

## ПОИСК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ МИШЕНЕЙ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ МЕЛИОИДОЗА И САПА

Ю. А. Кузютина<sup>1,2</sup>, И. Б. Захарова<sup>1,2</sup>, С. С. Савченко<sup>1,2</sup>, Я. А. Лопастейская<sup>1,2</sup>,  
Е. В. Молчанова<sup>1,2</sup>, Д. В. Викторов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора,  
<sup>2</sup>Волгоградский государственный медицинский университет,  
кафедра молекулярной биологии и генетики

В результате многоэтапного биоинформационного анализа последовательностей геномов патогенных видов *Burkholderia* выбраны дифференцирующие группы протеинов, обладающие потенциально высокой антигенной активностью, которые могут быть использованы в качестве диагностических мишеней. Для амплификации и последующего клонирования их полных кодирующих последовательностей сконструированы наборы олигонуклеотидных праймеров.

**Ключевые слова:** *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, дифференцирующие антигены, праймеры.

## SEARCH FOR POTENTIAL TARGETS FOR DETECTION AND DIFFERENTIATION THE CAUSATIVE AGENTS OF MELIOIDOSIS AND GLANDERS STRAINS

Yu. A. Kuzyutina<sup>1,2</sup>, I. B. Zakharova<sup>1,2</sup>, S. S. Savchenko<sup>1,2</sup>, Ya. A. Lopasteyskaya<sup>1,2</sup>,  
E. V. Molchanova<sup>1,2</sup>, D. V. Viktorov<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Federal Government Health Institution «Volgograd Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare,  
<sup>2</sup>Volgograd State Medical University,  
Department of Molecular Biology and Genetics

Differentiating groups of proteins with high potential antigenic activity, which can be apply as diagnostic targets, were selected using in silico genome comparison of pathogenic *Burkholderia* species. Oligonucleotide primer sets were designed for amplifying and cloning complete DNA sequences of the targets.

**Key words:** *Burkholderia pseudomallei*, *Burkholderia mallei*, differentiation antigens, primers.

Род *Burkholderia* включает более 80 видов грамотрицательных микроорганизмов и представляет собой довольно гетерогенную таксономическую группу, объединяющую сапрофиты, фитопатогены и патогены теплокровных животных. Важное эпидемиологическое значение имеют два вида — *B. mallei* и *B. pseudomallei*, являющиеся возбудителями сапа и мелиоидоза — особо опасных заболеваний человека и животных. Ежегодно регистрируются лабораторно подтвержденные случаи мелиоидоза среди населения эндемичных регионов Юго-Восточной Азии и Северной Австралии, а также отмечены завозные случаи в ряде стран Европы и Северной Америки [3]. Кроме того, *B. mallei* и *B. pseudomallei* рассматриваются как потенциальные агенты биотерроризма [4], что подчеркивает актуальность исследований, направленных на разработку и совершенствование методов их диагностики.

Стандартом лабораторной диагностики сапа и мелиоидоза является выделение чистой культуры. Но применение классического бактериологического метода не позволяет достаточно быстро установить присутствие возбудителей в пробах. Важной задачей является идентификация изолятов *B. pseudomallei* и *B. mallei*, являющихся генетически, биохимически и иммунологически очень схожими, и их дифференциация между собой, а также от непатогенных сапрофитных представителей рода, широко

распространенных в естественных биоценозах. В литературе неоднократно описаны случаи ошибочной идентификации клинических изолятов возбудителя мелиоидоза с использованием автоматических анализаторов как видов комплекса *B. cepacia* [7].

В настоящее время для совершенствования диагностики сапа и мелиоидоза считают оптимальным сочетание применения двух методов: полимеразной цепной реакции и твердофазного иммуоферментного анализа на основе моноклональных антител [1, 5, 6]. Используемые в настоящее время средства иммунодиагностики мелиоидоза на основе моноклональных антител к антигенным эпитопам экзополисахарида характеризуются различной степенью перекрестной реактивности в отношении филогенетически близких представителей рода *Burkholderia* [2]. Поэтому важным направлением исследований является поиск дифференцирующих групп генов и высокоспецифичных мишеней (антигенов), пригодных для применения в диагностических тест-системах нового поколения.

### ЦЕЛЬ РАБОТЫ

Выявление дифференцирующих групп кодирующих последовательностей поверхностных биополимеров патогенных видов буркхольдерий путем сравнительного *in silico* анализа их геномов.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

При *in silico* анализе использовали полные геномные сиквенсы 12 штаммов *B. pseudomallei* и 10 штаммов *B. mallei*, представленные в Genbank NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

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

Степень гомологии нуклеотидных и аминокислотных последовательностей оценивали, применяя алгоритм BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), для определения степени сходства использовался алгоритм Align X (Vector NTI Suite v.8.0; InforMax).

Поиск линейных эпитопов исследуемых белков проводился на основе скрытых марковских моделей и статистических методов, предназначенных для обработки больших массивов данных, — BepiPred с использованием ресурса IEDB Analysis (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>).

Подбор праймеров был проведен с помощью программы FastPCR Pro 5.4.4 (PrimerDigital Ltd.). 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 (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast)).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Из банка данных сайта <http://pathema.jcvi.org> были отобраны предполагаемые дифференцирующие последовательности, кодирующие факторы патогенности для каждого вида. Их поиск проводили путем определения синглетонных групп генов, то есть выбранные гены были характерны только для определенного вида и представлены собственной для каждого штамма нуклеотидной последовательностью. Общее число дифференцирующих последовательностей для *B. pseudomallei* составило 131, для *B. mallei* — 10.

В программе Vector NTI проведена трансляция выбранных нуклеотидных последовательностей, на основе которой сформирована локальная база данных по исследуемым белкам. Установление гомологии внутри одного гена по принципу локального выравнивания выполнено путем подстановки и сравнения имеющихся фрагментов. При определении сходства использовался алгоритм Align X, в котором ключевым элементом определения показателей сходства для любой возможной пары нуклеотидов или аминокислот является матрица замен с увеличенной вероятностью нахождения уникальных фрагментов.

После математического преобразования показателей сходства различных выравниваний выполнено их

сравнение, в результате чего получены дендрограммы кластерного анализа аминокислотных последовательностей, с помощью которых были установлены варибельные протеины. Исходя из полученных данных, ряд белков возбудителя мелиоидоза был исключен из дальнейшей работы.

Анализ межвидовой гомологии протеинов с использованием приложения BLASTP показал, что исследуемые белки являются видоспецифичными и уникальными для возбудителей сапа и мелиоидоза, в частности протеины семейства OmpA, встречающиеся у представителей рода *Burkholderia* со степенью гомологии от 48 до 61 %.

Следующим этапом работы было определение эпитопов. Для решения данной задачи был использован метод BepiPred, позволяющий локализовать в составе аминокислотных последовательностей участки линейных эпитопов. Изображенные в графическом виде результаты анализа представляли собой кривые, лежащие в осях координат: порог (ось ординат) / порядковый номер аминокислоты (ось абсцисс). Под порогом понимается наиболее оптимальная варианта между чувствительностью и специфичностью. В работе порог был равен 0,35, отношение чувствительности к специфичности приближено к 1. Пики, находящиеся выше линии порога, и являлись искомыми эпитопами. Чем выше был пик, тем большей антигенной активностью обладал данный участок. Анализируемые белки имели разную эпитопную характеристику (рис.).

В результате анализа гомологии аминокислотных последовательностей, исследуемые протеины были разделены на 30 групп, количество эпитопов в группе составило от 1 до 8, причем 2 эпитопа оказались уникальными для отдельных штаммов *B. pseudomallei*. Полученные эпитопы для удобства их дальнейшего изучения были промаркированы и отмечены на аминокислотных последовательностях. Затем была создана отдельная база данных в программе Vector NTI для сайтов эпитопов дифференцирующих белков и проведен анализ их гомологии с помощью приложения Align X.

Обнаружено, что белки *B. pseudomallei* MotB семейства OmpA и HrcV системы секреции III типа (TTSS) содержат эпитопы, аминокислотные последовательности которых гомологичны между собой. Они образуют 9 общих групп, причем последовательности расположения эпитопов совпадают. Следовательно, исследуемые протеины OmpA/MotB и HrcV, а также кодирующие их регионы перспективны при создании диагностической тест-системы для возбудителя мелиоидоза. Поиск дифференцирующих групп генов для возбудителя сапа не дал положительного результата.

С целью получения рекомбинантных штаммов-продуктов данных белков были сконструированы наборы олигонуклеотидных праймеров для амплификации их полных кодирующих последовательностей (CDS). К специфической части прямых и обратных праймеров, характеристика которых приведена в табл., на 5'-конце

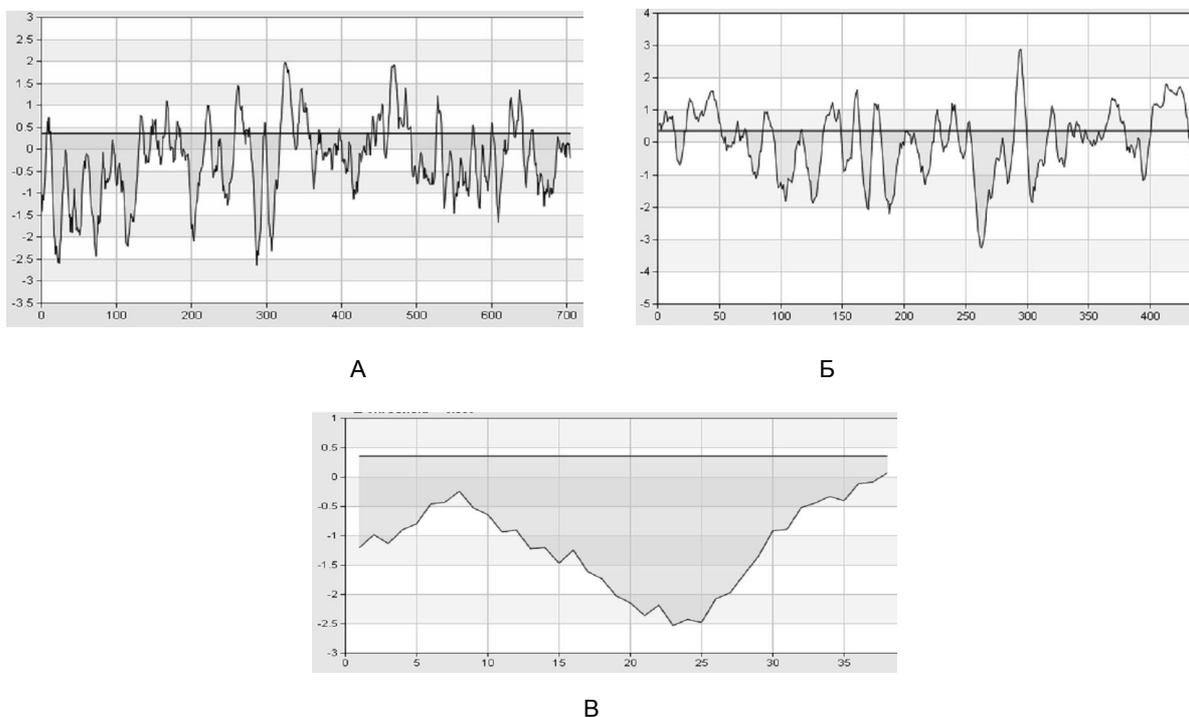


Рис. Выявленные с использованием алгоритма VeriPred эпитопы:  
 А — белка OmpA *B. pseudomallei*; Б — белка HrcV *B. pseudomallei*;  
 В — дифференцирующего поверхностного белка *B. mallei*

## Олигонуклеотидные праймеры для амплификации последовательностей генов поверхностных биополимеров возбудителя мелиоидоза

Праймер	Последовательность 5' → 3'	Мишень	Размер ампликона
bps4255ricF	(P)AAGCTTTGTTGGGGAGTGCCTCACAAATG	Ген <i>ompA/motB</i> <i>B. pseudomallei</i>	1310 п. н.
bps4255ricR2	(P)AATTCTTATTACAGCGTGACCGCGATTTTC		
bps6155ricF	(P)AAGCTTTGATGTTCAAATCGCTGAAACTG	Ген мембранного протеина TTSS HrcV <i>B. pseudomallei</i>	2118 п. н.
bps6155ricR	(P)AATTCTTATCAACCCTGGAGCGACAC		

добавлена фосфорилированная нуклеотидная последовательность, позволяющая осуществить клонирование амплифицированного фрагмента в дефосфорилированный вектор без предварительной обработки рестриктазами. Материалы авторской разработки направлены в Федеральную службу по интеллектуальной собственности для получения патента на изобретение. Справки о приоритете № 2016103360 и № 2016103419 от 02.02.2016 г.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании сравнительного *in silico* анализа геномов патогенных буркхольдерий был осуществлен выбор дифференцирующих групп кодирующих последовательностей поверхностных белков *B. pseudomallei*. Сконструированы наборы олигонуклеотидных праймеров для амплификации CDS перспективных мишеней возбудителя мелиоидоза: поверхностного биополимера OmpA/MotB и мембранного протеина TTSS HrcV, которые могут быть применены при создании иммунодиагностических систем нового поколения.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Антонов В. А., Илюхин В. И., Храпова Н. П. и др. Современные подходы к диагностике сапа и мелиоидоза. Идентификация и типирование *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* // Проблемы особо опасных инфекций. — 2012. — Вып. 2 (112). — С. 46—50.
2. Храпова Н. П., Алексеев В. В., Корсакова И. И. и др. Применение сапных и мелиоидозных моноклональных антител различной эпитопной направленности для обнаружения и идентификации патогенных буркхольдерий // Проблемы особо опасных инфекций. — 2011. — Вып. 1 (107). — С. 66—69.
3. Currie B. J., Dance D. A., Cheng A. C. The global distribution of *Burkholderia pseudomallei* and melioidosis: an update // Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. — 2008. — Vol. 102 (1). — P. 1—4.
4. Gilad J., Schwartz D., Amsalem Y. Clinical features and laboratory diagnosis of infection with the potential bioterrorism agents *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // Int. J. Biomed. Sci. — 2007. — Vol. 3 (3). — P. 144—152.
5. Janse I., Hamidjaja R.A., Hendriks A.C., et al. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of

*Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // BMC Infect. Dis. — 2013. — Vol. 13. — P. 86.

6. Van Pelt C., Verduin C. M., Goessens W. H. F., et al. Identification of *Burkholderia* spp. in the clinical microbiology laboratory: comparison of conventional and molecular methods // J. Clin. Microbiol. — 1999. — Vol. 37 (7). — P. 2158—2164.

7. Zong Z., Wang X., Deng Y., et al. Misidentification of *Burkholderia pseudomallei* as *Burkholderia cepacia* by the VITEK 2 system // J. Med. Microbiol. — 2012. — Vol. 61. — P. 1483—1484.

## Контактная информация

**Кузютина Юлия Александровна** — научный сотрудник лаборатории геномики и протеомики ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, ассистент кафедры молекулярной биологии и генетики Волгоградского государственного медицинского университета, e-mail: biochimuk@mail.ru