

О. Ю. Лиманська^{1,2}, О. П. Лиманський¹

¹ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України”, 61057 Харків
²Національний науковий центр “Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини
НААН України”, 61023 Харків

ДНК-ТЕХНОЛОГІЇ ДЕТЕКЦІЇ ТА ГЕНОТИПУВАННЯ ПАТОГЕНІВ У МОЛЕКУЛЯРНІЙ МЕДИЦИНІ ТА ВЕТЕРИНАРІЇ

(Представлено чл.-кор. НАН України С. С. Малютю)

Наведено результати пошуку цільових мішеней та їх наступного застосування у різних модифікаціях полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) для молекулярної детекції та генотипування соціально значущих патогенів вірусної та бактеріальної природи. З розвитком технології синтезу олігонуклеотидів, стрімко наростаючим обсягом секвенованих нуклеотидних послідовностей патогенів змінювались формати ПЛР — від стандартної ПЛР для детекції патогенів через ПЛР з наступним аналізом поліморфізму довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) до альель-специфічної ПЛР для типування патогенів з праймерами, що містять хитний 3'-кінцевий нуклеотид, ПЛР з LNA-модифікованими праймерами, а також ПЛР у реальному часі з різним форматом проб. На основі поліморфізму поодиноких нуклеотидів створено молекулярно-генетичні набори, що дозволяють здійснювати диференціацію близькоспоріднених видів мікобактерій туберкульозного комплексу, розповсюджених патогенів сечового тракту людини (*Proteus mirabilis* та *P. vulgaris*), видоспецифічну детекцію бактерій групи *Bacillus cereus sensu lato*. Тестування набору праймерів, цільовою мішенню для яких є фрагмент гена *ssp*, що характеризується гексануклеотидною вставкою тільки для ізолятів *B. anthracis*, дозволило за допомогою стандартної ПЛР та ПЛР у реальному часі надійно диференціювати бактерії *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Розроблено технології детекції точкових мутацій за допомогою альель-специфічної ПЛР з використанням праймера з LNA-мономерами (додаткового конкурентного блокуючого праймера), що дозволяє визначати тип точкових мутацій та чутливість або резистентність мікобактерій туберкульозу до протитуберкульозного препарату першого ряду — ізоніазиду. Проведено типування вірусу лейкозу (ВЛ) великої рогатої худоби (ВРХ), що циркулює на території України, та за результатами ПДРФ-аналізу і секвенування встановлено належність українського ізоляту ВЛ ВРХ до австралійського підвиду — одного з трьох відомих підвидів цього патогена. Розроблено систему праймерів для детекції провірусної ДНК вірусу імунодефіциту ВРХ.

Ключові слова: генотипування, мікобактерії туберкульозного комплексу, мікобактерія туберкульозу, протей, збудник сибірської виразки, вірус імунодефіциту великої рогатої худоби.

Одним з основних напрямів розвитку сучасної біотехнології є медична біотехнологія, яка розглядається як необхідна складова успішного виконання пріоритетних проектів та урядових програм у сфері охорони здоров'я, традиційно орієнтованих на профілактику, запобігання розповсюдження та ліквідацію актуальних і соціально значущих інфекційних захворювань. Поряд із проведенням санітарно-гігієнічних, протиепідемічних та профілактичних

заходів природна різноманітність збудників інфекційних захворювань потребує удосконалення та створення ефективних засобів молекулярної діагностики. Тому одна з важливіших задач медичної біотехнології полягає, зокрема, у створенні нових методів аналізу, розробці та застосуванні молекулярних технологій в медицині з використанням досягнень у галузі молекулярної біології, генетики, біоінформатики з метою ідентифікації патогенів,

ДУ “Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова НАМН України”

О. Ю. Лиманська — провідн. н.с. лабораторії специфічної профілактики крапельних інфекцій, д.б.н. (olga.limanskaya@mail.ru)

О. П. Лиманський — головн. н.с. лабораторії протимікробних засобів, д.б.н.

© О. Ю. Лиманська, О. П. Лиманський, 2012.

визначення їхньої вірулентності та епідеміологічної значущості, що є інтегральною складовою моніторингу інфекції.

Сучасний період біологічних досліджень можна охарактеризувати як постгеномну еру: значні зусилля вчених, які працюють у галузі геноміки, спрямовані на розробку ефективних засобів всебічного аналізу генетичних текстів. Завершення у 2000 р. проекту зі секвенування геному людини послужило поштовхом для кардинальних змін у молекулярній біології, і на теперішній час відповідні міжнародні проекти, що спрямовані на розшифровку структури геному різних організмів, займають особливе місце у вирішенні ряду проблем медичної біотехнології, молекулярної медицини, медичної та ветеринарної мікробіології, епідеміології [2]. Отримані результати сприяють розвитку фундаментальних знань, оскільки передбачають можливість встановлення еволюційних взаємозв'язків мікроорганізмів, ідентифікацію, класифікацію та визначення можливих функцій генів, визначення регуляторних елементів (до яких, зокрема, належать неканонічні структури, що утворюються різними варіантами повторів у молекулах ДНК та РНК і є гарячими точками геномної нестабільності) та створення регуляторних карт, виявлення поліморфізмів та аналіз їхнього розподілу тощо [12]. Крім цього, поява нової генетичної інформації, створення біоінформатичних методів стимулюють удосконалення традиційних та появу новітніх методологій та технологій, а також відіграють певну роль у розвитку молекулярної медицини (зокрема, у розробці методологічних підходів та ефективних методів детекції і диференціації збудників інфекційних захворювань як людини, так і тварин).

В останнє десятиріччя у галузі медичної біотехнології та молекулярної медицини широкого розповсюдження набули ДНК-маркери, активне використання яких обумовлене, з одного боку, обмеженнями, які притаманні фенотиповим методам, а з іншого боку — розвитком методичної бази та появою нових методологічних підходів. З урахуванням цього сучасна стратегія детекції та типування патогенів полягає, зокрема у розробці технологій, оснований на молекулярно-генетичному аналізі із застосуванням різних варіантів методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) — найефективнішого методу детекції та типування патогенів різної природи [25,47,62], а також явища ДНК-поліморфізму, основою якого крім вставок, делецій, зміни числа тандемних повторів є поодинокі мутації, або одонуклеотидні поліморфізми.

Натепер до числа найпоширеніших молекулярних маркерів можна віднести послідовності

нуклеотидів, що є специфічними сайтами для рестриктаз, IS-елементи та нуклеотидні послідовності, що повторюються, “випадкові” повтори, а також маркери, що створені на основі конформаційних змін одониткової ДНК, пов'язаних із наявністю точкових мутацій. Урізноманітненню ДНК-маркерів, що широко використовуються у різних галузях біології та медицини, сприяв стрімкий розвиток та удосконалення молекулярно-генетичних технологій на базі модифікацій ПЛР.

Усе зростаючу роль у видовій ідентифікації патогенів людини та тварин відіграє детекція точкових мутацій, які також є придатними маркерами молекулярної детекції. Для виявлення поліморфізму поодиноких нуклеотидів використовують широкий спектр сучасних методів аналізу амплікона: плавлення з високою роздільною здатністю [39], поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів (ПДРФ) [31], секвенування [14], одну з модифікацій мас-спектрометричного аналізу (*MALDI-TOF — mass spectrometry, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*, МАЛДІ-мас-спектрометрія) [53], високоефективну рідинну хроматографію у денатуруючих умовах [38], лігазну ПЛР [58], різні варіанти застосування блокування нуклеїнових кислот [50], ПЛР у реальному часі з гасінням антипраймера [37], ПЛР із праймерами у форматі молекулярні маяки, проби-праймери “скорпіони” [65], молекулярні сендвічі [44].

Незважаючи на існуючу різноманітність методів ідентифікації та диференціації інфекційних агентів як вірусної, так і бактеріальної природи, проблема швидкої, ефективної та високоспецифічної детекції і типування патогенів залишається актуальною внаслідок появи та реєстрації нових патогенів, необхідності виявлення, локалізації та швидкої ліквідації спалахів інфекційних захворювань та їх наслідків, розповсюдження мультирезистентних штамів мікроорганізмів, ідентифікації вірулентних штамів, необхідності створення національних систем біозахисту стосовно патогенів із біотерористичним потенціалом, здійснення належного контролю вакцинних препаратів тощо [13,22,35]. Вирішення вказаних проблем можливе на основі насамперед молекулярно-генетичних (внаслідок відомих певних переваг), а також інформаційних технологій.

У даній роботі наведено результати молекулярно-генетичної детекції та типування інфекційних збудників бактеріальної і вірусної природи та пошуку структурно-функціональних маркерів у їхньому геномі. Швидка ідентифікація, визначення резистентності та особливо множинної лікарської стійкості патогенів до лікарських препаратів є над-

звичайно важливими для оцінки інтенсивності епізоотологічного та епідеміологічного процесів, встановлення причин спалахів інфекцій, вибору ефективної методики антибактеріальної терапії.

Матеріал та методи

Комп'ютерний аналіз. Філогенетичний аналіз, множинне вирівнювання та наступний статистичний аналіз нуклеотидних послідовностей геномів вірусів та бактерій проводили на основі комп'ютерного аналізу нуклеотидних послідовностей генів та їх фрагментів за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм [1], термодинамічний аналіз праймерів та ампліконів — за допомогою програм *MeltCalc* [57,64], *Exiqon* [42,43] та *Oligo* (версія 3.0, США) [55].

Побудову філогенетичних дерев на основі нуклеотидних послідовностей після множинного вирівнювання за допомогою вбудованої в пакет програм *MEGA4* програми *ClustalW* проводили з використанням методу найближчого зв'язування (*neighbor-joining*) та методу мінімальної еволюції [56], реалізованих у пакеті *MEGA4.0* [61]. Попарні генетичні відстані між послідовностями були визначені за двоохпараметровою моделі Кімури [33], в якій приймаються у розрахунок трансверсійні та трансзиційні заміни. Статистичну вірогідність отриманих дерев оцінювали за допомогою бутстреп-аналізу шляхом побудови 4000 альтернативних дерев. Для підтвердження надійності побудованих філогенетичних дерев за допомогою пакета *GeneBee* вибірково проводили побудову деяких з них за допомогою пакета *MEGA4*. Порівняння філогенетичних дерев, отриманих за допомогою зазначених пакетів, показало, що побудовані дендрограми добре узгоджуються та не мають принципових розбіжностей.

Підготовка зразків ДНК для проведення ПЛР. ДНК мікобактерій туберкульозного комплексу (МТК) отримано або фенол/хлороформною очисткою (*M. microti*), або безпосередньо із супернатанту культур клітин після термічної обробки (*M. tuberculosis*, *M. bovis*) та ліофілізовано. Для розчинення ДНК використовували 10 мМ трис-НСІ, рН 7,6. Тестування трьох із п'яти розроблених наборів праймерів для детекції МТК було проведено із застосуванням ДНК різних штамів МТК, наданих проф. М. С. Gutierrez (референс-лабораторія мікобактерій Інституту Пастера, Франція).

Тестування набору праймерів для детекції *B. anthracis* проводили із застосуванням зразків ДНК, екстрагованої з 8 ізолятів *B. cereus*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, 6 ізолятів *B. thuringiensis*, двох ізолятів *B. weihenstephanensis*, *B. fluorescens*, *B. mycoides*,

отриманих від д-ра В. М. Степаншиної (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, Росія) та д-ра М. Barker (університет *Heriot-Watt*, Великобританія).

Розроблені набори праймерів для генотипування протеїв було тестовано на шести штамів *Proteus mirabilis* та *P. vulgaris*, отриманих від SGSC (*Salmonella Genetic Stock Centre*, університет Калгарі, Канада) та університету Монреалю (Канада). Штами *Proteus sp.*, надані SGSC, мають такі характеристики: *P. mirabilis* — штам 412, генотип 0:5с; *P. mirabilis* — штам PL050596; *P. vulgaris* — штам M12, клінічний ізолят, виділений при інфекції сечового тракту; *P. vulgaris* — штам ATCC 13315, що продукує ендонуклеази рестрикції *Pvu I* та *Pvu II*, чутливий до гентаміцину, має специфічність до сечовини. Клінічні штами, надані університетом Монреалю, не охарактеризовано.

Хромосому та плазмідну ДНК *P. vulgaris* та *P. mirabilis* екстрагували за допомогою наборів для виділення ДНК ("ДНК-технологія", а також "Ізоген", Росія). Виділену ДНК використовували для проведення стандартної ПЛР з наборами родоспецифічних праймерів для детекції бактерій роду *Proteus*, а з наборами видоспецифічних праймерів — для детекції *P. mirabilis* та *P. vulgaris*. Для цього використовували набір родоспецифічних праймерів *Pr1-Pr2*, що комплементарні гену *gyrB* *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, а також видоспецифічні праймери *Pr4-Pr5*, що комплементарні гену β-лактамази *P. vulgaris*, та видоспецифічні праймери *Pr6-Pr7*, комплементарні гену 16S рРНК *P. mirabilis*.

Як позитивний контроль для детекції вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (ВІ ВРХ) використовували плазмиду з клонованою провірусною ДНК ВІ ВРХ, провірусну ДНК ВІ ВРХ, виділену із трансформованої клітинної лінії тестикулів ВРХ SK40 (RD420), що містила провірусну ДНК ВІ ВРХ ізоляту *Florida* 112, а також геномну ДНК, яку виділяли з лімфоцитів периферійної крові серопозитивних овець та корів, експериментально інфікованих ВІ ВРХ [9]. Екстраговану ДНК використовували для проведення одноразової ПЛР із праймерами *BIV1-BIV2*, а також для постановки гніздової та напівгніздової ПЛР із праймерами *36BIV-PO1BIV* та *37BIV-PO2BIV*.

Для генотипування вірусу лейкозу (ВЛ) ВРХ лімфоцити периферійної крові 13 голів ВРХ віком 0,5-2 роки з двох неблагополучних щодо лейкозу господарств Харківської області України використовували як клінічний матеріал [41]. Лейкоцитарну фракцію виділяли з 5 мл цільної крові тварин з добавкою антикоагулянту (56 мМ цитрат Na, 166 мМ глюкоза) шляхом центрифугування у градієнті

фіколл-верографін за 1500g протягом 20 хв. Геномну ДНК ВРХ екстрагували за допомогою наборів для виділення ДНК (*Nucleospin Blood*, “Macherey-Nagel GmbH” та “Co KG” Duren, Німеччина). Виділену ДНК використовували для проведення гніздової ПЛР із праймерами, комплементарними гену *env* ВЛ ВРХ, та праймерами, комплементарними довгим кінцевим повторам [10].

Генотипування та детекцію вірусів і бактерій здійснювали за допомогою різних варіантів ПЛР (стандартної ПЛР, ПЛР із ПДРФ, ПЛР із секвенуванням амплікона, ПЛР у реальному часі, ПЛР із додатковим блокуючим праймером, ПЛР із LNA-модифікованими праймерами). Набори праймерів було тестовано на відповідних негативних та позитивних контрольних зразках ДНК, екстрагованої з шести штамів *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, МТК, бацил групи *Bacillus cereus sensu lato*, плазміди з клонованою провірусною ДНК ВІ ВРХ, ДНК з культури клітин, інфікованої ВІ ВРХ, ДНК з лімфоцитів експериментально інфікованих ВІ ВРХ овець та ВРХ, геномний ДНК з лімфоцитів крові ВРХ, інфікованої ВЛ ВРХ.

ПЛР із гарячим стартом проводили на ампліфікаторах *GeneAmp 9700* (*Perkin Elmer Inc.*, США), моделі 480 (*Perkin-Elmer, Inc.*, Німеччина), Амплі-4L (Біоком, Росія), Терчик (ДНК-технологія), а також ампліфікаторі НВО “Точність” (Росія).

Праймери для детекції та типування ВІ ВРХ, протеїв, МТК, збудника сибірської виразки були синтезовані на синтезаторі ASM-102 (Біоссет, Росія) та очищені шляхом електрофорезу у ПААГ (Синтол, Росія). Праймери для типування ВЛ ВРХ отримано від *MWG Biotech* (Німеччина).

Проби для ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ) для детекції *B. anthracis* (проба у форматі *TaqMan* та проба у форматі молекулярного маяка) містили флуорофори 5(6)-карбоксіфлуоресцеїн (*FAM*) або 5(6)-карбокситетраметилродамін (*TAMRA*) на 5'-кінці та гасник *RTQ1* на 3'-кінці (Синтол).

Для проведення ПЛР-РЧ використовували термоциклер моделі *ABI7500* (*Applied Biosystems, Inc.*, Німеччина) при наступних температурних та часових параметрах: денатурація — 95 °С, 15 с; відпал та синтез — 60 °С, 60 с; кількість циклів — 40. ПЛР-РЧ проводили у реакційній суміші *TaqMan*, що містила в якості референсного барвника *ROX* (*Applied Biosystems, Inc.*).

Стандартну ПЛР для детекції МТК проводили на ампліфікаторі НВО “Точність” при наступних температурних та часових параметрах: початкова інкубація — 95 °С, 3 хв; денатурація — 95 °С, 1 хв; відпал — 60-62 °С, 1 хв; синтез — 74 °С, 1,3 хв; кількість циклів — 45. Для наборів праймерів *Мус1* —

Мус3 та *Мус1* — *Мус4* проводили двокрокову ПЛР при таких параметрах: початкова інкубація — 94 °С, 3 хв; денатурація — 94 °С, 1 хв; відпал та синтез — 71 °С, 2 хв; кількість циклів — 45. Температуру відпалу праймерів ($T_{відп}$) оптимізували шляхом постановки низки реакцій при збільшенні температури відпалу з кроком 2-0,5 °С до повної елімінації смуги неспецифічного амплікона. Для проведення ПЛР використовували універсальний набір реагентів для ПЛР (Ізоген), до складу якого входить термостабільна ДНК-полімераза, інгібована антитілами, що дає можливість постановки ПЛР із гарячим стартом. ПЛР проводили в об'ємі реакційної суміші 25 мкл при концентрації праймерів 0,5 мкМ. Візуалізацію ампліконів здійснювали шляхом електрофорезу в 1,5-2 % агарозному гелі з наступним фарбуванням етидієм бромистим. Використовували набір маркерів молекулярної маси *M100* (Ізоген).

Поліморфізм довжини рестрикційних фрагментів. Для визначення підвидової належності ізолятів ВЛ ВРХ 10 мкл продукту ампліфікації гена *env* довжиною 444 п.н., обмеженого внутрішніми праймерами *ENV3-ENV4*, після проведення гніздової ПЛР безпосередньо піддавали гідролізу з 5 од. ферментів рестрикції *Bcl I*, *Pvu II* та *BamH I* (*Boehringer Mannheim*, Німеччина).

Детекція резистентних мікобактерій туберкульозу. Для перевірки розроблених наборів праймерів для детекції ізолятів дикого типу та мутантних (резистентних до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду) мікобактерій туберкульозу (МТБ) використовували ДНК, екстраговану із 43 ізолятів *M. tuberculosis*, що містять точкові мутації в кодоні 315 гена *katG*, асоційовані з резистентністю до даного препарату. Ізоляти ДНК резистентних до ізоніазиду штамів *M. tuberculosis* містять мутації *AGC* → *ACC*, *AGC* → *ACG* та *AGC* → *AGA* у кодоні 315 гена *katG* та характеризуються рівнем резистентності до ізоніазиду 1-25 мкг/мкл. У тому числі використовували ДНК *M. tuberculosis* штаму *НВ385*, що містить мутацію *AGC* → *AGA* у кодоні 315 гена *katG*; ДНК *M. tuberculosis* штаму *НВ125* з мутацією *AGC* → *ACC*; ДНК *M. tuberculosis* штаму *Н37Rv*, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 містить послідовність *AGC*).

Модифіковані замкненою нуклеїновою кислотою (*Locked Nucleic Acid* — *LNA*) праймери (Синтол), містили по 3-5 *LNA*-нуклеотидів (*Exiqon*, Данія). Температуру плавлення комплексу *LNA*-модифікований олігонуклеотид — одониткова ДНК розраховували за допомогою програми, що є у вільному доступі на сайті <http://www.exiqon.com/oligo-tools>, <http://lna-tm.com>.

ПЛР проводили в об'ємі реакційної суміші 20-50

мкл, що містила 4 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 12 мМ трис-НCl (рН 8,0), 2 мМ MgCl₂, 200 мкМ дезоксинуклеотидів, 0,1-0,5 мкМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК-полімерази. Стандартну ПЛР проводили при таких температурних та часових параметрах: початкова інкубація — 95 °С, 2 хв; денатурація — 95 °С, 40 с; відпал — 58-70 °С, 40 с; синтез — 70-74 °С, 40 с; кількість циклів — 38-45. Для ампліфікації використовували 0,05 мкг геномної ДНК МТБ.

Секвенування ДНК. Послідовність ампліконів була визначена за допомогою набору для секвенування, що містить праймери *ENV3* та *ENV4* із флуоресцентно міченим барвником (*MWG Biotech*). Пряму послідовність ампліфікованого фрагмента гена *env* провірусної ДНК ВІ ВРХ визначали за допомогою праймера *BLV3*, а комплементарну — за допомогою праймера *BLV4*, що були мічені барвником *IRD800*. Реакцію секвенування проводили за допомогою набору для секвенування *Thermo Sequenase DYEamic (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Німеччина)*. ПЛР-продукти були секвеновані як мінімум двічі для прямої та комплементарної ниток та проаналізовані на ДНК-секвенаторі *LI-COR 4200 (MWG Biotech)*. Консенсусна послідовність була отримана за допомогою пакета програм *LaserGene 99, версія 5.03 (DNA Star, США)*.

Результати та їх обговорення

Для родо- та видоспецифічної детекції ряду соціально та економічно значущих патогенів — збудників проблемних інфекцій — нами був використаний методологічний підхід, оснований на локалізації так званого хитного нуклеотида на 3'-кінці одного з видоспецифічних праймерів (рис. 1).

Для виявлення поодиноких мутацій можливе, зокрема, використання різних модифікацій алей-специфічної ПЛР (АС-ПЛР), а саме: із застосуванням праймера, що має некомплементарний по відношенню до ДНК-матриці дикого типу нуклеотид на 3'-кінці; із застосуванням додаткового праймера з блокованим 3'-кінцем; з використанням *LNA*-модифікованого праймера; нарешті, з використанням додаткового конкурентного блокуючого *LNA*-модифікованого олігонуклеотида, що допускає застосування *Stoffel*-фрагмента *Taq*-полімерази (мутантної форми ДНК-полімерази без 5' → 3' екзонуклеазної активності) (див. рис. 1).

Перераховані варіанти АС-ПЛР були використані нами для створення технологічної платформи, що дозволяє вирішувати коло задач, пов'язаних з видовою ідентифікацією патогенів, молекулярним типуванням та встановленням генетично детермінованої резистентності до лікарських препаратів.

Детекція провірусної ДНК вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби. До числа актуальних вірусних патогенів, здатних викликати повільний інфекційний процес як у людини, так і у тварин, належить численна родина ретровірусів, серед яких особливе місце займають лентівіруси. За даними епізоотологічних досліджень, ця підродина ретровірусів (вірус інфекційної анемії коней, вірус вісни овець, вірус артрити кіз) розповсюджена у низці країн світу. Типовим представником лентівірусів, що завдає відчутної шкоди тваринництву, є ВІ ВРХ. Зацікавленість даним патогеном обумовлена, з одного боку, епізоотологічно значущістю, а з іншого — філогенетичною близькістю до ВІ людини першого типу, що дозволяє використовувати його як зручну модель для вивчення імунодефіцитних станів тварин та людини. Точність детекції даного вірусу з використанням серологічних методів варіює у доволі широких межах (від 1.4 до 80 %), що є наслідком високої мінливості геному ВІ та відсутності імунної відповіді.

ВІ ВРХ є лентівірусом, який викликає захворювання, подібне до СНІДу, після варіабельної асимптоматичної фази. Важлива проблема, яка виникає при детекції ВІ за допомогою ПЛР, полягає у складності індикації провірусної ДНК у природно інфікованих ВІ ВРХ тварин на відміну від експериментально заражених. Спроби знайти ВІ в мононуклеарах крові ВРХ виявились безуспішними, хоч наявність провірусної ДНК ВІ ВРХ було продемонстровано в експериментах на вівцях [17].

Відносно можливості та результатів використання ПЛР з метою детекції зазначеного патогена серед експериментально інфікованих тварин у літературі представлено суперечливі дані, що пов'язане, зокрема, з недосконалістю існуючих наборів праймерів, розроблених на основі неповних даних про первинну структуру гена, вибраного в якості мішені, та, як наслідок — з наявністю у послідовності праймера нуклеотидів, некомплементарних ДНК-матриці. Про це свідчить виконаний нами аналіз низки праймерів (сконструйованих у різних лабораторіях, що займалися даною проблемою), що показав можливість наявності до трьох неспарених нуклеотидів у праймера залежно від ізоляту ВІ. Так, у роботі [11] наведено фрагмент проведеного множинного вирівнювання гена *env* провірусної ДНК для 11 ізолятів ВІ ВРХ, що демонструє наявність неспарених нуклеотидів для одного з праймерів, запропонованого групою дослідників під керівництвом *R. Renshaw* з ветеринарного коледжу Корнельського університету (Нью-Йорк, США).



Рис. 1. Варіанти алель-специфічної ПЛР, що використовували (за винятком 4) для диференціації МТК та протеїв (1), детекції чутливих/резистентних до ізоніазиду МТБ (2), а також для визначення точкових мутацій в геномі МТБ (3).

Суперечливі дані літератури з ПЛР-детекції ВІ ВРХ можна пояснити як недосконалістю діагностикумів, так і генетичною варіабельністю ВІ ВРХ, яка відіграє істотну роль в персистенції вірусу та його патогенності [60], а також невисокою точністю синтезу вірусної РНК-полімерази.

Нами створено набір праймерів для надійної ПЛР-детекції провірусної ДНК ВІ ВРХ у експериментально інфікованих тварин. Після аналізу різних локусів геному ВІ ВРХ у якості мішені для праймерів був вибраний фрагмент гена *pol* ВІ ВРХ довжиною 101 п.н. з відомими послідовностями провірусної ДНК, виділеної не тільки з культури клітин, що містять ВІ ВРХ, а і з лімфоцитів експериментально інфікованих тварин. За допомогою стандартної ПЛР амплікон очікуваного розміру був детектований (рис. 2) для трансформованої клітинної лінії тестикулів ВРХ, що містить провірусну ДНК ВІ ВРХ з ізоляту *Florida* 112, для плазмідної ДНК з клонованою провірусною ДНК ізоляту *R29* ВІ ВРХ, а також для ДНК, екстрагованої з лімфоцитів периферійної крові серопозитивних овець та корів, що були експериментально інфіковані ВІ ВРХ.

Аналіз секвенованих фрагментів гена *pol* ВІ ВРХ, що з'явилися відносно недавно, показав, що взаємодія ВІ ВРХ — організм-хазяїн має більш складний характер, ніж вважали раніше. Ізоляти ВІ ВРХ, виділені з клінічного матеріалу від експериментально інфікованих тварин, характеризуються набагато більш високою мінливістю порівняно з вірусом, виділеним із культури клітин. Ця генетич-

на варіабельність, що є відмінною властивістю ретровірусів і обумовлює їх патогенність, найбільш яскраво проявляється при персистенції вірусу в організмі хазяїна.

Наразі справжнє розповсюдження ВІ ВРХ в Україні невідоме через відсутність специфічних реагентів для вірусологічних та серологічних методів ідентифікації ВІ ВРХ. Тому, оскільки ВІ ВРХ, як і інші лентівіруси, характеризується тривалим латентним періодом, для ідентифікації вірусу, конт-

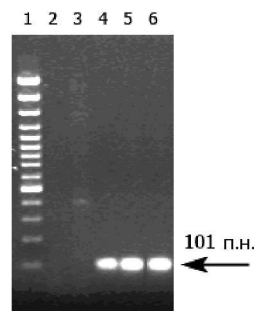


Рис. 2. Детекція продуктів ампліфікації провірусної ДНК ВІ ВРХ після проведення ПЛР з праймерами BIV1-BIV2 та електрофорезу у 2 % агарозному гелі: доріжка 1 — маркер молекулярної маси, 2 — негативний контроль ампліфікації (H_2O), 3 — ДНК з лімфоцитів вівці, негативною відносно ВІ ВРХ, 4 — ДНК з лімфоцитів вівці, експериментально інфікованої ВІ ВРХ, 5 — ДНК з лімфоцитів ВРХ, експериментально інфікованої ВІ ВРХ, 6 — плазміда з клонованою провірусною ДНК ізоляту *R29* ВІ ВРХ, очікуваний розмір ПЛР-продукту становить 101 п.н. [6].

ролю за його розповсюдженням, наявністю субвідів можуть бути застосовані молекулярно-генетичні методи на основі ПЛР з використанням створеного набору праймерів.

Отже, авторами розроблено систему праймерів для детекції провірусної ДНК ВЛ ВРХ. Отримані результати є підставами для використання розробленого нами набору праймерів з метою виявлення природно інфікованих вірусом імунodefіциту тварин, що є важливим кроком для моніторингу та встановлення ступеня розповсюдження даного патогена на території України.

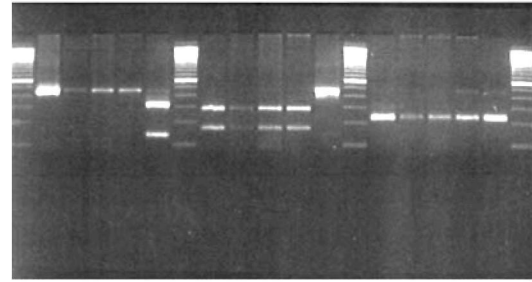
Генотипування вірусу лейкозу великої рогатої худоби, що циркулює в Україні. Наслідком генетичної варіабельності є можливість віднесення ізолятів патогена певного типу до різних підтипів у залежності від джерела набуття та географічного регіону, що представляє не тільки теоретичний, але і практичний інтерес з погляду серологічної діагностики. Така можливість була розглянута нами на прикладі іншого ретровірусу тварин — вірусу лейкозу ВРХ (ВЛ ВРХ), який, з одного боку, є зручною моделлю для вивчення лейкемії, а з іншого — розглядається як потенційний клінічно значущий патоген.

ВЛ ВРХ — це поширений ретровірус, асоційований з летальною формою лейкемії та персистуючим лімфоцитозом [21]. Одне з перших припущень щодо можливої наявності підвидів ВЛ ВРХ було зроблено *S. Dube* та співавт. [19] на підставі філогенетичного аналізу гена *pol* ВЛ ВРХ. На основі географічного розповсюдження та молекулярно-генетичних характеристик варіанти ВЛ ВРХ, яких було ізолювано в різних країнах Європи, США, Японії, Саудівській Аравії та Новій Зеландії, були розподілені на три підвиди — японський, австралійський та бельгійський [15].

Нами уперше проведено ідентифікацію підвиду ВЛ ВРХ, що циркулює в Україні, на основі фрагмента гена *env* довжиною 444 п.н. шляхом ПЛР із ПРДФ-аналізом. Фрагмент гена *env* провірусної ДНК був ампліфікований, секвенований та проаналізований після обробки амплікона трьома ферментами рестрикції — *Bam*HI, *Bcl*I, *Pvu*II. Наявність продуктів рестрикції довжиною 316 та 128 п.н. для рестриктази *Bam*HI, довжиною 225 та 219 п.н. для *Bcl*I, а також відсутність рестриктів після обробки рестриктазою *Pvu*II (рис. 3) стали підставою віднести ізолят ВЛ ВРХ, що циркулює в Україні, до австралійського підвиду.

Побудова філогенетичного дерева на основі послідовностей фрагмента гена *env* довжиною 444 п.н. ВЛ ВРХ [7] дозволила уточнити результати множинного вирівнювання. Структура дерева дає можливість чітко розрізнити два кластери ізолятів

M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M 1 2 3 4 5 M



Bam HI *Pvu* II *Bcl* I

Рис. 3. Рестрикційний аналіз продуктів ампліфікації фрагмента гена *env* провірусної ДНК 5 ізолятів ВЛ ВРХ довжиною 444 п.н. після проведення гніздової ПЛР з праймерами *ENV1-ENV4*. Профілі рестрикції отримували обробкою ампліконів ферментами рестрикції *Bam*HI, *Pvu*II та *Bcl*I. М — маркер молекулярної маси, доріжки 1-4 відповідають бельгійському варіанту ВЛ ВРХ (відсутність рестрикції для рестриктази *Bam*HI; наявність рестриктів довжиною 280 п.н. та 164 п.н. для рестриктази *Pvu*II, наявність продуктів довжиною 225 п.н. та 219 п.н. для рестриктази *Bcl*I), доріжка 5 — ізолят *Ukraine 1*, що відповідає австралійському варіанту ВЛ ВРХ [10].

ВЛ ВРХ, що відповідають бельгійському та австралійському підвидам.

Український ізолят *Ukr1*, хоч і віднесений до австралійського підвиду, розташований досить віддалено від кластера австралійських ізолятів, що вказує на те, що послідовність *Ukr1* має найбільшу порівняно з іншими ізолятами кількість нуклеотидів, що не збігаються. Проте запропонована раніше схема типування ізолятів ВЛ ВРХ на основі ПЛР з ПРДФ-аналізом [15] має деякі недоліки. По-перше, 10 % ізолятів (2 з 20) не можуть бути класифікованими через нехарактерні профілі рестрикції для того чи іншого підвиду. По-друге, кількість підвидів вірусу, які ідентифікують, повинна збігатися з кількістю чітко розрізнених кластерів ізолятів на філогенетичному дереві. Так, наприклад, філогенетичним аналізом підвидів вірусу кліщового енцефаліту (КЕ) з різних регіонів для послідовності гена *E* довжиною 1488 п.н. [26,27] переконливо продемонстровано наявність трьох підвидів вірусу КЕ, які на філогенетичному дереві відповідають трьом окремим кластерам ізолятів вірусу КЕ, що не перекриваються. По-третє, для типування вибрано відносно невеликий фрагмент геному ВЛ ВРХ, довжина якого становить близько 5 % повного геному вірусу лейкозу, що може призводити до неточностей у визначенні підвиду. Також можливо, що неоднозначність у субтипванні обумовлена вибором висо-

коконсервативного локусу гена *env*. Тому проведення філогенетичного аналізу для варіабельних фрагментів генів *pol*, *gag* або *env* ВЛ ВРХ довжиною 1000-1500 п.н. дозволить зробити типування ізолятів ВЛ ВРХ з більш високою надійністю.

Підсумовуючи вищенаведене, зазначимо, що нами проведено типування ВЛ ВРХ, що циркулює на території України, та за результатами ПДРФ-аналізу і секвенування встановлено належність українського ізоляту ВЛ ВРХ до австралійського підвиду — одного з трьох відомих підвидів цього патогена.

Диференціація мікобактерій туберкульозного комплексу. Зростання захворюваності населення на туберкульоз, що спостерігається наразі, дозволяє віднести його до числа актуальних інфекцій. Це обумовлює необхідність швидкого виявлення носіїв збудників туберкульозу, встановлення ефективного контролю за його розповсюдженням, а також диференціації МТК вже на етапі морфологічного дослідження. З огляду на це, ми використали методику “хитного” нуклеотида для видової ідентифікації близькоспоріднених МТК, за винятком *M. africanum*, що не циркулює в Європі.

Методика селективної ампліфікації послідовностей, що відрізняються поодиноким нуклеотидом, заснована на тому, що комплекс праймера з одонитковою ДНК-матрицею, який містить точкову мутацію, має більш низьку температуру плавлення порівняно з досконалим (повністю комплементарним) дуплексом. Тому ПЛР при виборі відповідної температури відпалу дозволяє проводити селективну ампліфікацію з набагато більшою ефективністю для комплексу “праймер — одониткова ДНК-матриця”, який стабільно утворюється порівняно з частково розплавленим комплексом. Специфічність та точність ПЛР-аналізу ще більше підсилюється при локалізації неспареного нуклеотида на 3'-кінці одного або обох праймерів, оскільки ДНК-полімераза у цьому випадку синтезує з набагато меншою ефективністю порівняно з досконалим дуплексом [23,66]. Так, у роботі [30] показано, що ефективність синтезу ДНК-матриці (яку визначали як концентрацію ДНК-матриці після проведення ПЛР) для різних неспарених нуклеотидів на 3'-кінці праймера істотно відрізняється. Неканонічні пари з некомплементарним нуклеотидом на 3'-кінці праймера, що утворюються із 16 можливих варіантів пар нуклеотидів, можна розташувати у порядку зростання ефективності синтезу для *Taq*-ДНК-полімерази у наступному порядку: GA, AG, GG (10^{-6}) < AA (10^{-6}) < TC (10^{-4} - 10^{-5}) < AC, CA, GT, TG (10^{-3} - 10^{-1}) < CT (10^{-2}),

де цифри у дужках означають зменшення ефективності синтезу ДНК-матриці для некомплементарної пари нуклеотидів порівняно з канонічною парою.

Оскільки *M. tuberculosis*, *M. microti* та *M. bovis* є близькоспорідненими видами, то стратегія їх диференціації полягала у конструюванні для кожного виду пари праймерів, один з яких є комплементарним послідовності кожного із видів, а другий має на 3'-кінці хитний нуклеотид — нуклеотид, що комплементарний відповідному нуклеотиду тільки для одного виду МТК. При цьому використовується різна ефективність синтезу *Taq*-ДНК-полімерази при елонгації праймера, що має на 3'-кінці хитний нуклеотид.

Цю технологію, ефективність якої підтверджено експериментально, було також використано при конструюванні праймерів для диференціації близькоспоріднених видів протеїв. За результатами множинного вирівнювання 35 ізолятів гена *gyrB*, представлених на час проведення досліджень у міжнародних базах даних, були встановлені позиції нуклеотидів, використаних як 3'-кінцеві при видової ідентифікації МТК. На основі результатів комп'ютерного аналізу цих секвенованих послідовностей гена *gyrB* ізолятів МТК (рис. 4) та наступного термодинамічного аналізу було сконструйовано три прямих та п'ять зворотних (видоспецифічних) праймерів, комбінації яких дозволяють здійснювати видову ідентифікацію МТК.

Важливо також, що ізоляти гена *gyrB* представників 5 видів МТК утворюють на дендрограмі 5 окремих кластерів, які не перекриваються, (рис. 5), що свідчить про правильну ідентифікацію досліджуваних видів. У даному випадку філогенетичний аналіз був використаний для контролю коректності видової ідентифікації ізолятів МТК. При неправильній класифікації видів ізоляти одного виду можуть знаходитися у середині кластера ізолятів іншого виду, що вказує на те, що філогенетично віддаленіші види характеризуються більшою подібністю нуклеотидних послідовностей, ніж близькоспоріднені види.

Результати тестування розроблених праймерів для *M. tuberculosis*, *M. bovis* та *M. microti* показали принципову можливість їх використання для диференціації указаних патогенів шляхом стандартної ПЛР (рис. 6, 7). У той же час, слід зазначити, що для елімінації синтезу неспецифічних ампліконів вкрай важливим є точний вибір температури відпалу праймера (внаслідок існуючої різниці температур плавлення досконалого та недосконалого дуплексів). Використання некомплементарного нуклеотида на 3'-кінці праймера (що комплементарний

		3'-acttgtcgactgggtgac -5' Мус6
1	AB014184 <i>M. bovis</i>	<u>TGAACAGCTGACCCACTGGTTTGAAGCCAACCCACCCGACTCGAAAGTCGTTGTGA</u>
2	AB014193 <i>M. bovis</i>	T.....T.....C.....
3	AB018554 <i>M. bovis</i>	T.....T.....C.....
4	AJ749913 <i>M. can.</i>	C.....G.....T.....
5	AJ749914 <i>M. can.</i>	C.....G.....T.....
6	AJ749915 <i>M. can.</i>	C.....G.....T.....
7	AJ276122 <i>M. capr</i>	C.....T.....C.....
8	AB014205 <i>M. mic.</i>	C.....T.....C.....
9	E44172 <i>M. mic.</i>	C.....T.....C.....
10	AB014194 <i>M. tub.</i>	C.....G.....C.....
11	AB014209 <i>M. tub.</i>	C.....G.....C.....
12	H37Rv <i>M. tub.</i>	C.....G.....C.....
13	H37Rva <i>M. tub.</i>	C.....G.....C.....

^позиція 837 гена *gyrB*

Рис. 4. Фрагмент множинного вирівнювання гена *gyrB* для ізолятів *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*. Наведений зворотний праймер *Мус6* має некомплементарний (“хитний”) нуклеотид на 3’-кінці (для ізолятів *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. canettii* та *M. caprae*), що дозволяє здійснювати видоспецифічну детекцію *M. bovis* шляхом ПЛР з набором праймерів *Мус9-Мус6*. Для ізолятів наведено номери у базі даних *GenBank* (за винятком лабораторних штамів *H37Rv* та *H37Ra*). Точками показано нуклеотиди, що збігаються з консенсусною послідовністю ізоляту *M. bovis* (AB014184). Підкреслено комплементарну до праймера послідовність “+” — нитки ДНК. Однаковим шрифтом виділено ізоляти, яких віднесено до одного виду. Нуклеотиди мішені, які можуть утворювати неканонічну пару з 3’-кінцевим нуклеотидом праймера *Мус6*, виділено сірим кольором.

фрагменту одониткової ДНК-матриці) для видо-вої диференціації не виключає можливості утворення неканонічної пари. Так, у нашому випадку підвищення температури відпалу усього на 0,5 °C призводило до неможливості утворення комплексу видоспецифічного для *M. microti* праймера *Мус4* з ДНК-матрицею, що містить на 3’-кінці неканонічну пару АС для *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. canettii*, *M.*

caprae, а отже, і до неможливості неспецифічного синтезу, про що свідчать результати гель-електрофорезу (див. рис. 7).

Інтервал плавлення коротких олігонуклеотидів становить близько 10 °C. У той же час, теоретично визначена різниця у температурах плавлення для досконалого дуплекса (комплексу “праймер-одонитковий амплікон”) та дуплекса із неспаре-

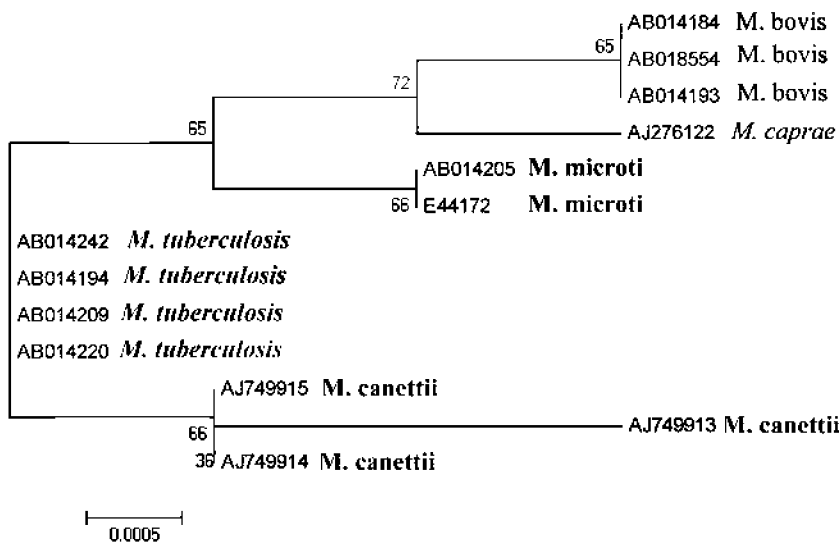


Рис. 5. Філогенетичний аналіз штамів *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*. Філограма побудована на основі послідовності гена *gyrB* довжиною 1257 п.н. Ізоляти кожного виду мікобактерій знаходяться усередині одного кластера.

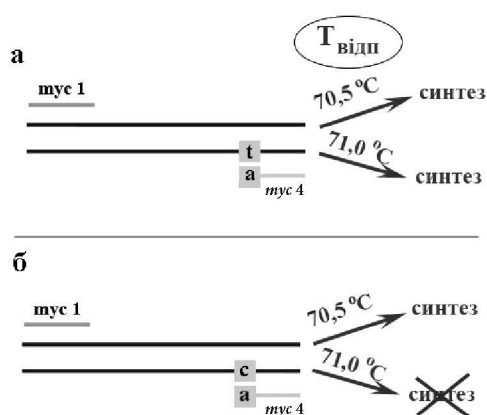


Рис. 6. Схема ампліфікації фрагмента ДНК МТК за допомогою ПЛР з прямим *Mus1* та зворотнім *Mus4* праймерами, специфічними до *M. microti*. Специфічність праймера *Mus4* визначається 3'-кінцевим нуклеотидом. а — праймер *Mus4* відпалюється на ДНК-матриці з утворенням канонічної пари на 3'-кінці лише для *M. microti*. б — праймер *Mus4* утворює комплекс із ДНК-матрицею з неканонічною АС-парою на 3'-кінці для *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. canettii*. На ДНК-матриці зазначених видів за температури відпалу 71 °C праймер *Mus4* не відпалюється і ампліфікація не відбувається.

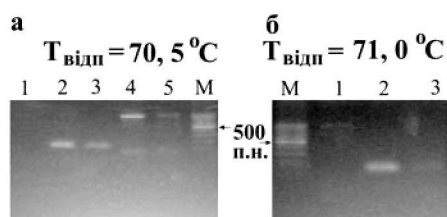


Рис. 7. Оптимізація ампліфікації фрагмента ДНК мікобактерій *M. microti* та *M. tuberculosis* після проведення ПЛР з видоспецифічними праймерами *Mus1-Mus4* (смуги 1-3) і *Mus1-Mus3* (смуги 4-5) та електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі: 1 — вода, 2 — ДНК *M. microti*, 3 — ДНК *M. bovis* (негативний контроль ампліфікації при детекції *M. microti*), 4 — *M. Tuberculosis*, 5 — *M. bovis* (негативний контроль ампліфікації при детекції *M. tuberculosis*), М — маркер молекулярної маси [3].

ним нуклеотидом на 3'-кінці праймера для більшості недосконалих дуплексів із розробленими праймерами для диференціації близькоспоріднених видів МТК становить 3,1-4,6 °C. Тому для мінімізації відпалу праймера з утворенням недосконалих дуплексів (що характеризуються зниженою температурою плавлення) необхідно визначення оптимальної температури відпалу праймера в конкретних умовах, які залежать від типу ампліфikatora та іонної сили реакційного буфера.

Отже, проведення стандартної ПЛР із праймерами, що мають хитні 3'-кінцеві нуклеотиди, а цільовою мішенню для яких є ген *gyrB*, дозволяє при коректному виборі температури відпалу праймерів здійснювати видоспецифічну детекцію близькоспоріднених МТК — *M. tuberculosis*, *M. canettii*, *M. microti*, *M. bovis* та *M. caprae*.

Родо- та видоспецифічна детекція протеїв.

До числа проблемних належать, зокрема, внутрішньолікарняні інфекції. Відповідно до рекомендацій ВООЗ, внутрішньолікарняні інфекції — це будь-яке клінічно виражене захворювання мікробного походження, вражаюче хворого в результаті госпіталізації або відвідування лікувальної установи. Типовими представниками грамнегативної флори, яка часто виявляється при внутрішньолікарняних, а також локальних інфекціях, є ентеробактерії, серед яких особливе місце за частотою виявлення займають протеї, а саме *P. mirabilis* та *P. vulgaris* (які є одними із збудників інфекційних захворювань сечостатевої системи людини, що часто зустрічаються, а також викликають септичні ураження різних частин тіла).

Проблема диференційної детекції ентеробактерій шляхом ПЛР та заснованих на ній методів полягає в тому, що багато хромосомних маркерів різних видів родини *Enterobacteriaceae* мають високий ступінь подібності. Гени 16S рРНК, 23S рРНК, а також, що кодують гіразу (*gyrA* та *gyrB*), РНК-полімеразу (*rpoA* та *rpoB*), кластер генів, що кодують сечовину (*ureA-ureG, ureR*), яких часто використовують для генотипування бактерій та філогенетичного аналізу, у багатьох випадках проявляють недостатній поліморфізм для диференціації близькоспоріднених видів. У той же час, використання плазмідних маркерів може призвести до отримання некоректного результату аналізу. Враховуючи це, нами було розроблено набір родоспецифічних праймерів для ПЛР-детекції протеїв (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. hauseri* та *P. penneri*), а також два набори праймерів (один з яких містить хитний нуклеотид на 3'-кінці) для видоспецифічної детекції *P. mirabilis* та *P. vulgaris*.

Аналіз різних локусів геному протеїв показав, що хромосомні гени, які кодують сімейство β-лактамаз розширеного спектра, є видоспецифічними, що дозволило сконструювати праймери для видоспецифічної детекції *P. vulgaris* саме на основі гена β-лактамази (висококонсервативні локуси були ідентифіковані як для 7 ізолятів гена β-лактамази *P. mirabilis*, так і для 3 ізолятів гена β-лактамази *P. vulgaris*, які, проте, не мали спільних мотивів.) Крім того, за рахунок хитного нуклеотида на 3'-кінці

одного з праймерів, видоспецифічного для *P. vulgaris*, можливо диференціювати *P. vulgaris* від *P. penneri*. Як маркерний для видоспецифічної детриекції *P. mirabilis* використовували ген 16S рРНК: послідовність одного з видоспецифічних праймерів має на 3'-кінці нуклеотиди, що не збігаються з такими для *P. vulgaris*. Близькість температур плавлення праймерів для видоспецифічної детекції *P. vulgaris* та *P. mirabilis*, а також різна довжина ампліконів, що утворюються (263 и 101 п.н., відповідно), дають можливість проводити ідентифікацію видів за допомогою мультиплексної ПЛР.

Для родоспецифічної детекції протеїв нами був вибраний ген *gyrB*, що кодує гіразу та має, як було показано в ряді робіт, достатню дискримінуючу потужність для диференціації близькоспоріднених видів бактерій [8,49]. При цьому, враховуючи послідовності даного гена для близькоспоріднених ентеробактерій *Morganella sp.* та *Providencia sp.*, ми визначили консервативні послідовності гена *gyrB*, специфічні тільки для бактерій роду *Proteus*.

Тестування розроблених наборів праймерів на різних штаммах *P. vulgaris* та *P. mirabilis*, що пройшли стандартну процедуру видової ідентифікації (на селективних поживних середовищах), продемонструвало їх специфічність. ПЛР з родоспецифічними праймерами дає можливість ампліфікувати фрагмент гена *gyrB* хромосомної ДНК бактерій роду *Proteus*, а мультиплексна ПЛР з наборами видоспецифічних праймерів — фрагмент гена 16S рРНК хромосомної ДНК *P. mirabilis* та фрагмент гена β-лактамази хромосомної ДНК *P. vulgaris*, які мають різну довжину (рис. 8).

ПЛР із розробленими видоспецифічними праймерами, тестованими на лабораторних та клінічних штаммах *P. mirabilis* та *P. vulgaris*, може бути використана для диференційної детекції зазначених



Рис. 8. Видоспецифічна детекція *Proteus vulgaris* після ампліфікації фрагмента ДНК з праймерами *Pr4-Pr5* та електрофору в 2 % агарозному гелі: М — маркер молекулярної маси, 1 — негативний контроль ампліфікації, 2 і 4 — продукт ампліфікації довжиною 263 п.н., який фланкують комплементарні фрагменту гена β-лактамази праймери *Pr4-Pr5*, для клінічного ізоляту та лабораторного штаму ATCC 13315 *P. vulgaris* відповідно, 3 — ДНК із клінічного ізоляту *P. mirabilis* [11].

широко розповсюджених патогенів сечового тракту людини. Можливість практичного використання пропонує наборів для диференціації видів протеїв була підтверджена дослідженнями, виконаними у лабораторії проф. А. Nocker (Університет Монтани, США). Зазначимо, що при проведенні ПЛР-РЧ з набором праймерів *Pr4-Pr5* з геномною ДНК *P. vulgaris* для детекції амплікона вистачає 28 циклів при температурі відпалу 60 °С. У той же час, ПЛР для ДНК-матриці, екстрагованої з клінічно значущих ентеробактерій *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium* та *Pseud. putida*, при температурі відпалу 60 °С та кількості циклів понад 45 не призводила до будь-якої ампліфікації, що підтверджує видоспецифічність праймерів *Pr4-Pr5* [9].

Отже, авторами визначено молекулярно-генетичні маркери та розроблено систему родоспецифічних праймерів для детекції протеїв — *Proteus mirabilis*, *P. vulgaris*, *P. hauseri* та *P. penneri*, а також два набори праймерів для видоспецифічної детекції *P. vulgaris* та *P. mirabilis* — широко розповсюджених патогенів сечового тракту людини.

Детекція чутливих та резистентних до ізоніазиду мікобактерій туберкульозу. Підвищення рівня лабораторної діагностики туберкульозу, викликаного лікарськостійкими МТБ, нерозривно пов'язане з розробкою та впровадженням молекулярно-генетичних методів для здійснення точної та швидкої детекції МТБ, що не може бути забезпечено за рахунок застосування класичних морфологічних, біохімічних тестів внаслідок властивих їм істотних недоліків.

Зокрема, все зростаючу роль у виявленні патогенів людини та тварин відіграє детекція точкових мутацій, які, крім того, є придатними маркерами для молекулярної диференціації патогенів. На додаток до вище зазначених молекулярно-генетичних методів виявлення однонуклеотидних поліморфізмів, все ширшого розповсюдження набувають молекулярні технології у форматі ПЛР з праймерами, що містять LNA-модифіковані нуклеотиди [59], ARMS-ПЛР [48,51], ПЛР із пробами у форматі молекулярних маяків [32,45].

Захворювання, що викликають різні види нетуберкульозних мікобактерій (НТМ), — хронічна обструктивна хвороба легенів, бронхоектаз, пневмокніоз, легеневий альвеолярний диспротеїноз тощо [24] — характеризуються подібними до туберкульозу клініко-рентгенологічними проявами, але потребують застосування схем лікування, які відрізняються від хіміотерапії туберкульозу через високу резистентність НТМ до протитуберкульозних препаратів [63]. Відомо, що найвагоміший внесок у розвиток

1	NCBI007 (H37Rv)	TGGCACCGGAACCGGTAAGGACGCGATCACCA AGC CCGTACGAGGTCGTATGGACGTT
2	DQ056356-China AAC
3	AF314112-Italy ATC
4	U41309-Finland ACA
5	AY155353-Taiwan ACC
6	HB385-China AGA
7	ДНК780-Russia ACG

Рис. 9. Фрагмент комп'ютерного аналізу гена *katG* для ізолятів *Mycobacterium tuberculosis* із бази даних *GenBank*. Наведено номери ізолятів у базі даних (за винятком ізолятів 6 та 7, які надано проф. Х. Уї та д-ром В. М. Степаншиною, відповідно) та вказано країну, з якої надано секвеновані послідовності. Виділено кодон 315, мутації в якому зчеплені з резистентністю до ізоніазиду. 1-й ізолят — лабораторний штамп *M. tuberculosis H37Rv*. Підкреслено позиції однонуклеотидних поліморфізмів [5].

резистентності МТБ до протитуберкульозних препаратів, поряд із резистентністю до стрептоміцину, вносить резистентність до ізоніазиду. Аналіз даних літератури показав, що резистентність одного зі стандартних протитуберкульозних препаратів першого ряду ізоніазиду, який застосовують для хіміотерапії при захворюванні на туберкульоз, асоційована з точковими мутаціями у кодоні 315 гена *katG* *M. tuberculosis* із вірогідністю від 50 % до понад 90 % (для різних географічних регіонів). У той же час, поряд із зазначеними мутаціями виявлено однонуклеотидний поліморфізм у кодоні 463 гена *katG*, також пов'язаний з резистентністю до ізоніазиду.

При розробці наборів праймерів на першому етапі проводили аналіз фрагментів геномної ДНК ізолятів МТБ з бази даних секвенованих нуклеотидних послідовностей *GenBank*. З наведеного фрагмента комп'ютерного аналізу для гена *katG* хромосомної ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів МТБ (рис. 9) видно, що мутацію в кодоні 315 можна використовувати для детекції резистентних до ізоніазиду ізолятів МТБ. Беручи до уваги дані літератури щодо порівняльного аналізу різних модифікацій ПЛР [32], а також враховуючи, що більшість клінічних лабораторій мають стандартне ПЛР-обладнання, у даній роботі розроблено дві технології детекції точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ за допомогою АС-ПЛР. У першому варіанті детекцію поодиноких мутацій в гені *katG* МТБ проводили на основі використання праймерів, що містять *LNA*-модифіковані нуклеотиди. Другий варіант шляхом проведення ПЛР із додатковим конкурентним блокуючим праймером із 3'-термінальною фосфатною групою дозволяє визначати тип точкових мутацій $AGC \rightarrow ACC$ та $AGC \rightarrow AGA$, $AGC \rightarrow ACA$ у кодоні 315 гена *katG*, що найчастіше зустрічаються.

Введення *LNA*-нуклеотидів дозволяє взагалі збільшити дискримінуючу потужність праймера, а введення *LNA*-мономера на 3'-кінці праймера дозволяє підвищити надійність детекції точкових мутацій за допомогою АС-ПЛР. У *LNA*-модифікованих праймерах деякі нуклеотиди заміщені *LNA*-мономерами — аналогами нуклеотидів, що

містять метиленовий місток 2'-О, 4'-С, який обмежує конформаційну гнучкість дезоксирибозного кільця та переводить мономер у жорстку структуру. Це призводить до підсилення гібридизації нитки, що містить *LNA*-мономери, з комплементарною ниткою дуплекса. Вбудовування *LNA*-нуклеотидів значно збільшує термічну стабільність дуплекса порівняно з немодифікованою ДНК.

АС-ПЛР із *LNA*-модифікованими праймерами основана на тому, що температура плавлення комплексу "праймер — однониткова ДНК-матриця" (а отже, і температура відпалу праймерів) для мутантного типу нижча від температури плавлення досконалого дуплекса. Це означає, що за наявності точкової мутації у сайті, що містить *LNA*-нуклеотид, комплекс "праймер — однониткова ДНК-матриця" буде мати нижчу температуру плавлення, ніж із досконалим дуплексом. Молекули ДНК ізолятів дикого типу МТБ є досконалими дуплексами, а ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів характеризується наявністю мутацій у кодоні 315 гена *katG* та, отже, має нижчу температуру плавлення. Важливо зазначити, що величина зміни температури плавлення комплексу "*LNA*-праймер — ДНК-матриця" за наявності однонуклеотидного поліморфізму залежить як від кількості *LNA*-мономерів, так і від довжини праймера [36].

Використання ПЛР з набором праймерів Л7-Л8^{SLNA} дозволяє диференціювати мутантний та дикий тип гена *katG* МТБ: для дикого типу гена *katG* ампліфікується фрагмент гена довжиною 214 п.н. (доріжки 3, 4, рис. 10Б), у той час як для мутантного ізоляту МТБ амплікон відсутній (хоча ампліфікація відбувається, про що свідчить смуга неспецифічного амплікона, яка утворюється внаслідок вибору праймера Л8^{SLNA} невеликої довжини) (доріжки 1, 2, рис. 10Б). Інтенсивність смуги неспецифічного амплікона зменшується при підвищенні температури відпалу від 66 °С до 71 °С (див. рис. 10); у цьому випадку проводили двокрокову ПЛР, яка дозволяла надійно диференціювати ізоляти МТБ мутантного та дикого типів.

Друга технологія базується на комбінації

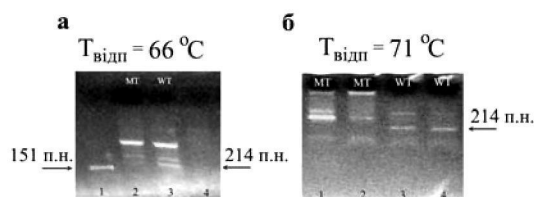


Рис. 10. Детекція продуктів ампліфікації фрагмента гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу дикого типу (*WT*) та резистентних (з мутацією в кодоні 315 гена *katG*) до ізоніазиду (МТ) після проведення ПЛР з набором праймерів Л7-Л8^{LNA} та електрофорезу в 1,5 % агарозному гелі. Л8^{LNA} — модифікований праймер, що містить 5 LNA-нуклеотидів. (а) 1 — маркер молекулярної маси (фрагмент довжиною 151 п.н., що містить кодон 315, після ампліфікації з набором праймерів *Mykat10-Mykat11*); 2 і 3 — ампліфікація з набором праймерів Л7-Л8^{LNA}, мутантних по кодону 315 гена *katG* МТБ (2) та дикого типу (3); 4 — негативний контроль ампліфікації. Наявність мутації в кодоні 315 веде до відсутності смуги амплікона довжиною 214 п.н. (2), яка є характерною для ізолятів дикого типу (3). (б) Ампліфікація фрагмента довжиною 214 п.н. з набором праймерів Л7-Л8^{LNA} для ДНК мікобактерій туберкульозу, стійких до ізоніазиду (1, 2), та ДНК ізолятів дикого типу (3, 4) [40].

алель-специфічних праймерів та додаткового блокуючого олігонуклеотида для пригнічення ампліфікації алелю дикого типу (рис. 11). Ефективність зазначеного підходу перевірено при розробці методу для детекції точкових мутацій в кодоні 315 гена *katG* МБТ. Підвищенню дискримінуючої потужності сприяло використання додаткового термінуючого праймера з 3'-кінцевою фосфатною групою (для елімінації неспецифічного зв'язування) (рис. 12). За умови вибору оптимальної температури відпалу набір праймерів *Mykat4-Mykat5-Mykat5P* дає можливість диференціювати точкову мутацію $AGC \rightarrow ACC$ (див. рис. 12 доріжка 2) від мутації $AGC \rightarrow AGA$ (див. рис. 12, доріжка 1) та послідовності AGC в кодоні 315 гена *katG* ДНК МТБ (див. рис. 12, доріжка 3).

На основі розроблених технологій детекції ізолятів дикого/мутантного типу МТБ та визначення типу точкових мутацій, зчеплених із резистентністю до ізоніазиду, нами запропонована схема аналізу клінічного зразка на наявність МТБ, визначення резистентності до ізоніазиду та уточнення, у випадку наявності, типу точкової мутації [40]. Відмітною особливістю даної схеми є можливість швидкого визначення ізолятів дикого типу МТБ (тобто чутливих до ізоніазиду), що дозволяє для

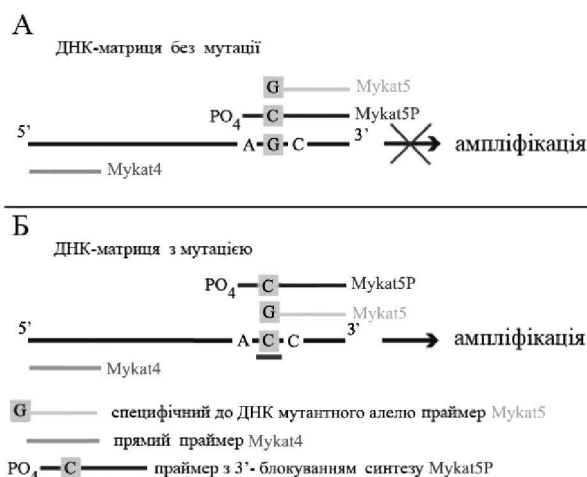


Рис. 11. Схема алель-специфічної ПЛР для визначення точкової мутації $AGC \rightarrow ACC$ у кодоні 315 гена *katG* з використанням додаткового конкурентного блокуючого зворотного праймера з 3'-термінальною фосфатною групою (для елімінації ампліфікації ДНК алелю дикого типу). 3'-кінцевий нуклеотид специфічного до зазначеної мутації праймера *Mykat5* є некомплементарним (А) та комплементарним (Б) до нуклеотиду у другій позиції кодона 315 [40].

первинних хворих негайно почати проведення курсу хіміотерапії, що включає і ізоніазид. Важливо, що раніше для того щоб встановити належність клінічного ізоляту *M. tuberculosis* до дикого або мутантного типу, необхідно було провести детекцію 6 варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ шляхом мультиплексної ПЛР з використанням 6 пар праймерів (за допомогою, наприклад, ARMS-ПЛР) [40], тоді як використання АС-ПЛР із розробленими LNA-модифікованими праймерами дозволяє значно спростити конструювання набору праймерів. В останньому випадку достатньо використати лише одну пару праймерів, один з яких містить 3-5 LNA-нуклеотидів, комплементарних (або фланкуючих та комплементарних) кодону з мутаціями, що досліджують.

Створені молекулярно-генетичні тест-системи для виявлення резистентних до протитуберкульозних препаратів мікобактерій туберкульозу можуть застосовуватися у діагностичних лабораторіях зі стандартним ПЛР-обладнанням та дозволять скоротити визначення лікарської стійкості МТБ від 1-3 міс традиційними бактеріологічними методами до 1-3 діб за допомогою ПЛР.

Отже, нами створено молекулярну технологію диференціації МТБ дикого та мутантного типів, а також технологію визначення варіантів точкових

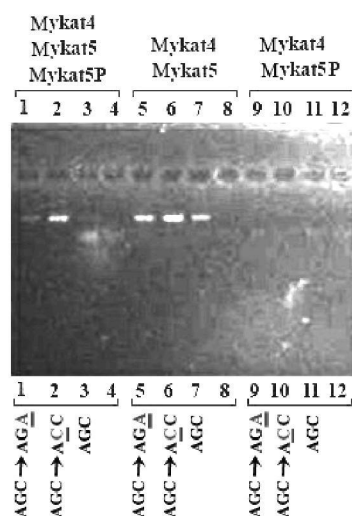


Рис. 12. Детекція точкової мутації $AGC \rightarrow ACC$ у кодоні 315 гена *katG* ДНК МТБ, зчепленої з резистентністю до ізоніазиду, після проведення ПЛР з набором праймерів *Mykat4-Mykat5-Mykat5P* та електрофорезу в 2 % агарозному гелі. 1, 5, 9 — ДНК *M. tuberculosis* штаму *HB385*, що містить мутацію $AGC \rightarrow AGA$; 2, 6 і 10 — ДНК *M. tuberculosis* штаму *HB125* з мутацією $AGC \rightarrow ACC$; 3, 7 і 11 — ДНК *M. tuberculosis* штаму *H37Rv*, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 містить послідовність AGC); 4, 8 і 12 — вода, негативний контроль ампліфікації. Підкреслено позиції точкових мутацій [40].

мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ на основі АС-ПЛР із додатковим конкурентним блокуючим праймером. Розроблені молекулярно-генетичні набори з використанням *LNA*-модифікованих праймерів дозволяють за допомогою АС-ПЛР диференціювати чутливі та резистентні МБТ до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду, а саме постановкою однієї реакції встановити наявність будь-якого з 6 можливих варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG*, асоційованих з резистентністю до даного препарату. Два набори праймерів, кожний з яких містить додатковий конкурентний блокуючий праймер з 3'-термінальною фосфатною групою, дозволяють виявляти точкові мутації $AGC \rightarrow ACC$, $AGC \rightarrow AGA$ та $AGC \rightarrow ACA$, що найчастіше зустрічаються.

Видоспецифічна детекція *Bacillus anthracis*.

Ще однією групою захворювань, що потребує контролю, є особливо небезпечні інфекції, викликані агентами з біотерористичним потенціалом. До числа таких агентів належать, зокрема бактерії *B. anthracis* — члени групи *B. cereus sensu lato* (у подальшому — групи *B. cereus*), до якої також вхо-

дять *B. thuringiensis*, *B. cereus* та непатогенні *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* та *B. weihenstephanensis*. Ці близькоспоріднені бактерії є патогенами тварин (*B. anthracis* та *B. cereus*) та комах (*B. thuringiensis*). Група *B. cereus sensu lato* є однією з найбільш таксономічно сумнівних груп бацил. На основі генетичної схожості було запропоновано вважати, що *B. anthracis*, *B. cereus* та *B. thuringiensis* належать до одного виду — *B. cereus*, але статус окремих видів залишається [28].

Беручи до уваги особливе місце, яке займає *B. anthracis* серед вищезгаданих видів бацил, існує необхідність у вирішенні проблеми біологічного контролю, тобто у здійсненні надійної диференціації: по-перше, *B. anthracis* від інших членів групи *B. cereus*; по-друге, штамів з різним профілем плазмід, що визначають патогенні властивості штамів; по-третє, в ідентифікації польових безкапсульних штамів (що мають слабку вірулентність для мишей, морських свинок).

Таким чином, диференціація *B. anthracis* від філогенетично близьких видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* на основі хромосомних маркерів залишається актуальною. Недавно показано, що горизонтальний переніс плазмід драматично змінює фенотипові властивості патогена [28], а протягом останніх років відкриті ізоляти *B. cereus*, що містять обидві плазмиди — *pXO1* та *pXO2*, наявність яких визначає вірулентні властивості *B. anthracis* [34]. Тому детекція патогенних штамів *B. anthracis* лише на основі визначення обох цих плазмід може призводити до хибно позитивних результатів аналізу. У даному фрагменті роботи на основі комп'ютерного аналізу генів хромосомної ДНК близькоспоріднених видів *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* та ін. визначені маркери для їх диференціації та розроблено системи праймерів для видоспецифічної детекції *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* за допомогою стандартної ПЛР, а також ПЛР у реальному часі з різними форматами проб, а саме у форматах *TaqMan* та молекулярного маяка.

В результаті аналізу фрагментів геномної ДНК більше 300 ізолятів *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* як потенціальні хромосомні маркери для видоспецифічної детекції бацил групи *B. cereus* були вибрані гени *groV* (кодує β -суб'єдиницю РНК-полімерази), *gyrB*, *ssp* (кодує кислотостійкі білки ендоспори) і ген *plcr*, кодує регулятор транскрипції.

Ген *ssp* належить до числа біомаркерів, використовуваних останнім часом для ідентифікації спор *B. anthracis*. Множинне вирівнювання послідовностей даного гена дозволило виявити гексануклеотид-

ну вставку, характерну тільки для ізолятів збудника сибірської виразки та делетовану для *B. cereus* і *B. thuringiensis* (рис. 13). Цей факт був покладений в основу розробки видоспецифічних праймерів для *B. anthracis* — зазначена вставка була частиною мішені на 3'-кінці для зворотного праймера. Після проведення стандартної ПЛР (рис. 14) та ПЛР-РЧ (рис. 15) з набором праймерів, один з яких містить характерну тільки для ізолятів *B. anthracis* 3'-кінцеву гексануклеотидну інсерцію, два амплікони очікуваного розміру (83 п.н. та 200 п.н.) були детектовані тільки для ізолятів *B. anthracis* (див. рис. 14), тоді як для ізолятів близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* був детектований тільки один амплікон (83 п.н.).

Для ПЛР-РЧ із пробною *TaqMan* для всіх ізолятів *B. anthracis* реєстрували інтенсивний позитивний сигнал. У той же час, для переважної більшості штамів групи *B. cereus* сигнал був значно нижчий, а для декількох штамів був негативний. На відміну від проби *TaqMan*, для ПЛР-РЧ із пробною у форма-

ті молекулярного маяка тільки штам *B. anthracis* характеризувалися позитивним сигналом.

Хромосомними маркерами, які донедавна використовували для ПЛР-детекції *B. anthracis*, були послідовність *Va813* [46], ген *rpoB* [4,52]. Проте істотним недоліком застосування даних маркерів була можливість отримання хибно позитивних результатів при проведенні ПЛР-аналізу з ізолятами близькоспоріднених видів *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, а також з ізолятами значно віддаленішого виду *B. megaterium* [4,16,20]. Тому в даній роботі розроблено набір праймерів, мішенню для яких є послідовність-підпис всередині гена *ssp B. anthracis*. За нашими даними, ген *ssp* вперше згадувався у роботі [54] у якості мішені для ПЛР-детекції *B. anthracis* без надання деталей. Шляхом множинного вирівнювання послідовностей гена *ssp B. cereus*, *B. thuringiensis* та *B. anthracis* була знайдена вставка довжиною 6 п.н. у послідовності *B. anthracis*. Виходячи з наявності цієї різни-

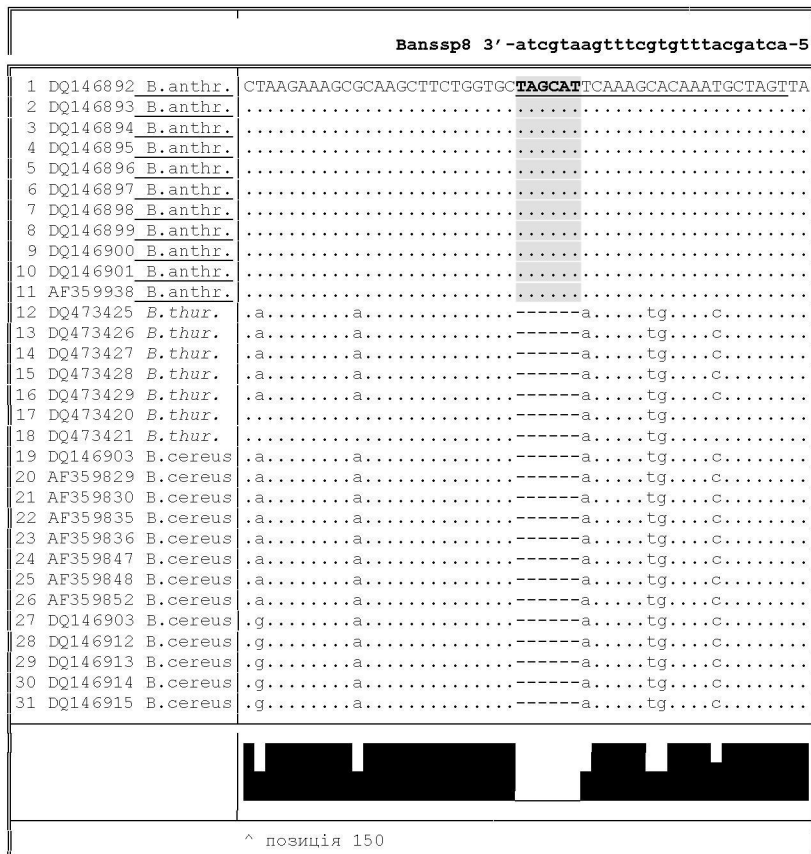


Рис. 13. Фрагмент множинного вирівнювання гена *ssp* для 11 ізолятів *Bacillus anthracis*, 13 ізолятів *B. cereus* та 7 ізолятів *B. thuringiensis*. Нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами консенсусної послідовності ізоляту *B. anthracis* DQ146892, показано маленькими літерами. Наведено номери, що відповідають номерам ізолятів у базі даних *GenBank*. Підкреслено комплементарну праймеру *Banssp8* послідовність “+”-нитки ДНК. Виділено унікальну для *B. anthracis* інсерцію довжиною 6 н.

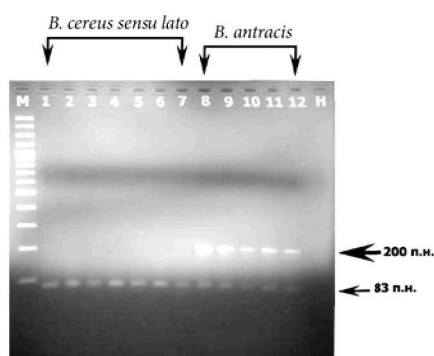


Рис. 14. Детекція продуктів ампліфікації геномної ДНК представників групи *B. cereus* за допомогою електрофорезу у 2 % агарозному гелі після проведення стандартної ПЛР. М — маркер молекулярної маси, 1-3 — ДНК з ізолятів *B. Cereus*, 4-7 — ДНК з ізолятів *B. Thuringiensis*, 8-12 — ДНК з ізолятів *B. Anthracis*, Н — негативний контроль ампліфікації. Всі штами групи *B. cereus* мають ПЛР-продукт тільки довжиною 83 п.н., а штами *B. anthracis* характеризуються наявністю ампліконів довжиною 83 та 200 п.н.

ці, авторами розроблено праймери та проби для ПЛР-РЧ-детекції *B. anthracis*.

Проведені в роботі експерименти з ПЛР-детекції збудника сибірської виразки підтвердили, що основою для успішної, високонадійної детекції зазначеного патогена може бути визначена, специфічна тільки для нього хромосомна інсерція в гені *ssp* (що кодує низькомолекулярний кислоторозчинний білок ендоспори) хромосомної ДНК.

Після відомих подій у США з надсиланням у поштових конвертах спор збудника сибірської виразки в усіх поштових відділеннях країни було встановлено системи *SmartCycler System* (*Cepheid*, США), які використовують найчутливіший на ринку молекулярно-біологічної продукції варіант ПЛР-РЧ [29]. Завдяки повній автоматизації процесів пробопідготовки, ампліфікації та детекції за допомогою цього високоточного приладу, який не потребує для обслуговування висококваліфікованого персоналу, результат тестування біологічних зразків на наявність інфекційних збудників можна отримати через 20-40 хв. Зазначимо, що найважливішим компонентом даної платформи є молекулярно-генетична тест-система. Цікаво, що представники фірми *Cepheid* не розкривають навіть ген, фрагмент якого служить для ампліфікації ДНК *B. anthracis*. Важливим показником ефективності та надійності зазначеної технології є відсутність жод-

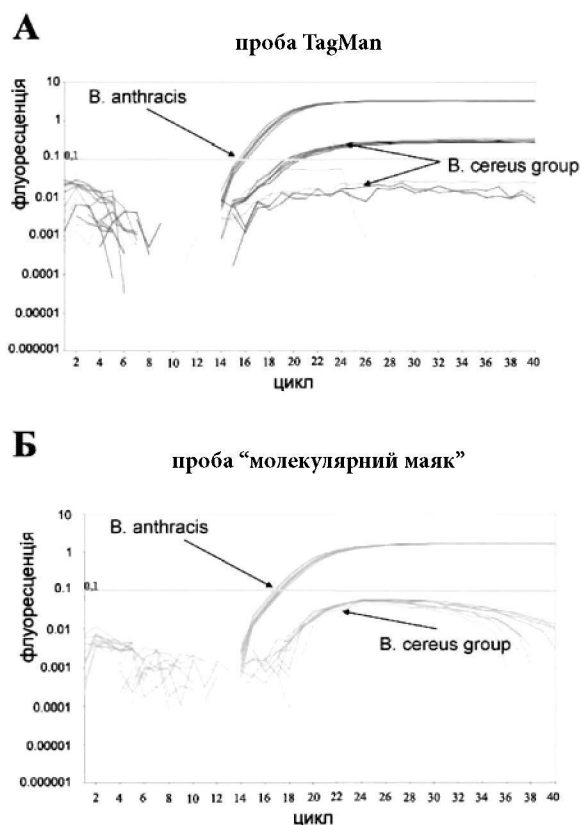


Рис. 15. Детекція продуктів ампліфікації геномної ДНК *B. anthracis* за допомогою ПЛР у реальному часі: А — лінійна проба у форматі *TaqMan*, Б — шпилькова проба у форматі молекулярного маяка.

ного помилково позитивного результату аналізу на фоні проведених сотень тисяч аналізів.

Враховуючи вищенаведене, розроблена нами тест-система для детекції *B. anthracis* на основі ампліфікації фрагмента гена *ssp* хромосомної ДНК може бути запропонована для подальших лабораторних випробувань, що стане наступним кроком на шляху підвищення рівня біобезпеки населення, території, економіки України (яка є складовою частиною національної безпеки).

Подяка

Автори висловлюють щире подяку д-ру В. М. Степаншій (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, Російська Федерація), проф. Х. *Wu* (Інститут дослідження туберкульозу, Китай), д-ру *L. Geue* та д-ру *D. Beier* (Федеральний науково-дослідний центр вірусних захворювань тварин, Німеччина), д-ру *J. Kuzmak* та д-ру *M. Rola* (Національний інститут ветеринарії, Польща) за допомогу у проведенні досліджень.

Список використаної літератури

1. Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов Р. Л., Чумаков К. М. Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneVee // Биополимеры и клетка. — 1991. — 7, № 1. — С. 10-14.
2. Леск А. Введение в биоинформатику. — М.: Бином, 2009. — 318 с.
3. Лиманская О. Ю. Видоспецифическая детекция микобактерий туберкулезного комплекса // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 10. — С. 49-56.
4. Лиманская О. Ю., Лиманский А. П. Маркеры для видоспецифической детекции бацилл группы *Bacillus cereus* // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2008. — № 3. — С. 20-26.
5. Лиманская О. Ю., Мухина Т. Н., Степаншина В. Н. и др. Детекция изолятов дикого типа и резистентных к изониазиду микобактерий туберкулеза // Туберкулез и болезни легких. — 2010. — № 9. — С. 45-51.
6. Лиманская О., Рола М., Віска Л. и др. Детекция провирусной ДНК вируса иммунодефицита крупного рогатого скота посредством полимеразной цепной реакции // Вопр. вирусол. — 2005. — № 2. — С. 38-43.
7. Лиманский А. П., Геие Л., Лиманская О. Ю., Веиер Д. Типирование вируса лейкоза крупного рогатого скота, циркулирующего в Украине // Вопр. вирусол. — 2004. — № 1. — С. 39-44.
8. Лиманский А. П., Минухин В. В., Лиманская О. Ю. и др. Видоспецифическая детекция ДНК *Proteus vulgaris* и *Proteus mirabilis* посредством полимеразной цепной реакции // Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол. — 2005. — № 3. — С. 33-39.
9. Лиманська О. Ю. Молекулярні технології в типуванні та детекції патогенів бактеріальної і вірусної природи: Автореф. дис. ... д-ра біол. наук. — К., 2011. — 44 с.
10. Лиманська О. Ю., Лиманський О. П. Аналіз наборів праймерів для ПЛР-детекції провірусної ДНК вірусу лейкоза великої рогатої худоби та вірусу імунодефіциту людини за допомогою полімеразної ланцюгової реакції // Біополімери і клітина. — 2002. — 18, № 2. — С. 124-130.
11. Лиманська О. Ю., Рола М., Віска Л. та ін. Ампліфікація провірусної ДНК вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби у експериментально інфікованих тварин // Мікробіол. журн. — 2007. — 69, № 1. — С. 52-60.
12. Примроуз С., Леск А. Геномика. Роль в медицине. — М.: Бином, 2008. — 277 с.
13. *Anthrax in humans and animals* / Ed. P. Turnbull. — Geneva: WHO Press, 2008. — 219 p.
14. Bayley H. Sequencing single molecules of DNA // Curr. Opin. Chem. Biol. — 2006. — 10, № 6. — P. 628-637.
15. Beier D., Blankenstein P., Marquardt O., Kuzmak J. Identification of different BLV provirus isolates by PCR, RFLPA and DNA sequencing // Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. — 2001. — 114, № 7-8. — S. 252-256.
16. Beyer W., Pocivalsek S., Bohm R. Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil samples — limitations of present published primers // Appl. Microbiol. — 1999. — 87, № 2. — P. 229-236.
17. Bicka L., Rola M., Kuzmak J. Experimental infection of sheep with bovine immunodeficiency virus // Bull. Vet. Inst. Pulawy. — 2000. — 44, № 1. — P. 3-10.
18. Boehme C., Nabeta P., Hillemann D. et al. Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance // New Engl. J. Med. — 2010. — 363, № 11. — P. 1005-1015.
19. Dube S., Bachman S., Spicer T. et al. Degenerate and specific PCR assays for the detection of bovine leukaemia virus and primate T-cell leukaemia/lymphoma virus pol DNA and RNA: phylogenetic comparisons of amplified sequences from cattle and primates from around the world // J. Gen. Virol. — 1997. — 78, Pt. 6. — P. 1389-1398.
20. Ellerbrok H., Nattermann H., Ozel M. et al. Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR // FEMS Microbiol. Lett. — 2002. — 214, № 1. — P. 51-59.
21. Gillet N., Florins A., Boxus M. et al. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human // Retrovirology. — 2007. — 4, № 1. — P. 39-70.
22. *Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing: WHO report 2009* / Ed. L. Blanc. — Geneva: WHO Press, 2009. — 314 p.
23. Creighton S., Huang M. M., Cai H. et al. Base mispair extension kinetics. Binding of avian myeloblastosis reverse transcriptase to matched and mismatched base pair termini // J. Biol. Chem. — 1992. — 267, № 4. — P. 2633-2639.
24. Griffith D. E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A. et al. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases // Am. J. Respir. Crit. Care Med. — 2007. — 175, № 4. — P. 367-416.
25. Gustafson K. S. Locked nucleic acids can enhance the analytical performance of quantitative methylation-specific polymerase chain reaction // J. Mol. Diagn. — 2008. — 10, № 1. — P. 33-42.
26. Hayasaka D., Ivanov L., Leonova G. et al. Distribution and characterization of tick-borne encephalitis viruses from Siberia and far-eastern Asia // J. Gen. Virol. — 2001. — 82. — P. 1319-1328.
27. Hayasaka D., Suzuki Y., Kariwa H. et al. Phylogenetic and virulence analysis of tick-borne encephalitis viruses from Japan and far-eastern Russia // J. Gen. Virol. — 1999. — 80. — P. 3127-3135.
28. Helgason E., Okstad O. A., Caugant D. A. et al. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*: one species on the basis of genetic evidence // Appl. Environ. Microbiol. — 2000. — 66, № 6. — P. 2627-2630.
29. Hoffmaster A. R., Meyer R. F., Bowen M. D. et al. Evaluation and validation of a real-time polymerase chain reaction assay for rapid identification of *Bacillus anthracis* // Emerging Infectious Dis. — 2002. — 8, № 10. — P. 1178-1182.
30. Huang M., Arnheim N., Goodman M. F. Extension of base mispairs by Taq DNA polymerase: implications for single nucleotide discrimination in PCR // Nucl. Acids Res. — 1992. — 20, № 17. — P. 4567-4573.
31. Jenkins G., Chaleshtori M., Song H., Parry J. Mutation analysis using the restriction site mutation (RSM) assay // Mutat. Res. — 1998. — 405, № 2. — P. 209-220.
32. Josefsen M., Lofstrom C., Sommer H., Hoorfar J. Diagnostic PCR: Comparative sensitivity of four probe chemistries // Mol. Cell Probes. — 2009. — 23, № 3-4. — P. 201-203.
33. Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences // J. Mol. Evol. — 1980. — 16, № 2. — P. 111-120.
34. Kolsto A., Tourasse N., Okstad O. What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? // Ann. Rev. Microbiol. — 2009. — 63. — P. 451-476.
35. Kuiken T., Fouchier R. A., Schutten M. et al. Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory

- syndrome // *Lancet*. — 2003. — **362**, № 9380. — P. 263-270.
36. *Latorra D., Arar K., Hurley J.* Design considerations and effects of LNA in PCR primers // *Mol. Cell Probes*. — 2003. — **17**, № 5. — P. 253-259.
 37. *Li J., Makrigiorgos G.* Anti-primer quenching-based real-time PCR for simplex or multiplex DNA quantification and single-nucleotide polymorphism genotyping // *Nat. Protoc*. — 2007. — **2**, № 1. — P. 50-58.
 38. *Li J., Berbeco R., Distel R. J.* et al. s-RT-MELT for rapid mutation scanning using enzymatic selection and real time DNA-melting: new potential for multiplex genetic analysis // *Nucleic Acids Res.* — 2007. — **35**, № 12. — P. e84.
 39. *Liew M., Pryor R., Palais R.* et al. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons // *Clin. Chem.* — 2004. — **50**, № 7. — P. 1156-1164.
 40. *Limanskaya O. Yu., Mukhina T. N., Stepanshina V. N.* et al. Identification of wild type Mycobacterium tuberculosis isolates and point mutations associated with isoniazid resistance // *Mol. Biol.* — 2010. — **44**, № 4. — P. 559-567.
 41. *Limansky A. P., Limanskaya O. Yu.* Comparison of primer sets for detection of bovine leukemia virus by polymerase chain reaction // *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* — 2002. — **46**, № 1. — P. 27-36.
 42. *LNA™ oligo tools and design guidelines / Exiqon Incorporation.* — [електронний ресурс]: URL : <http://www.exiqon.com/oligo-tools>.
 43. *Locked nucleic acid (LNA™) technology / Exiqon Incorporation.* — [електронний ресурс]: URL : <http://www.exiqon.com/lna-technology>.
 44. *Makrigiorgos G.* PCR-based detection of minority point mutations // *Hum. Mutat.* — 2004. — **23**, № 5. — P. 406-412.
 45. *Mhlanga M., Malmberg L.* Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR // *Methods*. — 2001. — **25**, № 4. — P. 463-471.
 46. *Mikesell P., Ivins B., Ristroph J., Dreier T.* Evidence for plasmid-mediated toxin production in *Bacillus anthracis* // *Infection and Immunity*. — 1983. — **39**, № 1. — P. 371-376.
 47. *Morlan J., Baker J., Sinicropi D.* Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method // *PLoS One*. — 2009. — **4**, № 2. — P. e4584.
 48. *Munoz C., Gomez Talquenca S., Volpe M. L.* Tetra primer ARMS-PCR for identification of SNP in beta-tubulin of *Botrytis cinerea*, responsible of resistance to benzimidazole // *J. Microbiol. Methods*. — 2009. — **78**, № 2. — P. 245-246.
 49. *Niemann S., Harmsen D., Rusch-Gerdes S., Richter E.* Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by gyrB DNA sequence polymorphism analysis // *J. Clin. Microbiol.* — 2000. — **38**, № 9. — P. 3231-3234.
 50. *Orum H.* PCR clamping // *Curr. Issues Mol. Biol.* — 2000. — **2**, № 1. — P. 27-30.
 51. *Piccioli P., Serra M., Gismondi V.* et al. Multiplex tetra-primer amplification refractory mutation system PCR to detect 6 common germline mutations of the MUTYH gene associated with polyposis and colorectal cancer // *Clin. Chem.* — 2006. — **52**, № 4. — P. 739-743.
 52. *Qi Y., Patra G., Liang X.* et al. Utilization of the rpoB gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — **67**, № 8. — P. 3720-3727.
 53. *Ragoussis J., Elvidge G. P., Kaur K., Colella S.* Matrix-assisted laser desorption/ionization, time-of-flight mass spectrometry in genomics research // *PLoS Genet.* — 2006. — **2**, № 7. — P. e100.
 54. *Ramisse V., Patra G., Vaissaire J., Mock M.* The Ba813 chromosomal DNA sequence effectively traces the whole *Bacillus anthracis* community // *J. Appl. Microbiol.* — 1999. — **87**, № 2. — P. 224-228.
 55. *Rychlik W., Spencer W. J., Rhoads R. E.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro* // *Nucleic Acids Res.* — 1990. — **18**, № 21. — P. 6409-6417.
 56. *Saitou N., Nei M.* The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* — 1987. — **4**, № 4. — P. 406-425.
 57. *Schütz E., von Ahsen N.* Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches // *Biotechniques*. — 1999. — **27**, № 6. — P. 1218-1224.
 58. *Shi C., Eshleman S. H., Jones D.* et al. LigAmp for sensitive detection of single-nucleotide differences // *Nat. Methods*. — 2004. — **1**, № 2. — P. 141-147.
 59. *Strand H., Ingebretsen O., Nilssen O.* Real-time detection and quantification of mitochondrial mutations with oligonucleotide primers containing locked nucleic acid // *Clin. Chim. Acta*. — 2008. — **390**, № 1-2. — P. 126-133.
 60. *Suarez D., Whetstone C.* Size variation within the second hypervariable region of the surface envelope gene of the bovine lentivirus BIV in experimentally and naturally infected cattle // *J. Virol.* — 1997. — **71**, № 3. — P. 2482-2486.
 61. *Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 // *Mol. Biol. Evol.* — 2007. — **24**, № 8. — P. 1596-1599.
 62. *Thehwell N., Millington S., Solinas A.* et al. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection // *Nucleic Acids Res.* — 2000. — **28**, № 19. — P. 3752-3761.
 63. *Venugopal D., Kumar S., Isa M., Bose M.* Drug resistance profile of human *Mycobacterium avium* complex strains from India // *Indian J. Med. Microbiol.* — 2007. — **25**, № 2. — P. 115-120.
 64. *Von Ahsen N., Wittwer C., Schutz E.* Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbor corrections for Mg²⁺, deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas // *Clin. Chem.* — 2001. — **47**, № 11. — P. 1956-1961.
 65. *Whitcombe D., Theaker J., Guy S. P.* et al. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence // *Nat. Biotechnol.* — 1999. — **17**, № 8. — P. 804-807.
 66. *Yu H., Goodman M. F.* Comparison of HIV-1 and avian myeloblastosis virus reverse transcriptase fidelity on RNA and DNA templates // *J. Biol. Chem.* — 1992. — **267**, № 15. — P. 10888-10896.

Одержано 12.07.2011

ДНК-ТЕХНОЛОГИИ ДЕТЕКЦИИ И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ПАТОГЕНОВ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ МЕДИЦИНЕ И ВЕТЕРИНАРИИ

О. Ю. Лиманская^{1,2}, А. П. Лиманский¹

¹Государственное учреждение "Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины", 61057 Харьков

²Национальный научный центр "Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины НААН Украины", 61023 Харьков

Приведены результаты поиска целевых мишеней и их последующего применения в различных модификациях полимеразной цепной реакции (ПЦР) для молекулярной детекции и генотипирования социально значимых патогенов вирусной и бактериальной природы. С развитием технологии синтеза олигонуклеотидов, стремительно нарастающим объемом секвенированных нуклеотидных последовательностей патогенов изменялись форматы ПЦР — от стандартной ПЦР для детекции патогенов через ПЦР с последующим анализом полиморфизма длины рестриционных фрагментов (ПДРФ) до аллель-специфичной ПЦР для типирования патогенов с праймерами, содержащими качающийся 3'-концевой нуклеотид, ПЦР с LNA-модифицированными праймерами, а также ПЦР в реальном времени с различным форматом проб. На основе полиморфизма единичных нуклеотидов созданы молекулярно-генетические наборы, позволяющие осуществлять дифференциацию близкородственных видов микобактерий туберкулезного комплекса, распространенных патогенов мочевого тракта человека (*Proteus mirabilis* и *P. vulgaris*), видоспецифическую детекцию бактерий группы *Bacillus cereus sensu lato*. Тестирование набора праймеров, целевой мишенью для которых является фрагмент гена *ssp*, характеризующийся гексануклеотидной вставкой только для изолятов *B. anthracis*, позволило с помощью стандартной ПЦР и ПЦР в реальном времени надежно дифференцировать бактерии *B. anthracis* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Разработаны технологии детекции точечных мутаций посредством аллель-специфичной ПЦР с использованием праймера с LNA-мономерами (дополнительного конкурентного блокирующего праймера), которые позволяют определять тип точечных мутаций и чувствительность или резистентность к противотуберкулезному препарату первого ряда — изониазиду. Проведено типирование вируса лейкоза (ВЛ) крупного рогатого скота (КРС), циркулирующего на территории Украины, и по результатам ПДРФ-анализа и секвенирования установлена принадлежность украинского изолята ВЛ КРС к австралийскому подвиду — одному из трех известных подвидов этого патогена. Разработана система праймеров для детекции провирусной ДНК вируса иммунодефицита КРС.

DNA TECHNOLOGIES FOR DETECTION AND TYPING OF PATHOGENS IN MOLECULAR MEDICINE AND VETERINARY

O. Yu. Limanskaya^{1,2}, A. P. Limanskii¹

¹State Institution "I. I. Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology NAMS Ukraine", Kharkov, 61057

²National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine" of NAAS Ukraine", Kharkov, 61023

Results of search of specific targets and their following utilization in different modifications of polymerase chain reaction (PCR) for molecular detection and typing of socially significant pathogens of viral and bacterial nature are represented. PCR formats were altering with the development of technology of oligonucleotide synthesis from conventional PCR for detection of pathogens through PCR with following RFLP analysis up to allele-specific PCR for typing pathogens with primers containing wobble 3'-terminal nucleotide, PCR with LNA-modified primers, real-time PCR with different probe format.

Based on the single nucleotide polymorphism, molecular genetic sets for differentiation of closely related species of mycobacteria tuberculosis complex, widespread pathogens of human urogenital tract *Proteus mirabilis* and *P. vulgaris*, species-specific detection of members of *Bacillus cereus sensu lato* have been designed. Testing the primer set, targeting the *ssp* gene fragment, which is characterized by hexanucleotide insertion only for *B. anthracis* isolates, has allowed reliably to differentiate *B. anthracis* bacteria from closely related *B. cereus* and *B. thuringiensis* species by conventional polymerase chain reaction and real-time PCR. Technologies for detecting of point mutations by allele-specific PCR with primer containing LNA-monomers, additional competitive blocking primer, have been developed. They allow determination of point mutation type and susceptibility or resistance of mycobacteria tuberculosis to antituberculosis drug of the first line isoniazid. Typing of circulating in Ukraine bovine leukemia virus (BLV) was performed. From results of RFLP-analysis and sequencing the belonging of Ukrainian BLV isolate to Australian subspecies (one of three known subspecies of this pathogen) was determined. Primer system for detection of proviral DNA of bovine immunodeficiency virus has been developed.