

ДИАГНОСТИКА ИЗМЕНЕННЫХ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

М. В. Кучвальский, Е. И. Якобсон

*Белорусский государственный университет, г. Минск;
kuchvalskimv@gmail.com, bio.yakobsonEI@bsu.by;
науч. рук. – А.П. Лысенко, д-р вет. наук, проф.*

Туберкулез до сих пор является опаснейшим заболеванием для человечества. Четверть населения Земли инфицированы микобактериями туберкулеза без явных признаков заболевания. Агентом латентной туберкулезной инфекции являются измененные формы микобактерий. Их диагностика остается актуальной задачей. Для выполнения данной работы смоделирована трансформация микобактерий туберкулеза из типичных в измененные формы. Впервые сравнена чувствительность полимеразной цепной реакции для упомянутых форм микобактерий. Показано, что сорбционные методы выделения ДНК работают менее эффективно с измененными формами микобактерий туберкулеза, чем с типичными. Также при работе с измененными формами выявлены обрывы синтеза цепи ДНК и менее интенсивная ультрафиолетовая люминисценция ампликонов в агарозном геле с бромистым этидием. Для однозначной детекции этих форм микобактерий необходимо использовать метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с праймерами к относительно (до 200 пар нуклеотидов) коротким локусам, специфичным для рода *Mycobacterium*.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, измененные формы микобактерий; дефектная клеточная стенка; полимеразная цепная реакция.

ВВЕДЕНИЕ

Микобактерии туберкулеза (МБТ) при воздействии стрессовых факторов окружающей среды образуют непатогенные формы с дефектной клеточной стенкой [1, 2]. Они «избегают» иммунного ответа хозяина, персистируют внутри организма и могут ревертировать в патогенные микобактерии (типичные формы), вызывая активную форму туберкулеза у человека или крупного рогатого скота [3, 4]. Измененные формы трудно обнаружить традиционными методами диагностики микобактерий [5]. Маркером латентной туберкулезной инфекции служат измененные формы микобактерий, выделяемые из биологических образцов на специальных питательных средах [6].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали штаммы *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv и *Mycobacterium bovis* 8 из коллекции РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». 1 мг бактериальной массы каждого штамма суспендировали в пробирках типа «Эппендорф» по 1 мл с опытным раствором агента, вызывающего трансформацию МБТ, и поместили в термостат при 37 °С. Через 2 суток суспензии посеяли на специальную питательную среду МусСел DW. В результате микобактерии трансформировались в измененные формы.

Для выделения ДНК использовали наборы: Instagene™ (Bio-Rad, США), ДНК-ВК (Институт биоорганической химии НАН Беларуси), РИБО-преп (AmpliSens®, РФ) и РИБО-сорб (AmpliSens®, РФ). Концентрацию выделенной ДНК определяли на Implen Nanophotometer P-Class. ПЦР проводили с праймерами к локусам, специфичным для рода *Mycobacterium* (условия проведения реакции приведены в таблице 1).

Таблица 1

Условия проведения полимеразной цепной реакции

Температура и время этапа (в минутах)	Локусы		
	ген 16S рРНК (1020 п.н.)		IS6110 (71 п.н.), gyrB (137 п.н.)
Первичная денатурация	94 °С 5:00	-	95 °С 10:00
Денатурация	94 °С 0:30	94 °С 0:30	94 °С 0:30
Отжиг	55 °С 0:30	68 °С 0:30	-
Элонгация	68 °С 0:30	72 °С 0:30	54 °С 1:30
Финальная элонгация	-	72 °С 10:00	98 °С 10:00
Циклы	1–10	11–40	40
Праймеры: прямой, обратный	TGCACACAGGCCACAAGGGA GAGAGTTTGATCCCTGGCTCAG		IS6110: GGCGTACTCGACCTGAAAGA CTGAACCGGATCGATGTGTA gyrB: AAGGACCGCAAGCTACTGAA GTGTTGCCCAACTTGGTCTT

Электрофорез проводили в 1,7% агарозном геле с использованием буфера составом (приведен 50-кратный концентрат): 2 М трис-

гидроксиметиламинометан, 1,56 М СН₃СООН, 0,05 М
этилендиаминтетрауксусная кислота, вода, рН 8,4.

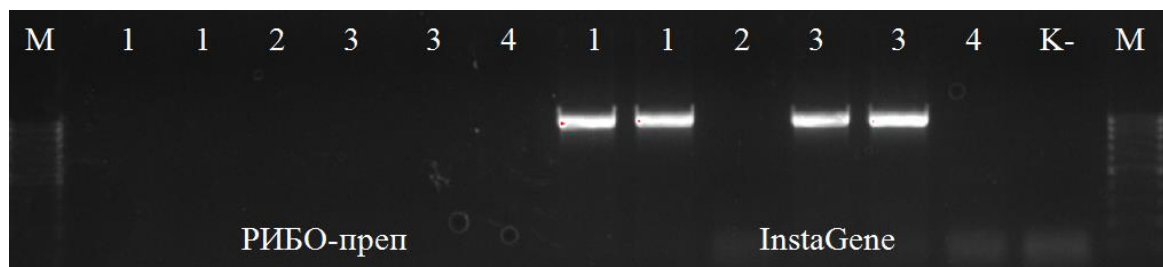
РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сорбционная экстракция оказалась менее эффективной для выделения ДНК измененных форм МБТ (таблица 2, рисунок).

Таблица 2

Измерение концентрации выделенной ДНК на Implen Nanophotometer P-Class

Исследуемый штамм, набор для выделения	Концентрация ДНК, нг/мл	A260/A280	A260/A230
<i>M. tuberculosis</i> бациллярный, РИБО-сорб	81,5	1,495	0,399
<i>M. tuberculosis</i> CWD, РИБО-сорб	9,0	1,800	0,514
<i>M. bovis</i> бациллярный, РИБО-сорб	36,0	1,200	0,145
<i>M. bovis</i> CWD, РИБО-сорб	10,5	1,050	1,105
<i>M. tuberculosis</i> бациллярный, InstaGene	78,0	0,609	0,131
<i>M. tuberculosis</i> CWD, InstaGene	67,0	1,252	0,453
<i>M. bovis</i> бациллярный, InstaGene	71,0	0,664	0,141
<i>M. bovis</i> CWD, InstaGene	77,5	1,325	0,464



Результаты электрофореза ампликонов ПЦР с праймерами к локусу 16S РНК
Номера проб: 1 – *M. tuberculosis* бациллярный, 2 – *M. tuberculosis* CWD, 3 –
M. bovis бациллярный, 4 – *M. bovis* CWD, К- – отрицательный контроль. В
крайние лунки добавлен маркер молекулярного веса М100 (Праймтех). ДНК для
амплификации выделяли наборами:

РИБО-сорб (левая половина геля), InstaGene (правая половина геля)

ПЦР-диагностика с использованием праймеров к коротким локусам
позволила обнаружить измененные формы МБТ (таблица 3).

Вместе с тем, ПЦР-диагностика микобактерий может быть
затруднена в результате их трансформирования. В частности,
результаты ПЦР с использованием праймеров к длинным участкам ДНК
неоднозначны и требуют дальнейших исследований. Вероятно, что есть
связь между трансформацией и структурой матрицы ДНК. Наши

исследования показывают, что наиболее вероятен обрыв синтеза цепи ДНК.

Таблица 3

Пороги циклов амплификации в ПЦР в режиме реального времени

Проба	Локусы	
	<i>IS6110</i>	<i>gyrB</i>
<i>M. tuberculosis</i> бациллярный	31	30,54
<i>M. tuberculosis</i> CWD	32,29	32,99
<i>M. bovis</i> бациллярный	18,46	18,89
<i>M. bovis</i> CWD	30	30,02
отрицательный контроль	не обнаружено	не обнаружено

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

- 1) при выделении ДНК измененных форм микобактерий методы сорбционной экстракции показывают низкую эффективность;
- 2) при ПЦР-диагностике измененных форм микобактерий туберкулеза наилучший выход продукта происходит при использовании праймеров к коротким целевым участкам ДНК (*IS6110*, *gyrB*).

Библиографические ссылки

1. Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм / *А.П. Лысенко* [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. 2019. Т. 1. № 1. С. 33–45.
2. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / *А.Э. Высоцкий* [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. 2019. № 2. С. 26–35.
3. Возможная роль туберкулезной инфекции в возникновении опухолей / *А.П. Лысенко* [и др.] // Экология и животный мир. 2020. № 1. С. 53–69.
4. Трансплацентарная передача туберкулезной инфекции у коров, зараженных *Mycobacterium bovis* / *А.П. Лысенко* [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. 2021. № 2. С. 18–25.
5. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / *А.П. Лысенко* [и др.] // Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Международной заочной научно-практической конференции, Ростов-на-Дону, 24 марта 2014 г. / РостГМУ; редкол.: Т.Н. Ильин (отв. ред.) [и др.]. Ростов-на-Дону, 2014. С. 176–198.
6. *Кучвальский, М.В.* Микобактерии туберкулеза образуют некислотоустойчивые формы на упрощенных питательных средах при стимуляции роста // 78-я научная конференция студентов и аспирантов Белорусского государственного университета: материалы конф., Минск, 10–21 мая 2021 г.: в 3 ч. / Белорус. гос. ун-т; редкол.: В. Г. Сафонов (гл. ред.) [и др.]. Минск, 2021. Ч. 1. С. 258–262.