

О.Ю. ЛИМАНСЬКА^{1,2}, О.П. ЛИМАНСЬКИЙ¹¹ ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова
НАМН України», Харків

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

² Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини», Харків

МОЛЕКУЛЯРНІ ТЕХНОЛОГІЇ В ДЕТЕКЦІЇ ЧУТЛИВИХ ТА СТІЙКИХ ДО ІЗОНІАЗИДУ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ



Розроблено два варіанти детекції однонуклеотидних поліморфізмів у кодоні 315 гена katG мікобактерій туберкульозу (МТБ), мутації в якому асоційовані з резистентністю до ізоніазиду – протитуберкульозного препарату першого ряду. Два набори праймерів, кожний з яких містить додатковий конкурентний блокуючий праймер з 3'-термінальною фосфатною групою (для елімінації неспецифічної ампліфікації), дозволяють у кодоні 315 гена katG виявляти точкові мутації AGC→ACC та AGC→AGA, що найчастіше зустрічаються. Проведення ПЛР з набором із двох праймерів, один з яких містить п'ять LNA-мономерів, дозволяє встановити наявність будь-якого з шести відомих варіантів мутацій у кодоні 315 гена katG, тобто диференціювати чутливі та резистентні до ізоніазиду МТБ. Чистоту та будову праймерів довжиною 17 нуклеотидів, що містять LNA-модифіковані нуклеотиди, охарактеризовано часопротібною мас-спектрометрією з матрично-активованою лазерною десорбцією/іонізацією, а 17-мірний дуплекс, утворений двома комплементарними олігонуклеотидами з LNA-мономерами, – методом термічної денатурації. Створені молекулярно-генетичні тест-системи для виявлення ізолятів дикого типу та резистентних МТБ до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду можуть застосовуватися у клінічних лабораторіях зі стандартним ПЛР-обладнанням та дозволяють скоротити визначення резистентності МТБ до ізоніазиду з 1–3 місяців стандартними бактеріологічними методами до 1–3 днів шляхом ПЛР.

© О.Ю. ЛИМАНСЬКА, О.П. ЛИМАНСЬКИЙ, 2011

Вступ. Інфекційні хвороби продовжують являти серйозну загрозу людству: серед 51 млн людей, які щорічно вмирають у світі, майже 17 млн гинуть від інфекційних та паразитарних хвороб [1]. На особливу увагу заслуговує туберкульоз (ТБ), який, як і раніше, залишається однією з актуальних проблем охорони здоров'я в усьому світі. Згідно з даними ВООЗ за 2009 р. [2], незважаючи на те, що тільки у невеликої частини інфікованих людей розвивається активна форма захворювання, загальна середньорічна смертність, обумовлена туберкульозом, становить близько 2 млн випадків, а у 2007 р. в усьому світі сталося 9,27 млн випадків захворювання на ТБ. У той же час в роботі Сергієва та ін. [1] підкреслюється, що кількість хворих на туберкульоз явно недо враховується. Відповідно до експертних оцінок загальна кількість хворих становить близько 1,3 млрд.

В Україні, як і у більшості країн СНД (табл. 1), показники захворюваності та смертності від туберкульозу у декілька разів перевищують вказані значення для країн Західної Європи (база даних Європейського регіонального комітету ВООЗ, <http://data.euro.who.int/hfad/>). Україна разом з іншими країнами СНД належить до числа країн з високими рівнями захворюваності на туберкульоз (87,5 на 100 тис. населення – 2006 р., 89,7 на 100 тис. населення – 2007 р.) та смертності (21,4 на 100 тис. населення – 2004 р.) (<http://data.euro.who.int/hfad/>).

Поряд з ростом захворюваності на туберкульоз не менш глобальною проблемою є широке розповсюдження мультирезистентних штамів мікобактерій туберкульозу (МТБ). Основним вирішенням проблеми контролю розповсюдження стійких до ліків форм захворювання є їхня своєчасна детекція на ранніх стадіях захворювання, яка дозволить контролювати поширення конкретного штаму та коригувати схему хіміотерапії для кожного хворого. Існує ряд традиційних класичних (як прямих, так і непрямих) методів визначення резистентності мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, затверджених ВООЗ. При цьому визначення спектра лікарської стійкості мікобактерій туберкульозу займає від 1 до 3 місяців, протягом яких первинним хворим призначають курс

терапії стандартними протитуберкульозними препаратами першого ряду. Оскільки резистентність клінічних ізолятів МТБ до призначених препаратів впродовж цього періоду залишається нез'ясованою, існує вірогідність, що прийом препаратів виявиться неефективним. Швидке визначення стійкості та особливо множинної лікарської стійкості МТБ є надзвичайно важливим для вибору ефективної методики протитуберкульозної терапії. Вирішення даної проблеми уявляється можливим на рівні генотипу, що дозволить скоротити час проведення відповідного аналізу до 1–3 днів.

На сьогодні в літературі описано безліч молекулярно-біологічних методів для детекції стійких штамів МТБ [3–6]. Дослідження молекулярних механізмів резистентності показали, що стійкість МТБ до того чи іншого препарату обумовлена поодинокими мутаціями в певних генах. Для виявлення таких точкових мутацій, або одонуклеотидних поліморфізмів, можливе використання різних варіантів ПЛР, а саме: з використанням праймера, що має некомплементарний по відношенню до ДНК-матриці дикого типу нуклеотид на 3'-кінці [7]; з використанням

додаткового праймера з блокованим 3'-кінцем [8]; з використанням LNA-модифікованого праймера (LNA – locked nucleic acid, або замкнена нуклеїнова кислота) [9]; нарешті, з використанням додаткового конкурентного LNA-модифікованого олігонуклеотида, що передбачає застосування Stoffel фрагмента Taq ДНК-полімерази (мутантної форми ДНК-полімерази (ДНКП), у якій відсутня 5' → 3' екзонуклеазна активність) [10] (рис. 1).

Відомо, що найвагоміший внесок у розвиток резистентності МТБ до протитуберкульозних препаратів поряд з резистентністю до стрептоміцину вносить резистентність до ізоніазиду (ІЗН), яка обумовлена в основному мутаціями, локалізованими в кодоні 315 гена *katG*, що кодує синтез каталази-пероксидази. Резистентність до ІЗН асоційована з мутаціями в кодоні 315 з ймовірністю 50 – понад 90 % [11, 12].

Сучасна стратегія детекції та типування патогенів людини і тварин полягає у розробці технологій, заснованих на молекулярно-генетичному аналізі з використанням полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) та її модифікацій, а також явища ДНК-поліморфізму. На ринку молекулярно-генетич-

Таблиця 1

Кількість оцінених випадків туберкульозу (ТБ) з множинною лікарською стійкістю (N, МЛС) у 2007 р. в країнах СНД, випадків ТБ з МЛС, про які повідомлено (К) за 2007 р., а також очікуване число випадків, в яких передбачалось проведення курсу хіміотерапії (Р) у 2008 та 2009 рр.

Країна	Кількість оцінених випадків у 2007 р.			Повідомлено		Очікувана кількість випадків проведення хіміотерапії, Р	
	%	N	SS+	К, 2007 р.	SS+, 2007 р.	2008 р.	2009 р.
Росія	21	42 969	31 397	5 297	17	4 221	9 897
Україна *	19	9 835	5 568	–	–	–	–
Узбекистан	24	9 450	6 936	484	7	334	720
Республіка Молдова	29	2 231	1 656	896	54	466	490
Білорусія	16	1 101	758	870	115	–	–
Таджикистан *	23	4 688	3 286	–	–	–	–
Киргизстан	17	1 290	813	322	40	–	–
Вірменія	17	486	373	123	33	–	–

Примітка. SS+ – випадки з позитивним аналізом мокроти; «–» – інформацію не надано. * Країни, які не надали даних щодо випадків ТБ з МЛС та про передбачувану хіміотерапію.

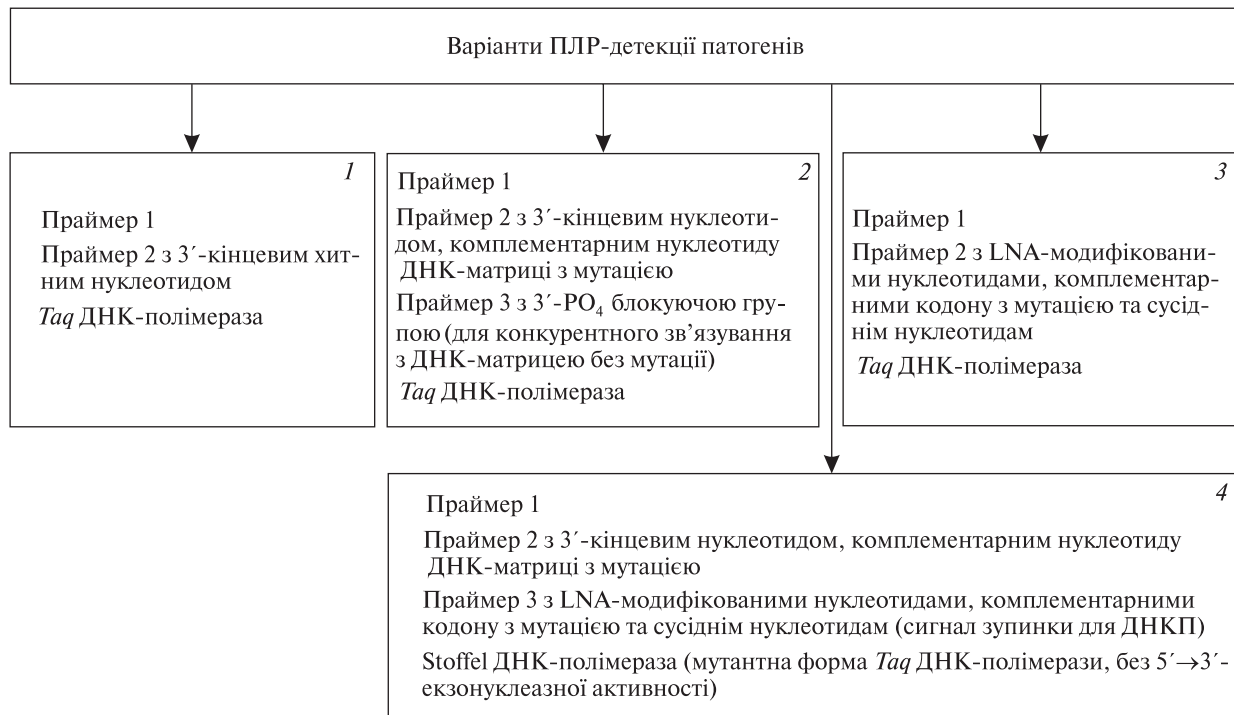


Рис. 1. Схема можливих модифікацій ПЛР-аналізу для детекції ізолятів мікобактерій туберкульозу дикого та мутантного (резистентного до ізоніазиду) типів. Методи 1–3 використовували в даній роботі

ної продукції постійно з'являються нові методи детекції точкових мутацій (в основному для ПЛР у реальному часі). Кожний з цих методів має як певні переваги, так і деякі недоліки.

Приймаючи до уваги літературні дані щодо порівняльного аналізу різних модифікацій ПЛР [13], а також враховуючи, що більшість клінічних лабораторій мають стандартне ПЛР-обладнання, у даній роботі розроблено два варіанти молекулярно-генетичних тест-систем для детекції мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ. У першому варіанті детекцію точкових мутацій в гені *katG* МТБ проводили на основі використання праймерів, що містять LNA-модифіковані нуклеотиди. Другий варіант шляхом проведення ПЛР з додатковим конкурентним блокуючим праймером з 3'-термінальною фосфатною групою дозволяє визначати у кодоні 315 гена *katG* тип точкових мутацій AGC→ACC та AGC→AGA, що найчастіше зустрічаються.

Праймери з LNA-модифікованими мономераами охарактеризовано методом часопролітної мас-спектрометрії з матрично-акти-

вованою лазерною десорбцією/іонізацією, а утворений ними дуплекс – методом термічної денатурації. Розроблені нами молекулярно-генетичні набори з використанням LNA-модифікованих праймерів дозволяють за допомогою постановки однієї реакції встановити наявність будь-якого з шести можливих варіантів мутацій у кодоні 315 гена *katG*, а отже, диференціювати чутливі та резистентні МТБ до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду відповідно.

Матеріали і методи. *Проведення ПЛР.* Для комп'ютерного аналізу використовували секвеновані нуклеотидні послідовності гена *katG* хромосомної ДНК 62 ізолятів дикого типу та резистентних до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду МТБ з бази даних GenBank. Множинне вирівнювання та наступний статистичний аналіз проводили за допомогою пакета прикладних програм GeneBee [14].

Для перевірки розроблених наборів праймерів для детекції ізолятів дикого типу та мутантних (резистентних до ізоніазиду) МТБ

використовували ДНК, екстраговану з 43 ізолятів МТБ дикого типу (WT) та мутантних (MT), що містять точкові мутації в кодоні 315 гена *katG*. Тестування наборів праймерів проводили на ДНК ізолятів МТБ з точковими мутаціями AGC→ACC, AGC→ACG та AGC→AGA у кодоні 315 гена *katG*, що характеризувалися рівнем резистентності до ізоніазиду 1–25 мкг/мкл. Колекцію ДНК МТБ люб'язно надано д-ром В.М. Степаншиною (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, РФ). Геному ДНК виділяли методом фенол-хлороформної екстракції.

Для перевірки наборів праймерів Mykat4 – Mykat5 – Mykat5P та Mykat4 – Mykat9 – Mykat9P, проведення ПЛР з якими дозволяє визначати варіанти точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ AGC→ACC та AGC→AGA відповідно, використовували три ДНК-матриці: ДНК *M. tuberculosis* штаму H385, що містить мутацію AGC→AGA у кодоні 315 гена *katG*; ДНК *M. tuberculosis* штаму H125 з мутацією AGC→ACC; ДНК *M. tuberculosis* штаму H37Rv, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 містить послідовність AGC).

Праймери з відповідними позиціями на гені *katG*, повна послідовність якого становить 2223 п.н.

L7 (739–762)	5'-gacattcgcgagacgtttcggcgc-3'
L8 ^{LNA} (952–936)	5'-cgatgcCGCTGgtgatc-3' (виділено LNA-мономери)
Mykat4 (739–758)	5'-gacattcgcgagacgtttcgc-3'
Mykat5 (962–944)	5'-catacgcacctcgatgccgg-3'
Mykat5P (962–944)	5'-catacgcacctcgatgccgc-3'-PO ₄
Mykat9 (962–943)	5'-tccatacgcacctcgatgcct-3'
Mykat9P (962–943)	5'-tccatacgcacctcgatgccg-3'-PO ₄
Mykat10 (895–918)	5'-ggctggttcagctcgatggacc-3'
Mykat11 (1045–1023)	5'-cagcaggctcttcgctcagctcc-3'

ПЛР проводили з використанням сухого набору реагентів для ампліфікації ДНК («Ізоген», РФ) в об'ємі реакційної суміші 20–50 мкл, що містила 4 мМ NaCl, 50 мМ KCl, 12 мМ трис-HCl (pH 8,0), 2,5 мМ MgCl₂, 200 мкМ дезоксинуклеотидів, 0,1–0,5 мкМ кожного праймера, 1 од. *Taq* ДНК-полімерази, інгібованої антитілами, що дає можливість постановки ПЛР з гарячим стар-

том. Синтезовані та очищені шляхом електрофорезу в ПААГ праймери одержано від компанії «Синтол» (РФ). LNA-модифіковані праймери («Синтол», РФ) містили по п'ять LNA-нуклеотидів виробництва фірми «Exiqon» (Данія; <http://www.exiqon.com/lna-technology>).

Стандартну ПЛР проводили на ампліфікаторі НВО «Точність» (Тула, РФ) за наступних температурних та часових параметрів: початкова інкубація – 95 °С, 4 хв; денатурація – 95 °С, 40 с; відпал – 58–71 °С, 60 с; синтез – 70–74 °С, 60 с; кількість циклів – 38–45. Температуру відпалу праймерів (T_{ан}) оптимізували шляхом постановки ряду реакцій при збільшенні температури з кроком 2–0,5 °С до повної елімінації смуги неспецифічного амплікона. Для ампліфікації використовували 0,05 мкг геномної ДНК мікобактерій туберкульозу. Для візуалізації ампліконів 10–20 мкл ПЛР-продукту розділяли за допомогою електрофорезу в 1,5–2%-ному агарозному гелі, що містив етидій бромистий за напруженості поля 10 В/см.

Температуру плавлення комплексу олігонуклеотид з LNA-мономерами – одониткова ДНК розраховували за допомогою програми, що є у вільному доступі на сайті <http://lna-tm.com>, а термодинамічний аналіз праймерів та ампліконів – за допомогою програми MeltCalc [15].

МАЛДІ-мас-спектрометрія олігонуклеотидів. Характеризацію LNA-модифікованих олігонуклеотидів проводили методом часопролітної мас-спектрометрії з матрично-активованою лазерною десорбцією та іонізацією (МАЛДІ). Принцип методу полягає в іонізації біоорганічних молекул, при якому коротким потужним імпульсом лазера випаровуються та іонізуються молекули підкладинки-матриці, які захоплюють молекули, що досліджуються, передаючи їм електричний заряд для подальшого їхнього розгону в електричному полі. В часопролітній МАЛДІ-мас-спектрометрії використовують часопролітний детектор, принцип дії якого базується на фіксації різниці часу досягнення сенсора іонами різної маси.

Аліквоти олігонуклеотидів (0,5 мкл), очищених за допомогою електрофорезу в ПААГ,

наносили на матричні кристали, отримані шляхом висушування водного матричного розчину, що містить 3-гідроксипіколінову кислоту (50 мг/мл) та цитрат амонію (2 мг/мл), на мішені з нержавіючої сталі. Мішень висушували за кімнатної температури до повного випаровування розчинників та поміщали у джерело часопротітного мас-спектрометра Autoflex II (Bruker Daltonics Inc., Німеччина), обладнаного азотним лазером, що дозволяє проводити імпульсне добування іонів. Мас-спектри олігонуклеотидів отримано у режимі реєстрації позитивних іонів. Іонізацію зразків проводили УФ-лазером з довжиною хвилі 337 нм у імпульсному режимі, тривалістю імпульсу 3 нс та частотою 20 Гц. Використовували час затримки екстракції іонів 30 нс. Позитивно заряджені іони детектували у режимі роботи рефлектрону. Для отримання результативного мас-спектра здійснювали підсумовування та усереднення 100 індивідуальних спектрів.

УФ-спектроскопія олігонуклеотидних дуплексів. Для характеристики олігонуклеотидних дуплексів, що містили по п'ять комплементарних LNA-модифікованих нуклеотидів, використовували термічну денатурацію з реєстрацією оптичної щільності за типового значення довжини хвилі 260 нм. УФ-спектроскопічні дослідження проводили на спектрофотометрі Specord M40 («Carl Zeiss Jena», Німеччина), що містив термостатовану камеру. Оптичну щільність реєстрували з кроком зміни температури 0,05 °C за швидкості нагріву 0,5 °C/хв. Плавлення проводили в 10^{-3} М, 10^{-2} М та $5 \cdot 10^{-2}$ М натрій-какодилатному буфері (рН 7,0) за концентрації ДНК 20–30 пкмоль/мкл. Диференційні профілі плавлення отримували через диференціювання інтегрального профілю плавлення за допомогою програми Origin (версія 7.0, США).

Результати досліджень та їх обговорення. У роботі використано дві технології детекції точкових мутацій: 1) алель-специфічну ПЛР з конкурентним блокуючим праймером; 2) стандартну ПЛР з використанням LNA-модифікованих праймерів для диференціації чутливих та резистентних до ізоніазиду

міко-бактерій туберкульозу. Для проведення алель-специфічної ПЛР один або обидва праймери конструюють таким чином, що вони відпаляються на сайтах з точковими мутаціями. В ідеалі, комплементарний специфічній послідовності праймер веде до ампліфікації тільки одного варіанта, але на практиці відбувається значна ампліфікація варіантів із відпадом праймерів з мішенями, що містять некомплементарні нуклеотиди.

При розробці наборів праймерів на першому етапі проводили аналіз повновимірного гена *katG* та його фрагментів ізолятів МТБ з бази даних секвенованих нуклеотидних послідовностей GenBank. Комп'ютерний аналіз гена *katG* хромосомної ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів МТБ з варіантами типових точкових мутацій показав, що мутацію в кодоні 315 можна використовувати для детекції як мутантних (резистентних до ізоніазиду), так і ізолятів дикого типу МТБ.

Метод алель-специфічної ПЛР, в основі якого лежить використання алель-специфічних праймерів та блокуючого олігонуклеотида, передбачає наявність, крім пари звичайних праймерів, додаткового конкурентного олігонуклеотида, послідовність якого є комплементарною до дикого типу ДНК та містить сайт потенційної мутації (рис. 2, а). Конкурентний олігонуклеотид блокований на 3'-кінці так, що подальша елонгація немутантного ланцюга за допомогою ДНК-полімерази стає неможливою, а спостерігається тільки селективна ампліфікація мутантної ДНК. Використовуючи цей варіант ПЛР для детекції резистентних до ізоніазиду мікобактерій туберкульозу, блокування синтезу ДНКП здійснювали за допомогою праймера, що містив на 3'-кінці фосфатну групу, яка призводила до термінації синтезу ДНКП.

У роботі створено два набори праймерів – Мукат4–Мукат5–Мукат5Р та Мукат4–Мукат9–Мукат9Р з використанням нуклеотида з приєднаною PO_4 -групою на 3'-кінці, проведення ПЛР з якими дозволяє визначати тип точкових мутацій $AGC \rightarrow ACC$ (рис. 2, в) та $AGC \rightarrow ACA$, $AGC \rightarrow AGA$ відповідно.

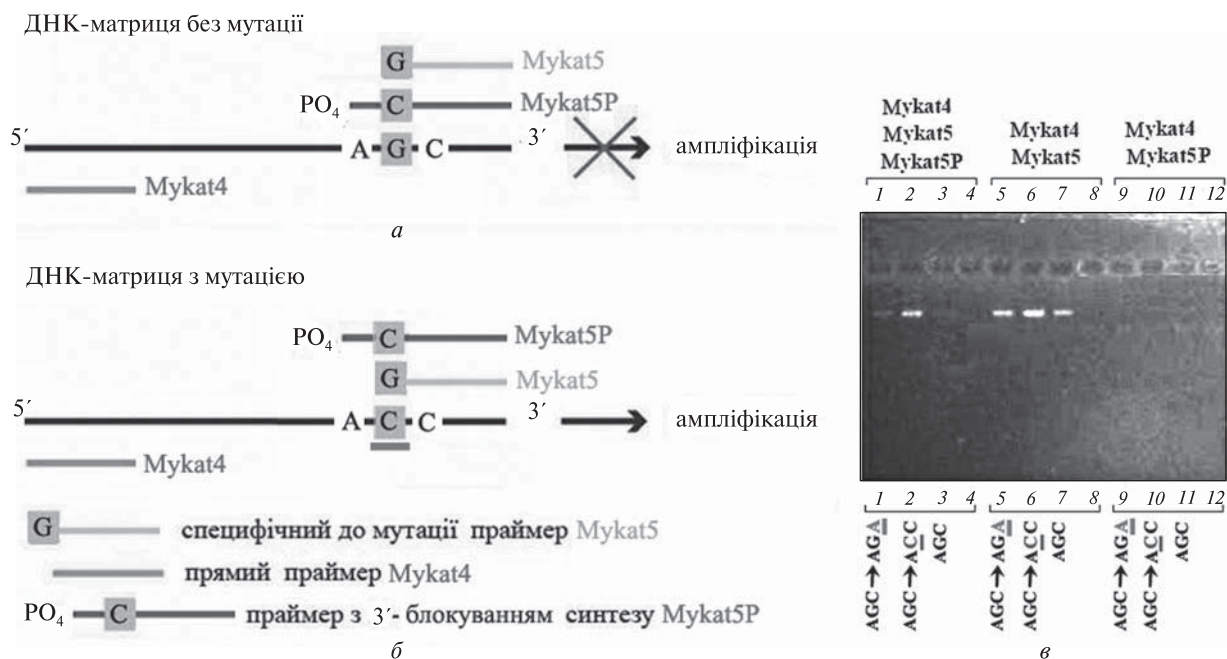


Рис. 2. Схема алель-специфічної ПЛР для визначення точкової мутації: AGC→ACC в кодоні 315 гена *katG* з використанням додаткового блокуючого конкурентного зворотного праймера з 3'-термінальною фосфатною групою (для елімінації ампліфікації ДНК алеля дикого типу). 3'-кінцевий нуклеотид специфічного до мутації праймера Mykat5 є комплементарним (а) та некомплементарним (б) до нуклеотида у другій позиції кодону 315; в – детекція точкової мутації AGC→ACC у кодоні 315 гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу, асоційованої з резистентністю до ізоніазиду, після проведення полімеразної ланцюгової реакції з набором праймерів Mykat4–Mykat5–Mykat5P та електрофорезу в 2%-ному агарозному гелі; 1, 5, 9 – ДНК *M. tuberculosis* штаму H3785, що містить мутацію AGC→AGA; 2, 6, 10 – ДНК *M. tuberculosis* штаму H125, що містить мутацію AGC→ACC; 3, 7, 11 – ДНК *M. tuberculosis* штаму H37Rv, негативний контроль ампліфікації (кодон 315 – AGC); 4, 8, 12 – вода, негативний контроль ампліфікації. За умови вибору оптимальної температури відпалу набір праймерів Mykat4–Mykat5–Mykat5P дозволяє диференціювати мутацію AGC→ACC (доріжка 2) від мутації AGC→AGA (доріжка 1) та послідовності AGC у кодоні 315 гена *katG* ДНК мікобактерій (доріжка 3). Підкреслено позиції точкових мутацій

Про те, що конкурентний праймер Mykat5P дійсно блокує синтез ДНКП, свідчить відсутність амплікона при проведенні ампліфікації з цим праймером та праймером Mykat4 (рис. 2, в). Відсутність блокуючого праймера Mykat5P призводила до неселективної ампліфікації фрагментів ДНК мікобактерій туберкульозу як дикого типу, так і тих, щомістять різні можливі мутації в кодоні 315 гена *katG* (доріжки 5 та 7, рис. 2, в). Введення блокуючого праймера призводило тільки до синтезу амплікона, що містить мутацію AGC → ACC (доріжка 2, рис. 2, в), та до неможливості ампліфікації неспецифічних фрагментів. Аналогічні результати отримано для набору

праймерів Mykat4–Mykat9–Mykat9P, який дозволяє визначати мутацію AGC → AGA у кодоні 315 гена *katG* (результати не показано).

Алель-специфічна ПЛР з LNA-модифікованими праймерами основана на тому, що температура плавлення (а отже, і температура відпалу) комплексу праймер – одониткова ДНК-матриця для мутантного типу нижче температури плавлення досконалого дуплекса. Це означає, що за наявності точкової мутації у сайті, що містить LNA-нуклеотид, комплекс праймер – одониткова ДНК-матриця буде мати більш низьку температуру плавлення (T_m) порівняно з досконалим дуплексом.

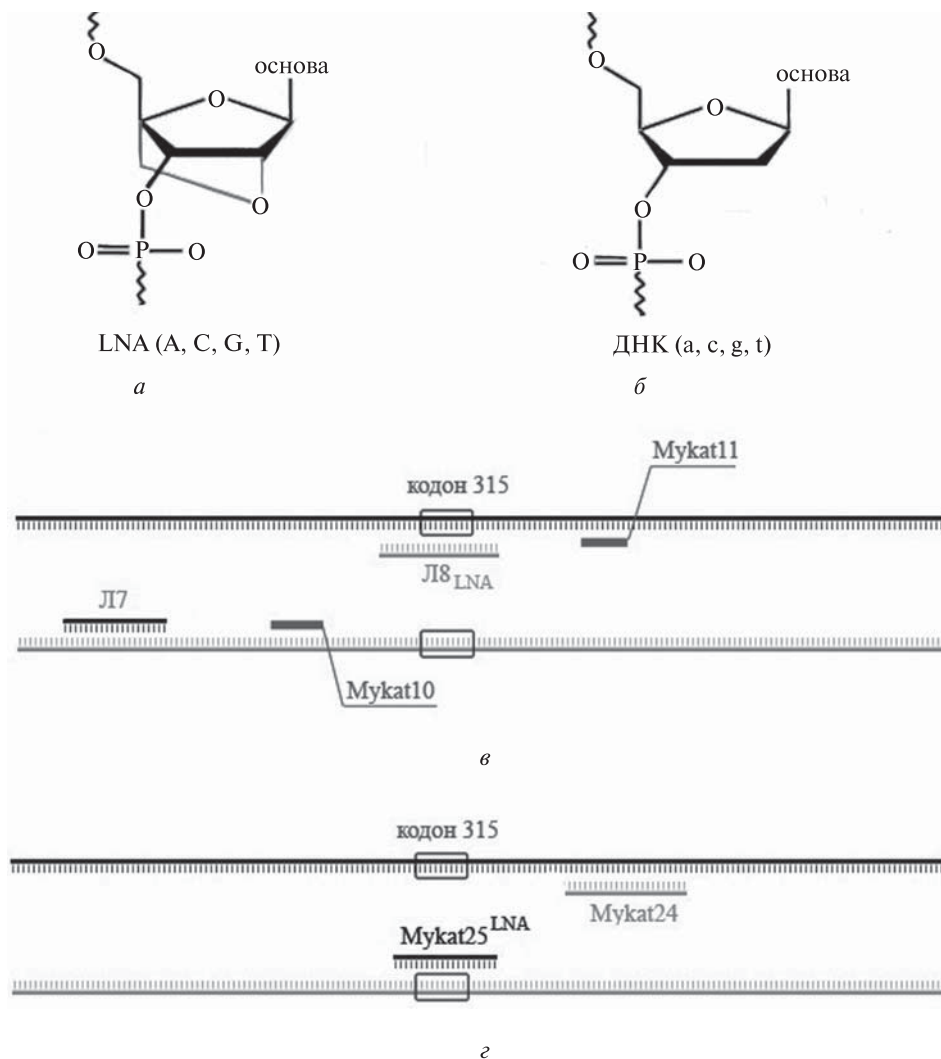


Рис. 3. Locked nucleic acid, або замкнена нуклеїнова кислота (ЗНК), хімічний аналог мономера ДНК (а), який може заміщувати нуклеотиди у послідовностях ДНК та РНК (б). Локалізація праймерів на гені *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу відносно кодона 315, мутації в якому зчеплені з резистентністю до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду. Набори праймерів Л7–Л8^{LNA} та Mykat24–Mykat25^{LNA} дозволяють ампліфікувати фрагменти гена *katG*, що містить кодон 315, довжиною 214 та 110 п.н. Праймери Л8^{LNA} та Mykat25^{LNA} містять по п'ять LNA-модифікованих нуклеотидів, два з яких фланкують, а три є комплементарними до «+»-нитки (с) та «-»-нитки (д) в ділянці кодона 315 гена *katG*. Набір праймерів Mykat10–Mykat11 використано як маркер молекулярної маси для ампліфікації фрагмента довжиною 151 п.н., що містить кодон 315

Стосовно мікобактерій туберкульозу молекули ДНК ізолятів дикого типу є доскональними дуплексами, а ДНК резистентних до ізоніазиду ізолятів характеризується наявністю мутацій у кодоні 315 гена *katG*, та, отже, має більш низьку температуру плавлення. Важливо зазначити, що величина

зміни T_m комплексу LNA-праймер – ДНК-матриця за наявності одонуклеотидного поліморфізму залежить як від кількості LNA-мономерів, так і від довжини праймера.

Введення LNA-нуклеотидів дозволяє збільшити дискримінуючу потужність праймера. В LNA-модифікованих праймерах деякі

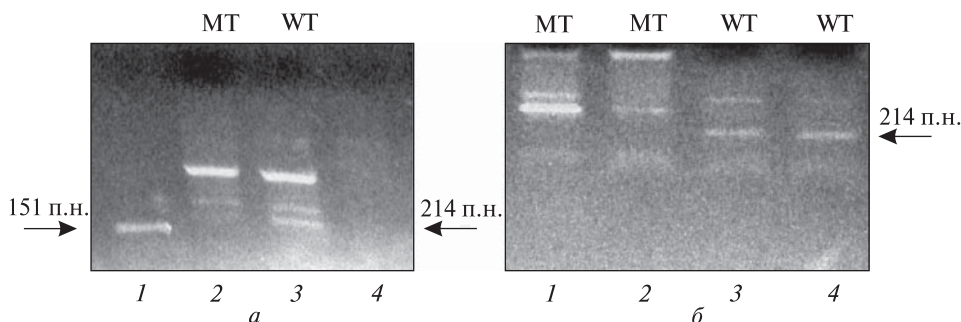


Рис. 4. Детекція продуктів ампліфікації фрагмента гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу дикого типу (WT) та резистентних (з мутацією в кодоні 315 гена *katG*) до ізоніазиду (MT) після проведення ПЛР з набором праймерів Л7–Л8^{LNA} та електрофорезу в 1,5%-ному агарозному гелі. Л8^{LNA} – модифікований праймер, що містить LNA-нуклеотиди: *a* – температура відпалу T_{an} становить 66 °С; 1 – маркер молекулярної маси – фрагмент довжиною 151 п.н., що містить кодон 315, після ампліфікації з набором праймерів Мукат10–Мукат11; 2, 3 – ампліфікація з набором праймерів Л7–Л8^{LNA}, мутантних за кодоном 315 гена *katG* ДНК мікобактерій туберкульозу (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* – температура відпалу T_{an} становить 71 °С. 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)

нуклеотиди заміщені LNA-мономерами – аналогами нуклеотидів, що містять метиленовий місток 2'-О,4'-С (рис. 3), який обмежує конформаційну гнучкість дезоксирибозного кільця та переводить мономер у жорстку структуру. Це призводить до посилення гібридизації нитки, що містить LNA-мономери, з комплементарною ниткою дуплекса. Вбудовування LNA-нуклеотидів значно збільшує термічну стабільність дуплекса порівняно з немодифікованою ДНК. Для 20-членного дуплекса введення одного додаткового LNA-мономера призводить до збільшення T_m на ~ 1 °С. Тому для збільшення дискримінуючої потужності праймера, з одного боку, вміст LNA-мономерів повинен бути відносно високим. З іншого боку, збільшення довжини праймера (для підвищення специфічності) веде до зменшення відносного внеску LNA-мономера (при збереженні їхньої кількості) та, отже, до зменшення дискримінуючої потужності праймера.

У даній роботі для детекції точкових мутацій, або однонуклеотидних поліморфізмів, у кодоні 315 гена *katG* МТБ розроблено два набори праймерів (Л7–Л8^{LNA} та Мукат24–Мукат25^{LNA}), кожний з яких містить по одному LNA-модифікованому прай-

меру. Обидва ці LNA-модифіковані праймери (Мукат25^{LNA} та Л8^{LNA}) довжиною 17 нуклеотидів (н.) містять по п'ять LNA-мономерів, причому три LNA-мономери кожного праймера є комплементарними до кодона 315 гена *katG*, а два інших фланкують вказаний кодон. Принциповою різницею цих наборів праймерів є локалізація LNA-модифікованого праймера – в одному наборі (Л7–Л8^{LNA}) LNA-праймер комплементарний до «+»-нитки ДНК (рис. 3, в), а в іншому (Мукат24–Мукат25^{LNA}) – до «-»-нитки ДНК (рис. 3, г).

Аналіз ПЛР-продуктів ампліфікації показує, що набір праймерів Л7–Л8^{LNA} дозволяє ампліфікувати фрагмент гена *katG* очікуваної довжини 214 п.н. при температурах відпалу (T_{an}), які становили 66 °С (доріжка 3, рис. 4, а) та 71 °С (доріжки 3, 4, рис. 4, б). Аналіз ПЛР-продуктів ампліфікації ДНК МТБ за низької температури відпалу показує, що обидва набори праймерів дозволяють ампліфікувати фрагмент гена *katG* очікуваної довжини – 214 п.н. для набору праймерів Л7–Л8^{LNA} та 110 п.н. для набору праймерів Мукат24–Мукат25^{LNA} (результати не показано). Інтенсивність смуги амплікона довжиною 110 п.н. за $T_{an} = 58$ °С

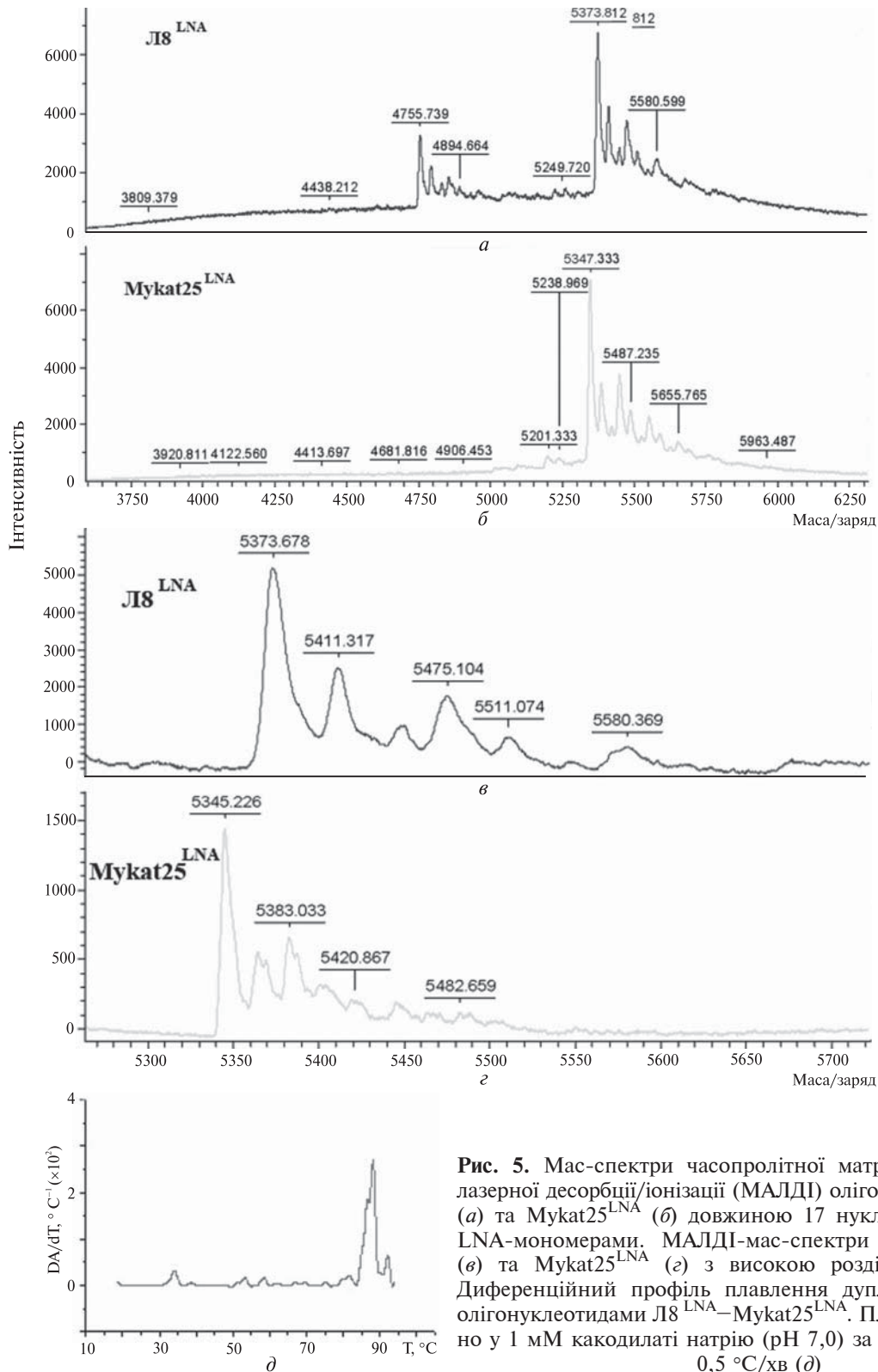


Рис. 5. Мас-спектри часопротітної матрично-активованої лазерної десорбції/іонізації (МАЛДІ) олігонуклеотидів Л8^{LNA} (а) та Мукат25^{LNA} (б) довжиною 17 нуклеотидів з п'ятьма LNA-мономерами. МАЛДІ-мас-спектри праймерів Л8^{LNA} (в) та Мукат25^{LNA} (г) з високою роздільною здатністю. Диференційний профіль плавлення дуплекса, утвореного олігонуклеотидами Л8^{LNA}—Мукат25^{LNA}. Плавлення проведено у 1 мМ какодилаті натрію (рН 7,0) за швидкості нагріву 0,5 °С/хв (д)

була вкрай низькою. Більш того, за тих температур відпалу ($T_{an} = 66-71\text{ }^{\circ}\text{C}$), при яких можливою була диференціація мутантних та диких ізолятів гена *katG* МТБ за допомогою ПЛР з набором праймерів Л7–Л8^{LNA}, ампліфікація фрагмента гена *katG* з праймерами Mykat24–Mykat25^{LNA} не відбувалась. Тому більшість експериментів проведена тільки з набором праймерів Л7–Л8^{LNA}.

Використання ПЛР з набором праймерів Л7–Л8^{LNA} дозволяє диференціювати мутантний та дикий типи гена *katG* МТБ (доріжки 2 та 3, рис. 4): для дикого типу гена *katG* ампліфікується фрагмент гена довжиною 214 п.н., 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^{LNA} невеликої довжини). Інтенсивність смуги неспецифічного амплікона зменшується при підвищенні T_{an} від 66 до 71 $^{\circ}\text{C}$ (у цьому випадку проводили двокрокову ПЛР, яка дозволяла надійно диференціювати ізоляти МТБ мутантного та дикого типів).

Як позитивний контроль використовували набір праймерів Mykat10–Mykat11. Проведення ПЛР з цим набором дозволяє ампліфікувати фрагмент гена *katG* довжиною 151 п.н., що містить локус з кодоном 315 (рис. 4, а, доріжка І). Наступне секвенування даного короткого ПЛР-продукту дозволить визначити його послідовність та ідентифікувати тип мутації у кодоні 315 гена *katG* для циркулюючих у регіоні клінічних ізолятів *M. tuberculosis*.

Для контролю якості хімічного синтезу одониткових олігонуклеотидів з LNA-мономерами застосовували часопролітну МАЛДІ-мас-спектрометрію. Зареєстровані МАЛДІ-мас-спектри олігонуклеотидів Л8^{LNA} та Mykat25^{LNA} (рис. 5, а–г) використано для контролю зняття захисту з реакційних груп азотистих основ нуклеотидів, а також для виявлення домішки олігонуклеотидів з відсутніми ланками.

В мас-спектрах LNA-модифікованих олігонуклеотидів (рис. 5, а, б) зареєстровано піки зі співвідношенням маса/заряд (m/z) 5373,8 (Л8^{LNA}) та 5347,3 (Mykat25^{LNA}), що підтверджують наявність LNA-мономерів у праймерах (табл. 2).

МАЛДІ-мас-спектри з високою роздільною здатністю (рис. 5, в, г) дозволили встановити наявність невилучених захисних груп на реакційних групах нуклеотидів. Відомо, що для запобігання розгалуження нитки олігонуклеотида в процесі елонгації аміногрупи основ у фосфорамідитах нуклеотиди dG, dA та dC заблоковані [16]. За наявності незнятих захисних груп в мас-спектрі олігонуклеотида, крім очікуваної основної смуги, з'являються додаткові піки більшої маси. Наприклад, ізобутирил (для dG) та бензоїл (для dA та dC), що використовуються для захисту аміногруп, збільшують масу олігонуклеотида на 70 та 104 Да відповідно [17].

В мас-спектрі олігонуклеотида Л8^{LNA} (рис. 5, а), крім основного піка очікуваної маси з m/z 5373,8, зареєстрований пік меншої маси з m/z 4755,7, який може відповідати

Таблиця 2

Параметри олігонуклеотидів, що містять LNA-модифіковані мономери, які охарактеризовано за допомогою часопролітної МАЛДІ-мас-спектрометрії

Олігонуклеотид	Послідовність	Формула/молекулярна маса	
		немодифікований олігонуклеотид	олігонуклеотид з LNA-мономерами
Mykat25 ^{LNA}	5'-gatcacCAGCGgcatcg-3'	C ₁₆₄ H ₂₀₇ N ₆₇ O ₉₈ P ₁₆ 5180,4	C ₁₆₉ H ₂₀₇ N ₆₇ O ₁₀₃ P ₁₆ 5320,4*
Л8 ^{LNA}	5'-cgatgcCGCTGgtgatc-3'	C ₁₆₅ H ₂₀₉ N ₆₃ O ₁₀₂ P ₁₆ 5202	C ₁₇₀ H ₂₀₉ N ₆₃ O ₁₀₇ P ₁₆ 5342*

Примітка. LNA-модифіковані нуклеотиди наведено великими літерами та підкреслено. *Очікувані формули та молекулярні маси сполук.

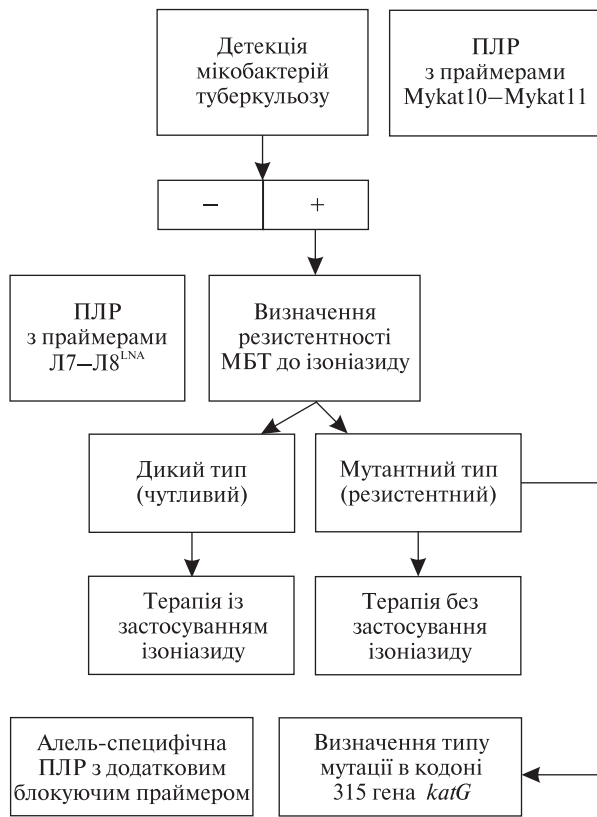


Рис. 6. Схема аналізу клінічного зразка на наявність мікобактерій туберкульозу, визначення стійкості/чутливості ізоляту МТБ по відношенню до ізоніазиду та типу точкової мутації в кодоні 315 гена *katG*, асоційованої з резистентністю до ізоніазиду

більш короткому олігонуклеотиду довжиною 15 н. Детекція такого більш короткого олігонуклеотида в МАЛДІ-мас-спектрі пояснює високу інтенсивність неспецифічного амплікона, що утворюється при проведенні ПЛР з праймерами L7-L8^{LNA}. Співвідношення площ під групою піків очікуваної маси (m/z 5373,8) та меншої маси (m/z 4755,7) показує, що олігонуклеотид довжиною 15 н. становить близько 25 % загальної кількості L8^{LNA}, що цілком достатньо для проведення ПЛР (концентрація праймера L8^{LNA} при проведенні ПЛР становить 0,5–1 мкМ).

Істотним недоліком синтезованих олігонуклеотидів з LNA-мономерами є наявність групи піків замість одного піка очікуваної маси (табл. 2), як це повинно мати місце у

випадку коректного синтезу [18]. Більшість цих додаткових піків, можливо, є результатом неповного знесолення зразка, що містить олігонуклеотид.

Праймери L8^{LNA} та Mykat25^{LNA} з двох різних наборів праймерів сконструйовано таким чином, що вони є комплементарними один одному та можуть утворити дуплекс довжиною 17 п.н. Теоретично розраховане значення температури плавлення (T_m) немодифікованого дуплекса L8-Mykat25 становить 45 °C за іонної сили (I) 1 мМ Na⁺. Заміна LNA-мономерами п'яти нуклеотидів у кожній нитці призводить до різкого збільшення (до 88 °C) температури плавлення дуплекса L8^{LNA}-Mykat25^{LNA} (рис. 5, д). Видно, що внесок однієї пари LNA-модифікованих нуклеотидів у підвищення температури плавлення 17-членного дуплекса становить 8,6 °C, а одного LNA-нуклеотида – 4,3 °C. В той же час для 17-членного олігонуклеотидного дуплекса L8^{LNA}-Mykat25 при модифікації нуклеотидів тільки однієї нитки визначена з теоретично розрахованого значення температури плавлення величина ΔT_m становить 2,8 °C (результати не показано). Таким чином, LNA-модифікація п'яти нуклеотидів в обох нитках дуплекса веде до значно сильнішої стабілізації дуплекса, ніж можна було очікувати, виходячи з теоретичних розрахунків, екстраполюючи дані однострочної LNA-модифікації на випадок LNA-модифікації обох ниток дуплекса. Зазначимо, що теоретичне визначення T_m за допомогою програми [15] можливе тільки для випадку LNA-модифікації нуклеотидів однієї нитки дуплекса.

Проведені експерименти з плавлення олігонуклеотидного дуплекса L8^{LNA}-Mykat25^{LNA} при значеннях іонної сили I = 5 мМ Na⁺ та I = 50 мМ Na⁺ дозволили зареєструвати тільки початок інтервалу плавлення через високу T_m дуплекса (результати не наведено). Це пояснюється ростом T_m дуплекса зі збільшенням іонної сили розчину приблизно пропорційно логарифму концентрації катіонів [19].

На основі розроблених технологій детекції ізолятів дикої/мутантного типу МТБ та визначення типу точкових мутацій, зче-

плених з резистентністю до ізоніазиду, нами запропонована схема аналізу клінічного зразка на наявність МТБ, визначення резистентності до ізоніазиду та уточнення, у випадку наявності, типу точкової мутації (рис. 6). Характерною особливістю даної схеми, на наш погляд, є можливість швидкого визначення ізолятів дикого типу МТБ (тобто чутливих до ізоніазиду), що дозволяє для первинних хворих негайно почати проведення курсу хіміотерапії, що включає і ізоніазид. Для того щоб визначити належність клінічного ізоляту *M. tuberculosis* до дикого або мутантного типу, необхідно провести детекцію шести варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* МТБ за допомогою мультиплексної ПЛР з використанням шести пар праймерів. У той же час використання стандартної ПЛР з LNA-модифікованими праймерами дозволяє значно спростити конструювання набору праймерів. В останньому випадку достатньо використати тільки одну пару праймерів, один з яких містить 3–5 LNA-нуклеотидів, комплементарних (або комплементарних та фланкуючих) кодону з мутаціями, що досліджують.

Розроблені праймери, підсилені LNA-мономерами, орієнтовані на стандартний варіант обладнання клінічної лабораторії, без застосування ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ). Але, враховуючи вражаючі темпи розвитку медичної біотехнології взагалі та швидкого поширення технології ПЛР-РЧ зокрема, можна очікувати, що у найближчому майбутньому відбуватиметься модернізація діагностичних лабораторій обладнанням для проведення ПЛР-РЧ. А для отримання оптимальних результатів за допомогою ПЛР-РЧ необхідний високий рівень очистки праймерів та проб з метою мінімізації фонового сигналу флуоресценції.

З огляду на це очистка олігонуклеотидів за допомогою ПААГ (на основі їхньої молекулярної маси) дозволяє видалити більшість укорочених олігомерів, але має тенденцію знижувати загальний вихід олігонуклеотида. Використання подвійної очистки – за допомогою ВЕРХ (високоєфективної рідинної хроматографії) після проведення ПААГ – дозволяє отримати найвищий рівень очистки, але при мінімальном виході. В той же час за

допомогою очистки зворотно-фазовою ВЕРХ можна отримати високий рівень очистки та виходу продукту.

Поява перших високотехнологічних систем закінченого циклу, таких як GeneXpert System (Cepheid Inc., США) [20], що базуються на ПЛР-РЧ, дозволила скоротити час генотипування або аналізу зразка на наявність інфекційного збудника до 30–45 хв, а визначення резистентності ізолятів МТБ до рифампіцину та ізоніазиду – до 2 год. Такі системи можуть служити альтернативою високоартісним референс-лабораторіям, оскільки не потребують спеціалізованого персоналу та лабораторних приміщень. Важливо, що клінічний матеріал (наприклад, крапля крові) переноситься до одноразового картриджу, який містить ліофільно висушені кульки з компонентами для ПЛР (ДНК-полімераза, нуклеотиди, праймери, скорпіонові проби та праймери для нормальної та мутантної ДНК).

Таким чином, у роботі розроблено два методи детекції точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* мікобактерій туберкульозу. В одному з них підвищенню дискримінуючої потужності набору праймерів сприяє застосування молекулярної технології (на основі стандартної ПЛР з використанням додаткового блокуючого праймера з 3'-кінцевою фосфатною групою) для визначення варіантів точкових мутацій у кодоні 315 гена *katG* мікобактерій туберкульозу, які асоційовані з резистентністю до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду. В роботі створено два набори праймерів: Mykat4–Mykat5–Mykat5P та Mykat4–Mykat9–Mykat9P, проведення ПЛР з якими дозволяє детектувати точкові мутації AGC → ACC та AGC → ACA, AGC → AGA відповідно. Другий метод із застосуванням ПЛР з набором праймерів, один з яких містить LNA-мономери, що комплементарні послідовності кодона 315 гена *katG* МТБ, дозволяє диференціювати ізоляти мікобактерій туберкульозу дикого та мутантного типів.

Створені молекулярно-генетичні тести системи для виявлення ізолятів дикого типу та резистентних МТБ до протитуберкульозного препарату першого ряду ізоніазиду можуть застосовуватися у клінічних лабораторіях зі

стандартним ПЛР-обладнанням та, на думку авторів, дозволять скоротити визначення резистентності МТБ до ізоніазиду з 1–3 місяців традиційними бактеріологічними методами до 1–3 днів за допомогою ПЛР.

Робота частково підтримана грантом АМН 95/2010 від Національної академії медичних наук України, а також Центром колективного користування приладом «Мас-спектрометричний комплекс з лазерною десорбцією та іонізацією Autoflex II» НАН України. Автори висловлюють подяку д-ру В.М. Степанішиній (Державний науковий центр прикладної мікробіології та біотехнології, РФ), проф. Х. Уи (Інститут дослідження туберкульозу, Китай), Т.В. Фесенко (Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка НАН України) за допомогу в проведенні досліджень.

O.Yu. Limanskaya, A.P. Limanskii

MOLECULAR TECHNOLOGIES
IN DETECTING SENSITIVE
AND ISONIAZID-RESISTANT
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Two types of techniques for detection of single nucleotide polymorphism in 315 codon of *katG* gene of MTB are developed. Isoniazid resistance of MTB is associated with point mutations in the mentioned codon. Two primer sets with additional competitive blocking primer containing 3'-terminal phosphate group (for elimination of unspecific amplification) allow detecting the most frequent point mutations AGC → ACC and AGC → AGA in 315 codon of *katG* gene. PCR with primer set of two primers one of which contains five LNA-monomers allows to determine an occurrence of any type from six known mutations in 315 codon of *katG* gene, i.e. to differentiate wild type and isoniazid-resistant MTB. Purity and structure of 17 bp long primers with LNA-modified nucleotides were characterized by time-of-flight MALDI-mass spectrometry. Duplex of 17 bp length formed by two complementary oligonucleotides with LNA-monomers was studied using melting.

O.Yu. Limanskaya, A.P. Limanskii

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ТЕХНОЛОГИИ
В ДЕТЕКЦИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ
И УСТОЙЧИВЫХ К ИЗОНИАЗИДУ
МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Разработаны два варианта детекции однонуклеотидных полиморфизмов в кодоне 315 гена *katG* микобактерий туберкулеза (МТБ), мутации в котором ассоциированы с устойчивостью к изониа-

зиду – противотуберкулезному препарату первого ряда. Два набора праймеров, каждый из которых содержит дополнительный конкурентный блокирующий праймер с 3'-терминальной фосфатной группой (для элиминации неспецифической амплификации), позволяют выявлять наличие наиболее часто встречающихся точечных мутаций AGC → ACC и AGC → AGA в кодоне 315 гена *katG*. Проведение ПЦР с набором из двух праймеров, один из которых содержит пять LNA-мономеров, позволяет определить наличие любого из шести известных вариантов мутаций в кодоне 315 гена *katG*, т.е. дифференцировать чувствительные и резистентные к изониазиду МТБ. Чистота и строение праймеров длиной 17 нуклеотидов, содержащих LNA-модифицированные нуклеотиды, охарактеризованы времяпролетной масс-спектрометрией с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF), а 17-мерный дуплекс, образованный двумя комплементарными олигонуклеотидами с LNA-мономерами, – методом термической денатурации.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. *Сергеев В.П., Филатов Н.Н.* Инфекционные болезни на рубеже веков. Осознание биологической угрозы. – М.: Наука, 2006. – 572 с.
2. *Global tuberculosis control. Epidemiology, strategy, financing.* – Geneva : WHO Press, 2009. – P. 303.
3. *Wu X., Zhang J., Liang J., Lu Y., Li H., Li C., Yue J., Zhang L., Liu Z.* Comparison of three methods for rapid identification of mycobacterial clinical isolates to the species level // *J. Clin. Microbiol.* – 2007. – **45**, № 6. – P. 1898–1903.
4. *Mikhailovich V., Lapa S., Gryadunov D., Sobolev A., Strizhkov B., Chernyh N., Skotnikova O., Irtuganova O., Moroz A., Litvinov V., Vladimirkii M., Perelman M., Chernousova L., Erokhin V., Zasedatelev A., Mirzabekov A.* Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – **39**, № 7. – P. 2531–2540.
5. *Wu X., Zhang J., Chao L., Liang J., Lu Y., Li H., Yang Y., Liang Y., Li C.* Identification of rifampin-resistant genotypes in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR-reverse dot blot hybridization // *Mol. Biotechnol.* – 2009. – **41**, № 1. – P. 1–7.
6. *Kolchinsky A., Mirzabekov A.* Analysis of SNPs and other genomic variations using gel-based chips // *Human Mutat.* – 2002. – **19**, № 4. – P. 343–360.
7. *Лиманская О.Ю.* Детекция изолятов дикого типа и резистентных к изониазиду микобактерий туберкулеза // *Туберкулез и болезни легких.* – 2010. – № 9. – С. 45–51.

8. *Orum H.* PCR clamping // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2000. – **2**, № 11. – P. 27–30.
9. *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.
10. *Dominguez P., Kolodney M.* Wild-type blocking polymerase chain reaction for detection of single nucleotide minority mutations from clinical specimens // *Oncogene.* – 2005. – **24**, № 45. – P. 6830–6834.
11. *Lipin M., Stepanshina V., Shemyakin I., Shinnick T.* Association of specific mutations in *katG*, *rpoB*, *rpsL* and *rrs* genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2007. – № 13. – P. 620–626.
12. *Nizova A.V., Stepanshina V.N., Majskaya N.V., Bogun A.G., Majorov A.A., Shemyakin I.G.* Analysis of resistance for clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* to drug of the first and second lines // *Epidem. and Infec. Dis.* – 2007. – № 4. – P. 7–10.
13. *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.
14. *Бродский Л.И., Драчев А.Л., Татузов Р.Л., Чумаков К.М.* Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // *Биополимеры и клетка.* – 1991. – **7**, № 1. – С. 10–14.
15. *Von Ahsen N., Wittwer C., Schutz E.* Oligonucleotide melting temperatures under PCR conditions: nearest-neighbour corrections for Mg^{2+} , deoxynucleotide triphosphate, and dimethyl sulfoxide concentrations with comparison to alternative empirical formulas // *Clin. Chem.* – 2001. – **47**, № 11. – P. 1956–1961.
16. *Ильина Е.Н., Говорун В.М.* Масс-спектрометрия нуклеиновых кислот в молекулярной медицине // *Биоорганич. химия.* – 2009. – **35**, № 2. – С. 149–164.
17. *Sauer S.* The essence of DNA sample preparation for MALDI mass spectrometry // *J. Biochem. Biophys. Meth.* – 2007. – **70**, № 2. – P. 311–318.
18. *Humeny A., Bonk T., Berkholz A., Wildt L., Becker C.-M.* Genotyping of thrombotic risk factors by MALDI-TOF mass spectrometry // *Clin. Biochem.* – 2001. – **34**, № 6. – P. 531–536.
19. *Волькенштейн М.В.* Биофизика. – М.: Наука, 1981. – 576 с.
20. *Helb D., Jones M., Story E., Boehme C., Wallace E., Ho K., Kop J., Owens M., Rodgers R., Banada P., Safi H., Blakemore R., Lan N., Jones-Lopez E., Levi M., Burday M., Ayakaka I., Mugerwa R., McMillan B., Winn-Deen E., Christel L., Dailey P., Perkins M., Persing D., Alland D.* Rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology // *J. Clin. Microbiol.* – 2010. – **48**, № 1. – P. 229–237.

Надійшла 29.10.10