Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>

УКРАЇНСЬКА АКАДЕМІЯ АГРАРНИХ НАУК

НАЦІОНАЛЬНИЙ НАУКОВИЙ ЦЕНТР

«ІНСТИТУТ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ І КЛІНІЧНОЇ

ВЕТЕРИНАРНОЇ МЕДИЦИНИ»

**СКРИПНИК Артем Валерійович**

# УДК 619:579:575.8:577.2

# МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНА ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ

#  МІКОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ В УКРАЇНІ,

# ТА ЇХ ФІЛОГЕНЕТИЧНІ ВЗАЄМОЗВ’ЯЗКИ

16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня

кандидата ветеринарних наук

Харків – 2007

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини».

***Науковий керівник***  доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент Української академії аграрних наук,

**Стегній Борис Тимофійович,**

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», директор.

***Офіційні опоненти:*** доктор ветеринарних наук, професор

**Апатенко Володимир Максимович**,

Харківська державна зооветеринарна академія

Міністерства аграрної політики України, професор кафедри мікробіології та біотехнології;

доктор ветеринарних наук, професор
**Ткаченко Олексій Андрійович**,

Дніпропетровський державний аграрний університет Міністерства аграрної політики України, завідувач кафедри епізоотології та інфекційних хвороб.

Захист відбудеться 16 жовтня 2007 р. о 13-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.359.01 у Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за адресою: вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» за адресою: вул. Пушкінська, 83, м. Харків, 61023.

Автореферат розісланий 12 вересня 2007 р.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради,

доктор ветеринарних наук,

професор А.Ф. Бабкін

**ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ**

**Актуальність теми.** Туберкульоз сільськогосподарських тварин має велике економічне і епідеміологічне значення. Збитки, яких завдає *Mycobacterium bovis* сільському господарству у світі, сягають 3 млрд. доларів США щорічно (Garnier T. *et al.*, 2003). Кожного року в світі від туберкульозу вмирає близько 2 млн. чоловік (Schütt-Gerowitt H., 1995; Rastogi N. *et al.*, 2001; WHO, 2006).

Незважаючи на значні досягнення ветеринарної служби в боротьбі з туберкульозом тварин, захворювання на туберкульоз реєструється в регіонах усіх природно-географічних зон і завдає значних збитків тваринництву України (Колос Ю. та ін., 2006; Ткаченко О. А., 1999). За період із 2001 по 2005 рр. зареєстровано 238 неблагополучних щодо туберкульозу великої рогатої худоби (ВРХ) господарств у 12 областях України.

Згідно з чинною Інструкцією «Про заходи з профілактики та оздоровлення тваринництва від туберкульозу», результати лабораторних досліджень з урахуванням епізоотологічних даних є регламентуючими у постановці діагнозу. У державних лабораторіях ветеринарної медицини України застосовують методи бактеріологічної діагностики, зокрема визначення фенотипових ознак мікобактерій (кислотостійкість, характер і швидкість росту на живильних середовищах, наявність або відсутність певних біохімічних властивостей, вірулентність для лабораторних тварин тощо) (Касіч Ю. Я. та ін., 1987; Завгородний А. И., 1997; Дяченко Г. та ін., 2006). Чинна методика ідентифікації та видової диференціації мікобактерій, яка включає в себе 10 культурально-морфологічних, біохімічних і біологічних тестів, дозволяє протягом 30–90 діб визначити видову належність тільки 18 видів епізоотичних культур з 90 систематизованих (Завгородний А. И., 1997; Springer B. *et al.*, 1996; Dostal S. *et al.*, 2003; Cook V. J. *et al.*, 2003; Дяченко Г. та ін., 2006).

Розробка методів ранньої діагностики цієї інфекції є найважливішою складовою в системі контролю за поширенням туберкульозу. Розвиток новітніх технологій на основі полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і секвенування відкриває нові перспективи щодо діагностики туберкульозу, зокрема детекції та диференціації збудників, проведення їх генотипування і молекулярно-епізоотологічного моніторингу (Rastogi N. *et al.*, 2001; Dvorska L. *et al.*, 2003; Haddad N. *et al.*, 2004). Молекулярно-генетичні методи дозволяють на ранніх стадіях інфекційного й епізоотичного процесів виявити джерело інфекції, шляхи передачі збудника, скоротити термін постановки діагнозу на туберкульоз та своєчасно провести оздоровчі заходи (Гребенникова Т.В. и др., 2004; Найманов А.Х. и др., 2004; Костюк Р.В., 2004; Тунгусова О.С. и др., 2003).

Наведені обставини викликають необхідність дослідження генетичної варіабельності штамів мікобактерій, виділених на території України, визначення їхніх філогенетичних взаємозв’язків, встановлення видового спектра мікобактерій, що циркулюють у гуртах тварин та в об’єктах навколишнього середовища, з метою розробки ефективних систем епізоотологічного моніторингу та вдосконалення методів діагностики для боротьби з туберкульозом із застосуванням нових діагностичних препаратів і технологій, що сприятиме встановленню ефективного контролю над цією небезпечною зооантропонозною інфекцією.

**Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконувалася згідно з тематичним планом наукових досліджень ННЦ «ІЕКВМ», завдання 04.04 «Розробити тест-системи для детекції збудників інфекційних захворювань за допомогою полімеразної ланцюгової реакції» (2002–2005 рр., № ДР 040101U001616), 37.01-005 «Вивчити генетичні особливості мікобактерій туберкульозу та атипових мікобактерій, ізольованих від сільськогосподарських тварин в різних регіонах України та розробити ПЛР тест-системи для їх детекції» (2006–2010 рр., № ДР 0106U000350).

**Мета і задачі дослідження.** Мета досліджень – визначити видовий склад мікобактерій, виділених в різних регіонах України, вивчити їхні культурально-морфологічні властивості, філогенетичні взаємозв’язки, розробити систему молекулярно-генетичної детекції та видової диференціації мікобактерій.

Для досягнення мети були поставлені такі задачі:

1. Провести видову диференціацію культур мікобактерій, ізольованих у різних регіонах України впродовж 1982–2004 років, з використанням молекулярно-генетичних методів, дослідити їхні культурально-морфологічні властивості.
2. Визначити видову належність і питому вагу атипових мікобактерій, виділених від ВРХ, що реагує на туберкулін для ссавців.
3. Провести порівняльний аналіз ефективності використання молекулярно-генетичних методів для діагностики туберкульозу тварин.
4. Провести секвенування послідовності гена 16S рибосомальної РНК (рРНК) досліджуваних мікобактерій, множинне вирівнювання секвенованих послідовностей та їхній філогенетичний аналіз.
5. Розробити метод екстракції ДНК з бактеріальної маси мікобактерій.
6. Розробити систему видової диференціації і визначення генетичної спорідненості мікобактерій.
7. Розробити родоспецифічну тест-систему для детекції роду *Mycobacterium* за допомогою ПЛР.

**Об’єкт дослідження:** туберкульоз сільськогосподарських тварин: збудники туберкульозу та атипові мікобактерії.

**Предмет дослідження**: молекулярно-генетична детекція та диференціація мікобактерій, культури туберкульозних і атипових мікобактерій, їхні культурально-морфологічні властивості, генетична варіабельність, філогенетичні зв’язки, засоби діагностики, методи виділення ДНК, тест-система для детекції роду *Mycobacterium* методом ПЛР, молекулярна епізоотологія.

**Методи дослідження.** Робота виконана з використанням бактеріологічних, молекулярно-біологічних, генетичних та статистичних методів досліджень.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Уперше в Україні здійснено порівняльну оцінку діагностичної ефективності молекулярно-генетичних методів видової диференціації мікобактерій і молекулярної епізоотології, а саме: ПЛР, рестрикційно-ензимного аналізу ділянки гена *groEL2* (РЕА-*hsp65*), споліготайпінга, гель-електрофорезу в пульсуючому полі (ГЕПП), секвенування гіперваріабельної ділянки гена 16S рРНК.

За допомогою молекулярно-генетичних методів визначено видову належність 125 штамів мікобактерій, уперше отримано дані щодо циркуляції на території України таких видів мікобактерій, як *Mycobacterium caprae, M.  frederiksbergensе, M. engbackii, M. doricum, M. parascrofulaceum*, *M. hassiacum, M.  confluentis, M. elephantis*. Показано, що найбільш поширеними зі 125 досліджених культур є *M. аvium* complex, *M. fortuitum*, *M. phlei.* Уперше проведено типування штамів *M. аvium* до підвидів: *M. avium* subsp. *hominissuis* і *M. avium* subsp. *avium*.

Серед досліджених 68 ізолятів атипових мікобактерій, виділених від ВРХ, 32,0 % віднесено до комплексу *M. аvium* (зокрема до *M. avium* subsp. *hominissuis* – 22,7 %); 17,3 % – до *M. fortuitum*; 9,3 % – до *M. nonchromogenicum*; 8,0 % – до *M. phlei*; 33,3 % – до інших 9 видів атипових мікобактерій.

Побудовано філогенетичне древо, що відображає еволюційні взаємозв’язки 17 видів мікобактерій. Аналіз генетичної спорідненості мікобактерій підтвердив генетичну детермінацію їхнього розподілу на швидко- та повільнозростаючі. Класифікація мікобактерій за Раньйоном (1967 р.) не відображає філогенетичні взаємозв’язки мікобактерій.

Розроблено швидкий, дешевий і ефективний метод виділення мікобактеріальної ДНК з бактеріальної маси для її використання в ПЛР. Розроблено систему видової диференціації мікобактерій і визначення їхньої генетичної спорідненості за допомогою генотипування. Розроблено родоспецифічну тест-систему для детекції бактерій роду *Мycobacterium* за допомогою ПЛР.

**Практичне значення одержаних результатів**. Результати досліджень використано для розробки нормативної документації щодо виготовлення, контролювання та застосування «Тест-системи для виявлення ДНК бактерій роду *Mycobacterium* методом полімеразної ланцюгової реакції «TUBMYC-Україна» (ТУ У 24.4-00497087-014:2005) та її впровадження в лабораторну практику. Запропоновано систему видової диференціації мікобактерій і визначення їх генетичної спорідненості за допомогою генотипування. Розроблено та впроваджено в лабораторну практику спосіб виділення ДНК мікобактерій з живильних середовищ для діагностики туберкульозу та мікобактеріозів в ПЛР (Деклараційний патент України № 8094 від 15.07.2005), спосіб діагностики туберкульозу та мікобактеріозів тварин (Деклараційний патент України № 3080 від 15.10.2004). Розроблені методичні рекомендації «Лабораторна діагностика туберкульозу тварин і птиці», затверджені Науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України (протокол № 3 від 23 грудня 2005 р).

**Особистий внесок здобувача.** Особистий внесок автора дисертації полягає в самостійному виконанні методичних, аналітичних і експериментальних робіт. Досліди з використанням таких методів, як культивування, секвенування гена 16S рРНК, споліготайпінг і ГЕПП виконано під час стажування за допомогою співробітників лабораторії генної інженерії та Національної референс-лабораторії вивчення туберкульозу й паратуберкульозу ВРХ Федерального дослідного інституту здоров’я тварин ім. Ф. Льоффлера (м. Йєна, Німеччина), за що висловлюю велику подяку Dr. K. Sachse, Dr. I. Moser та Німецькій службі академічних обмінів (DAAD).

**Апробація результатів дисертації.** Результати були представлені, обговорені та схвалені на звітних сесіях вченої ради ННЦ «ІЕКВМ» у 2003–2006 рр.; Міжнародній конференції «Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose» (13–14 травня 2003 р., м. Йєна, Німеччина); Міжнародній конференції «Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID)» (17–19 вересня 2003 р., м. Клостер Банц, Німеччина); VI конференції «Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology» (6 грудня 2003 р., м. Варшава, Польща); Міжнародному симпозіумі «Veterinary and animal husbandry in production of healthy safe food» (21–25 липня 2004 р., м. Херцег Нові, Сербія і Чорногорія); Міжнародному конгресі «27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology» (9–12 липня 2006 р., м. Лондон, Великобританія); Міжнародній конференції «Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose» (11–12 жовтня 2006 р., м. Йєна, Німеччина).

**Публікації.** Основний зміст дисертації опубліковано у 19 друкованих працях, з яких 7 – у фахових виданнях, перелік яких затверджено ВАК України.

**Структура та обсяг дисертації.** Основний зміст дисертації викладено на 150 сторінках комп’ютерного тексту та ілюстровано 15 таблицями і 23 рисунками, які займають 13 сторінок. Робота складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методів досліджень, результатів власних досліджень, обговорення результатів власних досліджень, висновків і пропозицій виробництву, списку джерел літератури, який містить 318 найменувань, серед яких 282 іноземних.

# МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконано в Національному науковому центрі «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» впродовж 2003–2006 років, частину досліджень проведено під час стажувань у Федеральному дослідному інституті здоров’я тварин ім. Ф. Льоффлера (м. Йєна, Німеччина).

Культури досліджуваних мікобактерій було виділено від ВРХ, свиней, собак, сільськогосподарської, зоопаркової та синантропної птиці, а також із молока ВРХ, водопровідної води, силосу, навколишнього середовища в 11 областях України в період з 1982 по 2004 роки і були отримані з колекції культур лабораторії вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ», Чернігівського інституту сільськогосподарської мікробіології УААН, обласних лабораторій ветеринарної медицини. Всього було досліджено 128 культур мікобактерій.

Культурально-морфологічні властивості всіх ізолятів мікобактерій досліджували з використанням 4 живильних середовищ: бульйону (7Н9 Meaddlebrook), агарвміщуючого (7Н10 Meaddlebrook) та яєчних (Stonebrink з піруватом та Ogawa з гліцеролом). Тинкторіальні властивості ізолятів досліджували в мазках, пофарбованих за методом Циля-Нільсена.

Визначення ефективності методів екстракції ДНК із бактеріальної маси мікобактерій проводили методом ПЛР шляхом ампліфікації десятикратних розведень (до 1:104) екстрактів ДНК, отриманих у результаті гомогенізації суспензій мікобактерій у фосфатно-сольовому буфері та приведення їх до однакової концентрації методами ультразвукової дезінтеграції клітин, впливом мікрохвильового випромінювання, руйнуванням скляними бусинками, фенол-хлороформною екстракцією, нагріванням суспензії до температури 100±1 °С.

Видову диференціацію та генотипування досліджуваних ізолятів проводили з використанням ПЛР (10 систем родо- та видоспецифічних праймерів), РЕА-*hsp65*, споліготайпінгу, ГЕПП, секвенування гіперваріабельної ділянки 16S рДНК.

Множинне вирівнювання секвенованих послідовностей проводили з використанням програми *CLUSTAL X*v.1.83 на основі алгоритму матриці IUB. Філогенетичний аналіз було здійснено за допомогою програми MEGA v. 3.1. Філогенетичне древо розраховане за методом neighbour-joining. Матрицю відмінностей було сформовано на основі моделі Кімури. Статистичну вірогідність галуження визначали за допомогою бутстреп-аналізу.

Теоретичний розрахунок праймерів під час розробки тест-системи для детекції ДНК бактерій роду *Mycobacterium* методом ПЛР здійснювали за аналізом консервативних ділянок 16S рДНК нуклеотидних послідовностей, опублікованих у GenBank, EMBL, DDBJ. Дизайн праймерів проводили з використанням програми AmplifX v.1.10. Аналіз показників якості праймерів здійснювали за допомогою програми Oligo Analyser v.1.0.2.

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ**

**Вивчення культуральних, тинкторіальних та морфологічних особливостей досліджуваних штамів мікобактерій.** При мікроскопії мазків з культур мікобактерій спостерігали палички червоного кольору, характерні для мікобактерій. Під час культивування на живильних середовищах культури мікобактерій мали різноманітний характер росту. На щільних середовищах вони росли у вигляді різних за величиною, вологих і гладких або сухих і зморшкуватих, матових або блискучих колоній без пігменту (85 культур) або із жовтим пігментом різного ступеня інтенсивності, від кремового до помаранчевого й рожевого (40 культур). Деякі культури росли нерозрізненними дрібними колоніями у вигляді напилювання, формуючи суцільний газон сухуватого або слизького нальоту. 81 культура росла у S-формі, а 42 культури – у R-формі, дві культури росли як у R-, так і у S-формах. Найшвидші темпи росту фіксували в бульйоні 7Н9 Meaddlebrook. Первинний ріст *M. bovis* спостерігали на 16–36 добу, *M. caprae* – на 15–29 добу, *M. avium* – на 7–29 добу, *M. doricum* – на 42 добу, *M. frederiksbergensе* – на 4 добу*, M. engbackii* – на 9 добу*, M. parascrofulaceum* – на 7 добу, *M.  confluentis* – на 6 добу*, M. hassiacum* та *M. elephantis* – на 5 добу.

**Порівняльні дослідження ефективності методів екстракції мікобактеріальної ДНК.** Для виділенняДНК із культур мікобактерій найменш ефективною (відсутня ампліфікація розведень 1:103 та1:104) і водночас найбільш тривалою (2,5 год) виявилася фенол-хлороформна екстракція. Порівняно з нею інші методи фізичної екстракції були більш ефективними (отримано ампліфікацію розведення 1:104) і швидкими – від 6 хв (руйнування клітин скляними бусинками) до 25 хв (решта методів). З огляду на такі критерії, як швидкість, трудомісткість, витрати на реактиви та обладнання, найбільш ефективним виявився запропонований нами метод екстракції ДНК шляхом обробки мікобактеріальних клітин нагріванням за температури 100±1 °С (Деклараційний патент України № 8094 від 15.07.2005).

**Видова диференціація культур мікобактерій методом ПЛР.** За результатами досліджень культур мікобактерій методом ПЛР із праймерами, специфічними до комплексу *M. tuberculosis*, позитивними виявилось 17 (13,6 %) зі 125 зразків ДНК мікобактерій. Усі ці культури було досліджено також і з праймерами, специфічними до *M. bovis*і*M. tuberculosis*, у результаті чого 16 (12,8 %) культур віднесено до виду *M. bovis*.

ПЛР-дослідження з праймерами, специфічними до комплексу *M. avium‑intracellulare*, дозволили віднести до нього 38 (30,4 %) культур. Як показали подальші дослідження, 19 культур належали до *M. avium* subsp. *avium* (1 культура змішана з *M. intracellulare*), а інші 19 – належали до *M. avium* subsp. *hominissuis* (1 культура також змішана з *M. intracellulare*). Решту ізолятів (55 %) було ідентифіковано як *Mycobacterium* spp. методом ПЛР із родоспецифічними праймерами (рис. 1). Подальшу диференціацію цих ізолятів було здійснено з використанням інших молекулярно-генетичних методів.

**Рис. 1 Співвідношення культур мікобактерій, досліджених методом ПЛР (n = 125).**

**Рестрикційно-ензимний аналіз ділянки гена *groEL2* *(hsp65)*** використовували для видової диференціації мікобактерій, вид яких не було визначено в ПЛР. З 73 культур мікобактерій, досліджених у РЕА-*hsp65*, 22 (30,1 %) показали профіль рестрикції, характерний для конкретного виду, натомість 45 культур (61,6 %) мали профіль рестрикції, близький двом видам мікобактерій, а 6 культур (8,2 %) утворили нові профілі, не наведені в існуючих базах даних, що свідчить про відносно низьку специфічність цього методу.

**Споліготайпінг.** За допомогою цього методу 12 штамів комплексу *M. tuberculosis* було визначено як *M. bovis*. Уперше в Україні ми диференціювали 3 штами *Mycobacterium caprae*, з яких два штами було ізольовано в Херсонській області, один – у Харківській. У всіх досліджуваних штамів відсутні спейсери 3, 9, 16, 39–43. За цими ознаками їх генотипи належать до генетичної родини *M. bovis*-BCG. Два штами утворили унікальні сполігопрофілі, відсутні в базах даних. Усі інші увійшли до чотирьох генетичних родів із восьми, які підпорядковані в генетичну родину *M. bovis*-BCG, а саме до BOVIS1\_BCG, BOVIS1, CAP, BOVIS2 (табл. 1).

Таблиця 1

**Видова диференціація, генетичний рід штамів та регіон їх циркуляції (n = 15)**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| № штаму | Восьмеричний кодсполігопрофілю | Висновок про вид мікобактерій | Генетичний рід сполігопрофілю | Область виділення |
| 901 | 676773777777600 | *M. bovіs* | BOVIS1\_BCG | Харківська |
| 1503 | 676773777777600 | *M. bovіs* | BOVIS1\_BCG | Київська |
| 1502 | 676773777736600 | *M. bovіs* | BOVIS 1 | Київська |
| 1520 | 676763777736600 | *M. bovіs* | BOVIS 1 | Київська |
| 1521 | 676773777736600 | *M. bovіs* | BOVIS 1 | Київська |
| 1505 | 200003774075600 | *M. caprae* | CAP | Харківська |
| 1544 | 200003777377600 | *M. caprae* | CAP | Херсонська |
| 1545 | 200003777377600 | *M. caprae*  | CAP | Херсонська |
| 1523 | 406323476514600 | *M. bovіs* | BOVIS 2 | Київська |
| 1527 | 406323476514600 | *M. bovіs* | BOVIS 2 | Київська |
| 1546 | 406323476514600 | *M. bovіs* | BOVIS 2 | Київська |
| 1547 | 406323476514600 | *M. bovіs* | BOVIS 2 | Київська |
| 1548 | 406323476514600 | *M. bovіs* | BOVIS 2 | Київська |
| 1511 | 476763636776600 | *M. bovіs* | унікальний | Луганська |
| 1539 | 406323476510200 | *M. bovіs* | унікальний | Чернігівська |

**Дослідження атипових мікобактерій за допомогою гель-електрофорезу в пульсуючому полі.** Усі 23 досліджувані штами мали унікальні фінгерпринтинги. Поліморфізм патернів рестрикції продемонстрував високий ступінь гетерогенності штамів *M. fortuitum*. Усі штами *M. fortuitum*, що мали профіль рестрикції з 17 смужок, були виділені в Чернігівській області, окрім одного з Харківської. Штами *M.* *fortuitum*, профіль рестрикції яких складався із 21–23 смужок, походили з Одеської області, за винятком одного штаму з Чернігівської області. Результати, отримані за допомогою ГЕПП, свідчать про можливість встановлення ступеня спорідненості двох або більше ізолятів мікобактерій одного виду між собою.

**Видова диференціація мікобактерій за допомогою секвенування ділянки гена 16S рибосомальної РНК.** За допомогою цього методу вперше вдалось отримати дані про циркуляцію на території України таких видів мікобактерій, як *M. frederiksbergensе, M. engbackii, M. doricum, M. parascrofulaceum*, *M. hassiacum, M. confluentis, M. elephantis.* За результатами наших досліджень найчастіше на території України, з числа вивчених ізолятів, зустрічались комплекс *M. avium* і *M.* *fortuitum*, на долю яких припадає більше двох третин усіх ізолятів. Значно меншою є доля *M. phlei* і *M. nonchromogenicum*. Інші види атипових мікобактерій представлені поодинокими ізолятами, їх доля не перевищує 2 % від їх загальної кількості (рис. 2).

Видовий склад мікобактерій, ізольованих з органів ВРХ, наведено на рис. 3. Як свідчать дані цього рисунка, поряд із представниками комплексу *M. tuberculosis* (*M. bovis* і *M. caprae*), на долю яких припадало 16,6 %, від ВРХ найчастіше виділялися такі види атипових мікобактерій: *M. avium* – 26,7 % (причому кількість ізолятів *M. avium* subsp. *hominissuis* майже в 2,5 рази перевищувала кількість ізолятів *M. avium* subsp. *avium*); *M. fortuitum* – 14,4 %; *M. nonchromogenicum* – 7,8 %; *M. phlei* – 6,7 %. Значною (27,8 %) була і питома вага інших 9 видів атипових мікобактерій, виділення яких від ВРХ, однак, було поодинокими випадками.

**Рис. 2 Співвідношення видів атипових мікобактерій, циркулюючих в Україні (n = 109).**

 **Рис. 3 Співвідношення видів мікобактерій, ізольованих від ВРХ (n = 83).**

**Результати множинного вирівнювання секвенованих ділянок 16S рибосомальної ДНК і філогенетичний аналіз.** За результатами аналізу топографії побудованого філогенетичного древа визначено наявність 3 кластерів: швидкозростаючих мікобактерій, «термотолерантних» швидкозростаючих мікобактерій та повільнозростаючих мікобактерій (рис. 4). Аналіз генетичної спорідненості мікобактерій дозволив їх поділити на дві групи: швидкозростаючі і повільнозростаючі, що відповідає традиційному розподілу мікобактерій. Виключенням є штам *M. doricum*, який, незважаючи на дуже повільний ріст (42 доби), знайшов своє розташування в групі швидкозростаючих «термотолерантних» мікобактерій, що можна пояснити подовженням петлі 10 вторинної структури 16S рДНК завдяки однонуклеотидній інсерції, що споріднює «термотолерантні» мікобактерії.

 

**Рис. 4 Філогенетичні взаємозв’язки мікобактерій. Кореневе древо побудоване на підставі аналізу первинної структури гіперваріабельної ділянки А гена 16S рибосомальної РНК.**

Примітки: 1) Масштабна лінійка показує частку нуклеотидних замін; 2) Ромбом відзначено вузол галуження «термотолерантних» швидкозростаючих мікобактерій.

Результати філогенетичного аналізу не підтверджують класифікацію мікобактерій за Раньйоном. Мікобактерії були поєднані в клади відповідно до швидкості їхнього росту, що підтверджує генетичну детермінацію цієї ознаки. Натомість ознака пігментоутворення не відіграла ролі у визначенні спорідненості мікобактерій.

Штами *M. avium* на філогенетичному древі, на відміну від штамів *M. fortuitum* і *M.* *phlei*, утворили гілки різної довжини. Ця гетерогенність дає підставу вважати нуклеотидні заміни, виявлені під час множинного вирівнювання, подіями більш стабільної природи, що можуть впливати на внутрішньовидову мінливість всередині групи *M.* *avium*, обумовлюючи таксономічне положення цих штамів.

У той же час розташування штамів *M. fortuitum* і *M. phlei* на єдиних гілках засвідчує дуже високий ступінь спорідненості цих штамів. Одиничні нуклеотидні заміни, виявлені під час множинного вирівнювання, і які дали можливість виділити окремі секувари, можна розцінювати як синонімічні, які не мають істотного значення з точки зору еволюції.

**Розробка системи видової диференціації мікобактерій і визначення їхньої генетичної спорідненості за допомогою генотипування.** Проаналізувавши результати досліджень, встановлення видової належності ізоляту мікобактерій пропонуємо здійснювати із застосуванням комплексу методів, включаючи культивування і мікроскопію. В основі розробленої системи є проведення каскаду ПЛР для визначення таких видів як *M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M.* *avium* (з наступним типуванням його до підвидів), *M. intracellulare*. Видову диференціацію інших видів атипових мікобактерій пропонуємо здійснювати за допомогою РЕА-*hsp65* і секвенування, зокрема 16S рДНК. Встановлення ступеня генетичної спорідненості досліджуваних штамів пропонуємо здійснювати за допомогою таких методів, як споліготайпінг, ГЕПП, ПДРФ та ін. (рис. 5).

Впровадження до рутинної практики лабораторій ветеринарної медицини запропонованої системи сприятиме значному скороченню тривалості досліджень (декілька днів), підвищенню їхньої специфічності та, водночас, збільшенню обсягів досліджень за одиницю часу.

Застосування методів молекулярної епізоотології разом із класичними епізоотологічними методами дозволить своєчасно виявляти джерело інфекції, встановлювати зв’язки між різними спалахами, тобто шляхи поширення інфекції, визначати, чи має інфекція в господарстві декілька джерел, що важливо для з’ясування причин повторного виникнення захворювання на туберкульоз в оздоровлених господарствах. Визначення генетичних патернів тих чи інших штамів дозволить віднести їх до певної генетичної родини й роду та створити епізоотологічну карту, яка надасть змогу відслідковувати шляхи поширення збудників як усередині країни, так і в світовому масштабі, оцінити роль диких тварин як резервуара інфекції. Встановлення за допомогою споліготайпінгу лабораторної крос-контамінації під час досліджень матеріалу з різних господарств в одній лабораторії допоможе запобігти помилковому забою тварин.

**Визначення спорідненості штамів**

**Родоспецифічна ПЛР**

**Не мікобактерія**

**Деконтамінація Збагачення Культивування**

**Досліджуваний зразок**

**Екстракція ДНК**

**Мікроскопія**

***M. avium* complex**

***M. a. avium***

**ПЛР IS*901***

**ПЛР IS*1245***

***M. a. hominissuis***

***M.a.paratuberculosis***

**ПЛР IS*900***

**−**

**Визначення конкретного виду**

**Секвенування**

**16S рДНК**

**Декілька видів,**

**унікальний профіль**

**РЕА-*hsp65***

**Атипові мікобактерії**

**Споліготайпінг**

**+**

**ПЛР *RvD1-Rv2031c***

***M. bovis***

**+**

***M. tuberculosis***

**ПЛР *mtр40***

**−**

**ПЛР 16S рДНК (МАС)**

**ПЛР 16S рДНК**

(***M. intracellulare***)

***M. intracellulare***

**+**

**+**

**−**

**Екстракція ДНК**

**ГЕПП, ПДРФ**

**+**

**−**

**−**



**Рис. 5 Схема проведення видової диференціації мікобактерій і встановлення їх генетичної спорідненості.**

**Розробка тест-системи для детекції ДНК бактерій роду *Mycobacterium* методом ПЛР.** Під час розробки праймерів з метою визначення висококонсервативних ділянок, спільних для усіх видів мікобактерій, для їх відпалу ми провели аналіз 15 повністю секвенованих послідовностей 16S рДНК мікобактерій. З урахуванням загальноприйнятих параметрів якості праймерів було розраховано пару праймерів, за допомогою якої отримали ПЛР-продукт, специфічний для роду *Mycobacterium*.

Для обраної пари праймерів було підібрано оптимальний режим ампліфікації та склад реакційної суміші. Ці параметри було оптимізовано з позицій зниження собівартості реакції із збереженням високої чутливості та урахуванням матеріально-технічного оснащення вітчизняних лабораторій.

Високі показники специфічності, чутливості (поріг чутливості становить 100 кл/мл) і відтворюваності підтверджено результатами міжлабораторних і державних комісійних випробувань. Специфічність та внутрішньородову універсальність праймерів встановлено чіткою позитивною реакцією 110 культур мікобактерій, що належать до 19 видів та підвидів роду *Mycobacterium*, таксономічну належність яких до мікобактерій було підтверджено за допомогою ПЛР, споліготайпінга, секвенування 16S рДНК, і негативною реакцією генотипово споріднених *Nocardia* spp.*, Corynebacterium pseudotuberculosis*.

**В И С Н О В К И**

1. За результатами тинкторіальних, культуральних, молекулярно-біологічних та філогенетичних методів дослідження визначено видовий склад та філогенетичні взаємозв’язки мікобактерій, ізольованих у різних регіонах України; здійснено порівняльну оцінку наявних молекулярно-генетичних методів, теоретично та експериментально обґрунтовано їх застосування для видової диференціації та генотипування мікобактерій. Запропоновано систему молекулярно-генетичної детекції та видової диференціації мікобактерій, яка містить комплекс послідовного застосування полімеразної ланцюгової реакції, рестрикційно-ензимного аналізу ділянки гена *groEL2* (*hsp65*), споліготайпінгу, гель-електрофорезу в пульсуючому полі, секвенування гіперваріабельної ділянки гена 16S рибосомальної РНК, а також культивування та мікроскопію.
2. За результатами визначення видової належності 125 штамів *М. tuberculosis* complex та атипових мікобактерій, виділених в Україні з 1982 по 2004 роки, уперше показано циркуляцію на її території таких видів: *M. caprae, M. frederiksbergensе, M. engbackii, M. hassiacum, M. doricum, M. parascrofulaceum*, *M.  confluentis, M. elephantis.* Здійсненим уперше типованням 38 штамів *M. аvium* до підвидів, при цьому установлено, що співвідношення між *M. avium* subsp. *hominissuis* та *M. avium* subsp. *avium* становить 1:1.
3. Під час дослідження атипових мікобактерій, виділених від ВРХ, що реагує на туберкулін, встановлено, що головна роль у сенсибілізації ВРХ до туберкуліну належить *M. аvium* (32,0 % ізолятів атипових видів мікобактерій), зокрема *M. avium* subsp.*hominissuis* – 22,7 %, і *M. fortuitum* (17,3 %), на долю *M. nonchromogenicum* припадає 9,3 %, *M. phlei* – 8,0 %, інших 9 видів атипових мікобактерій – 33,3 %.
4. За результатами дослідження культурально-морфологічних властивостей 125 культур мікобактерій встановлено, що найшвидші темпи росту культур з одночасною можливістю докладного вивчення їхніх культурально-морфологічних властивостей можуть бути отримані за паралельного використання різних живильних середовищ: яєчних, агарвміщуючих і рідких.
5. Вивчення генетичної варіабельності досліджених культур дало можливість визначити діагностичну цінність молекулярно-генетичних методів. При цьому встановлено, що для видової ідентифікації представників комплексу *М. tuberculosis* ефективним є споліготайпінг, для підвидів *М. avium* найбільш придатним є метод ПЛР, для атипових мікобактерій – секвенування гіперваріабельної ділянки гена 16S рРНК та РЕА-*hsp65*, однак останній має суттєві обмеження в специфічності порівняно із секвенуванням. Використання IS *902* як специфічного маркера для диференціації *M. аvium*subsp. *silvaticum* виявилося неможливим.
6. Ефективним методом молекулярно-епізоотологічних досліджень представників *М. tuberculosis* complex (MTC) є споліготайпінг, за допомогою якого було диференційовано 15 штамів МТС: 12 *M. bovіs* і 3 *M. caprae*, з них 2 сполігопрофілі є унікальними. Для генотипування атипових видів мікобактерій ефективним є гель-електрофорез у пульсуючому полі, за допомогою якого у всіх 23 досліджених штамів було визначено унікальні фінгерпринтинги і встановлено високий ступінь гетерогенності штамів *M. fortuitum*.
7. У результаті аналізу топографії побудованого філогенетичного древа 17 видів мікобактерій виявлено наявність трьох кластерів: швидкозростаючих мікобактерій (3 види), «термотолерантних» швидкозростаючих мікобактерій (7 видів) і повільнозростаючих мікобактерій (7 видів). Класифікація мікобактерій за Раньйоном не відображає філогенетичні взаємозв’язки мікобактерій.
8. Розроблений метод виділення ДНК з бактеріальної маси мікобактерій для її використання в ПЛР не поступається за ефективністю іншим лабораторним методам, дозволяє здійснити екстракцію ДНК протягом 20 хвилин і не потребує реагентів.
9. Розроблено систему видової диференціації мікобактерій (за допомогою ПЛР, РЕА-*hsp65*, секвенування ділянки гена 16S рРНК, споліготайпінгу) та визначення їхньої генетичної спорідненості за допомогою генотипування (з використанням споліготайпінгу та ГЕПП).
10. На основі розрахованих олігонуклеотидних послідовностей розроблена тест-система для діагностики роду *Мycobacterium*, яка дозволяє виявляти 100 клітин збудника в мілілітрі, що відповідає найкращим світовим аналогам.

**ПРОПОЗИЦІЇ ДЛЯ ПРАКТИКИ**

1. Методичні рекомендації «Лабораторна діагностика туберкульозу тварин і птиці», затверджені Науково-методичною радою Державного департаменту ветеринарної медицини МАП України (протокол № 3 від 23 грудня 2005 р.).
2. Технічні умови на тест-систему для виявлення ДНК бактерій роду *Mycobacterium* методом полімеразної ланцюгової реакції «TUBMYC-Україна»
ТУ У 24.4-00497087-014:2005.
3. Настанова по застосуванню тест-системи для виявлення ДНК бактерій роду *Mycobacterium* методом полімеразної ланцюгової реакції «TUBMYC-Україна».
4. Cистема видової диференціації мікобактерій і визначення їх генетичної спорідненості за допомогою генотипування.
5. Спосіб виділення ДНК мікобактерій з живильних середовищ для діагностики туберкульозу та мікобактеріозів в полімеразній ланцюговій реакції (Деклараційний патент України № 8094 від 15.07.2005 р.).
6. Спосіб діагностики туберкульозу та мікобактеріозів тварин (Деклараційний патент України № 3080 від 15.10.2004 р.).

**Список праць, опублікованих за темою дисертації**

1. Детекція збудників інфекційних захворювань тварин за допомогою полімеразної ланцюгової реакції: Учбово-методичний посібник / Б. Т. Стегній, В. О. Головко, П. І. Вербицький, А. М. Коваленко, І. І. Белоконов, **А. В. Скрипник**. – Х., 2003. – 27 с. (*Дисертантом проведено обробку даних та їх узагальнення*)
2. Полiмеразна ланцюгова реакцiя у практиці ветеринарної медицини: Науково-методичний посiбник / Б. Т. Стегнiй, А. П. Герiлович, О. Ю. Лиманська, В. I. Болотiн, **А. В. Скрипник**, С. А. Сапко, Р. Ю. Анiчин // ННЦ «IЕКВМ». – Х., 2006. – 110 с. (*Дисертантом проведено частину експериментальних досліджень, пошук і аналіз даних*)
3. **Скрыпник, А. В.** Лабораторные методы диагностики туберкулеза животных и птиц: Методические рекомендации. Утверждены научно-методическим советом Государственного департамента ветеринарной медицины Украины 26 января 2005 г. / **А. В.Скрыпник**, Б. Т.Стегний, А. И. Завгородний. – В печати. (*Дисертантом проведено експериментальні дослідження, збір і аналіз даних та їх узагальнення*)
4. Значение и практическая ценность молекулярно-генетических методов детекции возбудителей инфекционных заболеваний животных / Б. Т. Стегний, В. А. Бусол, **А. В. Скрыпник,** А. М. Коваленко, Л. В. Коваленко, И. И. Белоконов, Р. Ю. Аничин // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2003. – Вип. 81. – С. 301–315. (*Дисертантом проведено експериментальні дослідження і обробка даних*)
5. **Скрыпник, А. В.** Изучение генетической вариабельности гипервариабельного участка гена, кодирующего 16S рибосомальную РНК, с помощью секвенирования изолятов *Mycobacterium fortuitum* и *Mycobacterium parascrofulaceum*, выделенных на территории Украины / **А. В. Скрыпник** // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 83. – С. 219–222.
6. Дифференциация разных видов микобактерий / Б. Стегний, K. Sachse, I. Moser, P. Möbius, **А. Скрыпник** // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 84. – С. 647–656. (*Дисертантом сплановано досліди, проведено експериментальні дослідження, аналіз даних та їх узагальнення*)
7. Стегний, Б. Т. Применение сполиготайпинга для детекции *Mycobacterium tuberculosis* complex / Б. Т. Стегний, А. М. Коваленко, **А. В.** **Скрыпник** // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2004. – Вип. 84. – С. 685–689. (*Дисертантом сплановано досліди, проведені експериментальні дослідження, обробку даних та їх узагальнення*)
8. Коваленко, А. М. Розробка ПЛР тест-системи «TubMyc-Україна» для детекції бактерій роду *Mycobacterium /* А. М. Коваленко, Б. Т. Стегній, **А. В. Скрипник** // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2005. – Вип. 85. – С. 528–533. (*Дисертантом розроблено систему праймерів, сплановано досліди, проведено визначення специфічності, чутливості і відтворюваності, аналіз даних та їх узагальнення*)
9. Индикация и дифференциация выделенных культур микобактерий / Б. Т. Стегний, I. Moser, В. М. Горжеев, А. М. Коваленко, И. И. Белоконов, **А. В. Скрыпник** // Підвищення продуктивності сільськогосподарських тварин: Зб. наук. праць ХДЗВА. – Х., 2005. – Т. 15. – С. 328–338. (*Дисертантом проведено експериментальні дослідження, обробку даних та їх узагальнення*)
10. Генотипування мікобактерій за допомогою гель-електрофорезу в пульсуючому полі / **А. В. Скрипник,** Б. Т. Стегній, А. І. Завгородній, В. Г. Скрипник, І. Мозер // Ветеринарна медицина: Міжвід. темат. наук. зб. – Х., 2007. – Вип. 88. – С. 196–202. (*Дисертантом проведено експериментальні дослідження, обробку даних та їх узагальнення*)
11. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive unit genotyping / W. M. Prodinger, A. Brandstatter, L. Naumann, M. Pacciarini, T. Kubica, M. L. Oschiroli, A. Aranaz, G. Nagy, Z. Cvetnic, M. Ocepek, **A. Skrypnyk**, W. Erler, S. Niemann, I. Pavlik, I. Moser // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 10. – P. 4984–4992. (*Дисертантом проведено частину експериментальних досліджень*)
12. Деклараційний патент № 3080 Україна, МКИ G01N33/00. Спосіб діагностики туберкульозу та мікобактеріозів тварин / Б. Т. Стегній, А. М. Коваленко, **А. В. Скрипник**, В. Г. Скрипник (Україна). – № 2004010182; заявлено 09.01.2004; опубл. 15.10. 2004, Бюл. № 10. – 2 с.
13. Деклараційний патент № 8094 Україна, МКИ G01N33/00. Спосіб виділення ДНК мікобактерій з живильних середовищ для діагностики туберкульозу та мікобактеріозів в полімеразній ланцюговій реакції / Б. Т. Стегній, **А. В. Скрипник**, В. Г. Скрипник (Україна). – № 200500408; заявлено 17.01.2005; опубл. 15.07.2005, Бюл. № 7. – 2 с.
14. Stegniy, B. Epidemiological situation of bovine tuberculosis in Ukraine / B. Stegniy, A. Kovalenko, **A. Skrypnyk** // Arbeitstagung des nationalen veterinärmedizinischen Referenzlabors für Tuberkulose und des Referenzlabors für Paratuberkulose: 13–14 Mai 2003, Jena, Deutschland. – 2003. (*Дисертантом проведено обробку даних та часткове їх узагальнення*)
15. Atypische Mykobakterien. Möglichkeiten der Diagnostik und klinische Relevanz / I. Moser, **A. Skrypnik**, H. Hotzel, P. Möbius, W. Erler, J. Gottschaldt, B. Baumgärtner // Arbeitskreis für veterinärmedizinische Infektionsdiagnostik (AVID), 17–19 September 2003, Kloster Banz, Deutschland. – 2003. – S. 22. (*Дисертантом проведено експериментальні дослідження і обробку даних)*
16. The comparative analysis of different methods for mycobacteria typing by the example of *Mycobacterium fortuitum* / B. Stegniy, K. Sachse, I. Moser, H. Hotzel, A.Kovalenko, **A. Skrypnyk**, A. Stegniy // Materials of 6th Conf. «Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology», 6 December 2003, Warsaw, Poland. – 2003. – P. 196–203. (*Дисертантом сплановано досліди, проведено експериментальні дослідження, обробку даних та їх узагальнення*)
17. Стегний, Б. Т. Поэтапная ПЦР тест-система для диагностики туберкулеза и микобактериозов / Б. Т. Стегний, А. М. Коваленко, **А. В. Скрыпник** // Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе: Материалы междунар. науч.-практ. конф. – 2004., СПб. – С. 130–131. (*Дисертантом проведено більшу частину експериментальних досліджень, обробку даних та їх узагальнення*)
18. Mycobacterial infections in cattle in Ukraine during 2001–2005 / **A. Skrypnyk**, A. Zavgorodniy, B. Stegniy, I. Moser // Materials of 27th Annual Congress of the European Society of Mycobacteriology, 9–12 July 2006, London, United Kingdom. – 2006. (*Дисертантом проведено збір і аналіз даних та їх узагальнення*)
19. Epizootic analysis of cattle mycobacterial infections in Ukraine during 2001–2005 / **A. Skrypnyk**, A. Zavgorodniy, B. Stegniy, V. Skrypnyk, I. Moser. // Arbeitstagung des nationalen Referenzlabors für Tuberkulose und des nationalen Referenzlabors für Paratuberkulose, 11-12 Oktober 2006, Jena, Deutschland. – 2006 (*Дисертантом проведено збір і аналіз даних та їх узагальнення*)

**Скрипник А. В. Молекулярно-генетична диференціація мікобактерій, виділених в Україні,** **та їх філогенетичні взаємозв’язки. – Рукопис.**

*Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.03 – ветеринарна мікробіологія та вірусологія. Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, 2007.*

Дисертація присвячена вивченню видового складу ізолятів мікобактерій з різних регіонів України, їх тинкторіальних і культурально-морфологічних властивостей, філогенетичних взаємозв’язків та розробці системи молекулярно-генетичного виявлення і видової диференціації мікобактерій.

Проведено видову диференціацію 125 штамів мікобактерій, ізольованих в 11 областях України впродовж 1982–2004 рр. Вперше описано циркуляцію в Україні *Mycobacterium caprae, M.* *frederiksbergensе, M. engbackii, M. doricum, M. parascrofulaceum*, *M. hassiacum, M.  confluentis, M. elephantis*. Показано, що серед досліджених атипових мікобактерій (109 ізолятів) найбільш поширеними є *M. аvium* (34 %) та *M. fortuitum* (31 %)*.*

Встановлено, що серед атипових мікобактерій від реагуючої на туберкулін ВРХ найчастіше виділяється *M. аvium* (32,0 % ізолятів) (зокрема *M. avium* subsp. *hominissuis* – 22,7 %) і *M. fortuitum* (17,3 %), які грають провідну роль у сенсибілізації ВРХ до туберкуліну для ссавців. На долю *M. nonchromogenicum* припадає 9,3 %, *M. phlei* – 8,0 %, інших 9 видів атипових мікобактерій – 33,3 %.

У результаті філогенетичного аналізу визначено три кластери: швидкозростаючі, «термотолерантні» швидкозростаючі і повільнозростаючі мікобактерії, що свідчить про генетичну детермінацію ознаки швидкості росту мікобактерій. Класифікація мікобактерій за Раньйоном не відображає філогенетичні взаємозв’язки мікобактерій.

На підставі аналізу молекулярно-генетичних методів видової диференціації і генотипування мікобактерій (ПЛР, РЕА-*hsp65*, споліготайпінга, ГЕПП, секвенування 16S рДНК) розроблено систему їх видової диференціації і визначення їх генетичної спорідненості за допомогою генотипування.

Розроблено метод виділення мікобактеріальної ДНК із бактеріальної маси для її використання в ПЛР і родоспецифічну тест-систему для детекції бактерій роду *Мycobacterium* методом ПЛР.

**Ключові слова:** туберкульоз, атипові мікобактерії, видова диференціація, генотипування, філогенетичний аналіз, екстракція ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, рестрикційно-ензимний аналіз *hsp65*, споліготайпінг, гель-електрофорез у пульсуючому полі, секвенування 16S рДНК.

**Скрыпник А. В. Молекулярно-генетическая дифференциация микобактерий, выделенных в Украине, и их филогенетические взаимосвязи. - Рукопись.**

*Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.03 – ветеринарная микробиология и вирусология. Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», Харьков, 2007.*

Диссертация посвящена изучению видового состава изолятов микобактерий из разных регионов Украины, их тинкториальных и культурально-морфологических свойств, филогенетических взаимосвязей и разработке системы их молекулярно-генетического выявления и видовой дифференциации.

В работе приведены результаты определения видовой принадлежности 125 штаммов микобактерий, изолированных в 11 областях Украины в течение 1982–2004 гг. Впервые описана циркуляция в Украине таких видов микобактерий, как *Mycobacterium caprae, M. frederіksbergensе, M. engbackіі, M. dorіcum, M. confluentіs, M. parascrofulaceum, M. hassіacum, M. elephantіs*. Впервые проведенным типированием до подвидов 38 штаммов *M. аvium* установлено, что соотношение между *M. avium* subsp. *hominissuis* и *M. avium* subsp. *avium* составляет 1:1.

Показано, что из числа изученных 125 изолятов наибольшее распространение имеют комплекс *M. аvіum* (34 %) и *M. fortuіtum* (31 %). Значительно меньшая доля приходится на *M. phlei* (13 %) и *M. nonchromogenicum* (6 %). Остальные виды атипичных микобактерий представлены единичными изолятами, их доля не превышает 2 % от общего количества изолятов.

Установлено, что от реагирующего на туберкулин крупного рогатого скота из атипичных микобактерий наиболее часто выделяется комплекс *M. аvіum* (32,0 % изолятов) (в частности *M. avіum* subsp. *homіnіssuіs* – 22,7 %) и *M. fortuіtum* (17,3 %), которые являются одними из ведущих факторов, вызывающих сенсибилизацию КРС к туберкулину. На долю *M. nonchromogenіcum* приходится 9,3 %, *M. phleі* – 8,0 %, других 9 видов атипичных микобактерий – 33,3 %.

При исследовании культуральных и тинкториальных свойств 125 культур микобактерий установлено, что наиболее быстрые темпы роста культур с одновременной возможностью подробного изучения их культурально-морфологических свойств могут быть получены при параллельном использовании разных питательных сред: яичных, агарсодержащих и жидких.

По результатам анализа топографии построенного филогенетического древа было определено наличие трех кластеров: быстрорастущих, «термотолерантных» быстрорастущих и медленнорастущих микобактерий, что свидетельствует о генетической детерминации признака скорости роста микобактерий. Классификация микобактерий по Раньйону не отображает филогенетические взаимосвязи микобактерий.

В работе приведен анализ качественных характеристик молекулярно-генетических методов видовой дифференциации и генотипирования микобактерий: ПЦР, РЭА-*hsp65*, сполиготайпинга, ГЭПП, секвенирования 16S рДНК. На основе изучения генетической вариабельности определена их диагностическая ценность. Установлено, что для видовой идентификации представителей комплекса *М. tuberculosіs* наиболее эффективным является сполиготайпинг, подвидов *М. avіum* – ПЦР, атипичных микобактерий – секвенирование гипервариабельного участка 16S рДНК и РЭА-hsp65. Последний, однако, имеет существенные ограничения в специфичности по сравнению с секвенированием. Использование ІS*902* в качестве специфического маркера для дифференциации *M. аvіum* subsp. *sіlvatіcum* методом ПЦР оказалось невозможным.

Эффективным инструментом молекулярно-эпизоотологических исследований *М. tuberculosіs* complex (MTC) является сполиготайпинг, с помощью которого было дифференцированно 15 штаммов МТС: 12 *M. bovіs* и 3 *M. caprae*. Для генотипирования атипичных видов микобактерий эффективным является гель-электрофорез в пульсирующем поле, с помощью которого у всех 23 исследованных штаммов были определены уникальные фингерпринтинги и установлена высокая степень гетерогенности штаммов *M. fortuіtum*.

На основе проведенного анализа диагностической ценности молекулярно-генетических методов разработана система видовой дифференциации микобактерий и определение их генетического родства с помощью генотипирования. Система состоит в проведении каскада ПЦР для определения таких видов микобактерий, как *M. bovіs, M. tuberculosіs, M. avіum* (с последующим типированием его до подвидов), *M. іntracellulare*. Видовую дифференциацию других видов атипичных микобактерий предлагаем проводить с помощью РЭА-*hsp65* и секвенирования, в частности 16S рДНК. Установление степени генетического родства исследуемых штаммов предлагаем проводить с помощью таких методов, как сполиготайпинг, ГЭПП, ПДРФ и др.

На основе результатов анализа физических методов экстракции ДНК был разработан метод выделения микобактериальной ДНК из бактериальной массы для её использования в ПЦР, который характеризуется тем, что не нуждается в реагентах, не уступает по эффективности другим лабораторным методам и позволяет провести экстракцию ДНК в течение 20 минут.

Разработана родоспецифическая тест-система для детекции бактерий рода *Мycobacterіum* методом ПЦР. Порог чувствительности составляет 100 клеток/мл, специфичность и внутриродовую универсальность праймеров установлено положительной реакцией 110 культур микобактерий, принадлежащих 19 видам. Показатели специфичности, чувствительности и воспроизводимости тест-системы на основе разработанных праймеров подтверждены результатами межлабораторных и государственных комиссионных испытаний.

**Ключевые слова:** туберкулёз, атипичные микобактерии, видовая дифференциация, генотипирование, филогенетический анализ, экстракция ДНК, полимеразная цепная реакция, рестрикционно-энзимный анализ *hsp65*, сполиготайпинг, гель-электрофорез в пульсирующем поле, секвенирование 16S рДНК.

**Skrypnyk A.V. Molecular-genetic differentiation of mycobacteria isolated in Ukraine, and their phylogenetic interrelationships. – Manuscript.**

*Thesis for scientific degree of the Candidate of Veterinary Sciences, speciality 16.00.03 – Veterinary Microbiology and Virology. National Scientific Center “Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine”, Kharkiv, 2007.*

The thesis is devoted to studying the species structure of mycobacterial isolates isolated from different regions of Ukraine, their tinctorial and cultural-morphological properties, phylogenetic interrelationships and developing the system of their molecular-genetic identification and species differentiation.

Species differentiation of 125 mycobacterial strains isolated from agricultural and domestic animals, poultry, synanthropic birds and environment in 11 regions of Ukraine in 1982-2004 was conducted. For the first time in Ukraine the circulation of *M. caprae, M.* *frederiksbergensе, M. engbackii, M. doricum, M. parascrofulaceum*, *M. hassiacum, M. confluentis, M. elephantis* was described. It was shown that among atypical mycobacteria (109 isolates) the greatest occurrence belongs to *M. аvium* (34 %) and *M. fortuitum* (31 %)*.*

It was determined that among atypical mycobacteria isolated from cattle reacted on tuberculin for mammals high occurrence had *M. аvium* (32.0 % isolates) (in particular *M. avium* subsp. *hominissuis* – 22.7 %) and *M. fortuitum* (17.3 %), which seems to play the leading role in cattle sensibilization to tuberculin for mammals. Isolates of *M. nonchromogenicum* share 9.3 % from all isolates, *M. phlei* – 8.0 %, other 9 species of atypical mycobacteria – 33.3 %.

Phylogenetic analysis revealed the evidence of three clusters: fast growing, “thermotolerance” fast growing and slow growing mycobacteria. That evidence testifies that about the genetic determination of mycobacteria growth speed. Phylogenetic interrelationships do not correlate with Runyon’s classification of mycobacteria.

On the basis of the analysis of molecular-genetic methods for mycobacteria species differentiation and genotyping (PCR, REA-*hsp65*, spoligotyping, PFGE, 16S rDNA sequencing) it was developed the system for mycobacteria species differentiation and genetic relatedness determination by genotyping.

The method for isolation of mycobacterial DNA from bacterial mass for PCR and diagnostic kitspecific forgenus *Mycobacterium* was developed.

**Key words:** tuberculosis, atypical mycobacteria, species differentiation, genotyping, phylogenetic analysis, DNA extraction, polymerase chain reaction, restriction-enzyme analysis *hsp65*, spoligotyping, pulsed-field gel electrophoresis, 16S rDNA sequencing.

Для заказа доставки данной работы воспользуйтесь поиском на сайте по ссылке: <http://www.mydisser.com/search.html>