакодинамических характеристик *in vivo* демонстрируют, что продукция БЛРС не сказывается на эффективности цефепима при величине МПК до 8 мкг/мл в условиях экспериментальной инфекции (Chaowagul W. et al., 2000). БЛРС значительно различаются по способности гидролизовать различные цефалоспорины, поэтому и цефалоспорины III – IV поколения нельзя рассматривать как препараты, полностью идентичные по чувствительности к гидролизу этими ферментами. Существует мнение, что при лечении инфекций, вызванных продуцентами БЛРС, можно добиться высокой эффективности при использовании максимальных доз цефалоспоринов III – IV поколения.

Так как настоящее время цефалоспорины являются составляющими базовой терапии тяжёлых и крайне тяжёлых внебольничных и нозокомиальных инфекций, выполнение рекомендаций NCCLS существенно ограничивает возможности антимикробной терапии. Всё чаще штаммы бактерий, продуцирующих БЛРС, проявляют ассоциированную резистентность к антибиотикам других групп. Частота

ассоциированной устойчивости к ципрофлоксацину может достигать 40 – 60 %, к гентамицину – 80 % (Cormican M.G. et al., 1996; Cornaglia G. et al., 2008). В связи с эффектом гиперпродукции БЛРС, в некоторых случаях неэффективными оказываются даже защищённые ингибиторами β -лактамы. При таком варианте единственными средствами, при использовании которых можно добиться высокого уровня эффективности, являются карбапенемы.

Однако массовое эмпирическое назначение карбапенемов связано с высоким риском быстрого возникновения популяций микроорганизмов с устойчивостью к этим антибиотикам. Поэтому становится очевидной необходимостью эффективной лабораторной диагностики продукции БЛРС среди грамотрицательных микроорганизмов. По результатам проведения внешнего контроля качества ВОЗ в 5,4 % лабораторий штаммы бактерий, продуцирующие БЛРС, были охарактеризованы как полностью чувствительные ко всем цефалоспорином, и только в двух из 130 лабораторий отдельно была отмечена продукция БЛРС (Tenover F.C. et al., 1994; Tenover F.C., 2001).

Традиционные микробиологические методы обнаружения БЛРС не позволяют оценить, какой именно из 130 ферментов присутствует у данного микроорганизма, в большинстве случаев они могут дать информацию только о факте наличия фермента в клетках бактерий.

Развитие различных методов молекулярной генетики, в том числе - методов, в основе которых – полимеразная цепная реакция (ПЦР), молекулярной гибридизации и выявления последовательностей нуклеотидов в генах (секвенирования), способствовало их широкому распространению и применению в клинико-диагностических целях. Медицинская микробиология получила возможность детекции и типирования патогенных бактерий, изучения и оценки различных их характеристик, таких как антибиотикочувствительность или токсигенность.

При изучении β -лактамаз и описании новых их видов необходимыми этапами являются определение структуры последовательностей нуклеотидов изучаемых генов и их сопоставление с уже охарактеризованными нуклеотидными последовательностями (Payne D.J. et al., 1988; Payne D.J., 2001). Методики исследова-

дования фенотипа в данном случае не демонстрируют достаточную способность к выявлению различий. Самым достоверным и эффективным методом исследования β -лактамаз, в том числе – и разнообразных их производных типа TEM и SHV, является секвенирование ДНК (Mabilat C. et al., 1990; Mabilat C. et al., 1993). Но полная расшифровка последовательности нуклеотидов – это достаточно сложная процедура и, что немаловажно – требует существенных финансовых затрат. Выделение и клонирование изучаемых фрагментов генов представляют собой подготовительные стадии общепринятых методов секвенирования. Исключить этап клонирования изучаемых участков генов позволяет метод прямой амплификации и секвенирования ДНК. Реализуется этот вариант при наличии характеристики олигонуклеотидных участков, фланкирующих фрагмент исследуемого гена.

Дополнительное уменьшение трудоёмкости и увеличение эффективности проведения секвенирования осуществляется при переходе к применению автоматических систем с детекцией нерадиоактивной метки. При изучении ДНК генов SHV β -лактамаз с использованием различных методических подходов было выявлено, что автоматическое секвенирование с применением дидезокситерминаторов с флюоресцентными метками является более предпочтительным, в отличие от традиционных методов, при которых неизбежно возникают ошибки, обусловленные высокой насыщенностью гуанин-цитозиновыми парами оснований *bla*_{SHV} генов ~ 61 % (в генах других плазмидных β -лактамаз *bla*_{TEM-1}, *bla*_{PSE-1} и *bla*_{OXA-1} содержание ГЦ-пар: 49, 41 и 50 %, соответственно) (Bradford P.A. et al., 1999).

Гены β -лактамаз характеризуются большой протяжённостью, превышающей 1000 п.н. Поэтому процесс получения информации о полной нуклеотидной последовательности этих генов предполагает осуществление нескольких этапов секвенирования с применением праймеров, соответствующих структуре внутренних участков гена, а это неизбежно приведёт к удорожанию анализа. Следовательно, метод секвенирования генов не подходит для проведения эпидемиологического мониторинга, когда необходимо проведение изучения β -лактамаз у большого числа клинических изолятов (M'Zali F.H. et al., 1996).

Метод гибридизации с ДНК-зондами – протяжёнными, более 200 п.н., фрагменты генов β -лактамаз, может применяться для обнаружения ферментов конкретной генетической группы, в частности – TEM, SHV-ОИО-LEN, OXA, PSE. При использовании результатов рестрикционного картирования, если β -лактамазные гены локализованы в плазидах, ДНК-зонды могут быть получены способом выделения определённых рестрикционных фрагментов. В настоящее время получение зондов для ДНК-гибридизации чаще всего осуществляется с помощью ПЦР, при этом праймеры соответствуют внутренним участкам генов β -лактамаз (Payne D.J. et al., 1998).

Возможность олигонуклеотидных зондов перекрёстно гибридизоваться с ДНК разных β -лактамаз, входящих в состав одной генетической группы, является недостатком данного метода. Кроме того, при использовании таких зондов не дифференцируются различные производные ферментов, имеющих отличия по набору мутаций.

В 1987 г. впервые было описано применение гибридизационных зондов для выявления отличий у β -лактамаз TEM-1 и TEM-2. В дальнейшем, для исследования TEM β -лактамаз у клинических изолятов *Enterobacteriaceae* с помощью блот-гибридизации было предложено использовать синтезированные гептадекануклеотидные последовательности, комплементарные фрагментам *bla*_{TEM} генов с известными нуклеотидными заменами. Первично представленные 12 полинуклеотидных зондов были сконструированы на основе сведений о строении пяти участков, изменения в которых являются причиной возникновения отличий между пенициллиназами TEM-1, TEM-2 и первых пяти производных TEM с расширенным спектром активности TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-6 и TEM-7. Скрининговое исследование с данными гибридизационными зондами, проведённое на 256 клинических штаммах бактерий кишечной группы, синтезирующих БЛРС, продемонстрировало возможность выявления не только уже охарактеризованных ферментов, но и группу производных с иными вариантами комбинаций известных замен аминокислот TEM-13, TEM-14 и TEM-19. Следует отметить, что для определения принадлежности БЛРС к различным подгруппам были предложены нерадиоактивные

(биотинилированные) зонды и описаны результаты их успешного применения (Mabilat C. et al., 1990; Tham T.N. et al., 1990).

Позже были сконструированы подобные зонды для дифференцирования производных TEM, устойчивых к действию ингибиторов и имеющих отличия в структуре аминокислотной последовательности в позициях 69 (TEM-32, -33, -34, -35, -37, -38, -39), 244 (TEM-30, -31) и 276 (TEM-35, -36, -37, 39). Был представлен набор из 15 олигонуклеотидных зондов с разными типами нуклеотидных замен, в соответствии с тремя позициями в аминокислотной последовательности молекулы TEM, для обнаружения этих ферментов среди клинических изолятов *E. coli* (Henquell C. et al., 1995).

Методика на основе олиготипирования или – гибридизации с олигонуклеотидными зондами характеризуется простотой, эффективностью и достоверностью, и поэтому широко применяется для оценки распространённости TEM β-лактамаз с известным набором мутаций. Трудоёмкость выявления β-лактамаз с помощью гибридизации существенно возрастает из-за возникновения потребности в большем количестве зондов, так как число изучаемых TEM-производных ферментов и обнаружения новых мутаций в генах, кодирующих ферменты этой группы, постоянно увеличивается. На данный момент в генах *bla*_{TEM} выявлено более 30 нуклеотидных замен, ведущих к заменам аминокислот, и примерно столько же – молчащих мутаций. Изучение всех этих мутационных изменений, учитывая их взаимоположение, методом олиготипирования в варианте блот-гибридизации становится затруднительным.

Исследования в области создания методов микрогибридизации в формате ДНК-чипов, позволяющих одновременно использовать огромное количество зондов, приведут к решению задачи типирования этой группы β-лактамаз.

Методики, основанные на полимеразной цепной реакции, повсеместно применяются для обнаружения и изучения различных факторов резистентности к антимикробным препаратам среди клинических изолятов бактерий, в том числе – генов β-лактамаз. Также как и в случае гибридизации, с помощью ПЦР возможна детекция генов уже описанных β-лактамаз, принадлежащих к одной генетической

группе. Иногда для выявления бактерий, синтезирующих β -лактамазы, допустимо непосредственное использование клинических образцов в ПЦР, минуя этап первоначального культивирования, по причине высокого уровня чувствительности данного метода. Имеются данные об опыте прямого выявления с помощью ПЦР штаммов *Haemophilus influenzae*, устойчивых к действию ампициллина, в пробах ликвора. В реакции применяли праймеры комплементарные последовательностям генов TEM и ROB β -лактамаз. В результате выявлена практически 100 % корреляция между детектированием *bla*_{TEM} генов, итогами исследования штаммов *H. influenzae* на чувствительность к ампициллину и выявлением синтеза β -лактамаз при проведении хромогенного теста с нитроцефином. Подобная методика, основанная на ПЦР, создана для определения продукции пенициллиназы TEM-1 у различных штаммов *Neisseria gonorrhoeae*.

Так как бактерии семейства *Enterobacteriaceae* способны синтезировать разнообразные типы β -лактамаз, которые отличаются отдельными характеристиками возникающей резистентности к β -лактамам, положительный или отрицательный результат ПЦР чаще всего не имеет существенного значения для диагностики. Таким образом, необходимо решать проблему выявления β -лактамазных генов, имеющих различия в спектре мутационных изменений, что в свою очередь требует дополнительного внедрения в практику методов исследования специфических продуктов амплификации (Edelstein M. et al., 1998; Saunders N.A. et al., 1998; Taylor S.L. et al., 1997).

Описанные в литературе методы быстрого детектирования замен оснований в участках ДНК, полученных в результате ПЦР, условно группируются следующим образом:

- методы, основанные на специфическом расщеплении эндонуклеазами рестрикции (анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов – ПДРФ);
- методы исследования изменений пространственной структуры молекул ДНК, возникающих в результате мутаций, в частности – наиболее распро-

странённый метод одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP);

- методы гибридизации с внутренними зондами или ПЦР с праймерами, соответствующими фрагментам генов, содержащим мутационные изменения;
- методы химического или ферментативного разделения петлевидных участков в местах неспаренных оснований (гетеродуплексов) в цепи ДНК.

Для изучения β -лактамаз применялись только три метода: ПДРФ, SSCP и лигазная цепная реакция (ЛЦР).

В основе метода ПДРФ – способность эндонуклеаз «разрезать» двухцепочечную молекулу ДНК в специфических сайтах рестрикции – участках с конкретной последовательностью нуклеотидов. Все модификации первичной структуры ДНК, вызывающие возникновение нового или утрату существующего сайта рестрикции, выявляются при проведении ПЦР с последующей обработкой полученных ампликонов специфическими рестриктазами, последней стадией является разделение продуктов реакции методом электрофореза.

ПЦР–ПДРФ-анализ является одной из самых доступных методик, с его помощью были определены мутации, вызывающие формирование резистентности к различным антибиотикам у многих видов бактерий: ванкомицину (*vanC*) у *Enterococcus spp.*, изониазиду (*katG*) и стрептомицину (*rrs*) у *Mycobacterium tuberculosis*, к β -лактамам (*bla_{TEM}* и *bla_{SHV}*) у *E. coli*, *K. pneumoniae* и других энтеробактерий (Cockerill F.R., 1999).

Для исследования генов TEM β -лактамаз использование ПЦР–ПДРФ дало возможность описать некоторые мутации в генах 10 контрольных ферментов группы TEM и изучить генетические различия между БЛРС TEM-20, TEM-21 и TEM-29, обнаруженные среди клинических изолятов *K. pneumoniae*, которые были предварительно проанализированы только на основе биохимических тестов. В дальнейшем, результаты секвенирования генов *bla_{TEM-20}*, *bla_{TEM-21}* и *bla_{TEM-29}*, внесли дополнительные детали и подробности в описание строения ферментов, полученное по сведениям ПДРФ-анализа.

Методами секвенирования и ПЦР–ПДРФ у 27 клинических изолятов *E. coli* были изучены гены TEM β-лактамаз, устойчивых к действию ингибиторов. По результатам, полученным в ходе исследования, была продемонстрирована возможность конвергентной эволюции резистентных к ингибиторам ферментов от двух производных разных генетических линий, принадлежащих к рестрикционным группам *bla*_{TEM-1b} и *bla*_{TEM-2}.

М.Т. Nuesch-Inderbinen и соавт. разработали ПЦР/*Nhe* I тест – метод выявления БЛРС SHV-типа, в основе которого амплификация *bla*_{SHV} генов и их последующее избирательное расщепление эндонуклеазой рестрикции *Nhe* I. Увеличение ферментативной активности у производных SHV-1 чаще всего возникает в результате аминокислотной замены Гли₂₃₈→Сер, которая вызвана транзицией гуанин→аденин в последовательности гена и является причиной образования специфического сайта рестрикции для эндонуклеазы *Nhe* I. Таким образом, если фрагмент *bla*_{SHV} расщепляется при обработке рестриктазой *Nhe* I, значит, данный микроорганизм продуцирует (Nuesch-Inderbinen M.T. et al., 1996; Nuesch-Inderbinen M.T. et al., 2013).

Данный методический подход был применён для исследования контрольных штаммов микроорганизмов, синтезирующих β-лактамазы SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-5 и SHV-7, и – для 34 клинических изолятов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* и *S. enterica*, у которых результаты гибридизации ДНК с внутренним зондом *bla*_{SHV} были положительными. При этом чувствительность обнаружения БЛРС достигала 97 %, а специфичность – 100 %. На основании современных критериев интерпретации, чувствительность стандартного метода E-тестов, который проводили для сравнения, была меньше 65 %.

Однако ряд относительно недавно охарактеризованных β-лактамаз расширенного спектра, в том числе SHV-6, SHV-8 и SHV-11, нуклеотидные последовательности которых отличаются перестройками в других участках и не обладают уникальным сайтом рестрикции *Nhe* I, не могут быть детектированы при использовании ПЦР/*Nhe* I теста. Помимо этого, анализ мутагенеза SHV β-лактамаз в позиции 238 свидетельствует о том, что замены глицина не только серином, но и

другими аминокислотами, не связанные с образованием сайта рестрикции *Nhe I* в последовательности нуклеотидов, аналогично могут являться причиной формирования устойчивости к цефотаксиму и цефтазидиму (Taylor S.L. et al., 1997).

Применительно к изучению β -лактамаз наиболее значительным ограничением для применения ПЦР–ПДРФ-анализа является достаточно узкий спектр выявляемых мутаций.

Метод одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP) для выявления мутаций в генах человека впервые представили М. Orita и соавт. в 1989 г. (Orita M. et al., 1989). В последующие годы его применяли для лабораторной диагностики соматических и наследственных генетических заболеваний человека. ПЦР–SSCP-анализ и по сей день используется в клинической практике. Перечень известных областей, в которых возможно применение этого способа диагностики, охватывает внутривидовую и видовую дифференцировку патогенных бактерий, обнаружение мутаций в генах, вызывающих возникновение устойчивости микроорганизмов к антибактериальным препаратам: *katG*, *inhA*, *ahpC*, *rpoB*, *embB*, *gyrA* у *M. tuberculosis*, *bla_{TEM}* и *bla_{SHV}* у энтеробактерий.

В основе метода SSCP – воздействие точечных мутационных изменений на электрофоретическую подвижность коротких, от 100 до 450 нуклеотидов, одноцепочечных участков ДНК при их разделении в естественных условиях. В процессе SSCP-анализа амплифицированные фрагменты ДНК подвергаются нагреванию, в результате чего происходит температурная денатурация, и затем – быстрому охлаждению для стабилизации полученных цепей ДНК. При этом каждая полинуклеотидная цепь формирует специфическую пространственную структуру, которая обусловлена комплементарными взаимодействиями между участками ДНК, которые, в свою очередь, определяются расположением нуклеотидов в цепи. Полученные таким образом одноцепочечные ДНК-конформеры разделяются с помощью неденатурирующего электрофореза в высокоразрешающем полиакриламидном геле при пониженной температуре (4 – 20 °С), позволяющей стабилизировать их пространственную структуру. Возникновение единичных нуклеотидных замен неизбежно вызывает существенное изменение электрофоретической

подвижности исследуемой ДНК. Результаты этих изменений учитывают, сравнивая с контрольной ДНК, которая не содержит мутационных перестроек.

Впервые для изучения генов β -лактамаз, устойчивых к действию ингибиторов, метод ПЦР–SSCP применили V. Speldoogen и соавт. Для ПЦР использовали три пары праймеров, комплементарных частично перекрывающимся участкам ДНК: промоторной части гена - 388 п.н. и двум структурным - 426 и 418 п.н. Таким способом была проанализирована полная нуклеотидная последовательность гена $bla_{\text{TEM}} \sim 1000$ п.н. На основе полученных результатов SSCP-анализа этих фрагментов удалось продемонстрировать различия генов с известной нуклеотидной последовательностью $bla_{\text{TEM-1a}}$, -1b, -2, -30, -32, -35, а также – обнаружить новые мутации в генах $bla_{\text{TEM-33}}$, -34, -36, -37, -38, -39, выявленные в ходе ДНК-гибридизации с олигонуклеотидными зондами.

Было изучено восемь штаммов *E. coli*, обнаруженных в одном лечебном учреждении и имеющих отличия по профилю устойчивости к пенициллинам, защищённым ингибиторами. При использовании данного метода было показано следующее: у трёх штаммов определён повышенный уровень продукции пенициллиназы TEM-1, у четырёх других штаммов – продукцию β -лактамаз TEM-30, TEM-32, TEM-35 и нового фермента TEM-58 со специфическим набором аминокислотных замен (Arg₂₄₄→Сер и Val₂₆₁→Иле) (Speldooren V. et al., 1998).

Параллельно с применением метода ПЦР–SSCP для изучения ИРТ β -лактамаз в 1995 – 1998 гг. рассматривался вариант для молекулярно-генетической дифференциации отдельных ферментов группы SHV с помощью этого подхода. Представленный M'Zali и соавт. основанный на SSCP-анализе метод для типирования SHV-производных, предусматривает исследование фрагмента гена bla_{SHV} длиной 475 п.н., содержащего позиции наиболее часто возникающих мутаций. Полученный при проведении ПЦР ампликон, обрабатывали рестриктазой *Pst* I, следствием чего являлось образование двух фрагментов – 300 и 175 п.н., которые потом исследовали с помощью SSCP-электрофореза и окрашивания полиакриламидных гелей серебром (M'Zali F.H. et al., 1996; M'Zali F.H. et al., 1998).

Этот формат SSCP-анализа применялся для выявления β -лактамаз SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-7 у контрольных штаммов, невзирая на существующие ограничения, обусловленные невыполнимостью расшифровки полной последовательности нуклеотидов гена. При исследовании большого количества выделенных в различных медицинских центрах клинических штаммов *K. pneumoniae*, синтезирующих БЛРС, также демонстрировалась высокая эффективность данного метода для детекции и типирования β -лактамаз. Для некоторых культур было показано существование взаимосвязи между данными SSCP и анализа нуклеотидной последовательности ампликона *bla_{SHV}* (M'Zali F.H. et al., 1998).

Однако отличия многих ферментов невозможно обнаружить с помощью данного метода, в частности – SHV-1, SHV-2а и SHV-11, а также SHV-6 и SHV-12. Это объясняется тем, что замена Лей₃₅→Глн, которая обуславливает отличия между ферментами, располагается вне амплифицируемого участка гена. Чтобы решить эту задачу исследователи предложили одновременно проводить ПЦР–SSCP и ПЦР–ПДРФ, при этом ПДРФ-анализ подразумевает амплификацию более крупного фрагмента гена *bla_{SHV}* и последующую его обработку рестриктазой *Dde* I (Hujer K.M. et al., 1999).

Сложности, связанные с обнаружением замен в полной нуклеотидной последовательности генов β -лактамаз типов TEM и SHV можно преодолеть подвергая крупные ампликоны последовательной рестрикции и анализируя полученные участки ДНК с помощью SSCP. Этот метод известен как REF–SSCP – одноцепочечный конформационный полиморфизм рестрикционных фрагментов, его главные преимущества заключаются в высокой эффективности и способности обнаружения широкого спектра известных и неизвестных точечных мутаций.

Описанный подход позволил успешно типировать множество различных вариантов TEM и SHV β -лактамаз. Был охарактеризован спектр мутаций, которые являются причиной различий между пенициллиназами TEM-1, TEM-2 и их производными TEM-3, TEM-4, TEM-7, TEM-9, TEM-12, TEM-26 с расширенным профилем активности (Heritage J. et. al., 1992). При этом использовался нерадиоак-

тивный вариант SSCP *Taq* I–*Pst* I-рестрикционных фрагментов генов *bla*_{TEM}. Также удалось выявить мутации, свойственные для IRT-производных TEM-32, TEM-37, TEM-39, но в данном случае применяли другую комбинацию рестриктаз *Taq* I–*Ava* II (Edelstein M.V. et al., 1998).

Для определения отличий в ряду ферментов группы SHV (SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-6) предложен подобный метод с рестриктазами *Bsa*O I–*Nhe* I.

В то же время при использовании этой методики невозможно конкретизировать тип обнаруженных мутаций, и соответственно, более точно дифференцировать ферменты. Несмотря на такой существенный недостаток, если используемое оборудование отвечает высоким требованиям к стандартизации условий, SSCP-анализ может применяться в качестве одного из наиболее эффективных методов изучения распространённости TEM и SHV β-лактамаз (Edelstein M.V. et al., 1998).

Лигазная цепная реакция (ЛЦР) является методом, при котором комплементарные изучаемой нуклеотидной последовательности гена праймеры подвергаются многократному последовательному «сшиванию» (лигированию) с помощью фермента – термостабильной лигазы. В лигазной цепной реакции применяют две пары праймеров комплементарные друг другу и соответствующие структуре исследуемого фрагмента ДНК. Олигонуклеотиды каждой пары связываются с одной из цепей ДНК так, что 5'-конец одного праймера находится за 3'-концом другого, таким образом, появляется вероятность их «сшивания» ДНК-лигазой. Соединившиеся праймеры в следующих циклах ЛЦР являются матрицей для отжига и лигирования комплементарной пары, то есть реакция носит циклический характер.

Данная процедура может применяться для детекции нуклеотидных замен в участках связывания праймеров. Выявление мутаций в генах SHV β-лактамаз с помощью лигазной цепной реакции предложили J. Kim и Y. Kwon в 1999г. Фрагменты генов на начальном этапе получали в результате проведения ПЦР. Был представлен способ типирования генов семи контрольных β-лактамаз (SHV-1,

SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-12). В реакции использовали четыре набора ЛЦР-праймеров (16 олигонуклеотидов), комплементарных участкам ДНК, мутации в которых вызывают замены Лей₃₅→Глн, Арг₂₀₅→Лей, Гли₂₃₈→Сер и Глу₂₄₀→Лиз (Kim J. et al., 1999).

Существование огромного количества различных вариантов β-лактамаз и появление новых их производных, постоянное увеличение количества случаев их обнаружения среди грамотрицательных микроорганизмов и то, что они являются одной из главных причин формирования резистентности к препаратам β-лактаминового ряда – все эти факторы обуславливают потребность проведения широкомасштабных исследований этих ферментов, а также – необходимость разработки и использования в клинико-лабораторной практике проверенных, эффективных и стандартизованных методов их обнаружения и типирования.

Фенотипическое выявление БЛРС у клинических изолятов энтеробактерий, а также применение различных хромогенных тестов для детекции β-лактамаз у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae* позволяет решить задачу обнаружения данных ферментов в клинико-лабораторной практике (Kim J. et al., 1999; Maihew A. et al., 1975).

Для специализированных лабораторий основное направление исследований в этой области – изучение многообразия, основных характеристик и распространённости β-лактамаз для подробного описания механизмов возникновения резистентности у различных бактерий к β-лактаминам. Достижение наилучших результатов возможно при использовании всего комплекса современных фенотипических, молекулярно-биологических и генодиагностических методов исследования.

1.5 β-лактамазы патогенных буркхольдерий

Наиболее важным механизмом формирования и реализации устойчивости к β-лактаминам у возбудителей сапа и мелиоидоза является производство β-лактамаз, гены которых локализованы в хромосомах бактерий. Мутацион-

ные изменения, при которых β -лактамазы конститутивно продуцируются на высоких уровнях, могут происходить естественным путём.

До сих пор не было никаких доказательств того, что устойчивость *B. pseudomallei* к β -лактамам опосредована системой эффлюкса. Это позволяет считать β -лактамазы первичными агентами, обуславливающими развитие устойчивости к широкому спектру β -лактамных антибиотиков (Dance D.A.B., 2000; Godfrey A.J. et al., 1991).

Первоначальные свидетельства о данных ферментах, как детерминантах устойчивости, наблюдали при усилении эффекта β -лактамов путём добавления клавулановой кислоты в процессе исследования МПК *in vitro*. Выявленные различия в профиле резистентности бактерий были обнаружены для ампициллина, амоксициллина, карбенициллина, а МПК цефтазидима и имипенема снизилась в четыре раза (Livermore D.M. et al., 1987).

Аннотирование генома штамма *B. pseudomallei* K96243 показало, что в нём потенциально может содержаться целых семь последовательностей, кодирующих предполагаемые гены β -лактамаз различных классов (Holden M.T.G. et al., 2004; таблица 2).

Кроме того, большинство бактерий, способных продуцировать металло- β -лактамазы, имеют множество других ферментов (Rasmussen B.A. et al., 1997).

Несмотря на наличие большого количества нейтрализующих энзимов, β -лактамы до сих пор очень эффективны в отношении *B. pseudomallei* (Ashdown L.R., 1988). Обследование пациентов с мелиоидозной инфекцией в 1998 году показало следующее распределение устойчивости возбудителя к различным β -лактамам: 0 % – к имипенему, 0,9 % – к цефтазидиму, 0,3 % – к пиперациллину и 1,5 % к амоксиклаву (Heng B.H. et al., 1998).

Таблица 2

Предполагаемые последовательности генов β -лактамаз *B. pseudomallei* (Holden M.T.G. et al., 2004; GenBank, регистрационные номера NC_006350 и NC_006351).

Ген	Молекулярный класс	Функциональный класс (Bush)	Преимущественный субстрат
<i>Хромосома 1</i>			
BPSL0374	B	не охарактеризован	не охарактеризован
BPSL1561	B	не охарактеризован	не охарактеризован
BPSL2708	B	не охарактеризован	не охарактеризован
<i>Хромосома 2</i>			
BPSS0946 (PenA)	A	2a / 2b	Пенициллины (Cheung T.K.M. et al., 2002; Ho P.L. et al., 2002; Sam I.C. et al., 2009; Tribuddharat C. et al., 2003)
BPSS1915	B	не охарактеризован	не охарактеризован
BPSS1997 (OXA)	D	не охарактеризован	Оксациллины (Keith K.E. et al., 2005; Niusump P. et al., 2002)
BPSS2119	B	не охарактеризован	не охарактеризован

β -лактамазы класса А (BPSS0946)

Одним из наиболее подробно описанных генов, является *penA*, первоначально обозначенный как *bla_{BPSI}*, кодирующий β -лактамазу класса А (Cheung T.K.M. et al., 2002). При экспрессии из плазмиды *E. coli*, обуславливает возникновение устойчивости ко многим антибиотикам различных классов, включая пенициллины и ряд цефалоспоринов II поколения (Cheung T.K.M. et al., 2002). Показано,

что точечные мутации в пределах этого гена способствуют существенным изменениям субстратной специфичности фермента (Ho P.L. et al., 2002; Sam I.C. et al., 2009; Tribuddharat C. et al., 2003). Аминокислотная замена P167S вызывает возрастание устойчивости к цефтазидиму в экспериментах с использованием клинических изолятов и мутантных штаммов, полученных в лаборатории (Sam I.C. et al., 2009; Tribuddharat C. et al., 2003). Другое описанное изменение профиля устойчивости PenA – замена S72F, в этом случае увеличивается резистентность бактерий к клавулановой кислоте (Tribuddharat C. et al., 2003). Единичная замена аминокислоты S69Y в молекуле PenA ответственна за исчезновение чувствительности микроорганизма к цефтазидиму. В случае тех же штаммов, но с мутациями, устойчивость к амоксициллину меняется на чувствительность. Тот факт, что устойчивость возникает во время лечения пациента означает, что, по крайней мере в течение короткого периода, в организме одновременно существуют две субпопуляции бактерий с разными фенотипами: чувствительные к амоксициллину и устойчивые (Sam I.C. et al., 2009).

β-лактамазы класса D (BPSS1997)

Только одна из предполагаемых последовательностей β-лактамаз была молекулярно характеризована: оксациллиназа BPSS1997. Путём многократных пассажей *B. pseudomallei* на среде с цефтазидимом, при МПК увеличенной в четыре раза, Niumsup с соавторами смогли увеличить специфическую активность BPSS1997 в отношении цефтазидима и имипенема в 32 и 52 раза, соответственно. Однако это резкое увеличение эффективности было получено *in vitro*, где присутствовали только фермент и субстрат. Клонирование генов в плазмиды *E. coli* не выявило измеримых изменений в МПК цефтазидиму или имипенему.

При исследовании OXA-57 (класс D), авторы признают несоответствие между тем, насколько хорошо клонированная β-лактамаза проявляет активность *in vitro* и восприимчивостью штаммов (Keith K.E. et al., 2005). Одним из возможных объяснений является то, что ген просто не экспрессировался в достаточном количестве, чтобы повлиять на профиль устойчивости к пиперациллину.

β-лактамазы класса В

Ферменты функционального класса В, кодируемые предполагаемыми последовательностями металло-β-лактамаз BPSL0374, BPSL1561, BSL2708, BPSS1915 и BPSS2119, встречаются реже, но являются эффективными инактиваторами карбапенемов (Testa V. et al., 2003). Учитывая восприимчивость возбудителя мелиоидоза к карбапенемам (Thibault F.M. et al., 2004) существует вероятность того, что эти ферменты не активны в клетках данных бактерий.

Однако вклад конкретной β-лактамазы в общий профиль резистентности микроорганизма может быть полностью оценён только *in vivo*. Это верно не только для ферментов с охарактеризованной функциональной активностью (например, PenA), но и для ферментов, активность которых до сих пор не изучена. Например, устойчивость *Acinetobacter baumannii* к β-лактамам связана с синергетическим взаимодействием между слабой β-лактамазой и мощной эффлюкс-системой бактерии. Вполне возможно, что многие неохарактеризованные комбинации взаимодействия системы эффлюкса и модификаций ферментов могут работать совместно для некоторых классов антибиотиков.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Штаммы микроорганизмов рода *Burkholderia*, использованные в работе, питательные среды и условия культивирования

Перечень использованных в работе штаммов *B. pseudomallei* и *B. mallei* приведён в таблице 3. Все штаммы буркхольдерий предоставлены коллекционным центром ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Штаммы 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 («Ляхема», Чехия) и API 20NE («BioMerieux», Франция). Исследования проводили согласно инструкциям, прилагаемым к наборам. Использованные в работе штаммы по морфологическим и культурально-биохимическим свойствам являлись типичными представителями рода *Burkholderia*.

Учитывая то, что возбудители сапа и мелиоидоза относятся к агентам II группы патогенности, работа с ними проводилась в соответствии СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Сведения об использованных в исследовании штаммах *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia* с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям, в том числе к β -лактамным антибиотикам, приведены в соответствующих главах экспериментальных разделов работы.

Коллекционные штаммы различных видов буркхольдерий, использованные в работе

№ п/п	Штамм	Международный номер или авторское обозначение	Место и год выделения	Источник выделения
1.	<i>B. pseudomallei</i> 2	2	Вьетнам, 1985	кровь больного
2.	<i>B. pseudomallei</i> 100	Dalat 100	-''-	-''-
3.	<i>B. pseudomallei</i> 101	Crachat d' Iran 101	-''-	-''-
4.	<i>B. pseudomallei</i> 107	PJ 54 107	нет данных	нет данных
5.	<i>B. pseudomallei</i> 109	Roos 109	Вьетнам, 1985	мокрота
6.	<i>B. pseudomallei</i> 112	Cooper 112	Австралия, 1982	раневое отделяемое
7.	<i>B. pseudomallei</i> 113	Skanmandri 113	-''-	мокрота
8.	<i>B. pseudomallei</i> 125	125	нет данных	нет данных
9.	<i>B. pseudomallei</i> 127	127	нет данных	нет данных
10.	<i>B. pseudomallei</i> 130	130	Таиланд, 1985	клинический изолят
11.	<i>B. pseudomallei</i> 137	137	-''-	-''-
12.	<i>B. pseudomallei</i> C-141	C-141	Сайгон, 1948	кровь больного
13.	<i>B. pseudomallei</i> 56770	56770	-''-	моча
14.	<i>B. pseudomallei</i> 57582	57582	-''-	гной сустава
15.	<i>B. pseudomallei</i> 61503	61503	-''-	кровь
16.	<i>B. mallei</i> 10230	10230	нет данных	нет данных
17.	<i>B. mallei</i> Ц-4	Ц – 4	Монголия, 1967	лошадь
18.	<i>B. mallei</i> Ц-5	Ц – 5	-''-	-''-
19.	<i>B. mallei</i> «Иванович»	«Иванович»	Югославия	-''-
20.	<i>B. mallei</i> P-1	P – 1	Югославия	-''-
21.	<i>B. mallei</i> B-120	B - 120	Улан – Уде, 1985	-''-
22.	<i>B. mallei</i> Muksuwar – 11	Muksuwar – 11	Индия, 1979	-''-
23.	<i>B. mallei</i> 5584	5584	Россия, 1917	-''-
24.	<i>B. thailandensis</i> E264	E264	Таиланд, 1998	почва
25.	<i>B. cepacia</i> 25416	ATCC25416	-''-	-''-

2.2. Антимикробные препараты и методы определения чувствительности

Чувствительность культур микроорганизмов к антимикробным соединениям различных классов определяли диско-диффузионным методом. Принцип метода основан на способности антибиотиков диффундировать из пропитанных ими бумажных дисков в питательную среду, при этом угнетается рост чувствительных микроорганизмов, посеянных на поверхности агара. В работе использовали наборы стандартизированных дисков с антибиотиками производства научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии (НИИЭМ, Россия).

Определение чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам проводили на пластинах агара Мюллер-Хинтон («HiMedia», Индия). Для посева на чашки с антибиотиками из суточных бактериальных культур готовили бактериальные взвеси в 0,15 М NaCl (рН 7,0), содержащие $1,5 \times 10^8$ м.к./мл. Для стандартизации бактериальных взвесей использовали стандарт мутности 0,5 по Мак-Фарланду.

Аликвоты бактериальных взвесей наносили на поверхность агара и растирали по всей поверхности стеклянным шпателем. Посевы подсушивали и помещали на их поверхность с помощью прокалённого над пламенем спиртовки пинцета стандартные маркированные бумажные диски, содержащие определённую концентрацию антибиотиков. Диски располагали на расстоянии не менее 10 мм от краёв чашки Петри и 20 мм друг от друга.

Чашки с дисками помещали в термостат для инкубации при 37 °С в течение одних суток. Учёт результатов производили через 20 - 24 ч путём измерения диаметра зоны задержки роста в мм. Результаты тестов оценивали согласно МУК 4.2.1890-04.

2.3. Выделение геномных ДНК

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 модификация-

ми. Для выделения ДНК использовали культуры штаммов, выращенные на плотных питательных средах в течение 18 - 24 ч при 37 °С.

1. Из бактериальных культур, выросших на плотных питательных средах, готовили взвеси плотностью 2×10^9 м.к./мл в стерильной бидистиллированной воде.
2. К лизирующему буферу добавляли 0,03 мг протеиназы К.

Состав лизирующего буфера:

20 мМ трис-НСl

100 мМ КСl

5 мМ MgCl₂

0,2 мг/мл желатина

0,9 % Nonidet P-40

0,9 % Твин 20

3. 200 мкл бактериальной суспензии смешивали с равным объёмом лизирующего буфера и аккуратно перемешивали.
4. Инкубировали при 65 °С 120 мин.
5. Прогревали при 99 °С 30 мин для инактивации фермента.
6. Центрифугировали пробы при 10000 об/мин, 1 мин.
7. Полученные препараты ДНК хранили при -20 °С.

2.4. Методы анализа геномных последовательностей

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 Arte-

mis 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).

2.5. Постановка полимеразной цепной реакции

Конечный объём ПЦР – смеси для проведения индивидуальных реакций амплификации составлял 25 мкл с учётом добавления матричной ДНК.

Необходимые реакционные компоненты вносили в пропорциях, указанных в таблице 4, исходя из количества анализируемых препаратов ДНК. Реакционную смесь распределяли по 13 мкл в индивидуальные пробирки для ПЦР; в каждую пробирку добавляли по 1 мкл препарата геномной ДНК. После внесения образцов, поверх реакционной смеси наслаивали 10 мкл минерального масла. Амплификацию проводили согласно протоколам, указанным в соответствующих разделах экспериментальных исследований.

Состав амплификационной смеси

Компоненты	Объём*, мкл
бидистиллированная стерильная вода	5
2× ПЦР-буфер с Mg^{2+} и смесью dNTP	7,5
Taq – полимеразы	0,25
праймеры**	0,5

* – объём, добавленный в расчёте на одну реакцию;

** – нуклеотидные последовательности праймеров для амплификации фрагментов генов β -лактамаз приведены в разделе экспериментальных исследований.

Все манипуляции при постановке реакции амплификации проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями.

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 $MgCl_2$ («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.

2.6. Методы детекции продуктов амплификации ДНК

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 ки-

слота, 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).

2.7. Статистическая обработка данных

Полученные в ходе экспериментальных исследований данные подвергали статистической обработке. Для проведения статистической обработки результатов использовали пакет прикладных программ STATISTICA 6.0 («StatSoft Inc.», США).

ГЛАВА 3. КОНСТРУИРОВАНИЕ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ПЦР-ДЕТЕКЦИИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ ГЕНОВ β -ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

3.1 Сравнительная характеристика нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз и их предполагаемых продуктов

Выбор кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β -лактамаз, был проведён на основе анализа девяти аннотированных геномов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственного непатогенного вида *B. thailandensis* (Genbank access. CP000011, CP000545, CP000547, CP000525, CP000572, CP000124, CP000570, BX571965, CP000085, таблица 5), 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>).

Таблица 5
Секвенированные последовательности геномов *Burkholderia*, использованные для сравнительного анализа β -лактамазных генов

<i>Регистрационный номер в Genbank</i>	<i>Репликон, вид и штамм микроорганизма</i>
NC_006348	хромосома 1 <i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
NC_006349	хромосома 2 <i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
CP000124	хромосома 1 <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b
NC_007435	хромосома 2 <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b
NC_006350	хромосома 1 <i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
NC_006351	хромосома 2 <i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
NC_007651	хромосома 1 <i>Burkholderia thailandensis</i> E264
NC_007650	хромосома 2 <i>Burkholderia thailandensis</i> E264

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). Кодировующие последовательности патогенных буркхольдерий, имеющие высокую степень гомологии известным генам β -лактамаз классов А, В и D, приведены в таблице 6.

Таблица 6

Кодирующие последовательности буркхольдерий, гомологичные генам β -лактамаз молекулярных классов А, В и D

№ п/п	Локус	5' позиция	3' позиция	Микроорганизм, штамм
1	2	3	4	5
1.	<u>BMA_A0168</u>	165040	163661	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
2.	<u>BMA_A0381</u>	370141	369401	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
3.	<u>BMA_A1283</u>	1387241	1386354	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
4.	<u>BMA_0093</u>	105488	104409	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
5.	<u>BMA_1676</u>	1746969	1746193	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
6.	<u>BMA_2018</u>	2112349	2113809	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
7.	<u>BMA_2060</u>	2160326	2159370	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
8.	<u>BMA_2909</u>	3000920	3000276	<i>Burkholderia mallei</i> ATCC23344
9.	<u>BMA10229_0527</u>	576870	575926	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
10.	<u>BMA10229_1756</u>	1800394	1799654	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
11.	<u>BMA10229_A1632</u>	1676987	1677631	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
12.	<u>BMA10229_A2007</u>	2034256	2033177	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
13.	<u>BMA10229_A2684</u>	2711136	2712092	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
14.	<u>BMA10229_A2729</u>	2759474	2758260	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229
15.	<u>BMA10229_A3139</u>	3175737	3176513	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10229

Таблица 6 (продолжение)

1	2	3	4	5
16.	<u>BMA10247_1451</u>	1442627	1441851	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
17.	<u>BMA10247_1880</u>	1858726	1859940	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
18.	<u>BMA10247_1925</u>	1907714	1906758	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
19.	<u>BMA10247_2281</u>	2250788	2251867	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
20.	<u>BMA10247_2969</u>	2927030	2926386	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
21.	<u>BMA10247_A0195</u>	166241	164823	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
22.	<u>BMA10247_A0424</u>	372447	371707	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
23.	<u>BMA10247_A1040</u>	978359	979303	<i>Burkholderia mallei</i> NCTC10247
24.	<u>BMASAVP1_0255</u>	285400	285224	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
25.	<u>BMASAVP1_0257</u>	286401	285457	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
26.	<u>BMASAVP1_1339</u>	1329258	1327840	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
27.	<u>BMASAVP1_1570</u>	1536727	1535987	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
28.	<u>BMASAVP1_A0852</u>	846704	847660	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
29.	<u>BMASAVP1_A0896</u>	894426	893212	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
30.	<u>BMASAVP1_A2178</u>	2163049	2162273	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
31.	<u>BMASAVP1_A3089</u>	3062298	3063377	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
32.	<u>BMASAVP1_A3400</u>	3366059	3366703	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1
33.	<u>BURPS1106A_A0657</u>	638647	639573	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
34.	<u>BURPS1106A_A1301</u>	1229644	1230588	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
35.	<u>BURPS1106A_A1563</u>	1509535	1507943	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
36.	<u>BURPS1106A_A2599</u>	2548099	2549517	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
37.	<u>BURPS1106A_A2719</u>	2655289	2654480	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
38.	<u>BURPS1106A_A2863</u>	2805153	2805893	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
39.	<u>BURPS1106A_0420</u>	384410	385489	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
40.	<u>BURPS1106A_2172</u>	2157352	2158254	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
41.	<u>BURPS1106A_2617</u>	2579914	2579138	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
42.	<u>BURPS1106A_3173</u>	3088221	3089681	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
43.	<u>BURPS1106A_3217</u>	3136400	3135444	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
44.	<u>BURPS1106A_3903</u>	3811276	3811920	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106a
45.	<u>BURPS1106B_0687</u>	887896	888840	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b
46.	<u>BURPS1106B_0427</u>	1167770	1166178	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b
47.	<u>BURPS1106B_1341</u>	1390774	1391700	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b
48.	<u>BURPS1106B_2313</u>	2258233	2257493	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b
49.	<u>BURPS1106B_2455</u>	2408096	2408905	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b
50.	<u>BURPS1106B_2577</u>	2515169	2513751	<i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b

Таблица 6 (продолжение)

1	2	3	4	5
51.	<u>BURPS1106B_A1407</u>	1425274	1426176	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
52.	<u>BURPS1106B_A1840</u>	1847633	1846857	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
53.	<u>BURPS1106B_A2388</u>	2356846	2358060	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
54.	<u>BURPS1106B_A2431</u>	2404787	2403831	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
55.	<u>BURPS1106B_A3105</u>	3072211	3072855	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
56.	<u>BURPS1106B_A3704</u>	3632672	3633751	<i>Burkholderia pseudomallei 1106b</i>
57.	<u>BURPS1710b_A0048</u>	47294	47938	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
58.	<u>BURPS1710b_A0620</u>	595801	596880	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
59.	<u>BURPS1710b_A1095</u>	1090287	1091483	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
60.	<u>BURPS1710b_A2501</u>	2569963	2570865	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
61.	<u>BURPS1710b_A2931</u>	2992440	2991664	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
62.	<u>BURPS1710b_A3456</u>	3497172	3498404	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
63.	<u>BURPS1710b_A3501</u>	3545041	3544085	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
64.	<u>BURPS1710b_B0396</u>	477084	475885	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
65.	<u>BURPS1710b_B1188</u>	1277701	1279119	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
66.	<u>BURPS1710b_B1308</u>	1384815	1384006	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
67.	<u>BURPS1710b_B1446</u>	1533364	1534104	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
68.	<u>BURPS1710b_B2389</u>	2477618	2478508	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
69.	<u>BURPS1710b_B2996</u>	3069269	3070213	<i>Burkholderia pseudomallei 1710b</i>
70.	<u>BURPS668_0400</u>	369943	371022	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
71.	<u>BURPS668_1468</u>	1430939	1431745	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
72.	<u>BURPS668_2116</u>	2107958	2108881	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
73.	<u>BURPS668_2563</u>	2533407	2532631	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
74.	<u>BURPS668_3048</u>	2993112	2993600	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
75.	<u>BURPS668_3136</u>	3072477	3073691	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
76.	<u>BURPS668_3178</u>	3120195	3119239	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
77.	<u>BURPS668_3822</u>	3726823	3727467	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
78.	<u>BURPS668_A0749</u>	712853	713779	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
79.	<u>BURPS668_A1381</u>	1295171	1296115	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
80.	<u>BURPS668_A1383</u>	1296217	1296336	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
81.	<u>BURPS668_A1644</u>	1574487	1572895	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
82.	<u>BURPS668_A2742</u>	2620853	2622271	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
83.	<u>BURPS668_A2872</u>	2728608	2727799	<i>Burkholderia pseudomallei 668</i>
84.	<u>ntbpA0512</u>	657570	658496	<i>Burkholderia pseudomallei K96243</i>
85.	<u>BPSS0485</u>	657606	658496	<i>Burkholderia pseudomallei K96243</i>

Таблица 6 (продолжение)

1	2	3	4	5
86.	<u>ntbpA0995</u>	1248195	1249082	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
87.	<u>BPSS0946</u>	1248195	1249082	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
88.	<u>ntbpA1227</u>	1562109	1560517	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
89.	<u>ntbpA1381</u>	1796458	1795244	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
90.	<u>ntbpA2010</u>	2595052	2596470	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
91.	<u>BPSS1915</u>	2595091	2596470	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
92.	<u>ntbpA2098</u>	2702273	2701464	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
93.	<u>BPSS1997</u>	2702273	2701464	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
94.	<u>ntbpA2220</u>	2868176	2868916	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
95.	<u>BPSS2119</u>	2868176	2868916	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
96.	<u>ntbp0374</u>	404374	405453	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
97.	<u>BPSL0374</u>	404374	405453	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
98.	<u>ntbp0810</u>	971269	972465	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
99.	<u>ntbp1536</u>	1812292	1811369	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
100.	<u>BPSL1561</u>	1812292	1811369	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
101.	<u>ntbp2243</u>	2722395	2721619	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
102.	<u>ntbp2706</u>	3238401	3239633	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
103.	<u>BPSL2708</u>	3238401	3239633	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
104.	<u>ntbp2741</u>	3286337	3285381	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
105.	<u>ntbp3286</u>	3892896	3893540	<i>Burkholderia pseudomallei</i> K96243
106.	<u>BTH II0372</u>	443404	443904	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
107.	<u>BTH II0373</u>	443933	444742	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
108.	<u>BTH II0462</u>	551387	550008	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
109.	<u>BTH II0925</u>	1087267	1084895	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
110.	<u>BTH II1108</u>	1286646	1287836	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
111.	<u>BTH II1450</u>	1714052	1713084	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
112.	<u>BTH II1931</u>	2351048	2350152	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
113.	<u>BTH I0347</u>	385068	386147	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
114.	<u>BTH I1394</u>	1566945	1567901	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
115.	<u>BTH I1429</u>	1613601	1612369	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
116.	<u>BTH I1908</u>	2155152	2155928	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
117.	<u>BTH I2282</u>	2571646	2570735	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264
118.	<u>BTH I3151</u>	3594225	3594869	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264

Верификация транслированных аминокислотных последовательностей вышеобозначенных генов β -лактамаз видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» была проведена нами на основании принадлежности исследуемых последовательностей к различным функциональным группам β -лактамаз по классификации Structural Classification of Proteins (SCOP) (Murzin A.G. et al., 1995).

Результаты проведённого анализа с использованием поиска по БД Superfamily v. 1.75 (<http://supfam.cs.bris.ac.uk>) представлены на рисунке 2. В качестве поискового запроса был использован файл множественного выравнивания аминокислотных последовательностей анализируемых β -лактамаз в формате .fasta, сгенерированный с использованием программного пакета MEGA 6.06 Build # 6140122 (<http://www.megasoftware.net>).

В результате проведённого анализа исследуемые аминокислотные последовательности были отнесены к девяти группам гомологии, включающим энзимы, относящиеся к двум суперсемействам протеинов (β -лактамаз / транспептидаз и металло-гидролаз / оксидоредуктаз). Все исследованные аминокислотные последовательности принадлежали к β -лактамазам трёх молекулярных классов по классификации Ambler – ферментам класса А, В и D (рис. 2) (Ambler R.P., 1969).

Следует отметить, что, несмотря на принадлежность выявленных β -лактамаз классов А и D к одному суперсемейству « β -лактамазы / транспептидазы» и семейству протеинов « β -лактамазы / D-ala карбоксипептидазы» (рис. 2), представители каждого из классов несли в составе аминокислотной последовательности специфичный характеристический мотив активного сайта фермента. Для β -лактамаз класса А таким мотивом являлась последовательность [FY]-x-[LIVMFY]-{E}-S-[TV]-x-K-x(3)-{T}-[AGLM]-{D}-{KA}-[LC], тогда как для β -лактамаз класса D - [PA]-x-S-[ST]-F-K-[LIV]-[PALV]-x-[STA]-[LI].

Представители металло- β -лактамаз (класс В) формировали несколько групп гомологии, объединяющие ферменты семейств « β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы», «глиоксалазы II», «PqsE- подобные металло-гидролазы», «алкил-сульфатазы» и «Zn металло- β -лактамазы» (рисунок 1).

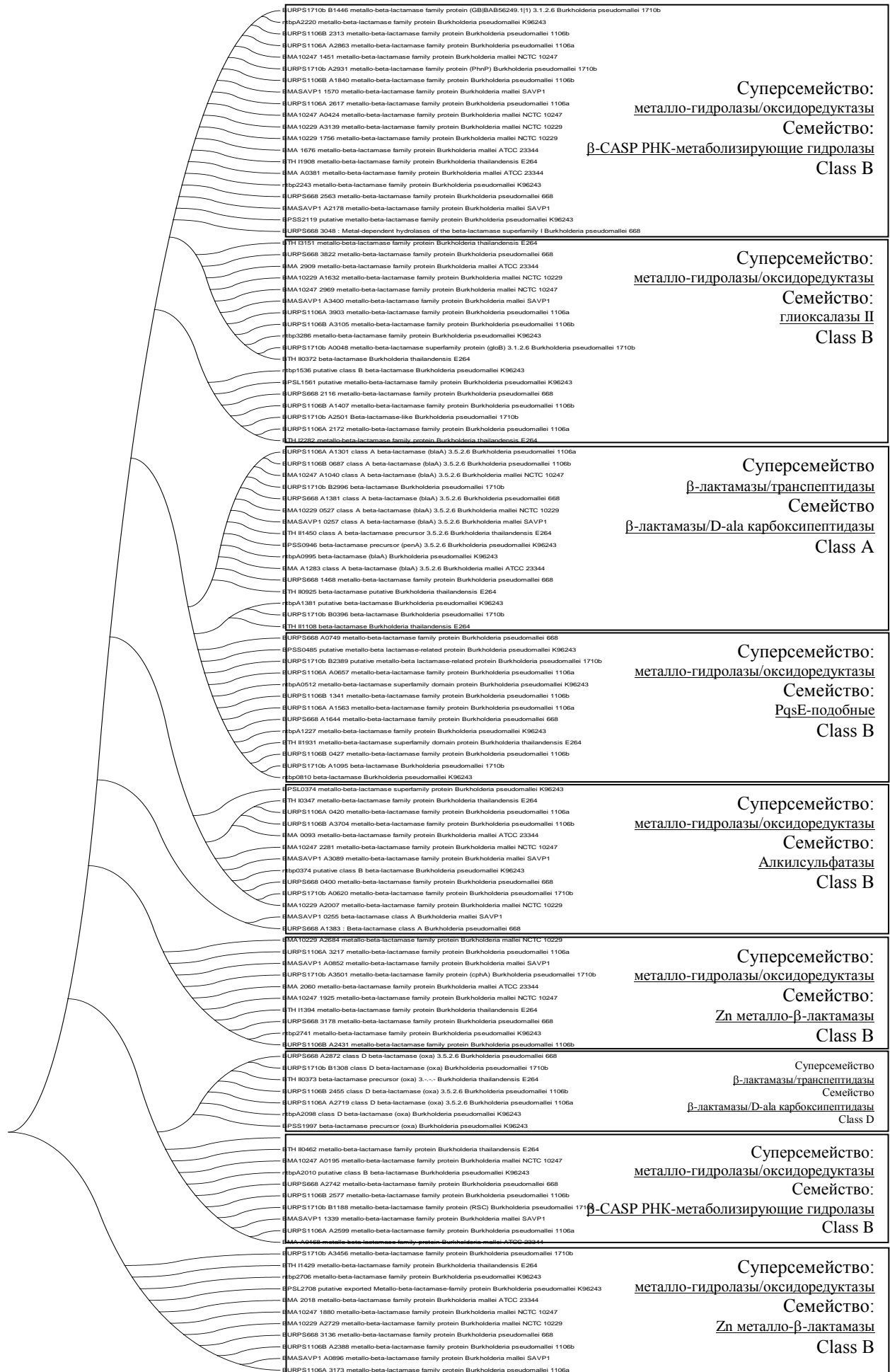


Рисунок 1. Принадлежность транслированных аминокислотных последовательностей β-лактамаз буркхольдерий к различным функциональным группам SCOP (результаты анализа по БД Superfamily v. 1.75 (<http://supfam.cs.bris.ac.uk>))

Также обращал на себя внимание тот факт, что β -лактамазы отдельных филогенетических групп были распространены не у всех исследуемых видов буркхольдерий. Так, β -лактамазы класса D были отмечены лишь у штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а отдельные группы металло- β -лактамаз семейств « β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы» были представлены в основном последовательностями *B. pseudomallei* и *B. mallei* и содержали лишь единичные последовательности *B. thailandensis* (рисунок 1).

3.2. Выбор консервативных дифференцирующих участков нуклеотидных последовательностей β -лактамаз классов А, В и D и конструирование олигонуклеотидных праймеров для их детекции

Нуклеотидные последовательности обозначенных на предыдущем этапе исследования групп β -лактамаз были использованы для подбора пар олигонуклеотидных праймеров. Начальным этапом подбора праймеров был анализ консервативных и вариабельных регионов кодирующих последовательностей β -лактамаз с помощью процедуры множественного выравнивания (multiple alignment) по алгоритму Clustal W (Thomson C.J. et al., 1998) с использованием функции multiple alignment blocks search пакета программ Vector NTI Advanced 9.1 (Invitrogen, США). Результаты группирования генов β -лактамаз буркхольдерий по степени гомологии их нуклеотидных последовательностей приведены на рисунке 2.

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. Данные группы гомологии выделены на рисунке тремя прямоугольными блоками.

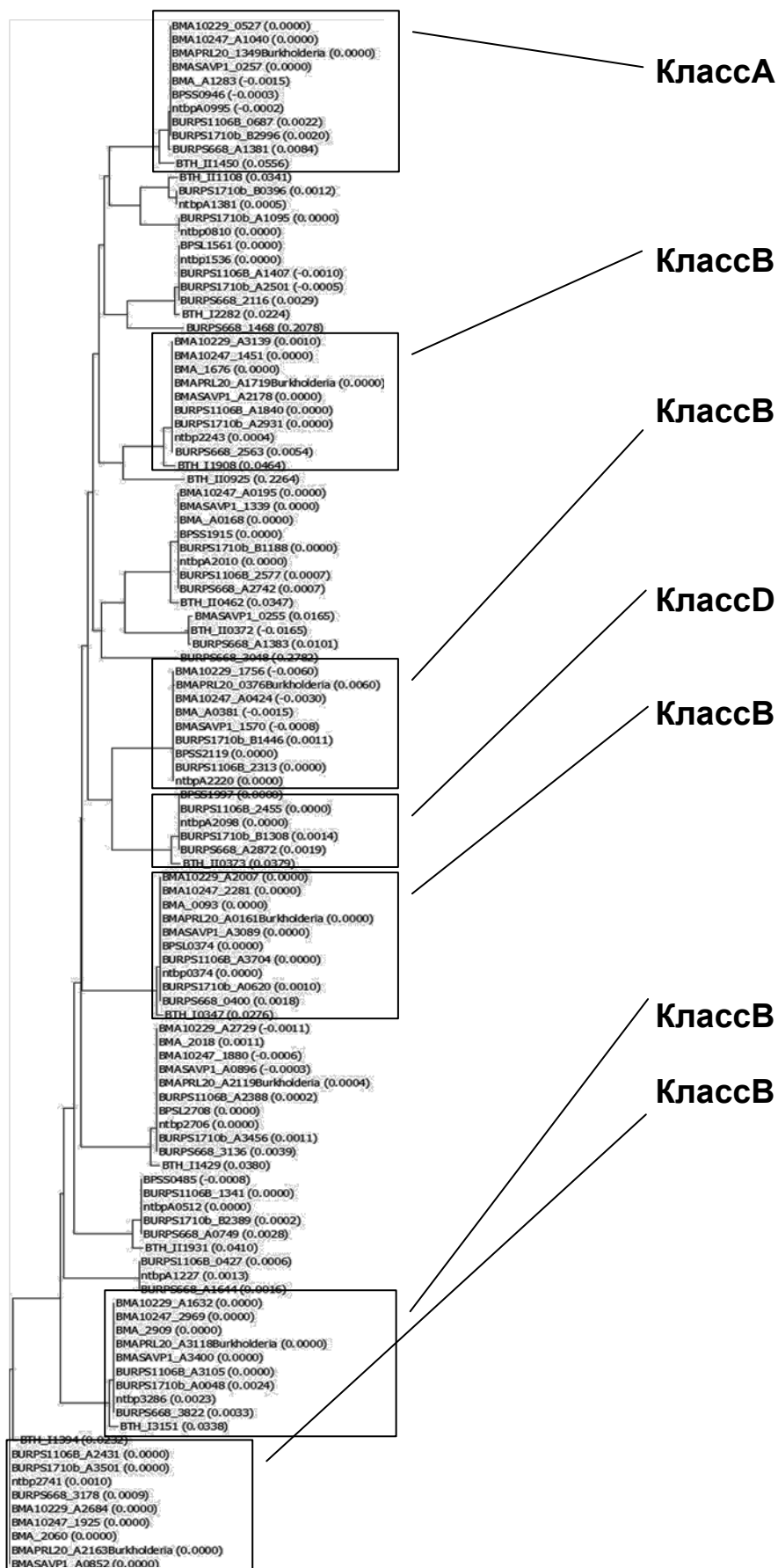


Рисунок. 2. Дендрограмма гомологии нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз буркхольдерий. Блоками обозначены группы генов, использованные для подбора праймеров.

Дальнейший подбор праймеров был проведён с помощью программы

FastPCR Pro 5.4.4 (PrimerDigital Ltd.), используя процедуру multiplex primer search. На данном этапе были подобраны 44 комбинации пар 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 7.

Таблица 7

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>	CCGGATGATGTTTCGAGTAGCCGT G		337-361 нуклеотид	
<i>bps1F3</i>	ACGGCAATTCCTCCATTGCGA	β -лактамаза класса В <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1106b (Genbank access. PRJNA16181 локусBURPS1106B_2313)	9-29 нук- леотид	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	

ГЛАВА 4. АНАЛИЗ РАСПРОСТРАНЁННОСТИ β -ЛАКТАМАЗ КЛАССОВ А, В И D В ГЕНОМАХ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ

4.1. ПЦР-детекция последовательностей β -лактамаз в коллекционных штаммах патогенных буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов

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.

Для выделения геномных ДНК анализируемых штаммов микроорганизмов нами была использована процедура протеиназного лизиса в присутствии неионного детергента Nonidet P-40 (Comey C. et al., 1994), позволяющая получать высокомолекулярную мало фрагментированную геномную ДНК.

Программа амплификации для всех пар праймеров состояла из этапов начального прогрева проб 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 – 1 мин.

Объём реакционной смеси на 1 пробу составил 15 мкл. В состав реакционной смеси входили праймеры в конечной концентрации 15 пМ, 1 Ед ДиаТак ДНК-полимеразы и 1× ПЦР-буфер с дНТФ и MgCl₂ («Интерлабсервис», Россия). Анализируемые препараты геномной ДНК вносили в реакционную смесь в объёме 3-5 мкл и наслаивали в каждую пробирку по 1 капле минерального масла.

Результаты использования набора сконструированных олигонуклеотидов для ПЦР-детекции последовательностей генов β -лактамаз различных молекулярных классов приведены на рисунках 3 – 7.

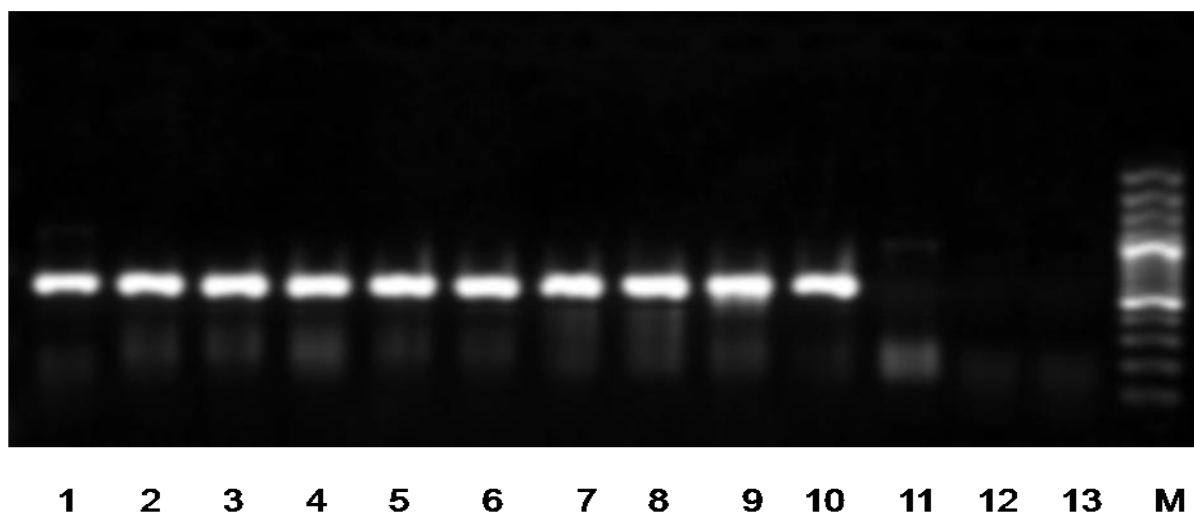


Рис. 3. Детекция гена β -лактамазы класса А в ПЦР с праймерами *bm1F1-bm4R1*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* 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 сшагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

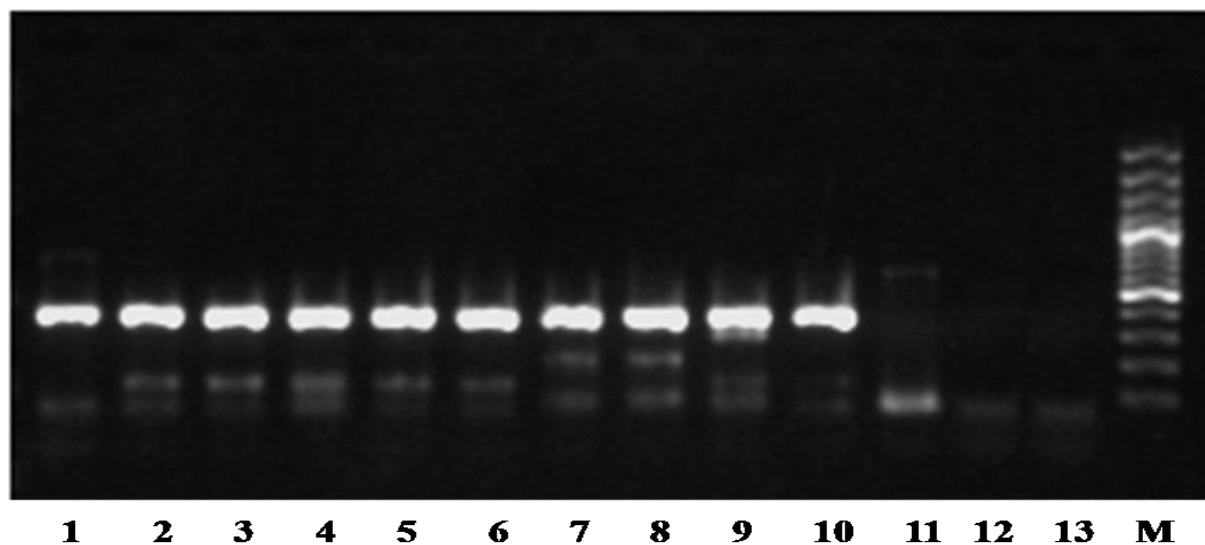


Рис. 4. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* 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 сшагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

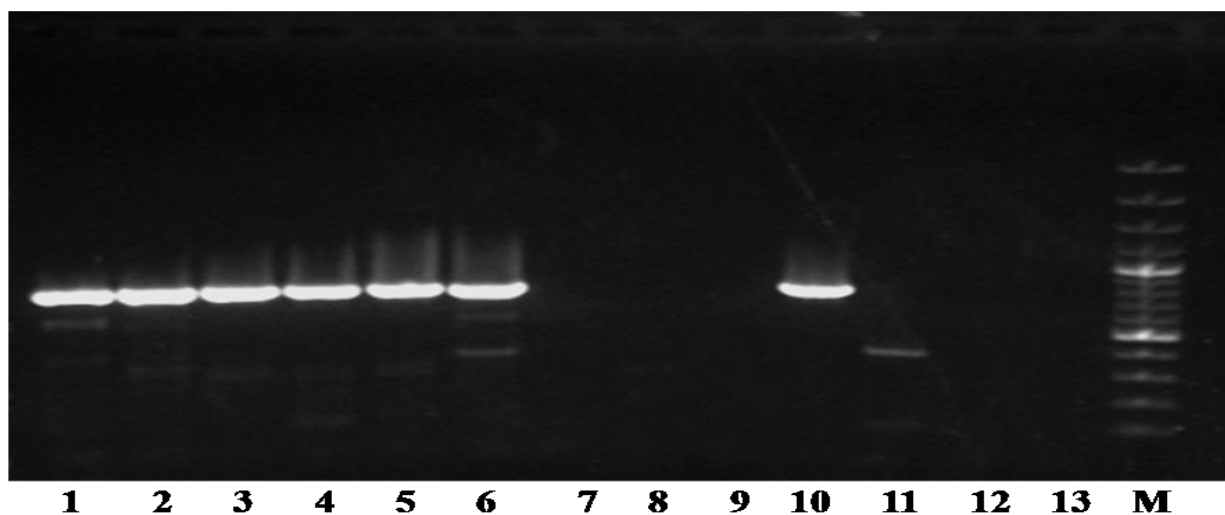


Рис. 5. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* 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.).

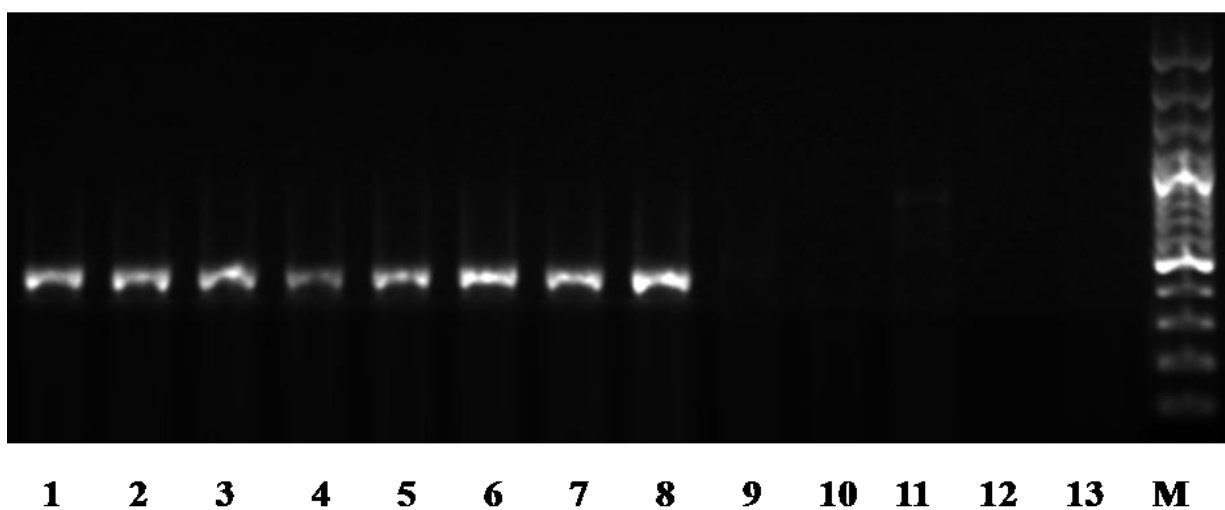


Рис. 6. Детекция гена β -лактамазы класса D в ПЦР с праймерами *bps1F4-bps8R4*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* 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.).

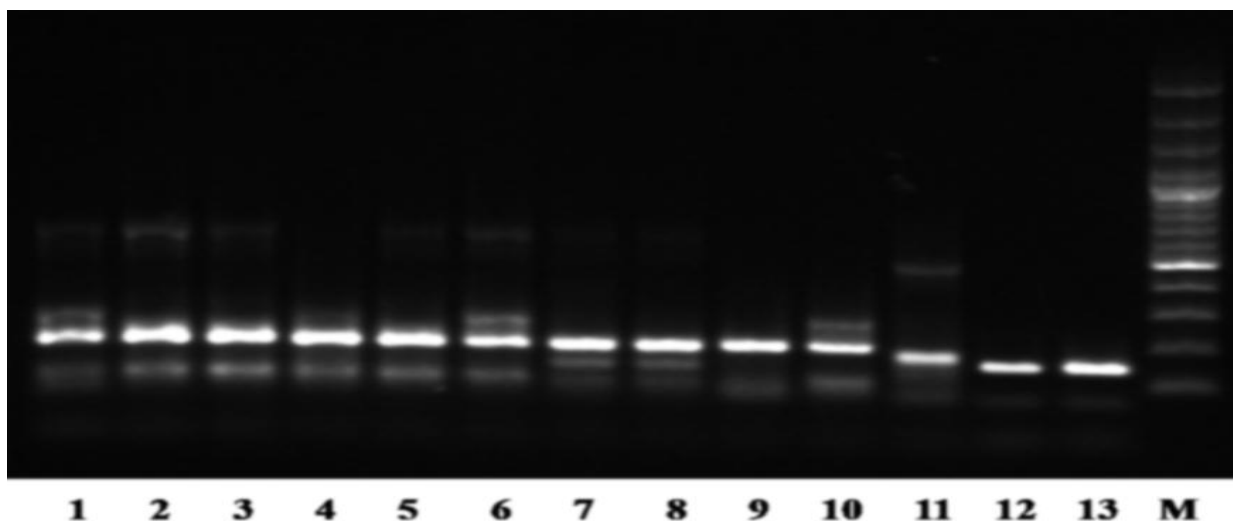


Рис. 7. Детекция гена β -лактамазы класса В в ПЦР с праймерами *bps3F5-bps8R5*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. pseudomallei* 100, 3 - *B. pseudomallei* 114; 4 - *B. pseudomallei* 135, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. pseudomallei* C141, 7 - *B. thailandensis* E264, 8 - *B. thailandensis* 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 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 8.

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>	+	-	+	-	-	-

4.2. Анализ эффективности использования сконструированного набора олигонуклеотидов в формате мультилокусной ПЦР

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 (рисунок 8) 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. ceracia*.

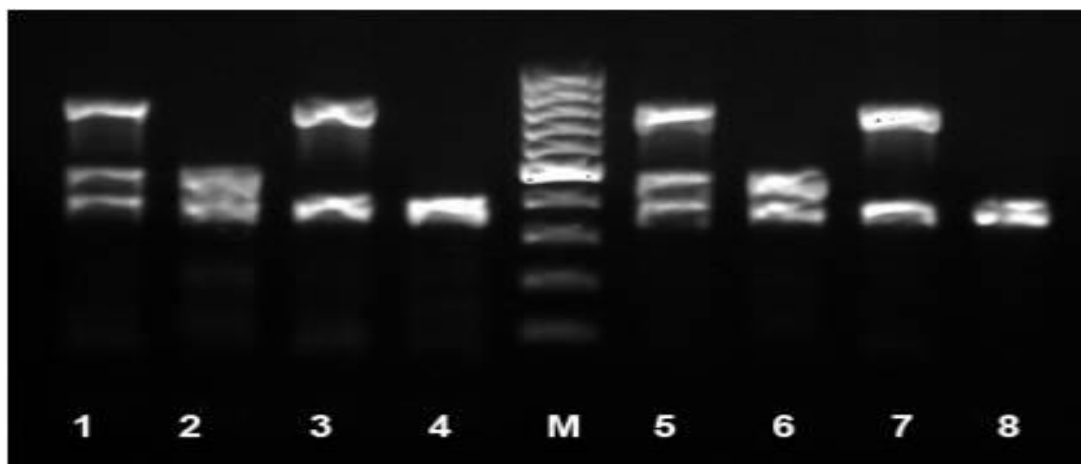


Рис. 8. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 56830, 2 - *B. thailandensis* E264, 3 - *B. mallei* Ц-5; 4 - *B. ceracia* 25416, 5 - *B. pseudomallei* 139, 6 - *B. thailandensis* E299,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

Постановка мультилокусной ПЦР на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геномоваров *ceracia*-комплекса подтвердила возможность дифференциации между различными видами рода *Burkholderia* по набору генов β -лактамаз классов В и D (рисунок 9).

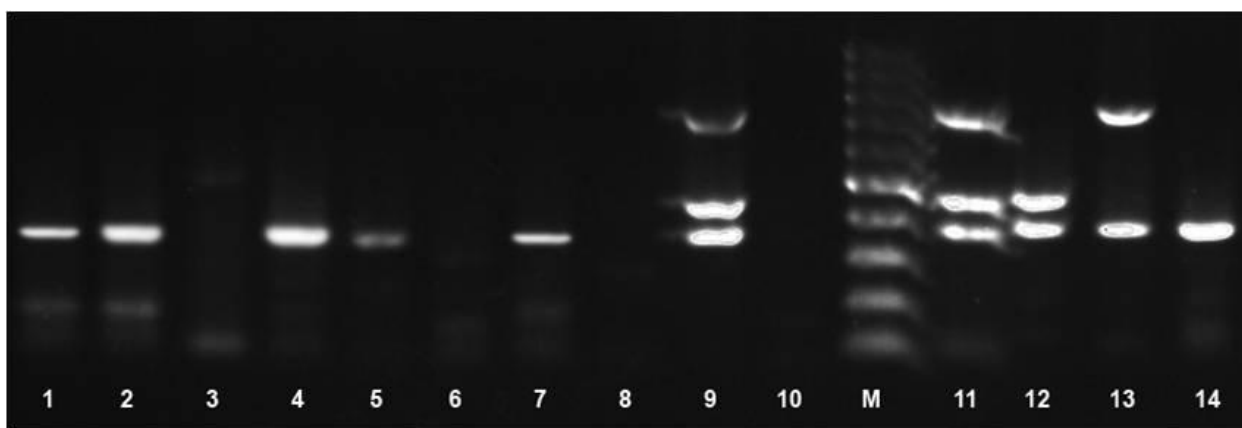


Рис. 9. Детекция генов β -лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 – *B. ceracia* 323, 2 - *B. ceracia* 506, 3 - *B. ceracia* 1934, 4 - *B. ceracia* 25416, 5 - *B. ceracia* 3189, 6 - *B. ceracia* 8235, 7 - *B. ceracia* 8237, 8 - *B. ceracia* 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. ceracia* 25416. М – ДНК леддер сшагом 100 п.н. (100 – 1000 п.н.).

4.3. Использование сконструированных олигонуклеотидов для молекулярно-генетического анализа штаммов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антибиотикам

В данном разделе работы была исследована возможность использования сконструированных олигонуклеотидных затравок для детекции штаммов различных видов буркхольдерий с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям различных классов, включая препараты β -лактамного ряда. Перечень и характеристики использованных при выполнении этого раздела исследования штаммов микроорганизмов приведён в таблицах 9 и 10.

Таблица 9

Исходные штаммы буркхольдерий и их производные, резистентные к препаратам фторхинолоновой и цефалоспориновой групп

Штамм	МПК антибиотиков (мкг/мл)		
	PFX	OFX	CAZ
<i>B. pseudomallei</i> 56770	8	8	10
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMCP	128	>64	>256
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMPC	>128	>128	>64
<i>B. pseudomallei</i> 56770 SMOC	>128	>128	>64
<i>B. pseudomallei</i> 57576	8	8	12
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCP	> 64	>64	>256
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMPC	>128	>128	>64
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMCO	> 64	>128	64
<i>B. mallei</i> Ц-5	2	2	4
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMC	2	2	>128
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMP-150-2	>128	64	4
<i>B. mallei</i> Ц-5 SMP-150-3	>128	32	4
<i>B. thailandensis</i> E264	10	12	10
<i>B. thailandensis</i> E264 SMOP	>128	>128	64

Обозначения: PFX – пefлоксацин, OFX – офлоксацин, CAZ – цефтазидим

Исходные штаммы и инсерционные мутанты различных видов буркхольдерий со сниженной устойчивостью к антибиотикам

Штамм	Фенотип резистентности	МПК, мкг/мл		
		OFX	PFX	CAZ
<i>B. pseudomallei</i> 57576	Дикий тип	25	25	30
<i>B. pseudomallei</i> 57576 SMRT21*	OFX ^R PFX ^R CAZ ^S	120	150	5
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-1**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	12	12	7
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM6-3**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	10	10	10
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7-1**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	12	12	10
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM7-2**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	15	10	10
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-1**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	15	20	30
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-2**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	20	20	20
<i>B. pseudomallei</i> 57576 TTM9-3**	OFX ^S PFX ^S CAZ ^S	15	20	35

Обозначения: PFX – пefлоксацин, OFX – офлоксацин, CAZ – цефтазидим, * - использован транспозон Tn9, ** - использован транспозон Tn5.

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 10.

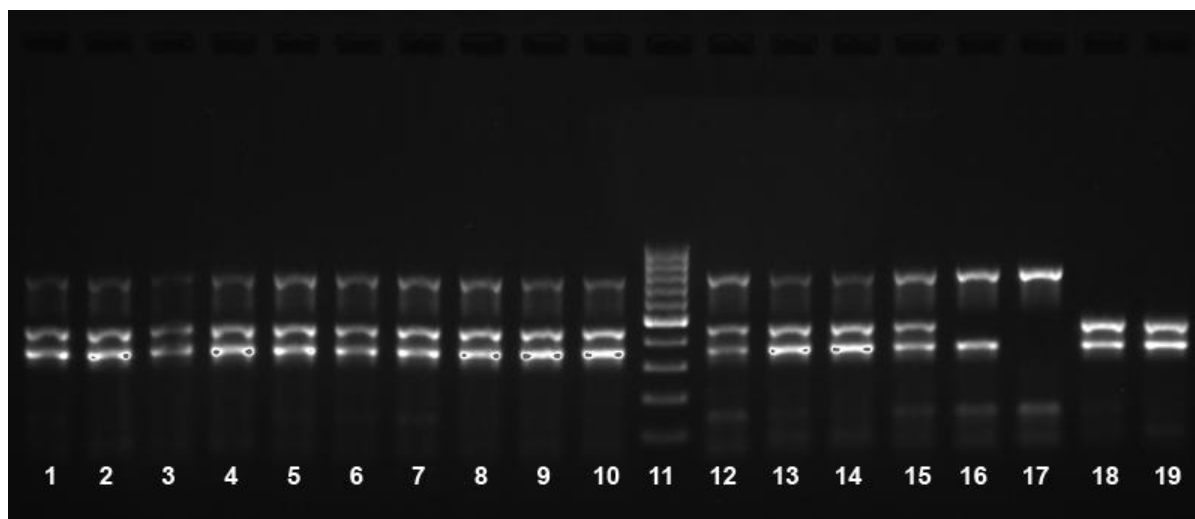


Рис. 10. Детекция генов β-лактамаз классов В и D в мультилокусной ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*, *bps1F4-bps8R4* и *bm1F2-bm14R2*. Обозначения: 1 - *B. pseudomallei* 57576 SMP, 2 - *B. pseudomallei* 57576 SMC, 3 - *B. pseudomallei* 57576 SMO, 4 - *B. pseudomallei* 57576 SMRT21, 5 - *B. pseudomallei* 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-лестер 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.

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. Следует отметить также, что при анализе резистентного к фторхинолоновым препаратам штамма *B. mallei* Ц5 SMP в мультилокусной ПЦР был зарегистрирован отрицательный результат ПЦР с праймерами *bps1F3-bps1R3*. Следует ли расценивать данный факт как свидетельство дефекта последовательности соответствующего гена металло-β-лактамазы у данного мутантного штамма – ответ на данный вопрос требует дополнительных исследований.

Таким образом, результаты, полученные при выполнении данного раздела работы, показали перспективность использования сконструированного набора праймеров для идентификации нуклеотидных последовательностей генов β-лактамаз молекулярных классов А, В и D патогенных буркхольдерий, исследования распространённости различных β-лактамаз в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственных микроорганизмов, а также разработки систем генетической паспортизации штаммов возбудителей с целью решения практических задач генной диагностики и молекулярного типирования.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА АЛГОРИТМОВ АНАЛИЗА ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ β -ЛАКТАМАЗ ПАТОГЕННЫХ БУРКХОЛЬДЕРИЙ СИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ПЛАВЛЕНИЯ АМПЛИКОНОВ СВЫСОКИМ РАЗРЕШЕНИЕМ (HIGH RESOLUTION MELTING, HRM)

Анализ кривых плавления с высокой разрешающей способностью (High Resolution Melting, HRM) представляет собой простую и высокоэффективную технологию для выполнения задач генотипирования и скрининга мутаций. Данный метод имеет ряд преимуществ перед существующими аналогами, прежде всего выражающихся в высокой чувствительности/специфичности (до 100 %) и возможности совмещения полимеразной реакции с самим этапом детекции мутаций. Принцип метода основан на дифференциации образцов ДНК, несущих потенциальные мутации, по форме или сдвигу кривых плавления (Geyner C.N. et al., 2014; Montgomery J.L. et al., 2010).

Технологии генотипирования, основанные на HRM-анализе специфических продуктов ПЦР (high-resolution melting analysis, HRMA, HRM-анализ) в настоящее время находят всё большее применение как в чисто научных исследованиях, так и в различных диагностических приложениях (Erali M. et al., 2010). Экспериментальная оценка применимости HRM-анализа для определения генетических полиморфизмов генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий, по нашему мнению, имеет существенное прикладное значение. В двух разделах данной главы приведены результаты исследования применимости -анализа амплифицированных в ПЦР фрагментов последовательностей генов β -лактамаз молекулярных классов В и D. Полученные HRM-профили применяли для выявления аллельного полиморфизма данных детерминант в штаммах различных видов буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов. Также изучена возможность использования данного подхода для скрининга вероятных мутантных последовательностей генов β -лактамаз у штаммов *Burkholderia spp.* с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям, в том числе, препаратам β -лактаминового ряда.

Аmplификация и HRM-анализ фрагментов генов β -лактамаз различных молекулярных классов были проведены нами на амплификаторе CFX96 («Bio-Rad», США) с использованием реагента SsoFast EvaGreen Supermix («Bio-Rad», США). Постановка всех реакций осуществлялась в объёме 25 мкл, количество геномной ДНК составляло 30-40 нг на реакцию, количество каждого праймера – 10 пмоль. При амплификации использовалась следующая программа: 94° С – 5 минут; далее 35 циклов: 94 °С – 30 секунд, 59,9 °С – 30 секунд, 72 °С – 45 секунд; затем 72 °С – 5 минут. Плавление продуктов амплификации проводили в диапазоне 72 – 95 °С, с увеличением температуры на 0,2 °С каждые 5 секунд. Для обработки полученных данных использовали программный пакет Precision Melt Analysis Software («Bio-Rad», США).

5.1. HRM-анализ полиморфизма генов β -лактамаз в штаммах видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» и гетерологичных микроорганизмов

В описываемой ниже серии экспериментов использовали автодетекцию анализируемого региона плавления. Пограничные домены (pre-melt, post-melt) составили при этом 86,4 °С – 86,9 °С и 94,3 °С – 94,8 °С, соответственно. При выделении кластерных групп HRM-профилей использовали стандартное значение порога различий T_m , равное 0,15.

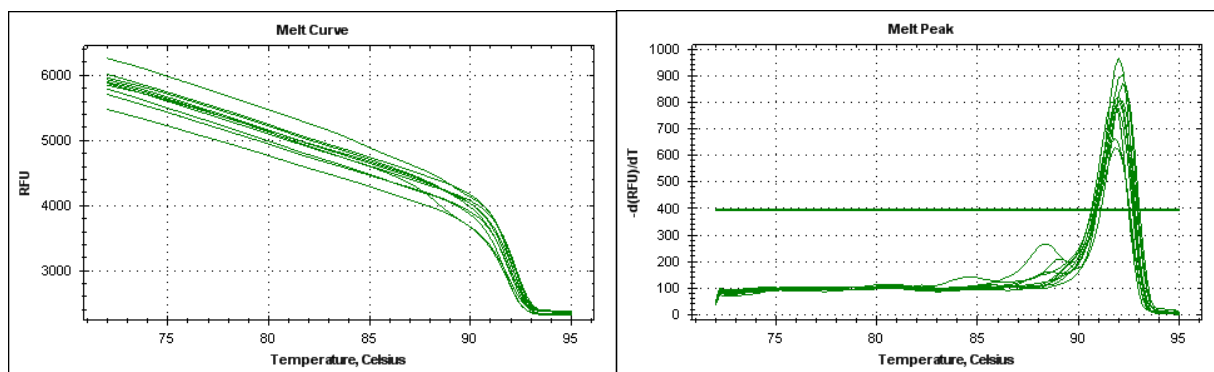
HRM-профилирование ампликонов гена β -лактамазы класса В, амплифицированных в ПЦР спраймерами *bm1F2-bm14R2*, показало наличие трёх аллельных вариантов данного гена в исследованных штаммах *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia* (табл. 11, рис. 11, 12). Наиболее распространённый 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. 11). 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. 11, рис. 11, 12).

Таблица 11

Результаты HRM-анализа фрагмента гена β -лактамазы класса В, амплифицированного в ПЦР с праймерами *bm1F2-bm14R2*

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. 11. Температурные кривые (А) и пики плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*).

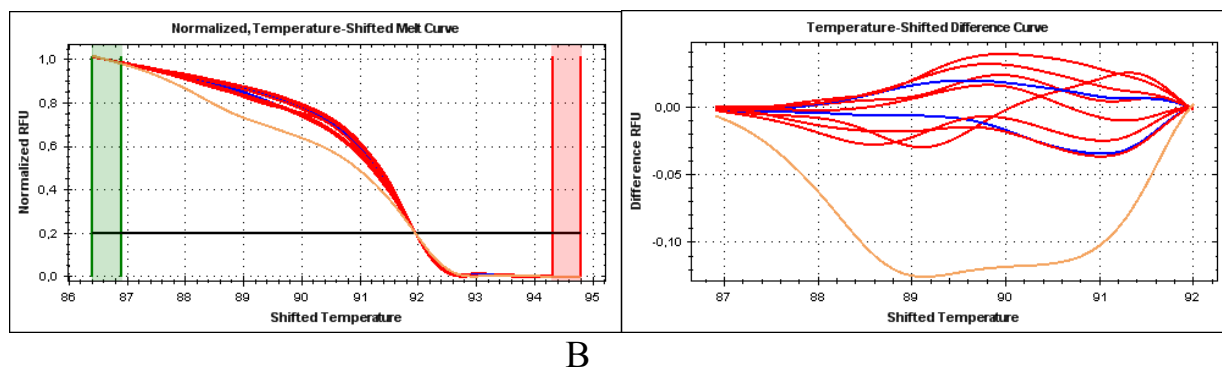


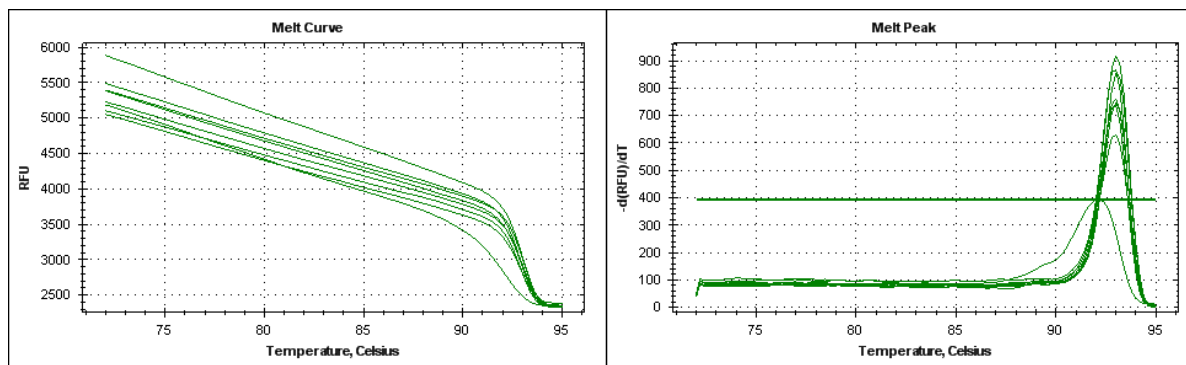
Рис. 12. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F2-bm14R2*).

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. 12, рис. 13, 14).

Таблица 12

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

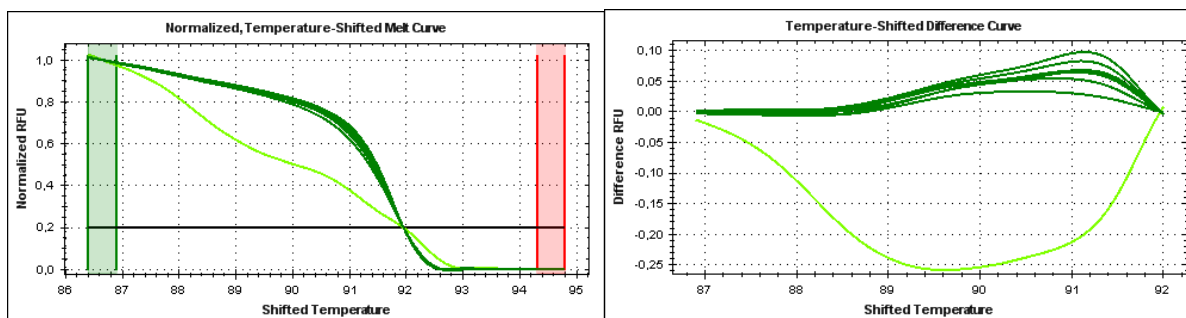
Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	HRM кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	93,00	745,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	93,00	918,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	93,00	761,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	93,00	631,46	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	93,00	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. 13. Температурные кривые (А) и пики плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*).



А

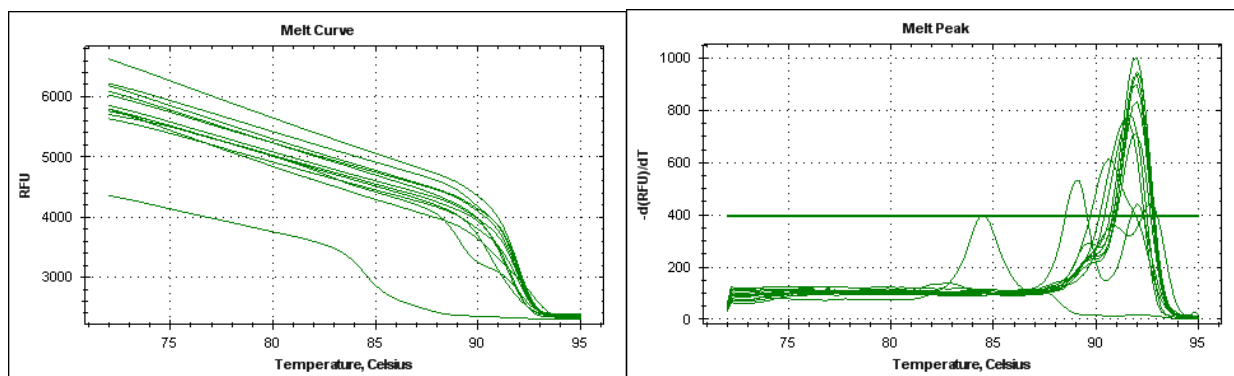
В

Рис. 14. 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. 13). Оба аллельных варианта отчётливо дифференцируются как по пику плавления, так и термодинамике melt-региона (рис. 15, 16).

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

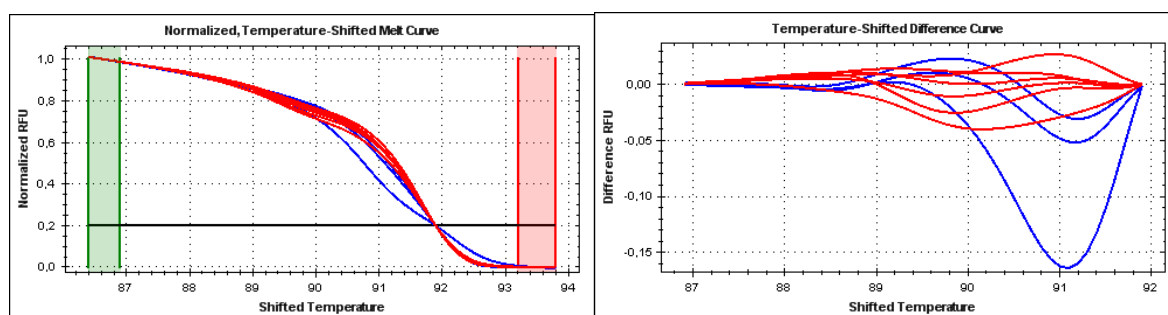
Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	92,0	711,0	01	91,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	92,0	835,0	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	92,0	1003,0	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	92,0	900,8	01	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	92,0	948,0	01	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



A

B

Рис. 15. Температурные кривые (A) и пики плавления (B) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса D (праймеры *bm1F4-bm8R4*).



A

B

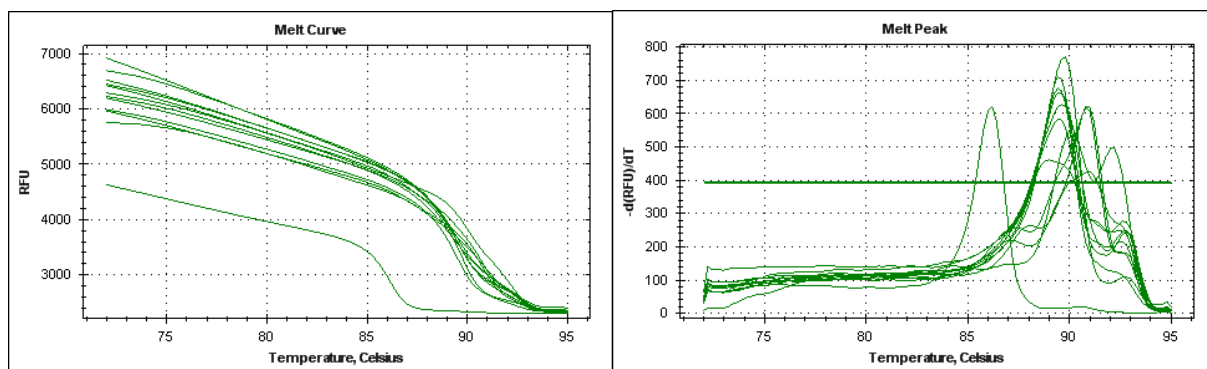
Рис. 16. Нормализованные кривые плавления (A) и дифференцирующий регион кривых плавления (B) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса D (праймеры *bm1F4-bm8R4*).

Аmplифицированная с праймерами *bm3F5-bm8R5* последовательность гена β -лактамазы класса В оказалась наиболее полиморфной по своей структуре, что подтверждается выявлением семи аллельных вариантов гена (табл. 13). 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. 14, рис. 17, 18). 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. 17, 18).

Таблица 14

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

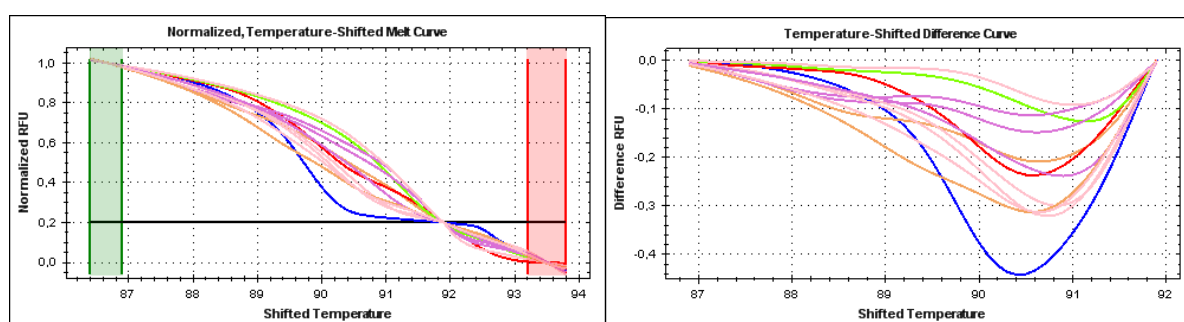
Штамм	Температура плавления, T_m	Высота пика	Кластер	Процент соответствия
<i>B. pseudomallei</i> 56830	89,4	580,00	01	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 100	89,0	460,00	02	97,0
<i>B. pseudomallei</i> 114	89,6	627,00	03	96,0
<i>B. pseudomallei</i> 135	89,8	768,00	01	92,0
<i>B. pseudomallei</i> 139	89,6	661,00	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. 17. Температурные кривые (А) и пики плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*).



А

В

Рис. 18. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*).

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

Выявленная при выполнении предыдущего раздела работы вариабельность структуры генов β -лактамаз молекулярных классов В и D у штаммов дикого типа различных видов буркхольдерий и, в ряде случаев, микроорганизмов отдалённой гетерологии продемонстрировала перспективность использования алгоритмов HRM-профилирования специфических нуклеотидных последовательностей для обозначения вариантов генных фрагментов, различающихся по нуклеотидному составу. В данном разделе исследования была поставлена задача оценить применимость HRM-анализа ПЦР-ампликонов детерминант β -лактамаз классов В и D для скрининга кандидатных мутантных последовательностей данных генов у штаммов с изменённым уровнем устойчивости к β -лактамам соединениям.

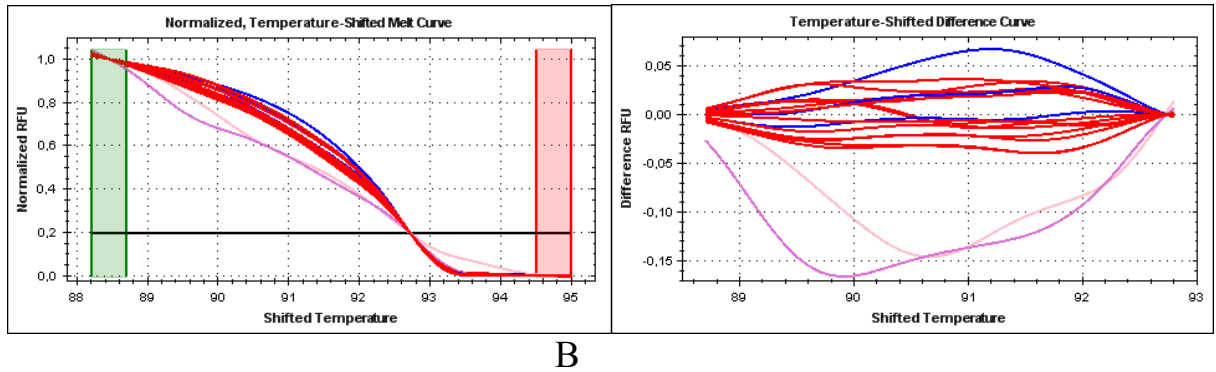
При выполнении данного фрагмента работы были использованы исходные штаммы дикого типа *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*, их полирезистентные производные, полученные методом направленной селекции антибиотиками цефалоспориновой и фторхинолоновой групп, а также Tn9- и Tn5- индуцированные мутанты со сниженным уровнем антибиотикоустойчивости (табл. 9, табл. 10).

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. 15, рис. 19). 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. 15, рис. 19).

Таблица 15

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 TМ7-1	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



А В
Рис. 19. 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. 16, рис. 20).

Таблица 16

HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*) у исходных и мутантных штаммов буркгольдерий 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

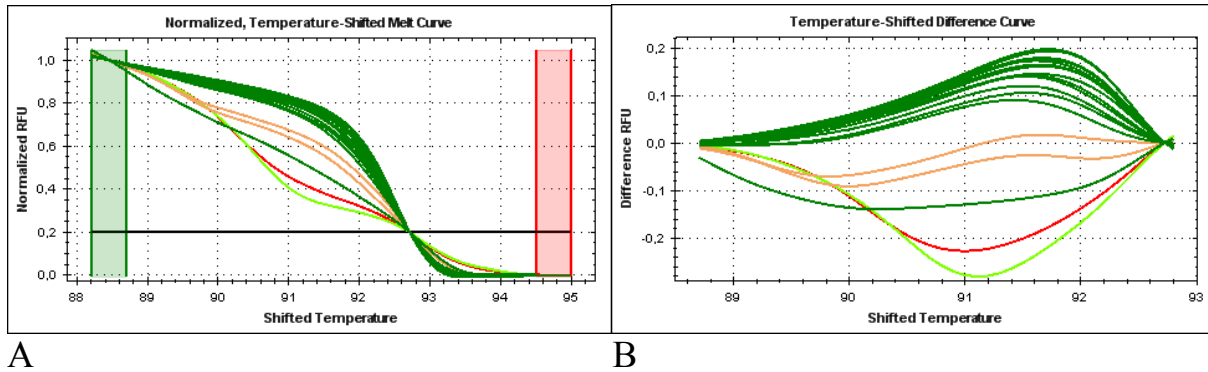


Рис. 20. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm1F3-bm1R3*).

Отметим, что выявленные кандидатные мутантные последовательности гена детектированы в штаммах, при получении которых устойчивость к фторхинолонам (пемфлоксацин) использована либо в качестве единственного (*B. mallei* Ц-5 SMP), либо первичного (*B. pseudomallei* 56770 SMPC) селективного маркера.

Последовательность гена оксациллиназы (*oxa*) оказалась мономорфной у *B. pseudomallei* 57576, его полирезистентных вариантов и части Tn-индуцированных производных (табл. 17, рис. 21); вероятные мутантные последовательности *oxa* были обнаружены лишь у клонов *B. pseudomallei* 57576 ТТМ9.

Также следует отметить то обстоятельство, что HRM-профили *oxa* полирезистентных производных штамма *B. pseudomallei* 56770 были идентичны с *B. pseudomallei* 57576 и его полирезистентными вариантами, тогда как melt-регион самого исходного штамма *B. pseudomallei* 56770 соответствовал другому кластеру (табл. 17, рис. 21).

HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса D (*oxa*) (праймеры *bm1F4-bm8R4*) у исходных и мутантных штаммов буркгольдерий 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

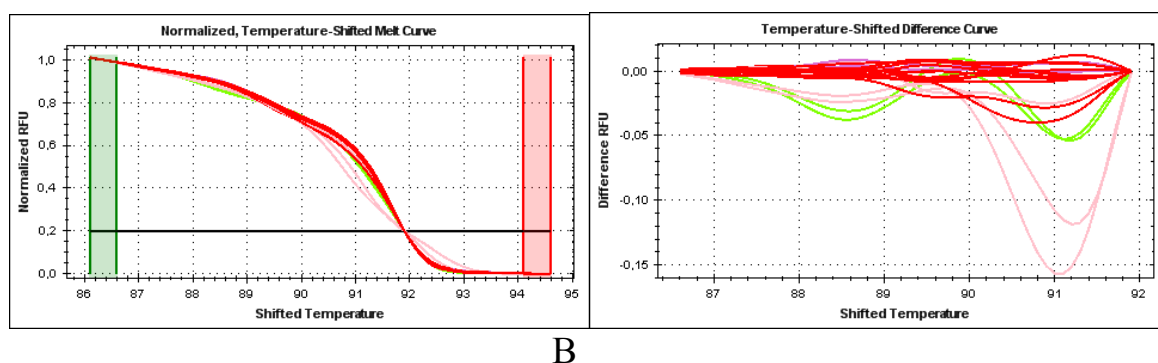


Рис. 21. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса D (*oxa*) (праймеры *bm1F4-bm8R4*).

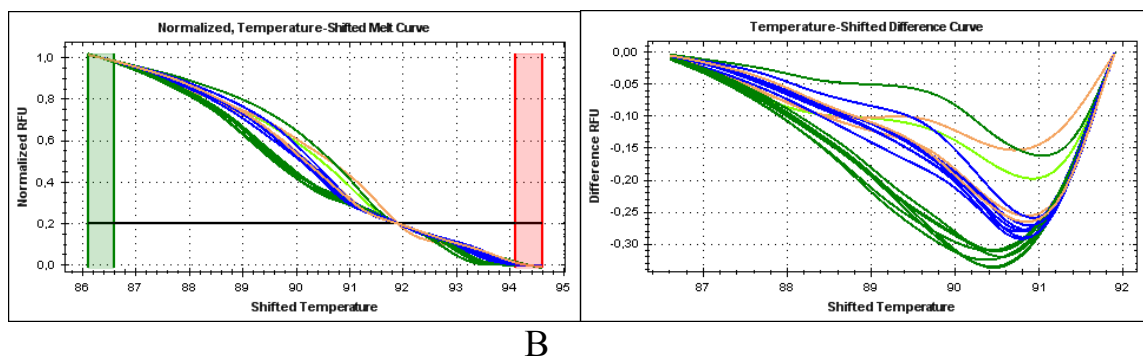
Результаты исследования HRM-полиморфизма гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*) приведены в таблице 18 и на рисунке 22. Как и в предыдущей серии экспериментов, была детектирована мономорфность последовательности гена у одного из исходных штаммов возбудителя мелиоидоза и полире-

зистентных производных (исключение - *B. pseudomallei* 57576, HRM-профиль гена у которого образовывал единый кластер смутантным штаммом *B. mallei* Ц-5 SMP и штаммом дикого типа *B. thailandensis* E264). Также отметим выраженные отличия структуры анализируемого фрагмента гена у Tn-индуцированных производных со сниженной устойчивостью от полирезистентных вариантов (табл. 18, рис. 22).

Таблица 18

HRM-полиморфизмы гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*) у исходных и мутантных штаммов буркхолдерий 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 TМ7-1	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. 22. Нормализованные кривые плавления (А) и дифференцирующий регион кривых плавления (В) ПЦР-ампликонов гена β -лактамазы класса В (праймеры *bm3F5-bm8R5*).

Таким образом, результаты проведённых в рамках данной главы 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.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Природная антибиотикорезистентность является характерным свойством для большинства представителей рода *Burkholderia*. Из патогенных видов буркхольдерий наиболее высокой природной устойчивостью к различным антимикробным препаратам отличается возбудитель мелиоидоза, что значительно затрудняет лечение заболевания (Антонов Ю.В. и др., 1991; Батманов В.П. и др., 1995; Vorachit M. et al., 2000). Большинство изолятов возбудителя сапа, по сравнению со штаммами возбудителя мелиоидоза, характеризуется заметно меньшим уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов, однако, *B. mallei* также обладает внушительным генетическим потенциалом формирования антибиотикорезистентности, поскольку в его геноме обнаружены нуклеотидные последовательности, гомологичные детерминантам резистентности различных типов (Nierman W. et al., 2004).

В лечении мелиодозной и сапной инфекции в настоящее время широко применяются β -лактамы группы цефалоспоринов и карбапенемов, а также хлорамфеникол, доксициклин и триметоприм (Батманов В.П. и др., 1995; White N.J., 2003). Известно, что в процессе применения данных антибиотиков может возникать устойчивость возбудителя к ним; в формировании резистентности задействованы самые разнообразные молекулярные механизмы.

В геномах возбудителей мелиоидоза и сапа выявлены последовательности β -лактамаз молекулярных классов А, В, и D (Holden M.T.G. et al., 2004; Nierman W. et al., 2004). Функциональная роль отдельных β -лактамаз патогенных буркхольдерий на сегодняшний день исследована экспериментально (Cheung T.K.M. et al., 2002; Ho P.L. et al., 2002; Niusump P. et al., 2002). Большинство же из аннотированных как β -лактамазные гены кодирующих последовательностей геномов возбудителей мелиоидоза и сапа, а также филогенетически наиболее близкого им вида *B. thailandensis*, на сегодняшний день функционально не охарактеризованы.

Структурно-функциональный анализ нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий представляет собой актуальное ис-

следовательское направление, важное, прежде всего, с точки зрения расшифровки молекулярных основ устойчивости данных микроорганизмов к антимикробным соединениям. Не менее важен и практический, прикладной аспект исследований в данном направлении – разработка и совершенствование технологий генетической паспортизации штаммов патогенных буркхольдерий, молекулярно-эпидемиологического мониторинга возбудителей и экспресс-оценки наличия детерминант антибиотикорезистентности изолятов.

Первичным этапом обозначенного направления исследований является разработка технологий молекулярной детекции и типирования исследуемых нуклеотидных последовательностей.

К настоящему времени описано более 500 различных β -лактамаз, и это количество стремительно растёт с каждым годом. Само семейство этих ферментов вполне может называться суперсемейством, поскольку оно объединяет несколько огромных групп или подсемейств, различающихся по свойствам ферментов. Объединяет их способность гидролизовать бета-лактамные антибиотики, а различия включают происхождение ферментов, структуру аминокислотных последовательностей, спектр субстратной специфичности, каталитические параметры, чувствительность к ингибиторам.

Наиболее применяемыми сегодня являются две схемы классификации известных β -лактамаз – классификация по функциональным группам и молекулярная классификация на основе общности структурных особенностей (Bush K. et al., 2010). Группирование ферментов в последней проводится на основании определения уровня гомологии, наличия консервативных участков в первичной структуре протеинов и строения активного центра энзима; в соответствии с классификационными критериями выделяют четыре молекулярных класса - β -лактамазы классов А, В, С и D.

Детекция и изучение нуклеотидной последовательности кодирующих β -лактамазы генов необходимы для идентификации типа генов и наличия в них мутационных изменений, которые могут быть ответственны за расширение спектра субстратной специфичности фермента, либо за утрату им чувствительности к ис-

пользуемым в клинической практике ингибиторам β -лактамаз. Такими мутационными изменениями могут быть, например, однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphism, SNP). Для определения SNP и различных аллельных вариантов исследуемого гена необходимо установление либо полной последовательности гена, либо структуры его фрагментов. В основе всех технологий анализа нуклеотидных последовательностей лежит их амплификация с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Основным направлением данной диссертационной работы, таким образом, была разработка технологии молекулярной детекции и типирования генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий, а именно, конструирование набора ген-специфических олигонуклеотидных праймеров, пригодных для выявления нуклеотидных последовательностей генов β -лактамаз классов А, В и D, исследования аллельного полиморфизма данных детерминант в штаммах *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственных видов микроорганизмов, а также скрининга возможных мутационных изменений генов β -лактамаз у штаммов с возросшей резистентностью к антибиотикам β -лактаманного ряда.

Конструирование набора олигонуклеотидных праймеров для детекции генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий с использованием полимеразной цепной реакции (ПЦР) было проведено нами на основе сравнительного анализа *in silico* кодирующих последовательностей геномов *Burkholderia*, гомологичных известным генам β -лактамаз. За основу были взяты нуклеотидные последовательности девяти 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 наборов геномных контигов буркхольдерий, представленных в GenBank NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) и базе данных геномных проектов J. Craig Venter Institute (<http://gsc.jcvi.org/projects>).

В оценке сходства аннотированных кодирующих последовательностей (CDS) видов буркхольдерий известным генам β -лактамаз нами было использовано как сопоставление по степени гомологии их нуклеотидных последовательностей,

так и на основе формально транслированных аминокислотных последовательностей, на основании чего было выделено 118 хромосомных локусов исследуемых видов *Burkholderia*, гомологичных известным CDS бактериальных β -лактамаз.

Формально транслированные сданных CDS *B. pseudomallei*, *B. mallei* и *B. thailandensis* аминокислотные последовательности были проанализированы в отношении содержания в своей структуре консервативных аминокислотных мотивов, характерных для β -лактамаз классов А, В и D с использованием процедуры Protein Motif Search web-сайта Comprehensive Microbial Resource (CMR, cmr.tigr.org/cgi-bin/CMR/CmrHomePage.cgi), инструментария базы данных InterProScan (www.ebi.ac.uk/Tools/InterProScan) и поиска специфических доменов аминокислотных последовательностей, характерных различным функциональным группам β -лактамаз в соответствии с системой структурной классификации протеинов (SCOP) (Murzin A.G. et al., 1995).

Исследованные нами аминокислотные последовательности были отнесены к девяти группам гомологии, включающим энзимы двух суперсемейств « β -лактамазы / транспептидазы» и «металло-гидролазы / оксидоредуктазы» и принадлежащих к β -лактамазам молекулярных классов А, В и D (Ambler R.P. et al., 1969).

Следует отметить, что, несмотря на принадлежность выявленных β -лактамаз классов А и D к одному суперсемейству « β -лактамазы / транспептидазы» и семейству протеинов « β -лактамазы / D-ala карбоксипептидазы», представители каждого из классов несли в составе аминокислотной последовательности специфичный характеристический мотив активного сайта фермента. Для β -лактамаз класса А таким мотивом являлась последовательность [FY]-x-[LIVMFY]-{E}-S-[TV]-x-K-x(3)-{T}-[AGLM]-{D}-{KA}-[LC], тогда как для β -лактамаз класса D - [PA]-x-S-[ST]-F-K-[LIV]-[PALV]-x-[STA]-[LI].

Представители металло- β -лактамаз (классВ) формировали несколько групп гомологии, объединяющие ферменты семейств « β -CASP РНК-метаболизирующие гидролазы», «глиоксалазы II», «PqsE- подобные металло-гидролазы», «алкил-

сульфатазы» и «Zn металло- β -лактамазы». β -лактамазы отдельных филогрупп были отмечены в геномах не у всех проанализированных видов буркхольдерий. β -лактамазы класса D были обнаружены лишь в геномах штаммов *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, а отдельные группы металло- β -лактамаз семейств « β -CASP РНК-метаболизующие гидролазы» были представлены геномными локусами *B. pseudomallei* и *B. mallei* и содержали лишь единичные последовательности *B. thailandensis*, что открывало определённую перспективу использования данных генетических последовательностей как дифференцирующих мишеней в ПЦР.

Результаты группирования генов β -лактамаз буркхольдерий по степени гомологии их нуклеотидных последовательностей в конечном итоге позволили определить пять групп кодирующих последовательностей β -лактамаз, относящихся к молекулярным классам А, В и D, имеющих высокую внутригрупповую степень гомологии и отличающихся друг от друга протяжёнными участками нуклеотидных последовательностей, дающих возможность подбора дифференцирующих специфичных праймеров. Сгенерированный набор олигонуклеотидных праймеров, специфичных дифференцирующим регионам генов β -лактамаз, был исследован *in silico* в отношении возможности детекции генетических последовательностей буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов; в результате были определены пять пар олигонуклеотидов, комплементарных фрагментам генов β -лактамаз классов А, В и D патогенных буркхольдерий.

Оценка диагностической эффективности сконструированных олигонуклеотидов для исследования распространённости β -лактамаз молекулярных классов А, В и D в геномах коллекционных штаммов была проведена на образцах геномной ДНК штаммов возбудителей мелиоидоза и сапа, родственных видов буркхольдерий и некоторых гетерологичных микроорганизмов.

Проведённый анализ продемонстрировал, что избранные в качестве мишеней гены β -лактамаз класса А имеются в составе геномов всех исследованных штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. cepacia*, но не гетерологичных видов микроорганизмов. Аналогичную распространённость имели гены

варианта металло- β -лактамазы класса В, детектируемые парой праймеров *bm1F2-bm14R2*. Нуклеотидные последовательности β -лактамаз класса D были обнаружены только в штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, тогда как разновидность металло- β -лактамаз, выявляемая праймерами *bps1F3-bps1R3* была детектирована лишь в штаммах *B. pseudomallei* и *B. mallei*. Еще один из вариантов металло- β -лактамазы (детекция с праймерами *bps3F5-bps8R5*) обнаруживался как у исследованных видов буркхольдерий, так и видов отдалённой гетерологии.

Учитывая факт возможности дифференциации между видами буркхольдерий, относящихся к группе «*pseudomallei*» (*B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis*) с помощью праймеров, специфичных вышеупомянутых последовательностей генов металло- β -лактамаз и β -лактамаз класса D, была исследована эффективность их использования в формате мультилокусной ПЦР. Результаты проведённых экспериментов продемонстрировали одновременную детекцию трёх генетических локусов в штаммах *B. pseudomallei*, двух локусов в штаммах *B. thailandensis*, двух локусов в штаммах *B. mallei* и одного генетического локуса в штаммах *B. ceracia*. Набор амплифицированных фрагментов, при этом, позволял чётко дифференцировать исследуемые виды микроорганизмов. Постановка мультилокусной ПЦР на широком наборе штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и штаммов различных геномоваров *ceracia*-комплекса подтвердила возможность дифференциации между видами буркхольдерий с помощью детекции последовательностей генов β -лактамаз классов В и D.

Специфичность сконструированных олигонуклеотидных праймеров для детекции и дифференциации видов буркхольдерий группы «*pseudomallei*» в случае анализа генетически изменённых штаммов была оценена на основе исследования мутантных штаммов с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям, в том числе β -лактамамным антибиотикам.

Полученные результаты доказали эффективность набора праймеров, используемых в мультиплексном варианте ПЦР, для детекции и дифференциации не только штаммов буркхольдерий дикого типа, но и их вариантов с повышенным уровнем устойчивости к антибиотикам различных классов и инсерционных му-

тантов со сниженной антибиотикорезистентностью. Вместе с тем, представлялось перспективным оценить адекватность разработанного набора олигонуклеотидных затравок для анализа генетических полиморфизмов генов β -лактамаз патогенных буркхольдерий, что по нашему мнению, имеет существенное как фундаментальное, так и прикладное значение.

Технологии генотипирования, основанные на HRM-анализе специфических продуктов ПЦР (high-resolution melting analysis, HRMA, HRM-анализ) в настоящее время находят всё большее применение как в исследовательских, так и диагностических целях. В рамках данной работы нами было предпринято изучение применимости HRM-анализа амплифицированных фрагментов генов β -лактамаз молекулярных классов В и D для выявления аллельного полиморфизма данных детерминант в штаммах буркхольдерий и гетерологичных микроорганизмов, а также скрининга вероятных мутантных последовательностей генов β -лактамаз у штаммов с изменённой чувствительностью к препаратам β -лактаминового ряда.

Выявленная вариабельность структуры генов β -лактамаз молекулярных классов В и D у штаммов дикого типа различных видов буркхольдерий и, в ряде случаев, микроорганизмов отдалённой гетерологии, продемонстрировала перспективность использования алгоритмов HRM-профилирования специфических нуклеотидных последовательностей для обозначения вариантов генных фрагментов, различающихся по нуклеотидному составу.

HRM-профилирование фрагментов гена β -лактамазы класса В, амплифицированных с праймерами *bm1F2-bm14R2*, показало наличие трёх аллельных вариантов данного гена в исследованных штаммах *B. pseudomallei*, *B. mallei*, *B. thailandensis* и *B. ceracia*. Наиболее распространённый аллель гена был детектирован в штаммах *B. pseudomallei* юго-восточноазиатского и австралийского происхождения (за исключением единственного штамма *B. pseudomallei* с уникальным аллелем данного β -лактамазного гена), а также в штамме возбудителя сапа и типовом штамме рода – *B. ceracia* 25416. Штаммы *B. thailandensis* несли другой аллельный вариант данной кодирующей последовательности.

Последовательность гена металло-β-лактамазы, выявляемая праймерами *bm1F3-bm1R3*, оказалась мономорфна; проведённое HRM-профилирование не выявило аллельных вариантов данной детерминанты у исследованных штаммов патогенных буркхольдерий.

Анализ кривых плавления последовательностей β-лактамазы класса D показал наличие двух аллельных вариантов гена, один из которых характерен для штаммов возбудителя мелиоидоза, а другой встречается у близкородственного *B. thailandensis*.

Детектируемая праймерами *bm3F5-bm8R5* последовательность гена β-лактамазы класса В оказалась наиболее полиморфной по своей структуре – в результате проведённого анализа были обозначены семи аллельных вариантов гена. Наиболее распространённые аллели выявлены в штаммах *B. pseudomallei* и *B. thailandensis*, уникальные аллельные варианты были детектированы в штаммах *B. mallei*, *B. cepacia*, *P. aeruginosa*, *V. cholerae* и одном из штаммов возбудителя мелиоидоза.

Полученные результаты, таким образом, показали перспективность использования сконструированного набора праймеров для идентификации нуклеотидных последовательностей генов β-лактамаз молекулярных классов А, В и D патогенных буркхольдерий, исследования распространённости различных β-лактамаз в геномах штаммов *B. pseudomallei*, *B. mallei* и близкородственных микроорганизмов, а также разработки систем генетической паспортизации и молекулярного типирования штаммов возбудителей.

Исследование применимости алгоритмов HRM-анализа специфических фрагментов детерминант β-лактамаз классов В и D для скрининга кандидатных мутантных последовательностей генов у штаммов с изменённым уровнем устойчивости к β-лактамамным соединениям являлось целью заключительного экспериментального раздела данной работы.

В целом, результаты проведённых исследований в данном направлении продемонстрировали принципиальную возможность использования данной аналитической технологии для скрининга вероятных мутантных последовательно-

стей генов β -лактамаз у штаммов *Burkholderia spp.* с изменённой чувствительностью к антимикробным соединениям. Так, при HRM-профилировании ампликона гена металло- β -лактамазы с праймерами *bm1F2-bm14R2* вероятные изменения нуклеотидного состава гена были выявлены в мутантных штаммах *B. pseudomallei*, при отборе которых в качестве одного из селективных маркеров использовалась устойчивость к цефалоспорином III поколения. Отметим, что в мутантных полирезистентных штаммах, при селекции которых применялись 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.

Апробированная технология анализа полиморфизма детерминант β -лактамаз, на наш взгляд, вполне применима для скрининга мутантных последовательностей генов с целью дальнейшего определения нуклеотидного состава и идентификации типа и характера мутационных изменений. Разработанная и апробированная технология молекулярного типирования генов β -лактамаз может найти своё применение для расширенной генетической паспортизации штаммов патогенных буркхольдерий и формирования каталогов геномных портретов изолятов ПБА I – II групп патогенности.

Ближайшей перспективой выполненных в ходе диссертационного исследования разработок, по нашему мнению, может быть их дальнейшая технологизация в плане создания на их основе амплификационной тест-системы с последующей её государственной регистрацией в установленном порядке.

ВЫВОДЫ

1. Выявлено, что гены β -лактамаз буркхольдерий кодируют энзимы, принадлежащие к β -лактамазам молекулярных классов А, В, D и относящиеся к двум суперсемействам протеинов « β -лактамазы / транспептидазы» и «металлогидролазы / 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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНКаза	- дезоксирибонуклеаза
дНТФ (dNTP)	- дезоксинуклеозидтрифосфаты
КОЕ	- колониеобразующие единицы
м.к.	- микробные клетки
МПК	- минимальная подавляющая концентрация
НГ	- N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидин
ООИ	- особо опасные инфекции
п.н. (т.п.н.)	- пар нуклеотидов (тысяч пар нуклеотидов)
ПААГ	- полиакриламидный гель
ПЦР	- полимеразная цепная реакция
Трис	- три-(гидрооксиметил)аминометан
УФ	- ультрафиолетовое облучение
ЭДТА	- натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
bp, kbp, Mbp	- пар оснований, тысяч пар оснований, миллионов пар оснований
CDS	- кодирующая последовательность
EtBr	- этидиум бромид
kDa	- килодальтон
LD ₅₀	- доза микроорганизма, летальная для 50 % заражённых животных
MD	- мегадальтон
M _r	- относительная молекулярная масса белка
NA	- Nutrient agar (питательный агар)
NB	- Nutrient broth (питательный бульон)
ORF	- открытая рамка считывания
RFLP	- полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
RT-PCR	- обратная транскрипция и амплификация
SDS	- додецилсульфат натрия
SDS-PAGE	- электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия
SNP	- полиморфизм единичных нуклеотидов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чувствительность псевдомонад к современным антибактериальным препаратам / Ю.В. Антонов [и др.] // Антибиотики и химиотерапия. 1991. Т. 36, № 1. С. 14-16.
2. Батманов В.П., Илюхин В.И., Лозовая Н.А. Клиника и лечение сапа // Сап: сб. науч. тр. Волгоград, 1995. С. 84-100.
3. Березняков И.Г. Резистентность к антибиотикам: причины, механизмы, пути преодоления // Клин. антибиотикотерапия. 2001. № 4. С. 18-22.
4. Березняков И.Г. Резистентность микробов к антибиотикам // Клин. антибиотикотерапия. 1999. № 1. С. 27-31.
5. Илюхин В.И. Мелиоидоз // Эпидемиол. и инфекц. болезни. 1999. № 4. С. 49 -51.
6. Илюхин В.И., Замараев В.С. Каплиев В.И. Микробиология, таксономия и бактериологическая диагностика *Pseudomonas pseudomallei* // Мелиоидоз. Волгоград, 1995. С. 8-26.
7. Мелиоидоз / В.И. Илюхин [и др.] // Диагностика возбудителей опасных инфекционных болезней: в 2 т. Саратов, 1998. Т. 2. С. 115-143.
8. Сидоренко С.В. Исследования распространения антибиотикорезистентности: практическое значение для медицины // Инфекции и антимикробная терапия. 2002. Т. 4, № 2. С. 38-41.
9. Синопальников А.И., Гучев И.А. Макролиды: современная концепция применения // Рус. мед. журнал. 2003. Т. 11, № 2. С. 88-93.
10. Смирнов В.В., Киприанова Е.А. Бактерии рода *Pseudomonas*. Киев: Наукова думка, 1990. 262 с.
11. Иммунологическая диагностика сапа / Н.П. Храпова [и др.] // Сап: сб. науч. тр. Волгоград, 1995. С. 37-44.
12. Ambler R.P., Meadway R.J. Chemical structure of bacterial penicillinases // Nature. 1969. 222. P. 24-26.

13. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 of β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals / C. Ariel [et al.] // J. Clin. Microbiol. 1994. P. 3-8.
14. Sequences of the genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum of β -lactamases / G. Arlet, S. Goussard, P. Courvalin, P. Philippon // Antimicrob. Agents Chemother. 1999. 43. P. 69-71.
15. Ashdown L.R. In vitro activities of the newer beta-lactam and quinolone antimicrobial agents against *Pseudomonas pseudomallei* // Antimicrob. Agents Chemother. 1988. 32. P. 1435-1436.
16. Azizi Z.A., Yahya M., Lee S.K. Melioidosis and the vascular surgeon: Hospital Kuala Lumpur experience // Asian J. Surg. 2005. 28, 4. P. 309-311.
17. Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease / P.A. Bradford, P.J. Petersen, I.M. Fingergerman, D.G. White // J. Antimicrob. Chemother. 1999. 44, 5. P. 607-610.
18. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2 of lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains / L. Bret [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. 1996. 38. P. 183-191.
19. Distinguishing species of the *Burkholderia cepacia* complex and *Burkholderia gladioli* by automated ribotyping / S. Brisse [et al.] // J. Clin. Microbiol. 2000. 38, 5. P. 1876-1884.
20. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiellapneumoniae* / C. Brun-Buisson [et al.] // Lancet. 1987. 11. P. 302-306.
21. Current studies on the pathogenesis of melioidosis / M.N. Burtnick [et al.] // Microbes Infect. 1999. 1, 2. P. 157-162.

22. Bush K., Jacoby G.A. Updated functional classification of β -lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. 54, 3. P. 969-976.
23. Inhibitor-resistant TEM of lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristic / E.B. Chaibi, D. Sirot, G. Paul, R. Labia // *J. Antimicrob. Chemother.* 1999. 43. P. 47-58.
24. Chan Y.Y., Chua K.L. The *Burkholderia pseudomallei* BpeAB-OprB efflux pump: expression and impact on quorum sensing and virulence // *J. Bacteriol.* 2005. 187, 14. P. 4707-4719.
25. BpeAB-OprB, a multidrug efflux pump in *Burkholderia pseudomallei* / Y.Y. Chan, T.M. Tan, Y.M. Ong, K.L. Chua // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004. 48, 4. P. 1128-1135.
26. Characterization of extended-spectrum of β -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-PDRP) / A. Chanawong [et al.] // *FEMS Microbiol. Lett.* 1. P. 5-9.
27. Pharmacokinetic-pharmacodynamic evaluation of ceftazidime continuous infusion vs intermittent bolus injection in septicaemic melioidosis / W. Chaowagul [et al.] // *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000. 50, 2. P. 184-191.
28. Chen Y., Shoichet B., Bonnet R. Structure, function, and inhibition along the reaction coordinate of CTX-M beta-lactamases // *J. Am. Chem. Soc.* 2005. V. 127. P. 5423-5434.
29. Cloning and expression of class A beta-lactamase gene blaA (BPS) in *Burkholderia pseudomallei* / T. K. M. Cheung [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. 46. P. 1132-1135.
30. First case of New Delhi metallo-beta-lactamase 1-producing *Escherichia coli* infection in Japan / S. Chihara [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* 2011. 52, 1. P. 153-154.

31. Cockerill F.R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. 43. P. 199-212.
32. *Burkholderia cepaci* genomovar VI, a new member of the *Burkholderia cepacia* complex isolated from cystic fibrosis patients / T. Coenye [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001. Vol. 51. P. 271- 279.
33. Cormican M.G., Marshall S.A., Jones R.N. Detection of extended-spectrum of lactamase (ESBL)-producing strains by the E-test ESBLscreen // *J. Clin. Microbiol.* 1996. 34. P. 1880-1884.
34. DNA extraction strategies for amplified fragment length polymorphism analysis / C. Comey [et al.] // *J. Forensic. Sci.* 1994. Vol. 39. P. 1254-1257.
35. Cornaglia G., Garau J., Livermore D.M. Living with ESBLs // *Clin. Microbiol. Infect.* 2008. 14, Suppl. 1. P. 1-2.
36. Characterization of a lipopolysaccharide O-antigen containing two different trisaccharide repeating units from *Burkholderia cepacia* serotype E (O2) / A.D. Cox [et al.] // *Carbohydr. Res.* 1995. 272, 2. P. 231-239.
37. Antibiotic resistance is ancient / V.M. D'Costa [et al.] // *Nature.* 2011. 477. P. 457-461.
38. Dance D.A.B. Melioidosis as an emerging global problem // *Acta Trop.* 2000. Vol.74. P. 115-119.
39. Imported melioidosis in England and Wales / D.A.B. Dance, M.D. Smith, H.M. Aucken, T.L. Pitt // *Research letters.* 2004. Vol. 353, № 9. P. 148.
40. Structural Insights into Substrate Recognition and Product Expulsion in CTX-M Enzymes / J. Delmas [et al.] // *J. Molecul. Biol.* 2010. 400. P. 108-120.
41. Drawz S.M., Bonomo R.A. Three Decades of beta-Lactamase Inhibitors // *Clin. Microbiol. Rev.* 2010. 23. P. 160-201.
42. Edelstein M., Pimkin M., Palagin I. Prevalence and molecular epidemiology of

CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. 47. P. 24-32.

43. Edelstein M.V., Stratchounski L.S. Development of single-strand conformational polymorphism (SSCP) PCR Method for discriminatory detection of genes coding for TEM-family of β -lactamases // Proceedings of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. San Diego, 1998. Abstr. E-96.

44. Emery C.L., Weymouth L.A. Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center // J. Clin. Microbiol. 1997. 35, 8. P. 2061-2067.

45. Erali M., Wittwer C.T. High resolution melting analysis for gene scanning // Methods. 2010. 50, 4. P. 250-261.

46. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* / J. Fielt [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 2000. 44. P. 499-505.

47. Taxonomic outline of the prokaryotes Bergey's manual of systematic bacteriology / G.M. Garrity, K.L. Johnson, G. Bell, D.B. Searles. 2002. 2-nd ed. P. 58-60.

48. Geyer C.N., Hanson N.D. Multiplex High-Resolution Melting Analysis as a Diagnostic Tool for Detection of Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamase Genes // J. Clin. Microbiol. 2014. 52, 4. P. 1262-1265.

49. *Pseudomonas pseudomallei* resistance to beta-lactam antibiotics due to alterations in the chromosomally encoded beta-lactamase / A.J. Godfrey [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 1991. 35. P. 1635-1640.

50. Goossens H. and MYSTIC study group. MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) results from Europe: comparison of antibiotic susceptibilities between countries and center types // J. Antimicrob. Chemother. 2000. 46. P. 39-52.

51. Gunn J.S., Hohmann E.L., Miller S.I. Transcriptional regulation of *Salmonella* virulence: a *PhoQ* periplasmic domain mutation results in increased net phosphotransfer to *PhoP* // J. Bacteriol. 1996. 178, 21. P. 6369-6373.
52. Heng, B.
53. Epidemiological surveillance of melioidosis in Singapore / H.K.T. Goh, E.H. Yap, H. Loh, M. Yeo // Ann. Acad. Med. Singap. 1998. 27. P. 478-484.
54. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM of lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli* / C. Henquell [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 1995. P.-30
55. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum of β -lactamase / J. Heritage, P.M. Hawkey, N. Todd, L.J. Lewis // Antimicrob. Agents Chemother. 1992. P.-17.
56. Characterization of a laboratory-generated variant of BPS beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei* that hydrolyses ceftazidime / P.L. Ho, T.K.M. Cheung, W.C. Yam, K.Y. Yuen // J. Antimicrob. Chemother. 2002. 50. P. 723-726.
57. Genomic plasticity of the causative agent of melioidosis, *Burkholderia pseudomallei* / M.T.G. Holden [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. 2004. 101. P. 14240-14245.
58. Hujer K.M., Hujer A.M., Bonomo R.A. Site-saturation mutagenesis of the 238 position in the SHV-1 beta-lactamase // Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: Abstr. San-Francisco, 1999. P. 2051.
59. Potential misidentification of *Burkholderia pseudomallei* by API 20NE / T.J. Inglis [et al.] // Pathology. 1998. Vol. 30. P. 62-64.
60. Jacoby G.A. AmpCb-lactamases // Clin. Microbiol. Rev. 2009. 22. P. 161-182.
61. Functional characterization of OXA-57, A class D beta-lactamase from *Burkholderia pseudomallei* / K.E. Keith [et al.] // Antimicrob. Agents Chemother. 2005. 49. P. 1639-1641.

62. In vitro susceptibilities of *Burkholderia mallei* in comparison to those of other pathogenic *Burkholderia spp* / D.L. Kenny [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. Vol. 43, № 11. P. 2773 - 2775.
63. Kim J., Kwon Y. Development of ligase chain reaction (LCR)-PCR method for discriminatory detection of genes coding for SHV variants // *Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy: Abstr.* San Francisco; 1999. P. 2051.
64. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumonia* and *Serratiamarcescens* / R. Knothe [et al.] // *Infection.* 1983. P. 5-7.
65. Knox J.P. Extended spectrum and inhibitor-resistant TEM-type of β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. P. 593-601.
66. Structure of the SHV-1 of lactamase / A.P. Kuzin [et al.] // *Biochemistry.* 1999. P. 7.
67. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT) of β -lactamases in *Klebsiellapneumoniae* strains / J. Lemozy [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1995. 39. P.2.
68. Beta-Lactamase of *Pseudomonas pseudomallei* and its contribution to antibiotic resistance / D.M. Livermore, P.Y. Chau, A.I. Wong, Y.K. Leung // *J. Antimicrob. Chemother.* 1987. 20. P. 313-321.
69. Mabilat C. Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum of lactamases // Persing D., Smith T., eds. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications.* Washington: ASM, 1993. P. 3-9.

70. Mabilat C., Courvalin P. Development of oligotyping for characterization and molecular epidemiology of TEM of lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. P. 6.
71. DNA based diagnostic approaches for identification of *Burkholderia cepacia* complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* genomovars I and III / E. Mahenthiralingam [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* 2000. Vol. 38, № 9. P. 3165-3173.
72. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases / A. Maihew, A.M. Harris, M.J. Marshall, G.W. Ross // *J. Gen. Microbiol.* 1975. 88. P. 169-178.
73. Montgomery J.L., Sanford L.N., Wittwer C.T. High-resolution DNA melting analysis in clinical research and diagnostics // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2010. 10, 2. P. 219-240.
74. Antibiotic resistance in *Burkholderia cepacia* at two regional cystic fibrosis centres in Northern Ireland: is there a need for synergy testing? / J.E. Moore [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* 2001. 48, 2. P. 319-321.
75. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures / A.G. Murzin, S.E. Brenner, T. Hubbard, C. Chothia // *J. Mol. Biol.* 1995. 247. P. 536-540.
76. Detection of mutations conferring extended-spectrum activity on SHV of lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) / F.H. M'Zali, D.M. Gascoyne-Binzi, J. Heritage, P.M. Hawkey // *J. Antimicrob. Chemother.* 1996. P. 797-802.
77. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum of lactamase and to identify different SHV genes within the same strain / F.H. M'Zali [et al.] // *J. Antimicrob. Chemother.* 1998. P. 3-5.

78. Detection of extended-spectrum of lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*; comparison of the MAST DD test, the double disc and the E-test ESBL / F.H. M'Zali [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. 2000. P. 5.
79. Contribution of gene loss to the pathogenic evolution of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkholderia mallei* / W. Nierman [et al.] // Infect. Immunol. 2004. 72, 7. P. 4172-4187.
80. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and an active efflux // Science. 1994. V. 264. P. 382-388.
81. Niumsup P., Wuthiekanun V. Cloning of the class D beta-lactamase gene from *Burkholderia pseudomallei* and studies on its expression in ceftazidime-susceptible and -resistant strains // J. Antimicrob. Chemother. 2002. 50. P. 445-455.
82. Novais A. Evolutionary trajectories of beta-lactamase CTX-M-1 cluster enzymes: predicting antibiotic resistance // PLoS. Pathog. 2010.
83. Nuesch-Inderbinen M.T., Hachler H., Kayser F.H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E-test // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 1996. 15. P. 399-402.
84. Cross-sectional study on fecal carriage of *Enterobacteriaceae* with resistance to extended-spectrum cephalosporins in primary care patients / M.T. Nüesch-Inderbinen [et al.] // Microb. Drug Resist. 2013. 19, 5. P. 362-369.
85. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms / M. Orita [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. 1989. 86. P. 66-70.
86. Palleroni N., Doudoroff M. Some properties and taxonomic subdivisions of the genus *Pseudomonas* // Ann. Rev. Phytopatol. 1972. Vol. 10. P. 73-100.

87. Taxonomy of the aerobic *pseudomonas*: The properties of the *Pseudomonas*stutzeri group / N. Palleroni [et al.] // J. Gen. Microbiol. 1979. Vol. 60. P. 215-231.
88. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumonia* strains isolated in an intensive care unit / O. Paniara [et al.] // J. Chemother. 2000. 12. P. 4-7.
89. Paterson D.L. Extended-spectrum beta-lactamases: the European experience // Curr. Opin. Infect. Dis. 2001. 14, 6. P. 697-701.
90. Payne D.J., Thomson C.J. Molecular Approaches for the Detection and Identification of lactamases. Molecular Bacteriology // N. Woodford, A.P. Johnson, editors. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998. P. 495-512.
91. Payne D.J., Farmer T.H. Biochemical and enzyme kinetic Applications for the Characterization of lactamases // N. Woodford, A.P. Johnson, editors. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1998. P. 513-535.
92. Peralta G., Sanchez M.B., Garrido J.C. Impact of antibiotic resistance and of adequate empirical antibiotic treatment in the prognosis of patients with *Escherichia coli* bacteraemia // J. Antimicrob. Chemother. 2007. 60. P. 55-63.
93. A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases / E.I. Petersen [et al.] // J. Biotechnol. 2001. 89, 1. P. 11-25.
94. Pitout J.D.D. Infections with extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Changing epidemiology and drug treatment choices // Drugs. 2010. 70, 3. P. 313-333.
95. Naturally Occurring Class A beta-Lactamases from the *Burkholderia cepacia* complex / L. Poirel, J.-M. Rodriguez-Martinez, P. Plesiat, P. Nordmann // Antimicrob. Agents Chemother. 2009. 53. P. 876-882.

96. Rasmussen B.A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997. 41. P. 223-232.
97. Rodley P.D., Römling U., Tümmler B.A. Physical genome map of the *Burkholderia cepacia* type strain // *Mol. Microbiol.* 1995. 17, 1. P. 57-67.
98. Salverda M.L., De Visser J.A., Barlow M. Natural evolution of TEM-1 betalactamase: experimental reconstruction and clinical relevance // *FEMS Microbiol.* 2010.
99. Sam I.-C., See K.H., Puthuchery S.D. Varying ceftazidime-andamoxicillin-clavulanate susceptibilities within a clonal infection of *Burkholderia pseudomallei* // *J. Clin. Microbiol.* 2009. 147. P. 1556-1558.
100. Saunders N.A., Clewley J.P. DNA amplification: general concepts and methods // N. Woodford, A.P. Johnson, editors. *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications.* Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. P. 63-82.
101. Schultsz C., Geerlings S. Plasmid-mediated resistance in *Enterobacteriaceae*. Changing landscape and implications for therapy // *Drugs.* 2012. 72, 1. P. 1-16.
102. Schwaber M.J., Carmeli Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis // *J. Antimicrob. Chemother.* 2007. 60. P. 13-20.
103. Songsivilai S., Dharakul T. Multiple replicons constitute the 6.5 – megabase genome of *Burkholderia pseudomallei* // *Acta Trop.* 2000. Vol. 74. P. 169-179.
104. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes / W. Sougakoff, S. Goussard, G. Gerbaud, P. Courvalin // *Rev. Infect. Dis.* 1988. 10, 4. P. 879-884.
105. Discriminatory detection of inhibitor-resistant β -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR / V. Speldooren, B. Heym, R. Labia, M. Nicolas-Chanoine // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998. 42. P. 79-84.
106. Surveillance for antimicrobial resistance in enterococci / S.L. Taylor [et al.] // NZ

Med. J. 1997. 110, 1047. P. 251-253.

107. Tenover F.C. Development and spread of bacterial resistance to antimicrobial agents: an overview // Clin. Infect. Dis. 2001. 15, 33, Suppl. 3. P. 108-115.

108. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae* / F.C. Tenover, M.B. Huang, J.K. Ra-sheed, D.H. Persing // Clin. Microbiol. 1994. P. 29-37.

109. Testa B., Mayer J.M. Hydrolysis in drug and prodrug metabolism chemistry, bio-chemistry, and enzymology. Zürich: Wiley-VCH, 2003.

110. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum of lactamases in *Enterobacteriaceae* / T.N. Tham, C. Mabilat, P. Courvalin, J.L. Guesdon // FEMS Microbiol. Lett. 1990. 57. P. 15.

111. Antibiotic susceptibility of 65 isolates of *Burkholderia pseudomallei* and *Burkhol-deria mallei* to 35 antimicrobial agents / F.M. Thibault [et al.] // J. Antimicrob. Che-mother. 2004. 54. P. 1134-1138.

112. Thomson C.J., Shanahan P.M., Amyes S.G. Nucleotide sequences of inhibitor-resistant TEMof lactamases // J. Antimicrob. Chemother. 1998. 41. P. 2-3.

113. Towner K.J. Mechanisms of acquired resistance // Greenwood D., ed. Antimi-crobial chemotherapy. 4th ed. Oxford, New York: Oxford University Press, 2001. P. 145-155.

114. *Burkholderia pseudomallei* class A beta-lactamase mutations that confer selec-tive resistance against ceftazidime or clavulanic acid inhibition / C. Tribuddharat, R.A. Moore, P. Baker, D.E. Woods // Antimicrob. Agents Chemother. 2003. 47. P. 2082-2087.

115. Turner P.J. Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. 2008. 60, 2. P. 85-92.

116. Antimicrobial resistance in *Burkholderia pseudomallei* / M. Vorachit, P. Chongtrakool, S. Arkomsean, S. Boonsong // *Acta Trop.* 2000. 74, 2-3. P. 139-144.
117. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women / J.W. Warren [et al.] // *Clin. Infect. Dis.* 1999. V. 29. P. 745-758.
118. White N.J. Melioidosis // *Lancet.* 2003. Vol. 361, № 9370. P. 1715-1722.
119. Whitmore A., Krishnaswami C.S. An account of the discovery of the hitherto undescribed infective disease occurring among the population of Rangoon // *Indian Med. Gazette.* 1912. Vol. 47. P. 262-267.
120. Russian *Klebsiellapneumoniae* isolates that express extended-spectrum of β -lactamases / P.L. Winokur [et al.] // *Clin. Microbiol. Inlect.* 2006. P. 3-8.
121. Proposal of *Burkholderia* gen. nov. and transfer of seven species of the genus *Pseudomonas* homology group 2 to the New Genus, with the Type Species *Burkholderia cepacia* (Palleroni and Holmes 1981) comb. nov / E. Yabuuchi [et al.] // *Microbiol.-Immunol.* 1992. Vol. 36, 12. P. 1251-1275.