

СПЕЦИАЛИЗИРАН НАУЧЕН СЪВЕТ ПО МИКРОБИОЛОГИЯ,
ВИРУСОЛОГИЯ И ИМУНОЛОГИЯ
ПРИ ВИСШАТА АТЕСТАЦИОННА КОМИСИЯ

Галина Динкова Стоянчева

**Комбиниран подход за молекулярно-
таксономична характеристика на
лактобацили**

АВТОРЕФЕРАТ

*на дисертация
за присъждане на образователна и научна степен “Доктор”*

Научна специалност: 01.06.12 Микробиология

Научен ръководител: ст.н.с. II ст. д-р Ваня Митева

Официални рецензенти: ст.н.с. I ст. д-р Енчо Савов, дмн
ст.н.с. II ст. д-р Недка Шиварова

София 2006

Използвани съкращения:

ARDRA	-amplified ribosomal DNA restriction analysis
BOX	-повторена последователност
ddH ₂ O	-би-дестилирана вода
DEP	-диетил пирокарбонат
DIG	-диоксигенин
EDTA	-ethylenediaminetetraacetic acid
ERIC	-enterobacterial repetitive intergenic consensus
GRAS-статус	-generally recognized as safe
IGS	-intergenic spacer
<i>Lb.</i>	- <i>Lactobacillus</i>
PCR	-полимеразна верижна реакция
PEG	-polyethylene glycol
REP	-repetitive extragenic palindromic
rep-PCR	-PCR с използване на праймери които са повторени последователности
RFLP	-restriction fragments lenght polymorphism
rtn	-рибозомален оперон
SDS	-натриев додецилсулфат
БВ	-бактериална вагиноза
Грам(+)	-Грам-положителен
Грам(-)	-Грам-отрицателен
МКБ	-Млечнокисели бактерии

ВЪВЕДЕНИЕ

Лактобацилите са широко разпространени в природата и се срещат в различни екологични ниши. Те са част от стартерните култури на много продукти в съвременната млечна промишленост и други хранителни производства. Напредъкът в развитието на микробиологията доведе до селекция на щамове със специфични качества и използването им в разработването на т. нар. функционални храни с здравословен и лечебен ефект.

Млечнокиселите бактерии и в частност, представителите на род *Lactobacillus* са важна част от човешката микробиота и имат редица положителни ефекти върху общото здравословно състояние на човека. Благодарение на способността си да продуцират млечна киселина, водороден перексид, бактериоцини и други антимикробни субстанции, те инхибират развитието на патогенни микроорганизми. Лактобацилите колонизират лигавицата и образуват естествен биофилм със защитна роля. Индивидуалната човешка микробиота и нейната активност е неразделна част от бъдещия персонализиран модел на грижа за човешкото здраве.

Точната идентификация на щамовете е първо и задължително условие за тяхното приложение като терапевтични агенти или в хранителни производства.

Поради еднаквите хранителни изисквания, условия на растеж и крайни метаболитни продукти при лактобацилите, идентификацията им е трудна и често пъти невъзможна на базата само на морфологични, физиологични и биохимични тестове. Затова молекулярно-генетичните

техники са основата, върху която се гради съвременната таксономия на лактобацилите.

Молекулярните методи са широко прилагани за изучаване на млечнокисели бактерии от смесени съобщества и комплексни екосистеми. Заедно с класическите критерии те са в основата на съвременния подход за идентификация, наречен полифазна таксономия. В настоящата работа са включени шест молекулярно-таксономични метода: ARDRA, PCR с видовоспецифични праймери, dot-хибридизация с видовоспецифични сонди, риботипиране, Rep-PCR и секвениране.

Много научни лаборатории в света работят активно върху идентификация на лактобацилни изолати. През последните 5 години са описани над 40 нови вида *Lactobacillus*, като 16 от тях са открити през 2005г. Изследванията на много автори са фокусирани върху близкородствените видове. Въпреки това, резултатите по разделянето на някои изключително близки видове и особено на подвидовете, често са спорни.

В настоящата работа е представено изследване на новоизолирани щамове *Lactobacillus* от млечни продукти и клинични проби и е направена молекулярно-таксономична идентификация.

ЦЕЛ И ЗАДАЧИ

Цел на настоящата работа е да се разработи оптимален полифазен подход за надеждна идентификация и диференциация на лактобацилни видове с различен екологичен произход.

Задачи:

1) Изолиране и характеризиране на лактобацилни щамове от млечни продукти и клинични проби.

2) Подбор на две групи от референтни щамове, типични представители на род *Lactobacillus* в различните екологични ниши – човешкия организъм и млечни продукти. Оптимизиране на условията за прилагане на методите ARDRA, риботипиране, гер-PCR, PCR с видово-специфични праймери.

3) Сравнителен геномен анализ на новоизолирани щамове и референтни лактобацили с помощта на ARDRA, риботипиране, гер-PCR, PCR с видово-специфични праймери, за установяване тяхната видова принадлежност и степента на генетично родство.

4) Изследване на възможността за разграничаване на група лактобацилни щамове в рамките на установения бактериален вид *Lactobacillus delbrueckii*, чрез изучаване на вътревидовия полиморфизъм.

МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

1. Щамове

В изследванията бяха използвани 43 щамове от род *Lactobacillus*, изолирани от различни екологични ниши и колекция от 41 референтни щамове *Lactobacillus* представители на 15 вида, с които разполага лабораторията.

Таблица 1: Референтни щамове от род *Lactobacillus* включени в изследването.

Вид	Щамове
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>	ATCC 9649 CIP 57.8 NCIMB 1411, NCIMB 3558
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842, ATCC 21815 NCDO 1489, NCDO 1373, NCIMB B37, NCIMB B5, NCIMB B8
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 12315, ATCC 8000, ATCC 15808 CIP 54.3, CIP 53.165 NCIMB 1130, NCIMB 3559, NCIMB 3560
<i>Lactobacillus helveticus</i>	ATCC 15009, ATCC 27558 NCDO 87, NCDO 2395
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4357, ATCC 4356
<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 14869
<i>Lactobacillus casei</i>	ATCC 1118, ATCC 27139, ATCC 393
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	ATCC 7469
<i>Lactobacillus crispatus</i>	ATCC 33820
<i>Lactobacillus fermentum</i>	ATCC 14931, ATCC 23271
<i>Lactobacillus gasseri</i>	ATCC 9857
<i>Lactobacillus jensenii</i>	ATCC 25258
<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014, ATCC 14917
<i>Lactobacillus reuteri</i>	ATCC 23271
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	ATCC 33200
<i>Lactobacillus vaginalis</i>	ATCC 49450
<i>Lb. salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i>	ATCC 11741

ATCC - American Type Culture Collection

CIP - Collection of Institute Pasteur, France

NCIMB - National Collection of Industrial Microorganisms, Bulgaria

NCDO - National Collection of Dairy Organisms, UK

Таблица 2. Лактобацилни изолати изследвани в настоящата дисертация.

Изолати от млечни хранителни продукти		Изолати от клинични проби
1	D41	HV3
2	D42	HV4
3	D43	HV10
4	D9	HV11
5	D45	HV13
6	D1	HV19
7	D2	HV110
8	D7	HV111
9	D3	HV120
10	D6	HV12
11	D8	HV14
12	D10	HV21
13	D13	HV24
14	D14	HV25
15	D15	HV26
16	D34	HV27
17	D35	HV31
18	D37	HV33
19	D32	HV35
20	D43	HV34
21	D12	HV37
22		HV28

По-важни методи използвани в дисертацията:

Риботипиране (Grimont end Grimond, 1986)

Рестрицираната хромозомна ДНК, разделена електрофоретично и пренесена на мембрана (Boehringer Mannheim) се хибридизира с нерадиоактивно белязана сонда съдържаща целия рибозомален оперон (16S+23S+IGS) или част от него (16S). Хибридизацията се осъществява при 62°C за 18h.

Хибридизация и детекция на фиксирана върху мембрана ДНК

Хибридизацията се извършва в хибридизационна камера Techne (Oxford, UK), в продължение на 18 часа. Използва се следния хибридизационен разтвор: 5xSSC; 0.1% SLS; 0.02% SDS; 0.5% blocking reagent (Boehringer Mannheim). Двуверижните сонди непосредствено преди използване се денатурират (10min на водна баня 95°C и 5min на лед). Температурата на хибридизация се определя от вида на сондата. Всички мембрани, които са хибридизирани със сонди при температура 62°C, се мият 2x5min с 2xSSC; 0.1xSDS при стайна температура и 2x15min с 0.1xSSC; 0.1xSDS при 62°C. Детекцията на хибридизираните мембрани се осъществява с кит за колориметрично ензимно оцветяване съобразно инструкциите на фирмата производител Boehringer Mannheim.

Rep PCR -дактилоскопия (Versalovic et al. 1994)

Беше използван следния праймер:

BOX /5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC-3'/

Амплификационните реакции са осъществени с 0.5U (Boehringer Mannheim) Taq полимераза и съответния 10x буфер към фирмения PCR кит /100mM Tris-HCl; 500mM KCl; 15mM MgCl₂; pH=8.3/. Беше използван апарат Techne Progene (Oxford, UK) с обем на епруветките 0.5ml. Обемът на реакционната смес е 25µl със следните концентрации на компонентите: 100µg/ml BSA; 0.2mM за всеки dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 50pmol от съответния праймер и 50ng ДНК. Условиата за амплификация са в модификация по метода Selenska-Pobell et al. (1996)-таблица 4.

ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis) на 16S рибозомална ДНК

В основата на метода е рестрикционен анализ на получените чрез PCR амплифицирани рибозомални гени. Използваните праймери са представени в таблица 3. Реакционната смес е в обем 25µl със състав: 0.5U Taq полимераза (Boehringer Mannheim) и съответния буфер към нея с концентрация на MgCl₂ от 5mM; 0.75mM за всеки dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 10pmol от всеки праймер и 50ng ДНК. Реакциите бяха проведени в апарат Techne Progene (Oxford, UK) с програми, посочени в таблица 4.

Таблица 3. Видовоспецифични праймери и праймери за рибозомалния оперон използвани в настоящата дисертация.

Вид	Праймери	Прицелно място	Секвенция (5'-3')	PCR annealing temp. (°C)	MgCl ₂ конц. (mM)	Литерат.
<i>L. acidophilus</i>	Aci I	16S gene	AGCTGAACCAACAGATTAC	62	1.5	Walter et al., 2000
	Aci II		ACTACCAGGGTATCTAATCC			
<i>L. crispatus</i>	CriI	16S gene	GTAATGACGTTAGGAAAGCG	60	1.5	Walter et al., 2000
	CriII		ACTACCAGGGTATCTAATCC			
<i>L. gasseri</i>	GasI	16S-23S	GAGTGCGAGAGCACTAAAG	55	2.5	Walter et al., 2000
	GasII	spacer	CTATTTCAAGTTGAGTTTCTCT			
<i>L. johnsonii</i>	JohI	16S gene	GAGCTTGCCTAGATGATTTTA	57	1.5	Walter et al., 2000
	JohII		ACTACCAGGGTATCTAATCC			
<i>L. helveticus</i>	Hell	16S-23S	GAAGTGATGGAGAGTAGAGATA	62	1.5	Tilsala-Timisjarvi 1997
	HellII	spacer	CTCTTCTCGGTCGCCTTG			
<i>L. fermentum</i>	FerI	16S-23S	GCCGCCTAAGGTGGGACAGAT	55	3.0	Walter et al., 2000
	FerII	spacer	CTGATCGTAGATCAGTCAAG			
<i>L. plantarum</i>	PlantI	16S gene	ATCATGATTTACATTTGAGTG	52	1.5	Chagnaud et al. 2001
	LOWLAC		CGACGACCATGAACCACCTGT			
<i>L. casei</i>	CasI	16S-23S	CAGACTGAAAGTCTGACGG	55	2.0	Walter et al., 2000
	CasII	spacer	GCGATGCGAATTTCTTTTTC			
Универсални праймери	16-01	16S 8-27	AGAGTTTGATCTACTGGCTCAG	55	5.0	Brosius et al., 1981
	16-02	16S	AAAGGAGGTGAATCC			
Универсални праймери		1542-1529				
	23-01	16S	GGG(AG)(CT)(GT)AAGTCGTAAC	55	5.0	Brosius et al., 1981
	23-07	1486-1499				
		23S	GGGTTNCCCCATTCGG			
		130-115				

PCR с видовоспецифични праймери

Използваните праймери са представени в таблица 3. Обемът на реакционната смес е 30 µл със следните концентрации на компонентите: 10 mM Tris-HCl; 2,5 mM MgCl₂; 50 mM KCl; dNTPs-200 µM; 20 pmol от всеки праймер; 500 ng ДНК; 2,5 U Taq Polymerase /Sigma/. Реакциите бяха проведени в апарат Techne Progene (Oxford, UK) с програми, посочени в таблица 4.

Таблица 4: Програми за PCR амплификация в различни етапи от изследванията.

Програма	Видовоспецифични праймери за:			
	<i>Lb.crispatus</i>	<i>Lb.gasseri</i>	<i>Lb.johnsonii</i>	<i>Lb.acidophilus</i>
Denaturation	<u>2 min 94°C</u>	<u>2 min 94°C</u>	<u>2 min 94°C</u>	<u>2 min 92°C</u>
	30s 95°C	30s 95°C	30s 95°C	30s 95°C
Cycles-30	1min 60°C	1min 55°C	1min 57°C	30s 62°C
	<u>1min 72°C</u>	<u>1min 72°C</u>	<u>1min 72°C</u>	<u>30s 72°C</u>
Final elongation	5min 72°C	5min 72°C	2min 72°C	2min 72°C
	<i>Lb.helveticus</i>	<i>Lb.fermentum</i>	<i>Lb.plantarum</i>	<i>Lb.casei</i>
Denaturation	<u>2 min 92°C</u>	<u>2 min 94°C</u>	<u>10min 95°C</u>	<u>2 min 94°C</u>
	30s 95°C	30s 95°C	30s 95°C	30s 95°C
Cycles-30	30s 62°C	1min 55°C	30s 52°C	1min 55°C
	<u>30s 72°C</u>	<u>1min 72°C</u>	<u>1min 72°C</u>	<u>1min 72°C</u>
Final elongation	2min 72°C	2min 72°C	10min 72°C	2min 72°C
Програма	Универсални праймери:			
	16S rДНК	23S rДНК	IGS	BOX
Denaturation	<u>10min 95°C</u>	<u>10min 95°C</u>	<u>5min 95°C</u>	<u>7min 95°C</u>
Cycles-5	--	--	40s 57°C; <u>90s 72°C</u>	--
	1min 95°C	1min 95°C	1min 95°C	1min 94°C
Cycles-40	1min 55°C	1min 55°C	1min 55°C	1min 52°C
	<u>4min 72°C</u>	<u>4min 72°C</u>	<u>90s 72°C</u>	<u>8min 68°C</u>
Final elongation	7min 72°C	7min 72°C	10min, 72°C	16min, 68°C

Компютърен анализ на таксономичните изследвания

Изображенията на полиморфните профили се описват чрез бинарни матрици. Кластерният анализ се осъществява на база изчисление на коефициента на Dice и Average linkage analysis /UPGMA/ с използване на следния софтуер: Multivariable Package for IBM PC /Shareware/.

Секвениране

Секвенирането на щам HV28 бе направено по дидезокси-метода на Sanger (Sanger et al. 1977) с помощта на Big Day Vers. 3.1 Sequencing Kit (Pharmacia) и автоматичен секвенатор ABI Prism 310 в Лабораторията за диагностициране на наследствени заболявания с ръководител проф. д.б.н. И. Кременски, Медицинска Академия, София. Концентрацията на ДНК за секвениране бе 100 ng/μl, а на всички праймери – 5 nmol/μl.

Компютърният анализ на секвенцията бе направен с програмата DNASStar. Сравнението между получената секвенция и световните базиданни (NCBI) беше проведено с програмите BLASTN (Altschul et al. 1997) и FASTA (Pearson and Lipman 1988), а сходните райони в дадени молекули бяха търсени с програмата за сравнение Clustal W (Thompson et al. 1994).

РЕЗУЛТАТИ

1. Изолиране и първично охарактеризиране на нови лактобацилни щамове

Лактобацилите са широко разпространени в природата и се срещат в различни екологични ниши. Настоящото изследване включва лактобацилни видове, изолирани от различни източници:

-млечни продукти– домашно приготвено бяло краве сирене, козе сирене, кисело мляко

-клинични изолати– вагинални проби

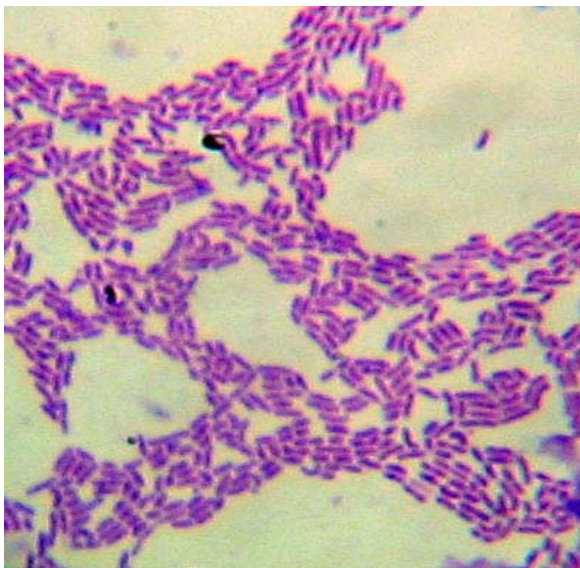
В изследването са включени 40 клинични проби от български жени в репродуктивна възраст (18-45 години), предоставени ни от гинекологична клиника. Получените проби са от две основни групи пациентки: *I група* -30 проби от клинично здрави жени, не боледували от БВ и други болести предавани по полов път; *II група* -10 проби от жени прекарвали БВ.

След посявка на щрих върху селективните хранителни среди MRS агар (кисел рН-5.6) и Rogoza агар до получаване на единични колонии, изолирахме различните морфологични типове колонии от всяка проба. Чистите култури тествахме за принадлежността им към род *Lactobacillus* чрез класическите хемотаксономични характеристики (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986): Грам (+), неспорообразуващи, неподвижни, пръчковидни бактерии, каталазоотрицателни, растящи в микроаерофилни до строго анаеробни условия. Те са хемоорганотрофни и катаболизират въглехидратите до

млечна киселина (Klein et al. 1998). Според изброените критерии подбрахме 21 щама от млечни хранителни продукти и 22 щама от клинични проби, като всички те отговарят на общоприетата характеристика за млечнокисели бактерии. Създадената по този начин колекция от 43 новоизолирани щама бе съхранена при -20°C в криопротекторен буфер.

Трябва да отбележим, че при пробите получени от II та група пациентки (прекарали БВ), лактобацили бяха изолирани само при два от случаите. Съгласно данни от клиниката по акушерство и гинекология при СБЛАГ “Майчин дом”, при микроскопско изследване на вагинални препарати при български пациентки с бактериална вагиноза само при 4,5 % се откриват лактобацили (Андреева, 2003).

На този първи етап от изследването са получени 2 основни групи щамове, притежаващи общи физиологични и морфологични характеристики, но различаващи се по произход (21 изолата от хранителни продукти и 22 клинични изолата). Независимо от повсеместното разпространение на млечнокиселите бактерии, всяка екологична ниша се характеризира с преобладаваща популация от лактобацилни видове. Тази моделна група от щамове беше използвана за разработване на нов комбиниран подход за молекулярно-таксономична характеристика на лактобацили.

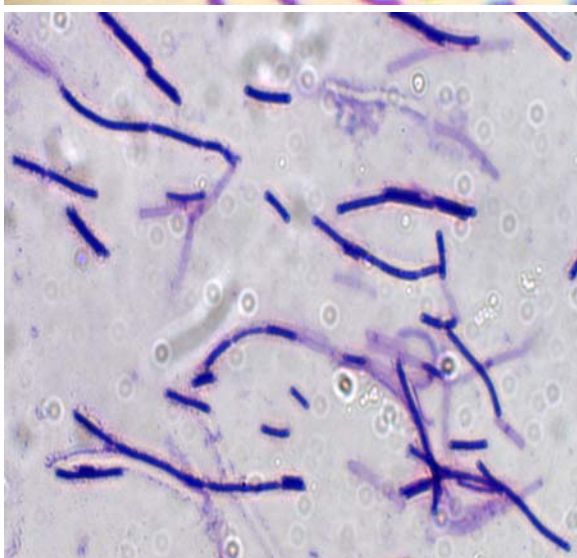


Фиг.1 Морфологично разнообразие на лактобацилни изолати от вагинални проби

Щам HV3



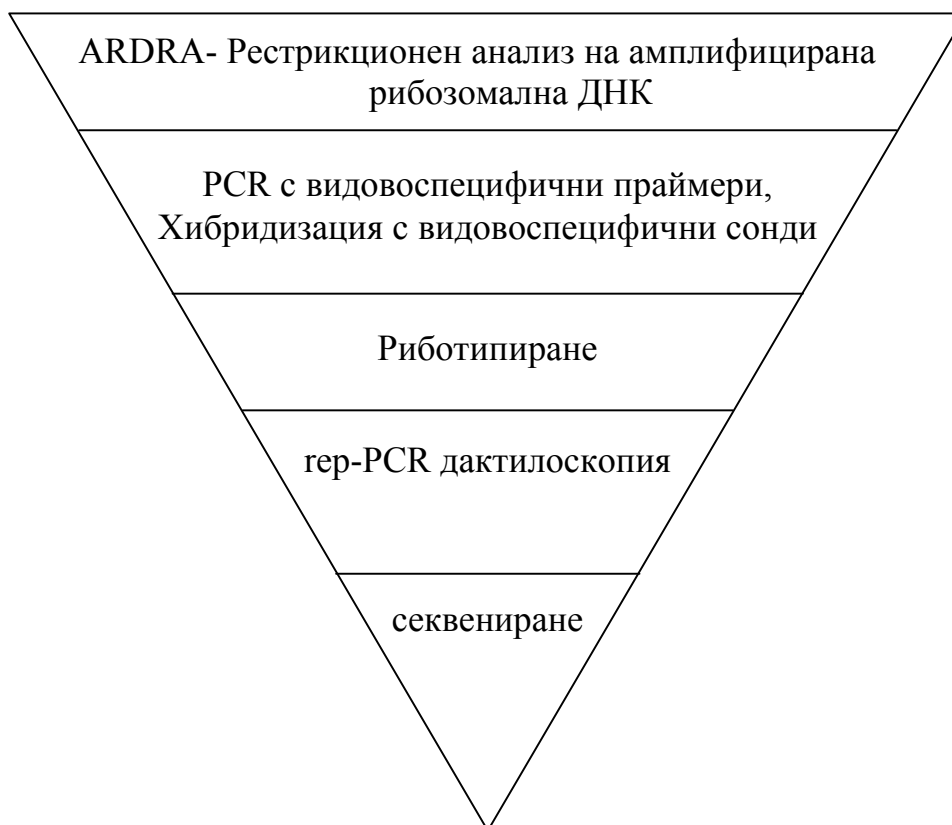
Щам HV28



Щам HV120

2. Сравнителен геномен анализ на моделна група щамове *Lactobacillus*, представители на различни екологични ниши

Изследванията бяха проведени по следната схема:



2.1. Първи етап: Групиране на изследваните изолати чрез ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction analysis)

Този метод бе избран за начално охарактеризиране на голямата и хетерогенна група лактобацилни щамове изолирани от хранителни продукти и клинични проби (43). Целта бе да се направи първоначално групиране на неизвестните изолати и референтни щамове *Lactobacillus*, на базата на сходство в полиморфните профили получени чрез ARDRA. В изследването бяха включени 41 референтни щама *Lactobacillus* представители на 15 вида.

2.1.1. Оптимизиране на условията и подбор на рестрикционни ензими

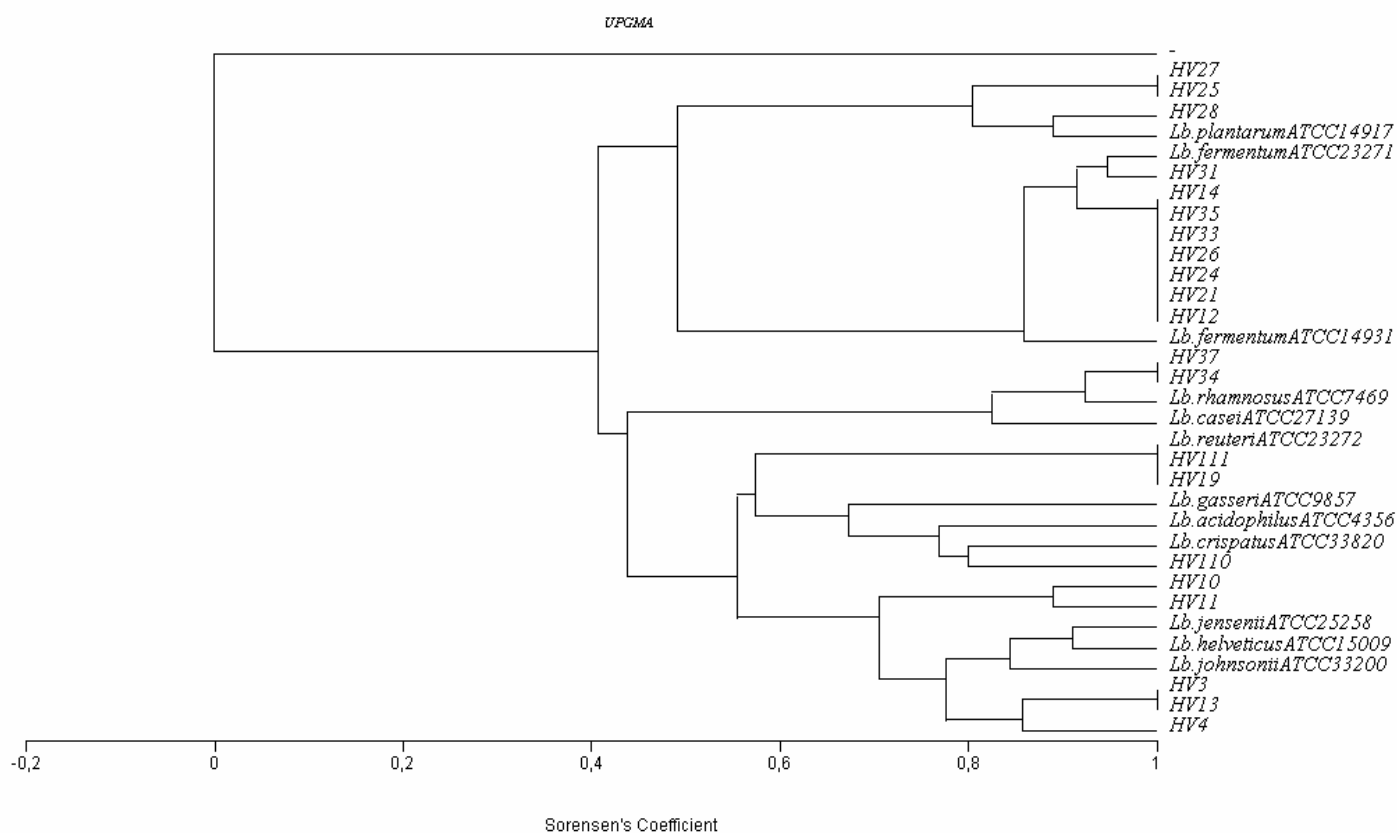
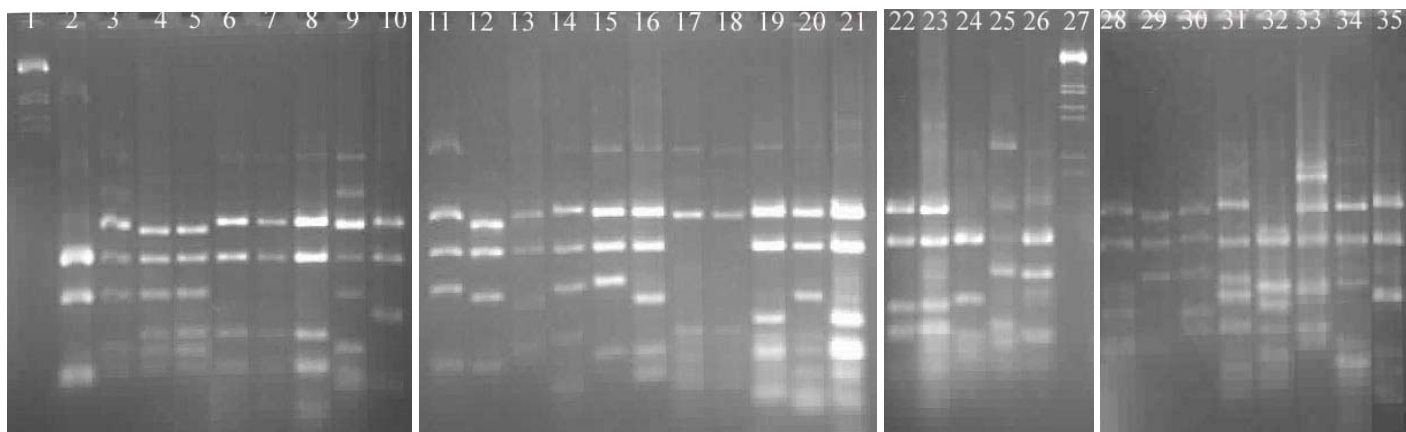
Приложеният от нас метод ARDRA е на базата на 16S рДНК и поради малкия размер на фрагмента (около 1500kb), като най-подходящи счетохме ензимите разпознаващи секвенция от 4 нуклеотида- *Hae* III, *Msp* I, *Mbo* I, *Taq* I, *Sau* 3A, *Alu*I. Подборът на рестрикционни ензими бе направен в съответствие с базата данни от секвенции на 16S рДНК.

2.1.2. Приложение на ARDRA за идентификация на нови изолати

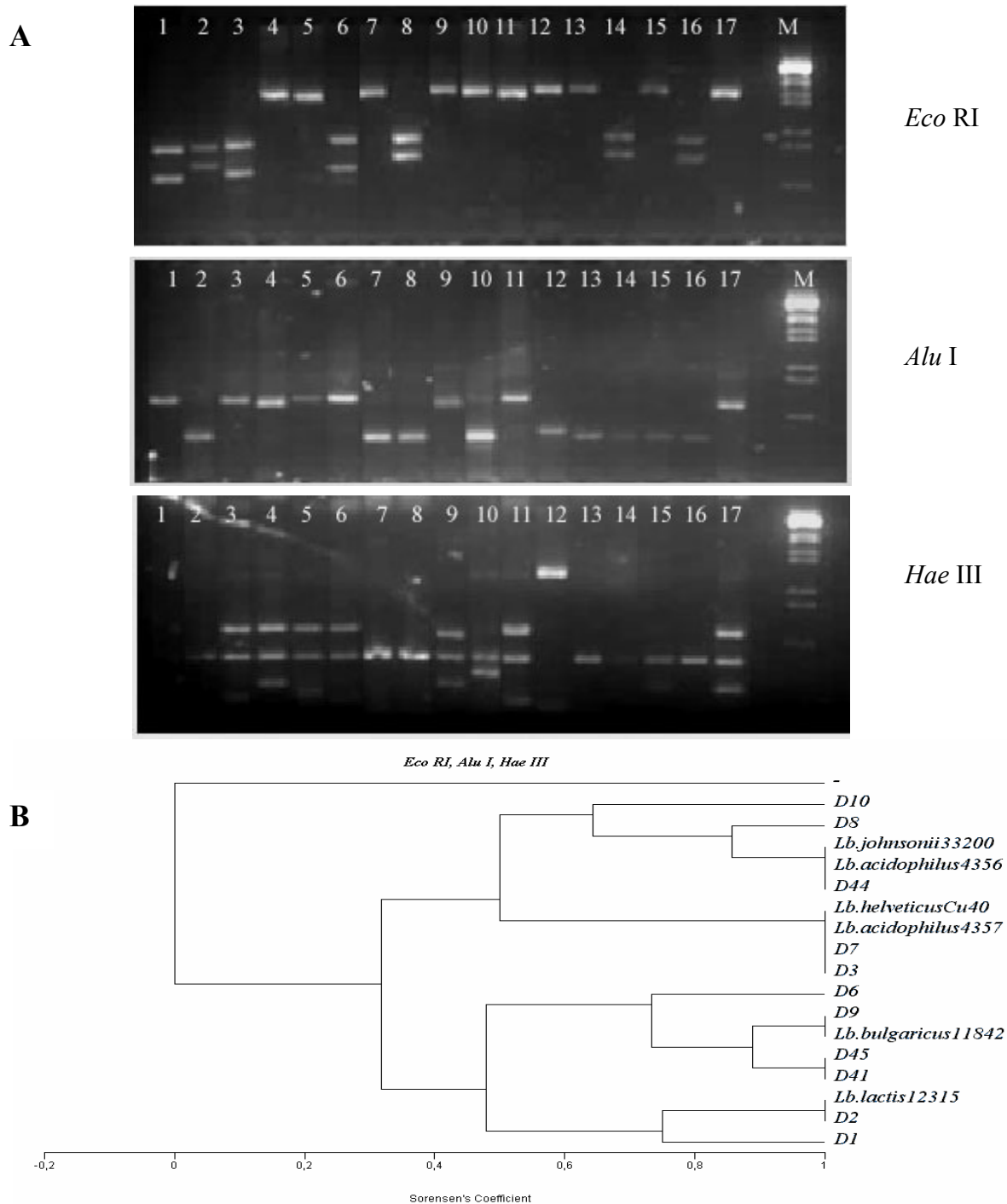
Всички изолати бяха изследвани чрез ARDRA в поредица от 13 експеримента с 7 различни рестрикционни ензима. Резултатите бяха обработени с компютърен номеричен анализ и са представени чрез снимки и дендрограми.

На фиг.2 е показан ARDRA с ензима *Hae* III на вагинални изолати и 12 референтни щама *Lactobacillus*. На дендрограмата ясно се виждат три обособени групи: част от изолатите се групират с *Lb. plantarum* и *Lb. fermentum*, във втората група попадат HV34, HV37, *Lb. casei* и *Lb. rhamnosus*, а третата група е доста разнородна- обхваща 7 референтни щама и 8 изолата. Изолати HV111 и HV19 се групира с *Lb. reuteri* ATCC 23272.

С цел да получим по-точни резултати и да оптимизираме приложения метод, направихме четири комбинирани анализа- 16S рибозомална ДНК от избрани изолати срязахме с различни рестрикционни ензими (в отделни рестрикционни реакции) и ги визуализирахме на обща гел електрофореза показана на фиг. 3.



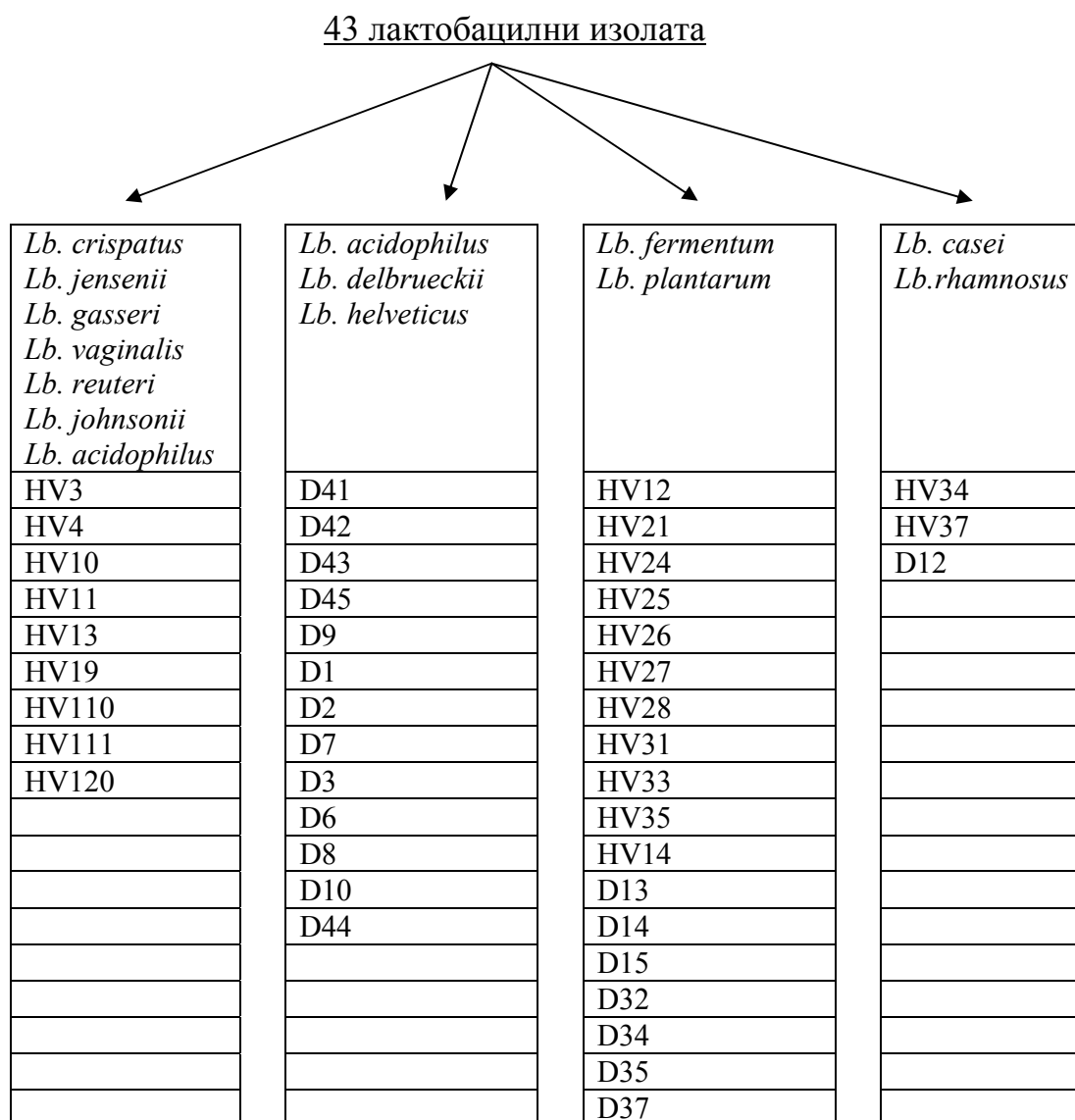
Фиг.2 Агарозна гел електрофореза на ARDRA (16S rDNA) таксономичен анализ на щамове *Lactobacillus* с рестрикционен ензим *Hae* III. Последователност: 1- Marker- Lambda phage DNA, срязана с *Hind* III, 2-HV110, 3-HV28, 4-HV25, 5-HV27, 6-HV31, 7-HV33, 8-HV35, 9-*Lb. fermentum* ATCC 23271, 10-HV14, 11-HV3, 12-HV4, 13-HV10, 14-HV11, 15-HV13, 16-HV110, 17-HV34, 18-HV37, 19-HV19, 20-HV111, 21-HV24, 22-HV26, 23-HV21, 24-*Lb. helveticus* ATCC 15009, 25-*Lb. rhamnosus* ATCC 7469, 26-*Lb. jensenii* ATCC 25258, 27- Marker, 28-*Lb. fermentum* ATCC 14931, 29-*Lb. plantarum* ATCC 14917, 30-*Lb. johnsonii* ATCC 33200, 31-*Lb. acidophilus* ATCC 4356, 32-*Lb. crispatus* ATCC 33820, 33-*Lb. gasseri* ATCC 9857, 34-*Lb. casei* ATCC 27139, 35-*Lb. reuteri* ATCC 23272. Дендрограма показваща групиране на референтни щамове *Lactobacillus* и част от изследваните изолати, получена чрез прилагане на номеричен анализ.



Фиг.3 **A** Агарозна гел електрофореза на ARDRA (16S rDNA) таксономичен анализ на щамове *Lactobacillus* с рестрикционни ензими *Eco RI*, *Alu I*, *Hae III*. Последователност: 1-D1, 2-D3, 3-D2, 4-D41, 5-*Lb.bulgaricus*11842, 6-*Lb.lactis*12315, 7-D44, 8-D7, 9-D6, 10-D8, 11-D9, 12-D10, 13-*Lb.acidophilus*4356, 14-*Lb.acidophilus*4357, 15-*Lb.johnsonii*33200, 16-*Lb.helveticus*Cu40, 17-D45, M- Lambda phage DNA, срязана с *EcoRI* и *Hind III*. **B** Дендрограма показваща групиране на референтни щамове *Lactobacillus* и част от изследваните изолати, получена чрез прилагане на номеричен анализ.

След обобщение на резултатите получени чрез ARDRA в проведените 13 експеримента, ние групирахме новите изолати и референтните щамове в четири големи кластера показани на фиг. 4.

Фиг. 4 Първоначално групиране на изследваните изолати чрез ARDRA



Общо: $9+13+18+3 = 43$ изолати

2.2. Втори етап: Идентификация до вид

Като втори етап от изследването с цел идентификация до вид на новоизолираните щамове бяха приложени два метода: PCR с видовоспецифични праймери и Dot-хибридизация с видовоспецифични сонди.

2.2.1. PCR с видовоспецифични праймери

Неизвестните изолати обособени в четири групи, се отнасят към един или няколко лактобацилни вида. Всяка от групите беше изследвана с видовоспецифични праймери за съответните видове.

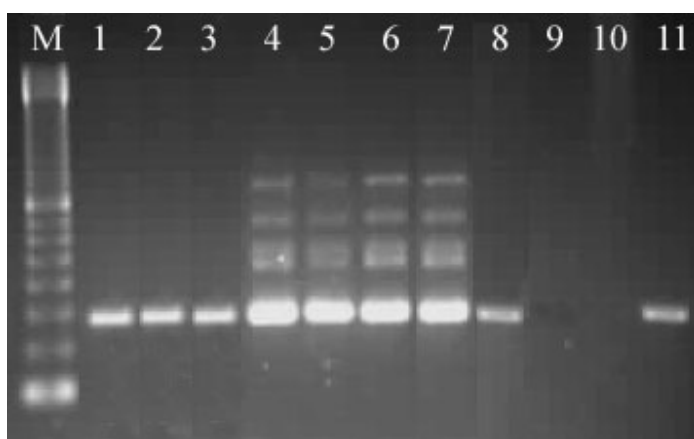
Използвахме 8 двойки видовоспецифични праймери (Матер. и методи, табл. 3) за: *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*. При *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum* и *Lb. acidophilus* се амплифицира видовоспецифичен участък от 16S рДНК, а при *Lb. gasseri*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum* и *Lb. casei* част от 16S-23S интергенния спейсър (IGS).

От изследваната група от 43 лактобацилни изолата 8 се оказаха представители на вида *Lactobacillus fermentum*, 4 на *Lactobacillus helveticus*, 2 на *Lactobacillus gasseri*, 9 на *Lactobacillus plantarum* и 2 на *Lactobacillus crispatus*. Част от резултатите са представени на фиг. 5.

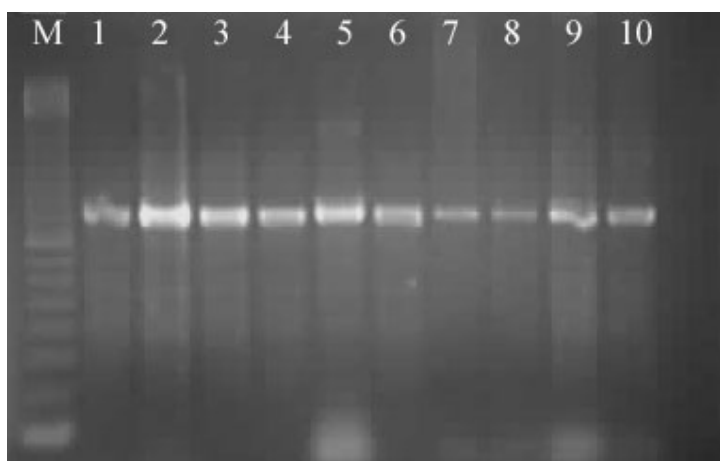
2.2.2. Dot-хибридизация с видовоспецифични сонди

Вторият приложен метод за идентификация до вид беше Dot-хибридизация с видовоспецифични сонди. Целта ни бе, чрез този метод да изследваме изолатите за родство с видове, за които не разполагаме с

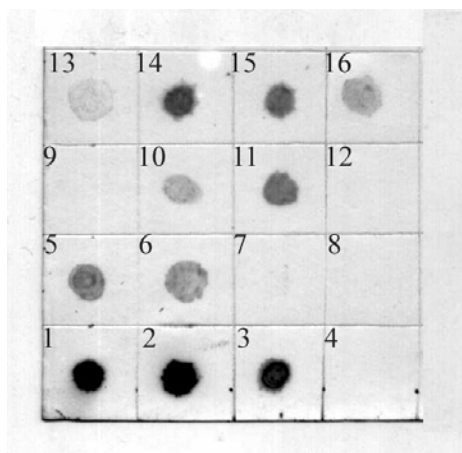
видово-специфични праймери. Избрахме II група, която включва 13 изолата и референтни щамове на видовете *Lb. acidophilus*, *Lb. delbrueckii* и *Lb. helveticus* и само 2 от неизвестните щамове дадоха продукт с праймери за *Lb. helveticus*. С цялата група изолати беше направена Dot-хибридизация с 2 видовоспецифични сонди за вида *Lb. delbrueckii*. Използвани бяха видовоспецифичните сонди: BOX-разработена в нашата лаборатория (Miteva and Boudacov 1999) и фрагмент от рекомбинантния плазмид pY85 (Delley et al. 1990). Част от резултатите са представени на фиг. 6.



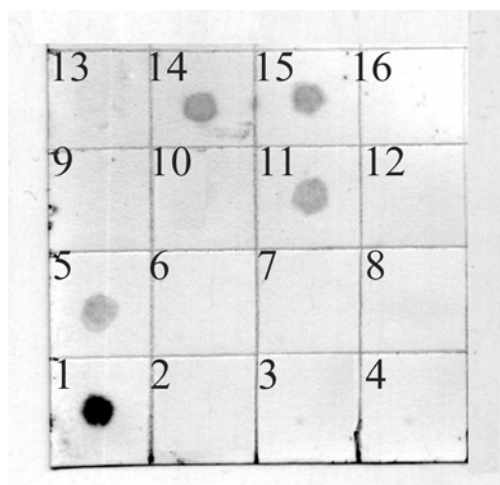
Фиг.5А Агарозна гел електрофореза показваща PCR-продуктите на новоизолирани щамове *Lactobacillus* с видовоспецифични праймери за *Lb. fermentum*. Последователност: М-Маркер 100bp, 1-*Lb. fermentum* ATCC 14931, 2-HV12, 3-HV21, 4-HV33, 5-HV31, 6-HV35, 7-HV14, 8-HV24, 9-HV25, 10-HV27, 11-HV26



Фиг.5В Агарозна гел електрофореза показваща PCR-продуктите на новоизолирани щамове *Lactobacillus* с видовоспецифични праймери за *Lb. plantarum*. Последователност: М-Маркер 100bp, 1-*Lb. plantarum* ATCC 14917, 2-HV25, 3-HV27, 4-HV28, 5-D37, 6-D13, 7-D14, 8-D32, 9-D35, 10-D34.



Фиг.6 А Dot хибридизационен анализ на изолатите от II група с видовоспецифична сонда за *Lb. delbrueckii* /Delley et al. 1990/. Последователност: 1-*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, 2-*Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*, 3-*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, 4-D10, 5-D8, 6-D6, 7-D3, 8-D7, 9-D44, 10-D2, 11-D1, 12-D45, 13-D9, 14-D43, 15-D42, 16-D41.



Фиг.6 В Dot хибридизационен анализ на изолати от I и II група с видовоспецифична сонда за *Lb. helveticus* /Pilloud et al. 1990/. Последователност: 1- *Lb. helveticus*, 2-D41, 3-D42, 4-D43, 5-D7, 6-D45, 7-D9, 8-D1, 9-D2, 10-D3, 11-HV10, 12-D6, 13-D8, 14-HV13, 15-HV-D44, 16-D10.

2.3. Трети етап: Идентификация до подвид

Следващия етап от работата бе да се направи опит да се идентифицират различните изолати до ниво подвид с помощта на различни молекулярно-таксономични техники. В този етап от изследването приложихме два молекулярни метода: Риботипиране и Rep-PCR дактилоскопия.

2.3.1. Риботипиране

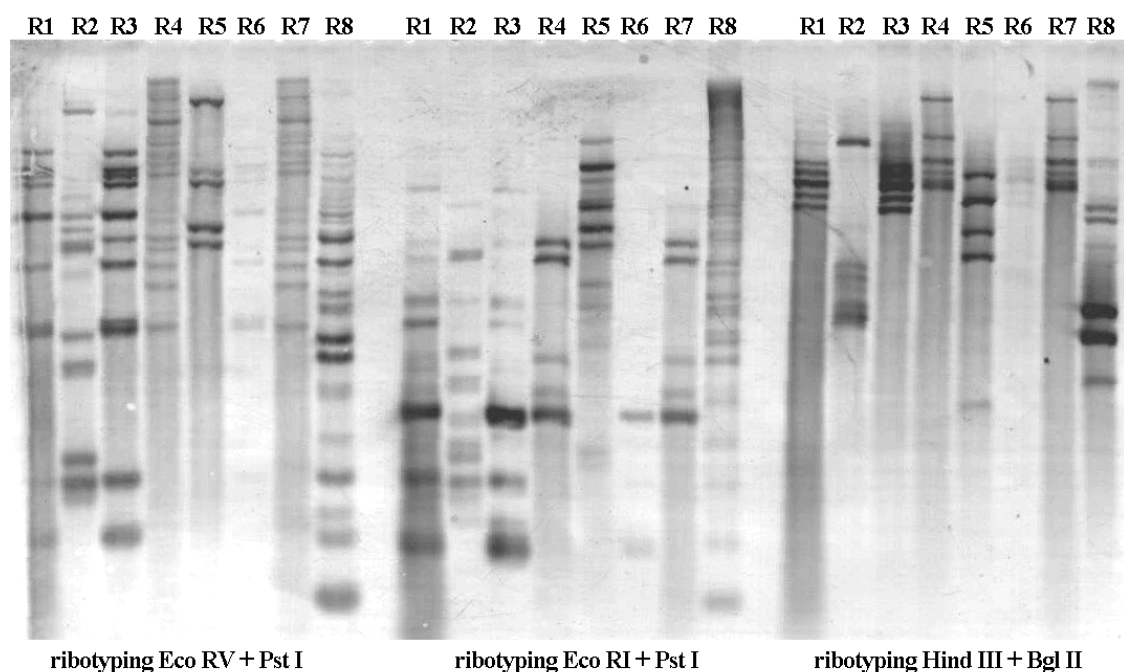
Риботипирането е метод с висока дискриминативна способност. Това е един от основните молекулярно-генетични методи прилагани за идентификация.

2.3.1.1. Предварителни експерименти по оптимизация на метода

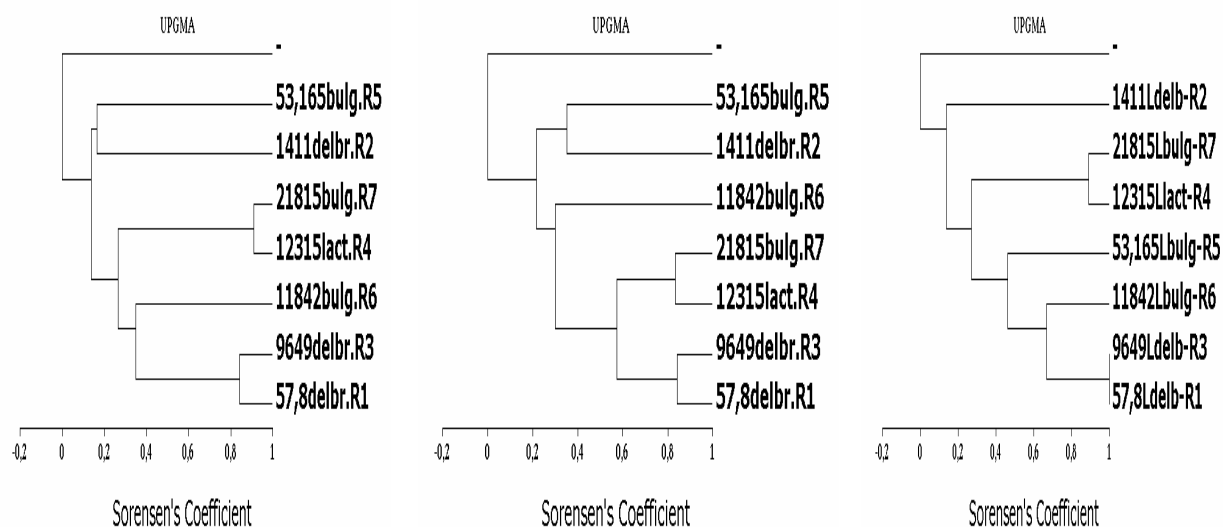
Тъй като бяха изследвани щамове с различно G+C съдържание, целенасочено бяха използвани различни рестриктази, разпознаващи съответно богати на AT или GC сайтове от 6, 5 или 4 нуклеотида. Подборът на рестрикционни ензими беше направен на базата на предварителни експерименти. В рамките на род *Lactobacillus* G+C съдържанието (32-55 mol%) варира в широки граници (Collins et al. 1991; Hammes et al. 1995) и това може да обясни големите различия в рестрикционните профили, които се получават с този метод и трудностите при сравняването им. Например при *Lb. delbrueckii* G+C съдържанието е 50 %, докато при *Lb. johnsonii*-34,6%.

Анализите са осъществени чрез паралелни рестрикции с един или два ензима в комбинация, за постигане на най-добро отдиференциране на изучаваните лактобацилни щамове. Предварително различните ензимни комбинации бяха тествани върху малък брой референтни щамове, за да изберем подходящи ензими за по-нататъчни анализи. Част от резултатите са представени на фиг. 7.

A



B

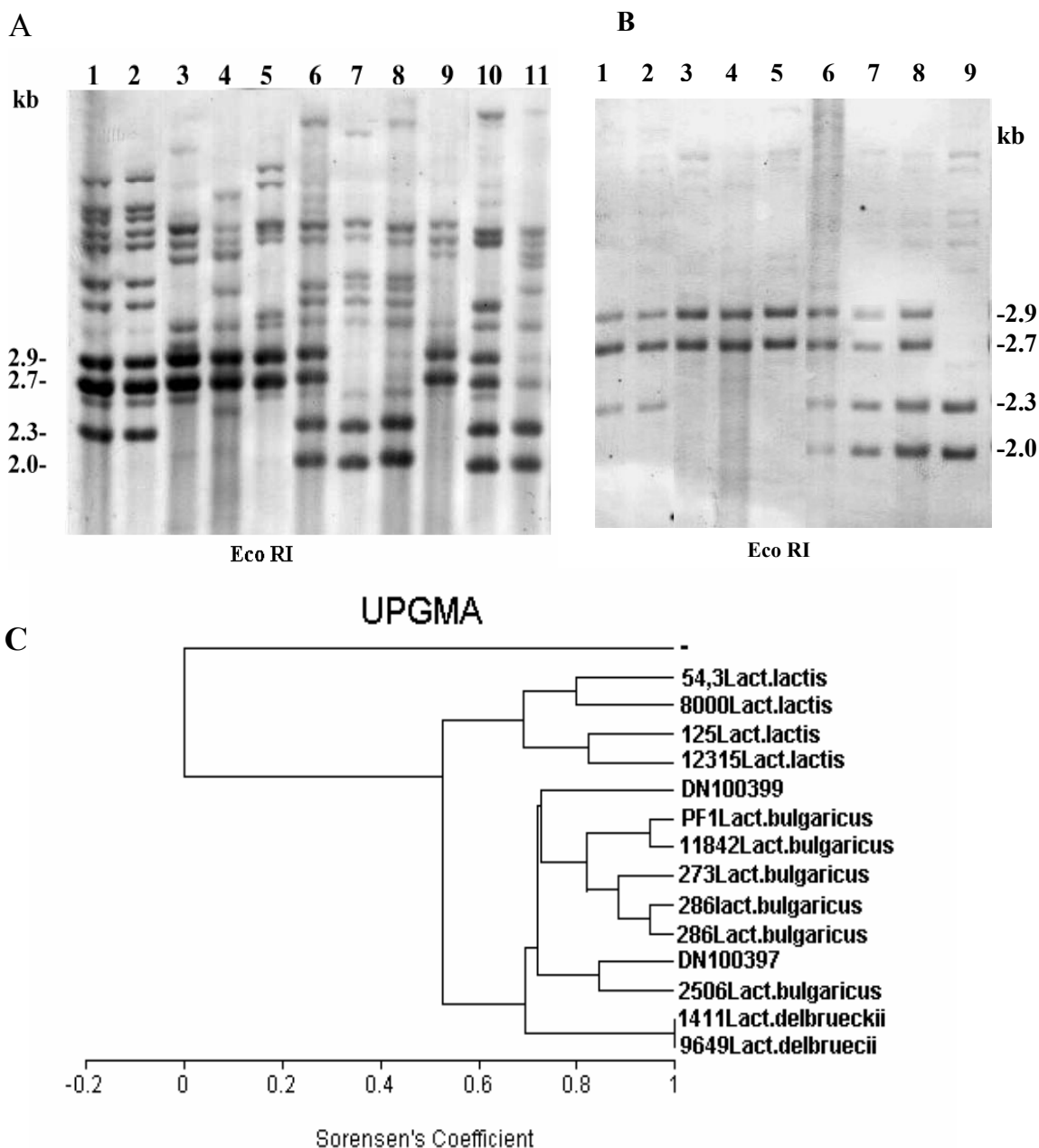


Фиг.7А Риботипиране на хидролизирана с различни ензими хромозомна ДНК от 8 референтни щама. Хибридизационни профили: *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (R1- 57.8, R2- 1411, R3- 9649), *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis* (R4- 12315, R5- 53.165), *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (R6- 11842, R7- 21815), *Lb. helveticus* (R8-ATCC 1509), В Дендрограми.

2.3.1.2. Нов метод за разграничаване трите подвида на *Lactobacillus delbrueckii*

Както вече бе отбелязано, изборът на рестрикционни ензими е от особено важно значение за изследването на бактериалните щамове чрез риботипиране. Бяха тествани много ензими върху моделна група референтни щамове с цел да се разграничат трите подвида на *Lb. delbrueckii*. Интересни резултати получихме с ензима *Eco* RI. Хибридизацията на ДНК рестрицирана с *Eco* RI, показва добро групиране на референтните щамове *Lb. delbrueckii* според подвидовата принадлежност (фиг. 8). След хибридизация с 16S рДНК + IGS + 23S рДНК при *Lactobacillus delbrueckii* се наблюдава добре изразена видова специфична позиция на 4 фрагмента с размер от 2kb до 3kb, които не се откриват в профилите на *Lb. helveticus* и *Lb. casei*. Две силни ивици 2.9kb и 2.7kb се наблюдават в профилите на всички щамове *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* и *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis*, и при някои от представените щамове *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. В същото време профилите на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* могат да бъдат разграничени от тези на *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* посредством допълнително присъстваща малка ивица (2.3kb). От друга страна тази последна ивица заедно с ивица от 2.0kb формира дублет типичен само за подвид *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. Същите резултати бяха получени и при използване само на 16S рДНК, като проба за хибридизация (резултатите не са показани). Това нагледно разграничаване на трите подвидово специфични профили се изрази много добре в дендограмите които разделиха *Lactobacillus delbrueckii* в три добре формирани кластера. Полученото от нас типично за всеки

подвид разпределение на ивиците, беше наблюдавано в профилите на всички изследвани колекционни щамове *Lactobacillus delbrueckii*.



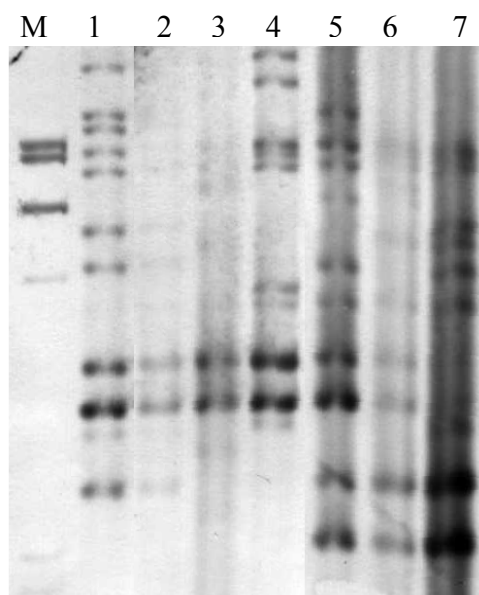
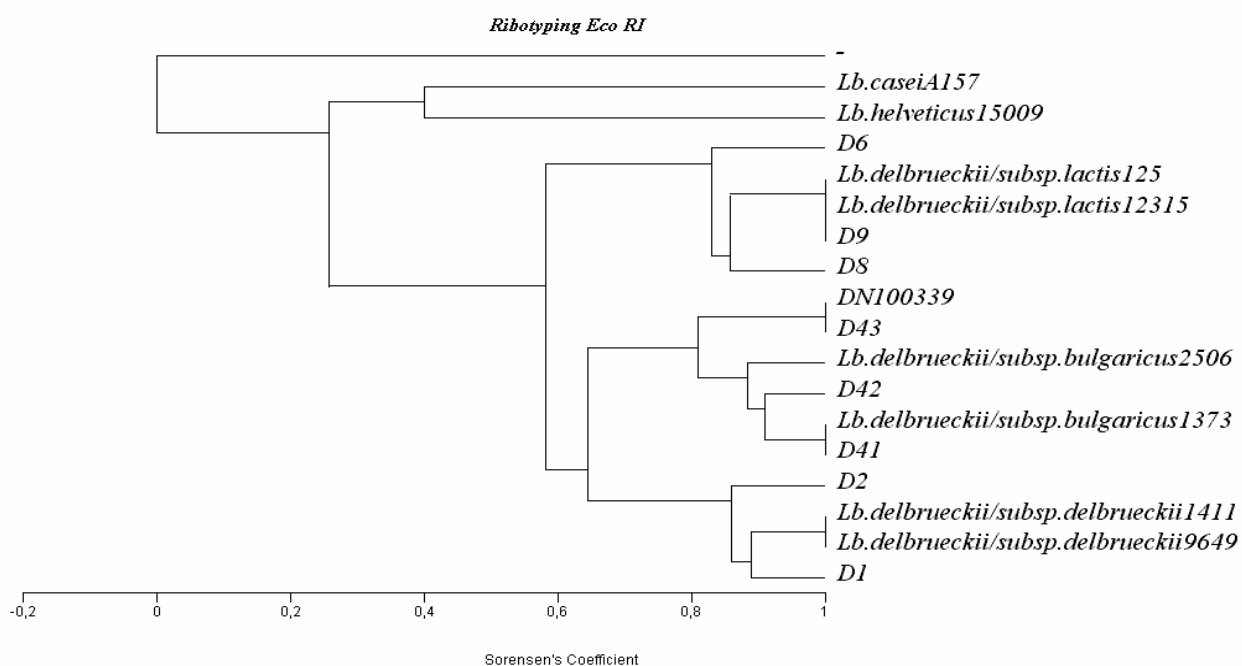
Фиг.8 Риботипиране на хидролизирана с *EcoR* I хромозомна ДНК от трите подвиди на *Lb. delbrueckii*. **A** Хибридизационни профили: *Lb. delbrueckii* subsp.*delbrueckii* (1-9649, 2-1411), *Lb. delbrueckii* subsp.*lactis* (3-12315, 4-8000, 5-125, 9-54.3), *Lb. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* (6-2506, 7-2506, 8-237, 10-DN 100195, 11-DN100339), **B** Хибридизационни профили: *Lb. delbrueckii* subsp.*delbrueckii* (1-1411, 2-9649, 3-3558), *Lb. delbrueckii* subsp.*lactis* (4-8000, 5-125), *Lb. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* (6-2506, 7-11842, 8-PF1, 9-286); **C** Дендрограма.

2.3.1.3. Изследване на новоизолирани щамове чрез риботипиране

Успешните резултати, получени след прилагане на риботипирането върху група референтни щамове послужиха като база за прилагане на същия анализ и при изолатите. Избрахме два рестрикционни ензима: *Eco* RI- за изследване на изолатите от втора група, получени от хранителни продукти и ензима *Pvu* II- за всички останали изолати.

Риботипиране с *Eco* RI приложихме за тези изолати, които предварително бяхме определили чрез Dot-хибридизация, че принадлежат към вида *Lactobacillus delbrueckii*. Получените резултати (фиг. 9) са изключително интересни. Както очаквахме, изолатите се групират с референтите в три ясно обособени кластера, отговарящи на трите подвида на *Lactobacillus delbrueckii*. Щамове D1 и D2 се отнасят към *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* с коефициент на сходство над 0,8. Изолати D41, D42 и D43 според това изследване, принадлежат към *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*- в профила им се наблюдават двете допълнителни ивици от 2,0kb и 2,3kb. Изолати D6, D8 и D9 са от подвид *lactis*- при тях тези ивици липсват, както и при всички изследвани референтни щамове от този подвид. Така, само чрез три стъпки, 8 от новите изолати успешно бяха определени до подвид.

Чрез риботипиране с ензима *Pvu* II изследвахме изолатите от I, III и IV група. Резултатите са представени чрез дендрограми. Резултатите, получени с риботипирането дават възможност да се разграничат помежду им всички изследвани щамове като следствие от притежаваните от тях индивидуални профили.

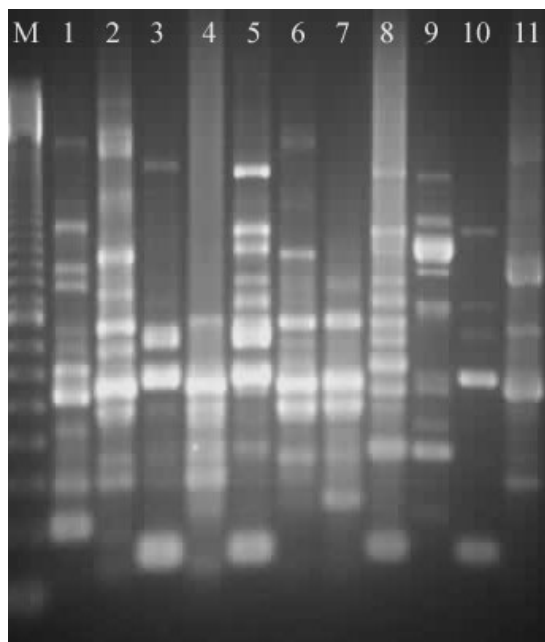
A**Eco RI****B****Eco RI****C**

Фиг.9 Риботипиране на хидролизирана с *EcoR I* хромозомна ДНК на референтни щамове и изолати от II група. **A** Хибридизационни профили: 1-D1, 2-D2, 3-D8, 4-D9, 5-D41, 6-D42, 7-D43; **B** Хибридизационни профили: *Lb. delbrueckii* subsp.*delbrueckii* (1-9649, 2-1411), *Lb. delbrueckii* subsp.*lactis* (3-12315, 4-125), *Lb. delbrueckii* subsp.*bulgaricus* (5-2506, 6-1373), *Lb. helveticus* (7-15009), *Lb. casei* (8-A157), 9-DN100339, 10-D6; **C** Дендрограма.

2.3.2. Изследване на новоизолирани щамове чрез rep-PCR дактилоскопия

За да бъдат разграничени отделните подвидове и за да се демонстрират различията между щамовете в рамките на вида, беше приложен и метода rep-PCR дактилоскопия.

За целта беше използван праймер BOX, който е повторена консервативна некодиреща последователност (Versalovic et al. 1994). Както се вижда от резултатите, представени на фигура 10 профилите, получени с праймер BOX, имат относително голям брой фрагменти. Идентични BOX-профили показват само щамове HV3 и HV13, които са близки и при изследване чрез риботипиране. BOX-профилите на двойките изолати HV19 и HV14, HV27 и HV28 също си приличат, но не са еднакви.



Фиг.10 Агарозна гел електрофореза показваща PCR на новоизолирани щамове *Lactobacillus* (III група) с праймер BOX. Последователност: M- Маркер 100bp, 1-HV21, 2-HV24, 3-HV25, 4-HV26, 5-HV27, 6-HV31, 7-HV33, 8-D37, 9-D14, 10-D32, 11-HV14.

2.3.3. Селекция на щам с антибактериална активност

Изолат HV28 показва антимикробна активност срещу различни микроорганизми и бе избран за секвенционен анализ. Резултатите са показани в табл. 5.

Таблица 5. Биологична активност на новоизолиран вагинален щам от род *Lactobacillus*.

Антимикробна активност на новоизолиран вагинален щам HV28		
Тест-микроорганизми	щам, колекция	mm стерилна зона
<i>Escherichia coli</i>	HB101 (ИМ)	17/19
	WF+ (ИМ)	0
<i>Listeria innocua</i> F	81T (CIP)	13
<i>Salmonella typhimurium</i>	123 (ИМ)	18
<i>Proteus vulgaris</i>	D52 (ИМ)	0
	1393 (ИМ)	0
<i>Bacillus subtilis</i>	6633 (ATCC)	16
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2 (ИМ)	0
<i>Staphylococcus aureus</i>	Smith (ИМ)	18
	209 (ИМ)	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5214 (CIP)	11
<i>Streptococcus piogenes</i>	15346 (ИМ)	0
<i>Candida albicans</i>	562 (НЦЗПБ)	0
	62 I (НЦЗПБ)	0

ИМ-колекция на Института по микробиология, БАН; CIP- Institute Pasteur, France; НЦЗПБ- Национален център по заразни и паразитни болести, ATCC - American Type Culture Collection.

2.3.4. Секвениране на гена за 16S rPHK при изолат HV28

Получената секвенция е депозирана в NCBI под номер DQ387856 и е представена на фиг. 11.

```
L.pl      AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAAC 60
HV28      -----

L.pl      GAACTCTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTACATTGAGTGAGTGGCGAACTGG 120
HV28      -----TTGAGTGAGTGGCGAACTGG 21
                      *****

L.pl      TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAA 180
HV28      TGAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAACAGATGCTAA 81
                      *****

L.pl      TACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT 240
HV28      TACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTT 141
                      *****

L.pl      TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGAT 300
HV28      TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGAGGTAACGGCTCACCATGGCAATGAT 201
                      *****

L.pl      ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCC 360
HV28      ACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCC 261
                      *****

L.pl      TCGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC 420
HV28      ACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGC 321
                      *****

L.pl      GTGAGTGAAGAAGGTTTCGGCTCGTAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATATGAGA 480
HV28      GTGAGTGAAGAAGG-TTTCGGCTCGTAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGA 380
                      *****

L.pl      GTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACGAAAG 517
HV28      GTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCA----- 412
                      *****
```

Фиг. 11 Сравнителен анализ на частични секвенции на гена за 16S рибозомалната РНК на *Lb. plantarum* (AY230230) и шам HV28 (DQ387856).

Като заключение можем да кажем, че моделната група от 43 лактобацилни щама изолирани от хранителни продукти и клинични проби беше изследвана с шест молекулярно-генетични метода по предложена от нас схема. Тридесет и три щама бяха определени до вид, от тях 8 и до подвид (сравнителната таблица 6).

Таблица 6. Обобщение-идентификация на лактобацилни изолати с различни молекулярни методи.

Изолати	Групиране	Идентификация до вид	Идентификация до подвид
	ARDRA анализ	PCR с видовоспецифични праймери, Dot- хибризация с видовоспецифични сонди	Риботипиране, Rep PCR с праймер BOX
HV3 HV4 HV10 HV11 HV13 HV19 HV110 HV111 HV120	I група: <i>Lb. crispatus</i> <i>Lb. jensenii</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. vaginalis</i> <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. johnsonii</i> <i>Lb. reuteri</i>	<i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. gasseri</i> <i>Lb. helveticus</i> --- <i>Lb. helveticus</i> несп.продукт <i>Lb.crispatus</i> несп.продукт <i>Lb.crispatus</i> --- ---	индивидуални щамово-специфични профили, потвърждаващи началното групиране на изолатите
D41 D42 D43 D45 D9 D1 D2 D7 D3 D6 D8 D10 D44	II група: <i>Lb. acidophilus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> --- <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. helveticus</i> --- <i>Lb. delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> --- <i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>bulgaricus</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>delbrueckii</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i> <i>Lb. delbrueckii</i> subsp <i>lactis</i>
HV12 HV21 HV24 HV25 HV26 HV27 HV28 HV31 HV33 HV35 HV14 D13 D14 D15 D32 D34 D35 D37	III група: <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. fermentum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> --- <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i> <i>Lb. plantarum</i>	индивидуални щамово-специфични профили, потвърждаващи началното групиране на изолатите
HV34 HV37 D12	IV група: <i>Lb. casei</i> <i>Lb. rhamnosus</i>	--- --- ---	индивидуални щамово-специфични профили
Общо: 43		33	8

ОБСЪЖДАНЕ НА РЕЗУЛТАТИТЕ

Цел на настоящата работа бе да се разработи подходящ молекулярно-генетичен подход за начална идентификация на нови лактобацилни изолати. Или да се подбере и предложи поредица от стъпки, водеща до точно определяне на всеки един изолат от род *Lactobacillus*.

Идентификацията е процес на определяне принадлежността на даден новоизолиран неидентифициран обект към съответната таксономична група.

Род *Lactobacillus* е един от най-хетерогенните в групата на млечнокиселите бактерии и в момента той обхваща повече от 129 различни вида. Схемите за таксономично определяне непрекъснато търпят развитие (Konings et al. 2000). Идентификацията и класификацията на тези видове се основава на класически морфологични, физиологични и биохимични тестове. Поради тази причина разграничаването им е твърде трудно вследствие еднаквите им хранителни изисквания, условия на растеж и крайни метаболитни продукти. Въпреки че класическите методи са сравнително прецизни, за да различат една група бактерии от друга те не позволяват разграничаване на близко родствени видове, още по-малко на отделни щамове.

В съответствие с тези съвременни схващания се наложи разработването и прилагането на нов подход от молекулярни техники, съобразен с видовите особености на лактобацилите. Това е особено важно при характеризирането на слабо проучени групи, каквато е групата на вагиналните лактобацили.

В нашето изследване бяха включени изолати от различни екологични ниши-всяка от които се характеризира с определен видов състав. Сравнително отскоро вагиналните лактобацили са предмет на изследвания. Досега в България подобно изследване не е провеждано. Тези лактобацили са слабо проучени и се срещат трудности при идентифицирането на доминиращите видове, колонизиращи вагината. Невъзможно е с класическите методи базирани на ферментация на захари и други фенотипни характеристики, те да бъдат разграничени (Tannock, 1999). Необходимо е използване на нови критерии за идентификация, базирани се на степента на генетично родство и по-надеждни подходи, на основата на молекулярно генетични анализи на изследваните щамове.

Вагиналната микрофлора при здрави жени в детеродна възраст е доминирана от *Lactobacillus* ssp. (Wilks et al. 2004; Andreu 2004). Когато техния брой се намали или изчезне, други микроорганизми доминират и това води до БВ (Sobel 2000). Една от възможните терапевтични стратегии включва повторно внасяне на природни вагинални лактобацилни видове, познати и прецизно идентифицирани, за да се приложи адекватна терапия в случай на урогенитална инфекция (McLean and Rosenstein 2000).

Точното определяне на видовото разнообразие има голямо значение, както за здравето на жените в репродуктивна възраст, така също и в борбата с бактериалната вагиноза и болестите предавани по полов път. Лактобацилите, срещани се в вагинални проби са: *Lb. gasseri*, *Lb. crispatus*, *Lb. acidophilus*, *Lb. iners*, *Lb. jensenii*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. vaginalis* (Reid et al. 1996; Pavlova et al. 2002; Kilic et al. 2001), *Lb.*

galinarum, *Lb. fornicalis*, *Lb. pentosus* (Silvester and Dicks 2003). Смята се, че *Lb. crispatus*, *Lb. gasseri*, *Lb. iners* и *Lb. jensenii* са най-разпространените видове от вагиналните лактобацили, срещани при жени в репродуктивна възраст (Antonio et al. 1999; Vasquez et al. 2002). Докато преобладаващите лактобацилни видове в млечните продукти са: *Lb. delbrueckii* (subsp. *delbrueckii*, *bulgaricus*, *lactis*), *Lb. helveticus*, *Lb. acidophilus* и др. Лактобацилите са много важни за хранителната индустрия, използват се като стартерни култури и пробиотици. Затова прецизната им идентификация е задължителна (Chavagnat et al. 2002).

Поради очакваното голямото видово разнообразие сред изолатите, бе наложително да бъде сформирана представителна група от референтни щамове, с помощта на които да бъдат сравнявани всички изолати. На базата на предишни изследвания на колектива и литературни данни, бе подбрана група от 41 референтни щама, принадлежащи към 15 лактобацилни вида, представени в таблица 1 от раздела “Материали и методи“.

Геномният анализ бе осъществен чрез използване на широк набор методи, подробно описани в глава Резултати. Успешното изпълнение на поставените задачи, при такъв тип изследвания, е в пряка зависимост от комбинирането на различните молекулярно-биологични техники и правилния подбор на рестрикционните ензими (за риботипиране и ARDRA). Трудността в избора на техника с добра дискриминативна сила зависи не само от самата техника, но и от видовете и щамовете, които ще бъдат изследвани. Резултатите също зависят от качеството и изчерпателността на базите данни. Едновременно с това избраните анализи трябва да са бързи, ефективни и да дават еднозначен отговор.

В това изследване подбрахме шест молекулярно-таксономични метода за сравнителен анализ на генома на 43 новоизолираните щамове и референтни представители на различните видове лактобацили: ARDRA, PCR със видовоспецифични праймери, dot-хибридизация с видовоспецифични сонди Риботипиране, Rep-PCR с праймер BOX, секвениране. Това са методи, доказали своята висока дискриминативна способност на ниво вид и някои и до подвид, при различни групи Грам (+) и Грам (-) микроорганизми.

Ние проведохме ARDRA анализ със 7 различни рестрикционни ензима. Според нас най-успешно отдиференциране на щамове получихме при използването на ензимите *Hae* III за изолатите от клинични проби (фиг.2). За изолатите от млечни хранителни продукти най-добри резултати показва комбинирания мултиензимен анализ, при който се обобщават данните с няколко ензима (фиг. 3). Комбинирането на резултатите, получени с различни рестрикционни ензими, е предпоставка за по-висока обективност и съответно коректна преценка на таксономичното положение на изследваните щамове. Произходът на изследваните щамове определя избора на ензим и това са двата фактора, които влияят върху качеството на получените резултати.

Резултатите получени чрез ARDRA анализа ни позволиха да направим предварително общо кластериране на новоизолираните щамове на базата на тяхното генетично родство. Този етап на първоначално групиране е особено важен при идентификацията на голяма група неизвестните изолати. Това ни позволи следващите стъпки от изследването да се проведат с по-малко и близкородствени щамове.

За идентификация до вид използвахме PCR анализ с видовоспецифични праймери и хибридизация с видовоспецифични сонди. PCR анализът с видовоспецифични праймери е бърз, високо специфичен с добра повторяемост на резултатите идентификационен метод. Подбрахме 8 двойки видовоспецифични праймери (за *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum*, *Lb. casei*) и 2 видовоспецифични сонди (за *Lb. delbrueckii*, *Lb. helveticus*) за най-често срещаните видове лактобацили в двете изследвани екосистеми. Всички избрани праймери и сонди са били успешно използвани за идентификация на лактобацили (Chagnaud et al. 2001, Walter et al. 2000, Tilsala-Timisjarvi & Alatossava, 1997, Miteva and Boudacov, 1999).

Тези резултати потвърдиха първоначалното групиране, направено чрез ARDRA и дадоха по-детайлна информация за някои от изолатите. Повечето от щамове (8) изолирани от български жени бяха идентифицирани като *Lb. fermentum*. Други автори (Giorgi et al. 1987) също идентифицират *Lb. fermentum* като преобладаващ вагинален вид. Въз основа на резултатите от нашето изследване други вагинални изолати бяха определени като *Lb. helveticus* – 2 щам, *Lb. gasseri* – 2 щам, *Lb. plantarum* – 3 щам и *Lb. crispatus* – 2 щам. Нито един от вагиналните щамове не беше отнесен към вида *Lb. acidophilus* и чрез другите приложени методи. Първоначално *Lb. acidophilus* е разглеждан като един от най-разпространените вагинални видове (Giorgi et al. 1987; Sieber and Dietz 1998). Затова трябва да отбележим, че според получените от нас резултати този вид не е преобладаващ сред българските жени. Тези резултати потвърждават хипотезата, че биоразнообразието на видовете, които колонизират женската вагина е

свързано с географски, демографски и социални фактори (Antonio et al. 1999). Всички тези фактори на околната среда оказват влияние върху разнообразието на защитната вагинална микрофлора. Изучаването на вагиналните видове *Lactobacillus* ще доведе до по-добри пробиотични продукти прилагани като възстановяваща терапия.

Сред изолатите от млечни храни, най-много принадлежат към вида *Lb. delbrueckii*- 8 изолата. Два бяха определени като *Lb. helveticus*, други 6-като *Lb. plantarum*. Това напълно съответства на нашите очаквания за преобладаващите видове в тази среда. *Lb. plantarum* е един от най-често докладваните видове характерни за микрофлората на сирена, какъвто е произхода на част от нашите изолати.

Десет от новоизолираните щамове (HV11, HV111, HV120, D45, D3, D10, D15, HV34, HV37, D12) не амплифицираха продукт с никоя от двойките видово-специфични праймери и не дадоха положителен сигнал с използваните видовоспецифични сонди. Нашето заключение е, че те не принадлежат към никой от следните видове: *Lb. crispatus*, *Lb. johnsonii*, *Lb. gasseri*, *Lb. acidophilus*, *Lb. fermentum*, *Lb. helveticus*, *Lb. plantarum* и *Lb. delbrueckii*. Тези щамове се нуждаят от допълнителни изследвания.

Ние избрахме риботипирането като друг метод за разграничаване на изследваните изолати. При него профилите са стабилни и по-лесно се коментират от тези получени чрез рестрикционен анализ (Charteris et al. 1997).

Един от нерешените таксономични проблеми на род *Lactobacillus* е трудното разграничаване на трите подвида (*delbrueckii*, *bulgaricus*, *lactis*) на вид *Lactobacillus delbrueckii* (Vandamme et al. 1996).

Изследванията на много автори използвали различни молекулярни подходи са фокусирани върху подвидовете на *Lb. delbrueckii* (Torriani et al. 1999; Lick et al. 2000). Дори при секвениране на гените за 16S rRNA трите подвида не могат да бъдат разграничени (Collins et al. 1991; Schleifer et al. 1995). Досега няма публикувани данни за успешно решаване на тази задача. Трудността произтича от високата степен на хомология на трите подвида и близкото им родство. Поради изложените причини групата от референтни щамове *Lb. delbrueckii*, с които разполага лабораторията, бе подложена на по-прецизна характеристика с помощта на различни молекулярно-таксономични методи. Необходимо е да се знае, че в различните национални колекции има малко налични щамове, определени като *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. След поредица експерименти постигнахме разграничаване на трите подвида на *Lb. delbrueckii* чрез *Eco* RI риботипиране. При така подбраните условия и рестрикционен ензим получихме добри и ясно разграничими профили за отделните референти и разграничихме до подвид колекционните щамове принадлежащи към вида *Lactobacillus delbrueckii*. Тези резултати позволяват да се направи заключение, че за първи път е постигнато отчетливо разделяне на трите подвида на *Lactobacillus delbrueckii* посредством *Eco* RI риботипиране. Добрите резултати, получени от нас с ензима *Eco* RI, логично доведоха до прилагането му при групата изолати определени като *Lb. delbrueckii*. Така 8 изолата от моделната група бяха определени до подвид чрез *Eco* RI риботипиране (фиг.9 и таблица 6). Това доведе до съвсем точна идентификация на тези изолати каквато бе и нашата начална цел.

За групата вагинални изолати, като най-подходящ според предварителните изследвания бе избран ензима *Pvu* II. Според нас, ако правилно е избрана комбинацията от рестрикционни ензими, риботипирането може да бъде високо дискриминативен и много резултатен метод.

Като цяло, с резултатите от риботипирането получихме полиморфни профили, характерни за всеки изолат и се потвърди групирането на щамове направено чрез ARDRA. Чрез риботипирането можем да изследваме различията между отделните щамове. Получените профили могат да служат като паспорт за откриване и доказване наличието на определен щам, например в даден търговски продукт, за мониторинг и идентификация на вече изучени микроорганизми в хода на различни ферментационни процеси.

Rep-PCR дактилоскопията също спада към методите, които са по-високо дискриминативни и отразяват различия на подвидово ниво. Този метод анализира целия геном, за разлика от ARDRA и риботипиране и затова бе включен в нашето изследване. Получените от нас профили съдържат много фрагменти, демонстрират разлики между щамове, но трудно се анализират. Резултатите от Rep-PCR дактилоскопията показват различията между отделните изолати определени като един и същи вид и доказват, че моделната група, с която са извършени изследванията се състои от разнородни щамове.

Един представител от голямата група изолати- HV28 бе избран за секвенционен анализ. Резултатите са представени в табл. 5. Избрахме именно този щам, заради биологичната му активност срещу редица патогени, а от там нуждата от пълна характеристика преди

евентуалната му употреба като пробиотичен щам. Щам HV28 показва активност срещу шест различни вида микроорганизми, някои от тях патогенни.

Частичната секвенция (412bp) на гена за 16S рРНК при HV28 показва неговата принадлежност към вида *Lb. plantarum*, което потвърди резултатите получени от нас с другите молекулярни техники за идентификация. Сравнението между нашата секвенция и такива, депозирани в базата данни в интернет, показва подобие над 99% с представители на *Lb. plantarum*. Най-голямо е подобие с секвенция на щам *Lb. plantarum* изолиран от Пере и сътрудници (Пере О. et al., 2004).

В настоящата работа бяха включени шест молекулярно-таксономични метода: ARDRA, PCR с видовоспецифични праймери, dot-хибридизация с видовоспецифични сонди, Риботипиране, Rep-PCR с праймер BOX, секвениране.

Нашето изследване доказва, че приложените методи могат успешно да бъдат използвани за установяване на видовата принадлежност на новоизолирани щамове и изследване на тяхното генетично родство.

Въз основа на данните от тази дисертация и тяхното обсъждане можем да направим извода, че предложението от нас комбиниран подход за молекулярно-таксономична характеристика на лактобацили позволи новоизолираните 43 лактобацилни щамове да бъдат разделени на няколко групи и отнесени към определени видове. Тридесет и три изолата бяха определени до вид, а 8 от тях и до подвид (сравнителната таблица 6). Успешно бяха разделени трите подвида на вида *Lb. delbrueckii*. Като се

има в предвид, че това е един от най-използваните видове за различни закваски в млечната промишленост, разработения от нас метод би могъл да се използва за мониторинг и идентификация на наличните щамове *Lb. delbrueckii* в храните.

В заключение трябва да отбележим, че това е първото молекулярно-генетично изследване на вагинални лактобацили изолирани от български жени. В изследваната група като преобладаващ вид беше определен *Lb. fermentum*. Преобладаването на определени видове във вагиналната микробиота е свързано донякъде с географски и национални особености, начин на хранене и др. Затова получените резултати за преобладаващите видове при български жени са основа за бъдещо приложение на определени щамове *Lactobacillus* в профилактиката и терапията на урогенитални инфекции.

ИЗВОДИ

1. Проведен е сравнителен геномен анализ на моделна група щамове *Lactobacillus* с шест различни молекулярно-таксономични метода (риботипиране, ARDRA, гер-PCR, PCR с видовоспецифични праймери, хибридизация с видовоспецифични сонди и секвениране), на базата на който е разработен оригинален подход за диференциация и идентификация на нови изолати от род *Lactobacillus*.
2. В резултат на проведените изследвания, 33 нови изолати са идентифицирани до вид, а 8 от тях и до подвид.
3. При молекулярно-таксономичния геномен анализ на вагинални лактобацили изолирани от български жени беше доказано, че преобладаващият вид е *Lb. fermentum*.
4. По-подробни изследвания ни позволиха успешно да разграничим трите подвида на вида *Lb. delbrueckii* (*delbrueckii*, *bulgaricus* и *lactis*) и да характеризираме вътревидовия полиморфизъм чрез риботипиране с ензима *Eco* RI.
5. При изследване на лактобацили изолирани от млечни храни, като преобладаващият вид е определен *Lb. delbrueckii*.

6. Чрез секвенционен анализ на 16S rDNA е доказана видовата принадлежност на вагинален щам HV28, притежаващ висока антибактериална активност.
7. Анализът на резултатите получени с ARDRA доказва, че това е метод с добра възпроизводимост и с него успешно могат да бъдат групирани близкородствени видове от род *Lactobacillus*.
8. Методите PCR с видово-специфични праймери и хибридизация с видово-специфични сонди са бързи, с добра повторяемост, висока специфичност на резултатите и са подходящи за точна видова идентификация на изолати от род *Lactobacillus*.
9. Резултатите, получени с методите Риботипиране и гер-PCR значително се влияят от използваните ензими и условия и тези два метода са по-подходящи за типизиране на щамове и изучаване на вътревидовия полиморфизъм.

СПРАВКА ЗА ПРИНОСИТЕ НА ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Разработена е оригинална схема, включваща съвременни молекулярно-генетични методи, която е използвана с успех за идентификация и диференциация на щамове от род *Lactobacillus*, произхождащи от различни екологични ниши.
2. За първи път е проведено молекулярно-таксономично изследване на лактобацили с вагинален произход от български жени, като доминантен вид в изследваната група е определен *Lb. fermentum*.
3. Разработен е нов подход за разграничаване на трите подвида на вида *Lb. delbrueckii* (*delbrueckii*, *bulgaricus* и *lactis*) на базата на риботипиране с използване на ензима *Eco* RI.
4. Изолиран е вагинален щам, принадлежащ към вида *Lactobacillus plantarum*, характеризиращ се с висока антибактериална активност, което го прави подходящ за бъдещо практическо приложение.

ПУБЛИКАЦИИ СВЪРЗАНИ С ДИСЕРТАЦИОННИЯ ТРУД

1. Stoyancheva G., Danova S., Boudakov I. (2006). "Molecular identification of vaginal lactobacilli isolated from Bulgarian women", *Antonie van Leeuwenhoek*, под печат, публикувана on line, IF 2.93 (за 2004)
2. Miteva V., Boudakov I., Stoyancheva G., Mitev V., Mengaud J. (2001). "Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by ribotyping and amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA)", *Journal of Applied Microbiology*, 90 (6) p. 909-918, IF 1.479
3. Danova S., Pavlov P., Stoyancheva G., Diankova S., Manasiev J., Petrova P., Jordanova T., Ivanovska N. (2003). "Antagonistic activity of Lactobacilli from different ecological niches", *Научна конференция с международно участие*, Стара Загора, Юни 5-6, Сборник с материали, том IV, част I, стр. 59-63
4. Danova S., Diankova S., Pavlov P., Stoyancheva G., Petrova P., ordan Manasiev J., Valcheva R., Andreeva P., Miteva V. (2002). "Molecular identification and cluster analysis of Bulgarian vaginal *Lactobacillus* strains", *X конгрес по Микробиология*, Пловдив
5. Danova S., Manasiev Y., Stoyancheva G., Petrova P., Ivanovska N., Miteva V. (2001). "Characterization of lactobacilli in healthy women and during bacterial vaginosis (BV), and their probiotic potential", 41 *Biotechnology conference*, November 3-5, Damascus, Syria

УЧАСТИЯ В КОНГРЕСИ

1. Stoyancheva Galina D., Petrova Penka M., Aleksandrova Ralica N., Dimitonova Silviya P., Danova Svetla T. (2005). "Characterization of new probiotic vaginal *Lactobacillus* strain HV3", "Microbiologia Balkanika-2005" *IVth Balkan conference of microbiology*, Bucharest, Romania, November 23-26
2. Stoyancheva G. D., Petrova P., Alexandrova R., Danova S. (2005). "Molecular identification of vaginal lactobacilli with antibacterial activity", *Symposium on Lactic Acid Bacteria - Genetics, Metabolism and Applications*, August 28 to September 1, Egmond aan Zee, The Netherlands, B 021
3. Stoyancheva G., Petrova P., Manasiev J., Miteva V. and Danova S. (2003). "Identification of *Lactobacillus* strains from different ecological nishes", *Third Balkan Conference of Microbiology*, Istanbul, September 4-6, Proceeding and abstract book, P-233, p.434
4. Галина Стоянчева, Йордан Манасиев, Светла Данова, Пенка Петрова, Мая Вукашинович, Ваня Митева (2001). "Молекулярно-генетична идентификация на вагинални лактобацили с антибактериална активност", *V Национален конгрес по биохимия, биофизика и молекулярна биология*, 29-31 март, София, постерна сесия
5. Petrova Penka M., Gouliamova Dilnora and Stoyancheva Galina D. (2005). "New vaginal *Lactobacillus gasseri* strain contains a plasmid-encoded *hsp*-gene", "Microbiologia Balkanika-2005" *IVth Balkan conference of microbiology*, Bucharest, November 23-26
6. Danova S.T., Aleksandrova R., Stoyancheva G., Petrova P., Boudakov I. (2005). "Polyphasic characterization of bio-active *Lactobacillus* strain from artisanal dairy products", *International Symposium on Original Bulgarian Yogurt*, 25-27 may, Sofia, Bulgaria

7. Danova S.T., Stoyancheva G., Tzvetkova I., Iliev I. and Ivanova I. (2004). "Selection of Bulgarian LAB strains for development of new fermented products", oral presentation, p.1, *Всероссийский симпозиум с международным участием "Biotechnology of bacteria"*, Москва 22-23.10

8. Danova S., Manasiev Y., Stoyancheva G., Petrova P., Maximova V., Roeva V., Miteva V. (2002). "Isolation and characterization of vaginal lactobacilli", *Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria - Genetics, Metabolism and Applications*, Egmond aan Zee, the Netherlands, 1-5 September, poster session

9. Andreeva P., Stoyancheva G., Manasiev J., Petrova P., Danova S. (2002). "Evaluation of risk factors correlated with Bacterial vaginosis and the role of vaginal Lactobacilli in defensive bio-film", *Third National Congress of Sterility, Contraception and Hormone replacement therapy*, March 10-13, Borovetz, Bulgaria

10. Miteva V., Ivanova G., Boudakov I., Mengaud J. (1999). "Differentiation of *Lactobacillus delbrueckii* subspecies by different genotyping methods", *First Balkan conference of microbiology, "Balcanica-1999"*, 5-9.10, Plovdiv, Bulgaria, GM19