

о наличии у них иных факторов патогенности, помимо токсина, одним из которых может явиться адгезивная активность. В нашем исследовании штаммы недифтерийных коринебактерий (*C. pseudodiphtheriticum*), выделенные от обследованных с патологией респираторного тракта, обладали наиболее высокой степенью адгезивности по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, выделенными от практически здоровых лиц, причём этот показатель коррелировал у них со способностью к инвазии. Этот факт особенно интересен, так как ранее считалось, что коринебактерии – неинвазивные микроорганизмы. Подтверждение наличия инвазивной активности у штаммов *C. pseudodiphtheriticum* представлено на электронограмме, где отчетливо видна электронно-прозрачная клетка коринебактерий, внедряющаяся в цитоплазму клеток фарингеального эпителия Her-2. Возможно, внутриклеточное расположение недифтерийных коринебактерий является одним из факторов, способствующих развитию острого воспалительного процесса в респираторном тракте. Не случайно от больных с ангинами были выделены штаммы коринебактерий с более высокой инвазивной и адгезивной активностью, чем от больных с хроническим тонзиллитом. Внутриклеточное расположение создаёт этим микроорганизмам определённые преимущества, позволяя избежать защитного действия иммунной системы организма, а также антибактериальных препаратов. На основании этого можно предположить, что для реализации патогенных свойств недифтерийным коринебактериям, не обладающим способностью продуцировать токсин, необходимы такие факторы патогенности, как адгезивность и инвазивность.

**Заключение.** Недифтерийные коринебактерии штаммов *C. pseudodiphtheriticum*, выделенных от больных с патологией респираторного тракта (ангина, хронический тонзиллит), обладали более высокой способностью к адгезии и инвазии по сравнению со штаммами *C. pseudodiphtheriticum*, изолированными от практически здоровых лиц. Выраженная способность к адгезии и инвазии, рассматриваемым как факторы патогенности *C. pseudodiphtheriticum*, позволяет

этим микроорганизмам, не продуцирующим токсические субстанции, реализовывать свой патогенный потенциал, защищая их от действия иммунной системы хозяина и антибактериальных препаратов.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 2–7 см. REFERENCES)

1. Харсеева Г.Г., Воронина Н.А.. Факторы патогенности *Corynebacterium non diphtheriae*. Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016; (3) 97-104.

#### REFERENCES

1. Kharseeva G.G., Voronina N.A. Factors of pathogenicity *Corynebacterium non diphtheriae*. Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunobiologii. 2016; (3) 97-104. (in Russian)
2. Oliveira A., Oliveira L. C., Aburjaile F. Insight of Genus *Corynebacterium*: Ascertain the Role of Pathogenic and Non-pathogenic Species. J. Frontiers in Microbiology. 2017; Article 1937.
3. Sangal V., Hoskisson P. A. Evolution, Epidemiology and diversity of *Corynebacterium diphtheriae*: new perspectives on an old foe. Infect. Genet. Evol. 2016; (43): 364–70.
4. Sangal V., Blom J., Sutcliffe I.C., Ch. von Hunolstein, Burkovski A., Hoskisson P.A.. Adherence and invasive properties of *Corynebacterium diphtheriae* strains correlates with the predicted membrane-associated and secreted proteome. BMC Genomics. 2015; 16:765.
5. Tauch A., Burkovski A. Molecular armory or niche factors: virulence determinants of *Corynebacterium* species. FEMS Microbiology Letters. 2015; 362 (23).
6. Ott L., Höller M., Rheinlaender J. Strain-specific differences in pili formation and the interaction of *Corynebacterium diphtheriae* with host cells. BMC Microbiology. 2010; 10: 257.
7. Luft J.H. Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, methods of use, and mechanism of action. The Anatomical Record. 1971; 3 (171): 369-415.

Поступила 21.03.18

Принята к печати 12.04.18

©КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 579.266.6:577.21.083

Щит И.Ю.<sup>1</sup>, Игнатов К.Б.<sup>2,3</sup>, Бикетов С.Ф.<sup>1</sup>

## СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ LAMP И ПЦР-РВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ САПА И МЕЛИОИДОЗА

<sup>1</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, г. Оболенск;

<sup>2</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 117971, Москва;

<sup>3</sup>Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии РАН, 127422, Москва

Представлены результаты выявления ДНК штаммов *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* с помощью петлевой изотермической амплификации (LAMP) и ПЦР с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Показано, что в ПЦР-РВ праймеры надежно выявляли ДНК тех микроорганизмов, к последовательностям которых они были сконструированы. ДНК гетерологичных штаммов указанные праймеры не выявляли. При проведении LAMP ни один набор праймеров не показал высокой аналитической чувствительности и специфичности. Праймеры выявляли ДНК не всех исследованных штаммов, к генам-мишеням которых они были рассчитаны, но были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов. При этом результаты повторных экспериментов плохо воспроизводились. Неудачи при проведении LAMP могут быть обусловлены наличием GC-богатых областей в гене *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* и формированием вторичных структур в изотермических условиях. В случае таких сложных для LAMP матриц, как ДНК *Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei*, рекомендуется использовать ПЦР-РВ для детекции возбудителей.

**Ключевые слова:** петлевая изотермическая амплификация; ПЦР в режиме реального времени; *Burkholderia mallei*; *Burkholderia pseudomallei*.

Для корреспонденции: Щит Ирина Юрьевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов; e-mail: [shchit@obolensk.org](mailto:shchit@obolensk.org)

**Для цитирования:** Шчит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦП-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (6): 378-384 DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384>

Shchit I.Yu.<sup>1</sup>, Ignatov K.B.<sup>2,3</sup>, Biketov S.F.<sup>1</sup>

#### COMPARATIVE ANALYSIS OF LAMP AND REAL TIME PCR METHODS TO DETECT PATHOGENS OF GLANDERS AND MELIODOSIS.

<sup>1</sup>State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russia;

<sup>2</sup>The Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>3</sup>All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology

Results of detection of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* DNA strains by LAMP (Loop-mediated Isothermal Amplification) and Real Time PCR are shown. It has been revealed that, in Real Time PCR, primers steadily detected DNA of those microorganism for the sequences of which they were designed. The above mentioned primers did not detect DNA of heterologous strains. During LAMP method no set of primers showed high analytical sensitivity and specificity. Primers did not detect DNA of all the strains under research to target genes of which they were not intended, but they were capable of directing the synthesis of fragments of genes of heterologous strains. Furthermore, it was difficult to reach the same results during repeated experiments. Failures during LAMP may occur due to existence of GC-rich regions in *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* genomes and due to emergence of secondary structures in isothermal conditions. It is recommended to use Real Time PCR in order to detect pathogens, in case of such matrixes as *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* DNAs which are very complicated for LAMP.

**Key words:** loop mediated isothermal amplification of DNA; LAMP; Real Time PCR; *Burkholderia mallei*; *Burkholderia pseudomallei*.

**For correspondence:** Shchit I.Yu., Ph.D. (Biology), Senior Researcher of the department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, e-mail: [shchit@obolensk.org](mailto:shchit@obolensk.org)

**For citation:** Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Biketov S.F. Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and melioidosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2018; 63 (6): 378-384 (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384>

#### Information about authors:

Shchit I. Yu., <http://orcid.org/0000-0001-9871-8018>

Ignatov K.B., <https://orcid.org/0000-0001-8900-5278>

Biketov S.F., <http://orcid.org/0000-0003-1179-6895>

**Acknowledgment.** The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Russian Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 26.03.2018

Accepted 13.04.2018

*Burkholderia mallei* и *Burkholderia pseudomallei* относятся к грамотрицательным бактериям, которые являются возбудителями сапа и мелиоидоза соответственно. *B. mallei* патогенна для человека и животных. Сап – заболевание, которое в первую очередь поражает непарнокопытных (лошадей, мулов и ослов). Случаи заболевания регистрируются в странах Африки, Азии, Ближнего Востока, Центральной и Южной Америки [1]. Человек заражается при контакте с больными животными. Клинические проявления заболевания зависят от способа заражения. При сапе наблюдаются лихорадка, пневмония, абсцессы в печени, селезенке, на коже и мышцах, бактериемия [2].

*B. pseudomallei* также патогенна для человека и животных и является возбудителем мелиоидоза у людей. Заражение мелиоидозом происходит в результате контакта с заражённой почвой и водой [3]. Источником инфекции также являются сельскохозяйственные и дикие животные. Единичные случаи и вспышки мелиоидоза встречаются практически на всех континентах. Симптомы мелиоидоза похожи на симптомы, описанные для сапа, но, кроме контактного и воздушно-капельного способов заражения, существует также алиментарный [4]. *B. pseudomallei* является основной причиной сепсиса в Северной Австралии [5] и бактериальной пневмонии в Таиланде [6]. Даже в случае интенсивной антимикробной терапии смертность как при сапе, так и при мелиоидозе высокая (до 50%) [7]. При отсутствии лечения смертность достигает 95% [8].

Кроме того, оба микроорганизма представляют собой потенциальные агенты биотерроризма: для инфицирования требуются низкие дозы, заболеваемость и смертность высокие, возбудители устойчивы ко многим антибиотикам, их можно распространять в виде аэрозоля [9].

Для диагностики сапа и мелиоидоза применяются ми-

кробиологические методы, иммунологические тесты на основе моноклональных антител и молекулярные методы для идентификации нуклеотидных последовательностей возбудителей. Существующие бактериологические и иммунологические методы идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* недостаточно эффективны для экспресс-диагностики. Имеются сведения о применении ПЦП с детекцией продукта в режиме реального времени (ПЦП-РВ) с праймерами к последовательностям гена *fliP*, который кодирует белок флагеллин Р, что позволило выявить оба микроорганизма в клинических образцах [10, 11]. Также разработаны ПЦП тест-системы, в том числе мультиплексные, для детекции и дифференциации *B. mallei* и *B. pseudomallei* [12, 13]. Сложность при разработке подобных тестов заключается в том, что генетически *B. mallei* и *B. pseudomallei* очень близки: более 99% их последовательностей гомологичны, поэтому дифференцировать их друг от друга с помощью молекулярно-генетических методов затруднительно.

Относительно новый метод амплификации ДНК – LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification, или петлевая изотермическая амплификация) позволяет провести быструю высокоспецифичную диагностику вирусных и бактериальных инфекций. Он чувствителен, прост, не требует сложного оборудования и больших затрат времени. Этот метод, разработанный Т. Notomi и соавт. [14, 15], представляет собой реакцию изотермической амплификации выбранной последовательности ДНК. Реакция синтеза новых цепей ДНК сопровождается смещением (вытеснением) старых. Амплификацию и детектирование гена можно осуществить за одну стадию путём инкубации смеси образцов, праймеров, ДНК-полимеразы с функцией вытеснения цепей и субстратов при постоянной температуре (около 65°C). Эффективность ам-

плификации очень высока, в течение 15–60 мин ДНК амплифицируется  $10^2$ – $10^{10}$  раз. Высокая специфичность достигается за счёт использования 2–3 пар праймеров на ген-мишень.

Имеется несколько сообщений о применении LAMP для детекции *B. mallei*. Публикации на эту тему появились совсем недавно. В 2016 г. вышла статья иранских ученых [16], в которой описывалось применение метода LAMP для детекции *B. mallei*. В качестве мишени для конструирования праймеров был выбран ген интегразы *B. mallei*. Хотя для тестирования праймеров использовали всего 2 штамма *B. mallei* и 2 гетерологичных штамма *B. pseudomallei* и *Pseudomonas aeruginosa*, авторы предлагают разработанный ими набор применять для ранней диагностики сапа. В 2017 г. появилась публикация V. Pal и соавт. [17], посвящённая применению LAMP для детекции *B. mallei*. Авторы сообщают, что с помощью данного метода удалось выявить 1 пг геномной ДНК возбудителя и  $5,5 \times 10^3$  КОЕ/мл *B. mallei* в крови, и рассматривают LAMP как альтернативу ПЦР для выявления сапа в эндемичных районах.

Сведений об использовании LAMP для выявления ДНК *B. pseudomallei* также немного. Группа исследователей [18] для детекции *B. pseudomallei* с помощью LAMP использовала в качестве мишени кластер генов системы секретиции III типа (TTS1). Амплификация показала высокую чувствительность и специфичность – ДНК *B. pseudomallei* выявлена в 10 из 10 образцов с возбудителем мелиоидоза, в случае 5 образцов *B. thailandensis* и 5 образцов *B. mallei* был получен отрицательный результат. При обнаружении ДНК *B. pseudomallei* в образцах от больных диагностическая точность LAMP составила 87,5%, но метод был неэффективен при исследовании образцов крови (из 44 положительных образцов с помощью LAMP выявлен только 1 образец).

Целью данной работы является оценка оригинальных праймеров для выявления ДНК штаммов *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью LAMP и ПЦР-РВ.

Для расчета LAMP-праймеров с целью идентификации *B. mallei* и *B. pseudomallei* мы использовали несколько мишеней: область *fliP/IS407A B. mallei*, ген *fliP B. pseudomallei*, ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei*. В работе использовали 2 фермента с функцией замещения цепи: Bst-полимеразу 2.0 WarmStart («New England Biolabs», США) и SD-полимеразу [19].

**Материал и методы. Штаммы бактерий.** В работе использованы 12 штаммов *Burkholderia mallei*: *B. mallei* 10230, *B. mallei* 5/5 RP-4, *B. mallei* Загреб, *B. mallei* Иванович, *B. mallei* Муксувар Р-5, *B. mallei* Р-1, *B. mallei* Р-5, *B. mallei* С5, *B. mallei* Z-12, *B. mallei* Ц-4, *B. mallei* t-12, *B. mallei* B120; 11 штаммов *Burkholderia pseudomallei*: *B. pseudomallei* 100, *B. pseudomallei* 61503, *B. pseudomallei* 101, *B. pseudomallei* 51274, *B. pseudomallei* 115, *B. pseudomallei* 116, *B. pseudomallei* 60913, *B. pseudomallei* 301, *B. pseudomallei* 102, *B. pseudomallei* 135, *B. pseudomallei* 132 из коллекции ФКУЗ «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора. В исследованиях также использовали *F. tularensis* 15/10, *B. abortus* 19, *Y. pestis* И-3449, *Y. pseudotuberculosis* C79, *Y. enterocolitica* C-126, *B. anthracis* СТИ-1, *V. cholerae* eltor M878, *E. coli* JM83, *L. pneumophila* 33152 из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболонск». Все работы проводили в соответствии с требованиями безопасности<sup>1</sup>.

**Культивирование.** Культуры патогенных буркхолдерий и близкородственных микроорганизмов из ампул высевали в бульон Хоттингера с 5% содержанием глицерина по ГОСТу 6259-75, рН  $7,0 \pm 0,2$ , и инкубировали при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 18–24 ч. Затем культуры пересевали на агар Хоттингера с 5% содержа-

ем глицерина и инкубировали в течение 24–48 ч при  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Для культивирования гетерологичных микроорганизмов использовали общепринятые питательные среды для соответствующих видов (FТ-агар – для *F. tularensis*; бульон Хоттингера и агар Хоттингера – для *B. anthracis*, *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli*; бруцеллагар – для бруцелл; легионелбакагар – для легионелл). Инкубацию посевов культур проводили при  $37^\circ\text{C}$  и при  $28^\circ\text{C}$  – для *Y. pestis*.

Для дальнейшего использования в ПЦР готовили взвеси каждого штамма в концентрации, соответствующей 10 МЕ по стандартному образцу мутности бактериальных взвесей (комплект БАК) СОП № 1-98 ООО «ОРМЕТ», Екатеринбург, эквивалентной  $110^9$  м. кл./мл, которые затем разводили 0,9% раствором натрия хлорида от  $1 \cdot 10^6$  м. кл./мл до концентрации  $1 \cdot 10^8$  м. кл./мл для *B. pseudomallei* и *B. mallei*.

Из каждой культуры готовили отдельно суспензии в 2 мл 0,9% раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 ед. ГИСК им. Л. А. Тарасевича, что соответствует  $1 \cdot 10^8$  м. кл./мл для *B. anthracis*,  $1 \cdot 10^9$  м. кл./мл для *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Brucella*, *Legionella* и *E. coli*,  $5 \cdot 10^{10}$  м. кл./мл для *F. tularensis*. Суспензии с гетерологичными микроорганизмами разводили до концентрации  $1 \cdot 10^6$  м. кл./мл.

**Подготовка проб для ПЦР и LAMP.** Для обеззараживания в пробирки с тестируемыми микробными взвесями добавляли мертиолат натрия до конечной концентрации 0,01% (1:10000) и прогревали на водяной бане при  $56 \pm 1^\circ\text{C}$  в течение 30 мин. Затем в отдельные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл переносили по 100 мкл обработанных мертиолатом натрия проб, добавляли лизирующий буфер на основе 6М гуанидинизотиоцианата в объеме, указанном в инструкции к набору для выделения ДНК, и инкубировали 30 мин при  $65 \pm 1^\circ\text{C}$ . После выполнения данного этапа материал считали обеззараженным.

**Выделение ДНК.** ДНК выделяли с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (ОАО «ИнтерЛабСервис»). Работу проводили в соответствии с инструкцией к указанному набору.

**Конструирование праймеров.** Праймеры были рассчитаны с помощью программы Primer Explorer 3 (<http://primerexplorer.jp/elamp3.0.0/index.html>) и проверены на специфичность с использованием программы BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Праймеры синтезированы и очищены компанией «Синтол», Москва. Последовательности праймеров представлены в таблице.

**Постановка LAMP.** При использовании SD-полимеразы реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 1х SD-буфер («РусЭнзим», Россия), 40 ед. SD-полимеразы («РусЭнзим», Россия), 3,5 мМ  $\text{MgCl}_2$ , 0,5 мМ каждого дНТФ, 4 праймера: 0,2 мкМ F3, 0,2 мкМ B3, 0,8 мкМ VIP, 0,8 мкМ FIP, 5 мкл матрицы. Реакцию проводили при  $60^\circ\text{C}$  в течение 60 мин с предварительным прогревом при  $92^\circ\text{C}$  в течение 2 мин на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология»).

При использовании Bst-полимеразы реакционная смесь содержала 0,8 мкМ каждого FIP- и VIP-праймеров, 0,2 мкМ каждого F3- и B3-праймеров, 1х реакционный буфер для изотермической амплификации, содержащий 20 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl, 10 мМ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2 мМ  $\text{MgSO}_4$ , 0,1% Твин-20 («New England BioLabs», США), 0,5 мМ каждого дНТФ, 0,8 М бетаина, 2 ед. полимеразы Bst 2.0 WarmStart («New England BioLabs», США), 1–5 мкл образца, воды до конечного объема реакции 25 мкл. Реакцию собирали на льду. Образцы инкубировали на амплификаторе Терцик («ДНК-Технология») при  $63^\circ\text{C}$  в течение 60 мин.

**Визуализация продуктов LAMP.** Электрофорез продуктов LAMP проводили в 1,0% агарозном геле в ТАЕ-буфере, гели окрашивали с помощью бромистого этидия. Визуализацию осуществляли на УФ-транслюминаторе при длине волны 260 нм.

**Постановка ПЦР-РВ.** Реакцию выполняли на приборе для ПЦР-РВ Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems (США) в следующем режиме: первичная денатурация:  $95^\circ\text{C}$  – 10 мин, далее 40 циклов:  $95^\circ\text{C}$  – 15 с,  $60^\circ\text{C}$  – 1 мин, считывание

<sup>1</sup> Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. – М., 2009.

**Праймеры для детекции *B. pseudomallei* и *B. mallei* с помощью LAMP и ПЦР-РВ**

№ п/п	Название праймера	Последовательность праймера	Мишень
1	F3-Bm252	5'-gacgatgatccgcgtgaag-3'	<i>fliP/IS407A</i>
2	B3-Bm252	5'-ggactacaacgagcaaaaggc-3'	<i>B. mallei</i>
3	FIP-Bm252	5'-gccgcttccaggagttggtt-tcgttgacctgccccct-3'	
4	BIP-Bm252	5'-gtcccgcggtgccccgatg-cgcacagcgcactgaac-3'	
5	F3-Bm21	5'-gctgaagctcgttgacct-3'	<i>fliP/IS407A</i>
6	B3-Bm21	5'-ggactacaacgagcaaaaggc-3'	<i>B. mallei</i>
7	FIP-Bm21	5'-gccgcttccaggagttggtt-ccccctcgataggccaat-3'	
8	BIP-Bm21	5'-gtcccgcggtgccccgatg-cgcacagcgcactgaact-3'	
9	F3-Bm26	5'-caggtgtagaacgacgcg-3'	<i>IS407A-fliP</i>
10	B3-Bm26	5'-cgatgctgctgttctgc-3'	<i>B. mallei</i>
11	FIP-Bm26	5'-agaagcctttacggaacagca-ctgcacagttcttgaccg-3'	
12	BIP-Bm26	5'-tactagactccgctgcccc-cgatgctgctgatgatgacg-3'	
13	F3-Bma54	5'-gcttccttcgaaaacccgat-3'	<i>IS407A-fliP</i>
14	B3-Bma54	5'-ggcacgacctattcgtgag-3'	<i>B. mallei</i>
15	FIP-Bma54	5'-ggccagccggagctagtaaaag-ttccgtaaacgctttctca-3'	
16	BIP-Bma54	5'-ctgtttgtagggggcaggtcac-gacgatgctgctgtcac-3'	
17	F3-Bp228	5'-caggttgatgctggaggc-3'	<i>Orf12</i> области кластера генов TTS1
18	B3-Bp228	5'-tcgaacattctgctcgc-3'	<i>B. pseudomallei</i>
19	FIP-Bp228	5'-ccgcccgtgttgatcgat-gaacctgctgctctatgcg-3'	
20	BIP-Bp228	5'-ggcaggatggccgatctg-ttcgataatgctctgcccgc-3'	
21	F3-Bp27	5'-attcaggttgatgctggagg-3'	<i>Orf12</i> области кластера генов TTS1
22	B3-Bp27	5'-cgataatgctctgcccgc-3'	<i>B. pseudomallei</i>
23	FIP-Bp27	5'-ccgcccgtgttgatcgat-gcaacctgctgctatgcg-3'	
24	BIP-Bp27	5'-atccggttgcgctttatgctcg-taatgggcaagcagatcgg-3'	
25	F3-Bp1	5'-ctcggcgctcaactc-3'	<i>fliP B. pseudo-</i>
26	B3-Bp1	5'-tgaggaagaggcgagc-3'	<i>mallei</i>
27	FIP-Bp1	5'-acgacagcatcgtgagcagc-acggcggcagcacta-3'	
28	BIP-Bp1	5'-ttcacgggatcatcgtgc-gacgagcactgattcgg	

флуоресценции; построение кривой плавления в интервале от 60 до 95°C. Для постановки ПЦР-РВ использовали набор реактивов для проведения ПЦР-РВ с красителем SYBR Green I («Синтол», Москва). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала 1х буфер Б, 1,25 ед. Taq-полимеразы, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,25 mM каждого дНТФ, праймеры F3 + B3 0,4 мкМ каждого или праймеры FIP + BIP 0,4 мкМ каждого, 5 мкл матрицы. Накопление специфического продукта амплификации – участка ДНК *B. mallei* или *B. pseudomallei* – детектировалось по каналу FAM/SYBR Green dye. Анализ данных (оценку эффективности реакции, анализ кривой плавления и вычисление температуры плавления (Tm) ампликона осуществляли с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems.

**Воспроизводимость.** Все эксперименты повторяли не менее 3 раз, в том числе выращивание штаммов, выделение ДНК, постановку LAMP и детекцию продукта.

**Результаты. Выбор мишеней и конструирование праймеров для изотермической амплификации ДНК возбудителей сапа и мелиоидоза.** Показано, что удобными мишенями для дифференциальной детекции патогенных буркхолдерий с помощью ПЦР служат ген *fliP*, кодирующий белок флагеллин Р, и инсерционный элемент IS407A. Это обусловлено тем, что хотя инсерционный элемент IS407A присутствует в геноме обоих микроорганизмов, только у *B. mallei* он встраивается в последовательность гена флагеллина Р, меняет ориентацию гена *fliP* на противоположную, нарушает его экспрессию, и *B. mallei* теряет подвижность [20]. У *B. pseudomallei* вставки IS407A внутри гена *fliP* нет, кроме того, последовательности гена *fliP* у *B. pseudomallei* и других видов буркхолдерий, таких как *B. ceracia*, различаются. Область *fliP/IS407A* является уникальной для вида *B. Mallei*, и, как показали D. Gillings и соавт. [21]

с помощью пиросеквенирования, определение наличия или отсутствия последовательности IS407A в гене *fliP* позволяет надёжно дифференцировать эти два вида. Данные пиросеквенирования были использованы для конструирования праймеров с целью детекции возбудителей сапа и мелиоидоза.

В результате были синтезированы несколько наборов праймеров, направляющих синтез фрагмента участка *fliP/IS407A B. mallei* – Bm252 и Bm21, Bm26 и Bma54, а также Bp1 к участку гена *fliP* для детекции *B. pseudomallei*. Также для выявления ДНК *B. pseudomallei* в качестве мишени использовали ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei*, который является специфичным для данного микроорганизма. К фрагменту этого гена был рассчитан набор праймеров Bp27.

**Амплификация фрагментов ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью ПЦР-РВ.**

Первоначально провели оценку специфичности праймеров с помощью ПЦР *in silico* (<http://insilico.ehu.es/PCR/Amplify.php>). Полученные данные показали, что все наборы обладают способностью направлять синтез уникальных участков на хромосомной ДНК тех возбудителей, к ДНК-последовательностям которых они рассчитаны. Внешние праймеры F3B3 из наборов Bm252, Bm21, Bm26, Bma54 могли направлять синтез фрагмента более 1 тысячи пар нуклеотидов (т. п. н.) с ДНК некоторых штаммов *B. mallei*, но так как в LAMP используются 4 праймера, за счёт чего специфичность синтеза повышается и возможность синтеза другого продукта практически исключена, наработка фрагмента большой длины маловероятна. *In silico* все подобранные наборы праймеров не инициировали амплификацию фрагментов ДНК других буркхолдерий, сиквенсы которых находятся в базе данных GenBank.

Для проверки специфичности внутренних и внешних праймеров всех наборов для выявления ДНК *B. pseudomallei* и *B. mallei* провели ПЦР-РВ. Детекцию ПЦР-продукта осуществляли с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I по накоплению флуоресцентного сигнала и температуре плавления (Tm) синтезированного ампликона. Для этого после амплификации выполняли анализ кривой плавления. Самыми удачными наборами оказались Bma54 к мишени *IS407A-fliP B. mallei* и Bp27 на ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei*. При использовании как F3-B3, так и FIP-BIP пар праймеров этих наборов флуоресцентные сигналы были зарегистрированы только при амплификации специфического продукта, синтез которого с ДНК-мишени направляла соответствующая пара праймеров. На кривой плавления были детектированы единичные пики, соответствующие плавлению специфического продукта, т. е. в анализируемых образцах синтезировался ожидаемый фрагмент с соответствующей пары праймеров. Сигналов с ДНК гетерологичных штаммов микроорганизмов получено не было. Праймеры других наборов такой специфичностью не обладали, они могли инициировать амплификацию фрагментов ДНК других микроорганизмов. При анализе продуктов ПЦР-РВ с помощью гель-электрофореза в геле были детектированы единичные полосы на ожидаемом уровне: 202 п. н. в случае праймеров Bma54-F3-B3 (рис. 1), 147 п. н. при использовании Bma54-FIP-BIP, 194 п. н. в случае праймеров Bp27-F3-B3 (рис. 2) и 139 п. н. при синтезе с праймеров Bp27- FIP-BIP.

При использовании других праймеров помимо образования специфического продукта синтезировались неспецифические продукты, отличающиеся от фрагмента ожидаемой длины, либо наблюдалась амплификация ДНК гетерологичных штаммов.

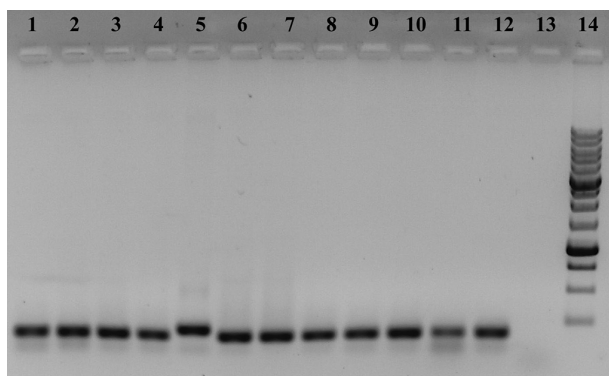


Рис. 1. Обнаружение фрагмента гена *IS407A-fljP* *B. mallei* с помощью праймеров *Vma54* и ПЦР-РВ.

1 – ДНК *B. mallei* 10230; 2 – ДНК *B. mallei* 5/5 RP-4; 3 – ДНК *B. mallei* Загреб; 4 – ДНК *B. mallei* Иванович; 5 – ДНК *B. mallei* Муксувар P-5; 6 – ДНК *B. mallei* P-1; 7 – ДНК *B. mallei* P-5; 8 – ДНК *B. mallei* C5; 9 – ДНК *B. mallei* Z-12; 10 – ДНК *B. mallei* Ц-4; 11 – ДНК *B. mallei* t-12; 12 – ДНК *B. mallei* B120; 13 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 14 – маркер молекулярной массы (250—10 000 п. н.).

#### LAMP амплификация фрагментов ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei* с помощью SD-полимеразы

Результаты детекции *B. mallei* и *B. pseudomallei* с использованием LAMP отличались от результатов ПЦР-РВ. Ни один набор праймеров для LAMP не показал высокой аналитической чувствительности и специфичности. Например, с помощью набора *Vm252* было выявлено 8 штаммов возбудителя сапа из 12 исследованных. Этот набор также направлял синтез с ДНК трех штаммов *B. pseudomallei*. Аналогичные результаты были получены при работе с тремя другими наборами *Vma54*, *Vm21* (рис. 3) и *Vm26*: они не выявляли ДНК всех исследованных штаммов *B. mallei* и были способны направлять синтез фрагментов генов гетерологичных штаммов. При этом в некоторых случаях выход LAMP-продуктов был низким, а результаты повторных экспериментов плохо воспроизводились.

При детекции мелиоидоза наибольшей чувствительностью обладали 2 набора: *Vp1* и *Vp27*: они выявили 9 и 8 штаммов возбудителя соответственно. Выход продуктов реакции также

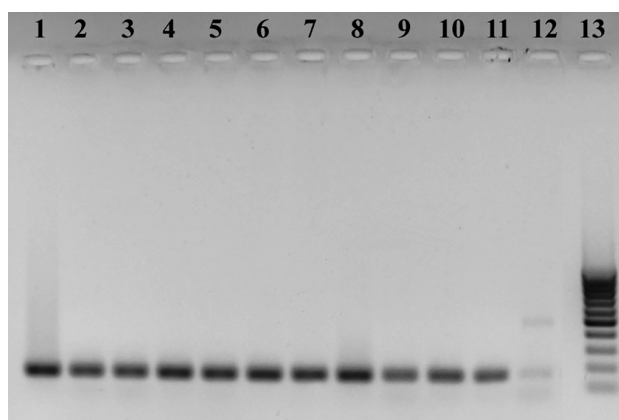


Рис. 2. Обнаружение фрагмента гена *Orf12* области кластера генов *TTS1* *B. pseudomallei* с помощью праймеров *Vp27* и ПЦР-РВ.

1 – ДНК *B. pseudomallei* 100; 2 – ДНК *B. pseudomallei* 61503; 3 – ДНК *B. pseudomallei* 101; 4 – ДНК *B. pseudomallei* 51274; 5 – ДНК *B. pseudomallei* 115; 6 – ДНК *B. pseudomallei* 116; 7 – ДНК *B. pseudomallei* 60913; 8 – ДНК *B. pseudomallei* 301; 9 – ДНК *B. pseudomallei* 102; 10 – ДНК *B. pseudomallei* 135; 11 – ДНК *B. pseudomallei* 132; 12 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 13 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.).

был низким, а результаты экспериментов плохо воспроизводились.

Геномы *B. mallei* и *B. pseudomallei* отличаются высоким содержанием GC-пар. В литературе приводятся данные о том, что введение в реакцию бетаина усиливает специфичность праймеров и выход ампликона при синтезе GC-богатых участков ДНК, образование нежелательных продуктов при этом снижается [22–24]. Амплификация GC-богатых областей ДНК затруднена из-за недостаточной денатурации цепей ДНК и образования вторичных структур, а бетаин способствует лучшему разделению цепей [22]. Тем не менее в наших экспериментах введение разных количеств бетаина в реакцию никакого эффекта не оказало.

Проведение LAMP с использованием *Bst 2.0 WarmStart-полимеразы*. В параллельных экспериментах использовали полимеразу *Bst 2.0 WarmStart* («New England Biolabs»). Результаты LAMP с использованием *Bst 2.0 WarmStart* не совпадали с результатами изотермической амплификации с применением SD-полимеразы и отличались от результатов ПЦР-РВ. В ходе электрофореза наблюдали иногда появление в отрицательном контроле (вода) большого количества неспецифического продукта LAMP, вероятно, вследствие образования димеров праймеров (рис. 4, дорожка 13).

При работе с SD-полимеразой образования димеров праймеров не наблюдали ни разу. Разными исследователями отмечалось, что *Bst 2.0 WarmStart* может работать в отсутствие матрицы и осуществлять неспецифический синтез ДНК (до-страивать димеры праймеров). Следует отметить, что *Bst 2.0 WarmStart* могла направлять синтез с праймеров, при использовании которых с SD-полимеразой ампликонов получено не было. Как и в случае с SD-полимеразой, результаты повторных экспериментов воспроизводились плохо.

Обсуждение. Одним из основных преимуществ LAMP является отсутствие необходимости в сложном оборудовании. Для проведения амплификации требуется лишь водяная баня. Визуализация продукта тоже может не требовать оборудования. Всё это делает LAMP очень привлекательной для использования в малооснащённых лабораториях и полевых условиях.

Следует отметить, что критическими моментами для подбора праймеров являются несколько параметров: наличие GC-богатых областей, температура плавления ( $T_m$ ) праймеров, стабильность последовательности праймеров, формирование вторичных структур и дистанция между праймерами [25]. Можно предположить, что неудачи при работе с некоторыми

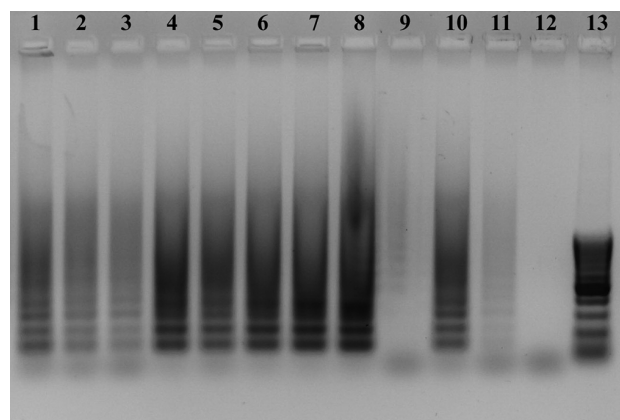


Рис. 3. Обнаружение фрагмента гена *fljP/IS407A* *B. mallei* с помощью LAMP праймеров *Vm21* и SD-полимеразы.

1 – ДНК *B. mallei* 10230; 2 – ДНК *B. mallei* 5/5 RP-4; 3 – ДНК *B. mallei* Загреб; 4 – ДНК *B. mallei* Иванович; 5 – ДНК *B. mallei* Муксувар P-5; 6 – ДНК *B. mallei* P-1; 7 – ДНК *B. mallei* P-5; 8 – ДНК *B. mallei* C5; 9 – ДНК *B. mallei* Z-12; 10 – ДНК *B. mallei* Ц-4; 11 – ДНК *B. mallei* t-12; 12 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 13 – маркер молекулярной массы (100–1000 п. н.).

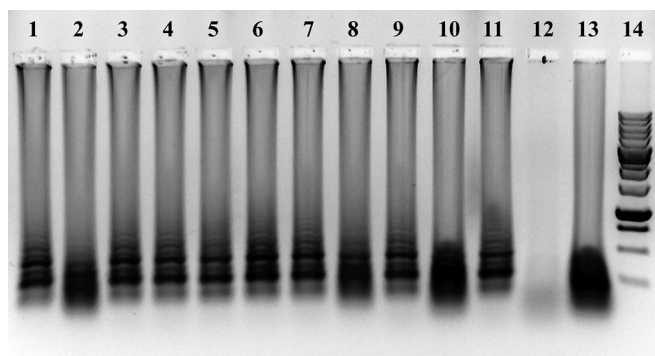


Рис. 4. Обнаружение фрагмента гена *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* с помощью праймеров Bp27 и полимеразы Bst 2.0 WarmStart («New England Biolabs»).

1 – ДНК *B. pseudomallei* 100; 2 – ДНК *B. pseudomallei* 61503; 3 – ДНК *B. pseudomallei* 101; 4 – ДНК *B. pseudomallei* 51274; 5 – ДНК *B. pseudomallei* 115; 6 – ДНК *B. pseudomallei* 116; 7 – ДНК *B. pseudomallei* 60913; 8 – ДНК *B. pseudomallei* 301; 9 – ДНК *B. pseudomallei* 102; 10 – ДНК *B. pseudomallei* 135; 11 – ДНК *B. pseudomallei* 132; 12, 13 – отрицательный контроль ПЦР (вода); 14 – маркер молекулярной массы (250–10 000 п. н.).

наборами праймеров могут быть обусловлены дизайном олигонуклеотидов или особенностями петлевой изотермической реакции (участие в реакции 4 праймеров, 2 из которых имеют сложное строение). К сожалению, нельзя исключить возможность формирования вторичных структур, особенно внутренними праймерами FIP и VIP, так как они длиннее и имеют более сложную структуру, чем внешние праймеры.

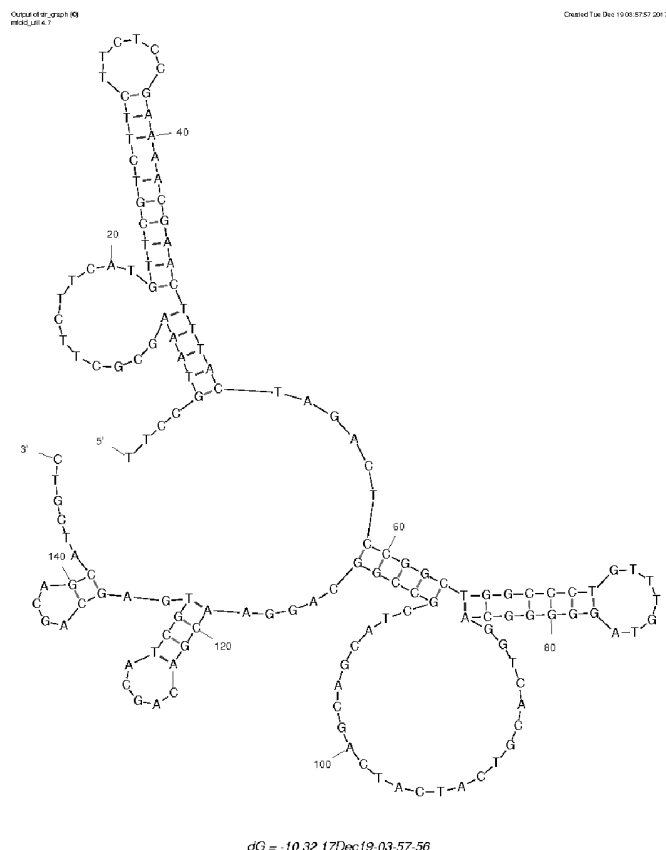


Рис. 5. Вторичные структуры, формируемые фрагментом гена *IS407A-flpB* *B. mallei*, на который с помощью программы Primer Explorer 5 рассчитаны праймеры Bma54.

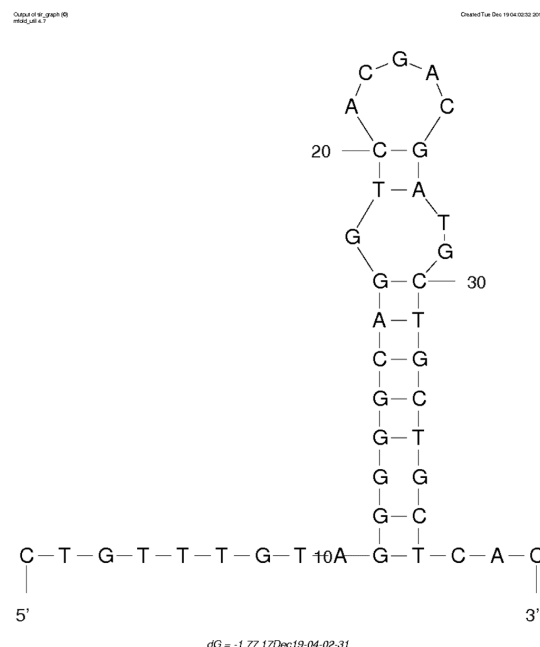


Рис. 6. Вторичные структуры, формируемые внутренним праймером VIP-Bma54.

По-видимому, существенную роль играет содержание GC-пар в геноме возбудителя инфекции. Например, содержание GC-пар в геномах *B. anthracis* составляет 35%, и при детекции этого микроорганизма с помощью SD-полимеразы был получен положительный результат [26]. Содержание GC-пар в геномах *B. mallei* и *B. pseudomallei* – около 69–70%. Изотермическая амплификация протекает при довольно низкой температуре, в результате чего полной денатурации молекул ДНК не происходит. Возможно, при низком содержании GC-пар процесс денатурации ДНК в изотермических условиях проходит лучше, формирование гантелеобразных структур в первые моменты реакции осуществляется успешнее, а сама изотермическая амплификация протекает с большей эффективностью.

Для выяснения причин неудач при постановке LAMP был проведён анализ формирования вторичных структур на матрице и праймерах с помощью программы mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>). Образование шпилек и димеров наблюдалось у всех праймеров и ампликонов (рис. 5, 6).

Например, ампликон, синтезированный с внутренних праймеров набора Bma54 на фрагмент гена *IS407A-flpB* *B. mallei*, при 63°C образует несколько вторичных структур. Одна из таких структур представлена на рис. 5 ( $\Delta G = -10,32$  ккал/моль). На рис. 6 показана структура, образованная праймером VIP-Bp1 ( $\Delta G = -1,77$  ккал/моль). Нельзя исключить, что наработке LAMP-продукта в изотермических условиях помешали вторичные структуры, образовавшиеся на матрице и праймерах. Возможно, успешная амплификация прошла в том случае, когда стабильность вторичных структур была более низкой.

Попытки избавиться от вторичных структур с помощью реагентов, которые используют при проведении ПЦР, не дали успехов. В некоторых публикациях сообщается, что добавление 0,8 М бетаина увеличивало чувствительность реакции и усиливало эффективность LAMP-теста [27]. Предполагается, что бетаин способен облегчать амплификацию GC-богатых матриц и предотвращать образование вторичных структур GC-богатых областей ДНК-последовательностей из-за уменьшения межплоскостных взаимодействий оснований. Однако S. Chen и соавт. [28] обнаружили, что бетаин не оказывал влияния на амплификацию. В проведённых нами

исследованиях положительного действия бетаина на реакцию амплификации также не обнаружено.

Существует мнение, что степень очистки внутренних праймеров FIP и VIP очень важна для формирования первичных гантелеобразных структур, поэтому рекомендуется использовать очистку с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии [29]. Отчасти неудачи в детекции возбудителей сапа и мелиоидоза при работе с SD-полимеразой можно объяснить недостаточной чистотой внутренних праймеров, но на эффективность ПЦР-РВ и LAMP с Bst 2.0 WarmStart степень очистки праймеров не влияла.

Успех изотермической амплификации также зависит от активности ферментов в вытеснении цепи и их способности проходить такие сложные области ДНК, как шпильки, без скопления, останки и диссоциации полимераз во время амплификации. Оба фермента Bst 2.0 WarmStart и SD-полимераза были способны направлять синтез специфических фрагментов с ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*. Преимуществами SD-полимеразы является её термостабильность и более высокая специфичность. В отдельных экспериментах с использованием фермента Bst-полимеразы наблюдали появление димеров праймеров вместо образования специфических продуктов, а также в отрицательном контроле. При использовании обоих ферментов для синтеза GC-богатых матриц необходимо решить, как улучшить денатурацию ДНК во время амплификации с целью снижения формирования вторичных структур.

**Заключение.** В проведённых исследованиях наилучший результат был получен при выполнении ПЦР-РВ. Наборы Vma54 к мишени *IS407A-flpB* *B. mallei* и Vp27 на ген *Orf12* области кластера генов TTS1 *B. pseudomallei* надёжно выявляли ДНК тех микроорганизмов, к последовательностям которых они были сконструированы. ДНК гетерологичных штаммов указанные праймеры не выявляли. Таким образом, в случае сложных для LAMP матриц, таких как ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*, можно рекомендовать остановить свой выбор на ПЦР-РВ для детекции возбудителей, хотя это повышает требования к необходимому оборудованию.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1–25, 27–29,  
см. REFERENCES)

26. Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Кудрявцева Т.Ю., Шишкова Н.А., Миронова Р.И., Маринин Л.И., Мокриевич А.Н., Крамаров В.М., Бикетов С.Ф., Дятлов И.А. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибиреязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017. 35(2):69-76.

## REFERENCES

1. Neubauer H., Sprague L.D., Zacharia R., Tomaso H., Al Dahouk S., Wernery R. et al. Serodiagnosis of Burkholderia mallei infections in horses: state-of-the-art and perspectives. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health*. 2005; 52:201–5.
2. Van Zandt K.E., Greer M.T., Gelhaus H.C. Glanders: an overview of infection in humans. *Orphanet J. Rare Dis*. 2013; 8:131.
3. Dance D.A. Melioidosis as an emerging global problem. *Acta Trop*. 2000; 74:115–9.
4. Cheng A.C., Currie B.J. Melioidosis: epidemiology, pathophysiology, and management. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005; 18:383–416.
5. Currie B.J., Fisher D.A., Howard D.M., Burrow J.N., Lo D., Selva-Nayagam S. et al. Endemic melioidosis in tropical northern Australia: a 10-year prospective study and review of the literature. *Clin. Infect. Dis*. 2000; 31:981–6.
6. Chaowagul W., White N.J., Dance D.A., Wattanagoon Y., Naigowit P., Davis T.M. et al. Melioidosis: a major cause of community-acquired septicemia in northeastern Thailand. *J. Infect. Dis*. 1989; 159:890–9.
7. Dance D.A. Melioidosis: the tip of the iceberg? *Clin. Microbiol. Rev*. 1991; 4:52–60.

8. Sanford J.P. Pseudomonas species (including melioidosis and glanders) In: Mandell G.L., Bennett J.E., Dolin R., ed. Principles and practice of infectious diseases. 8th ed. New York, N.Y: Churchill Livingstone; 1995; 2003–9.
9. HHS and USDA Select Agents and Toxins 7 CFR Part 331, 9 CFR Part 121, 42 CFR Part 73. 2012. [http://www.selectagents.gov/resources/List\\_of\\_Select\\_Agents\\_and\\_Toxins\\_2012-12-4.pdf](http://www.selectagents.gov/resources/List_of_Select_Agents_and_Toxins_2012-12-4.pdf). Accessed 1 February 2012.
10. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Pitt T.L., Treu T.M., Neubauer H. Development of 5' nuclease real-time PCR assays for the rapid identification of the Burkholderia mallei/Burkholderia pseudomallei complex. *Diagn. Mol. Pathol*. 2004; 13:247–53.
11. Tomaso H., Scholz H.C., Al Dahouk S., Eickhoff M., Treu T.M., Wernery R. et al. Development of a 5'-nuclease real-time PCR assay targeting flpP for the rapid identification of Burkholderia mallei in clinical samples. *Clin. Chem*. 2006; 52(2):307–10.
12. Lee M.A., Wang D., Yap E.H. Detection and differentiation of Burkholderia pseudomallei, Burkholderia mallei and Burkholderia thailandensis by multiplex PCR. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2005; 43:413–7.
13. Janse I., Hamidjaja R.A., Hendriks A.C., van Rotterdam B.J. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei. *BMC Infect. Dis*. 2013; 13:86.
14. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28:E63.
15. Notomi T., Hase T. Process for synthesizing nucleic acid, 2002, *US patent* 6410278.
16. Mirzai S., Safi S., Mossavari N., Afshar D., Bolourchian M. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of Burkholderia mallei. *Cell Mol. Biol. Noisy-le-grand*. 2016; 62(10):32–6.
17. Pal V., Saxena A., Singh S., Goel A.K., Kumar J.S., Parida M.M. et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Burkholderia mallei. *Transbound Emerg. Dis*. 2017; 65(1):e32–e39.
18. Chantratita N., Meumann E., Thanwisai A., Limmathurotsakul D., Wuthiekanun V., Wannapasni S. et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification Method Targeting the TTS1 Gene Cluster for Detection of Burkholderia pseudomallei and Diagnosis of Melioidosis. *J. Clin. Microbiol*. 2008; 46(2):568–73.
19. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskich K.A., Kramarova T.V., Kramarov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *BioTechniques*. 2014; 57:81–7.
20. Nierman W.C., DeShazer D., Kim H.S., Tettelin H., Nelson K.E., Feldblyum T. et al. Structural flexibility in the Burkholderia mallei genome. *Proc. Nat. Acad. Sciences USA*. 2004; 101(39):14246–51.
21. Gilling D.H., Luna V.A., Pflugrad C. The Identification and Differentiation between Burkholderia mallei and Burkholderia pseudomallei Using One Gene Pyrosequencing. *International Scholarly Research Notices*. 2014, Article ID 109583.
22. Rees W.A., Korte Y.T., Von J., Hippel P.H. Betaine can eliminate the base pair composition dependence of DNA melting. *Biochemistry*. 1993; 32(1):137–44.
23. Henke W., Herdel K., Jung K., Schnorr D., Loening S. A. Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucl. Acids Res*. 1997; 25(19):3957–8.
24. Jensen M.A., Fukushima M., Davis R. DMSO and Betaine greatly improve amplification of GC-rich constructs in De Novo synthesis. *PLoS ONE*. 2010; 5(6):e11.
25. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol*. 2008; 18:407–21.
26. Shchit I.Y., Kudryavtseva T.Y., Shishkova N.A., Mironova R.I., Marinin L.I., Mokrievich A.N., Biketov S.F., Dyatlov I.A., Ignatov K.B., Kramarov V.M. The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection and identification of the anthrax pathogen. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 32(2):69–76. (in Russian).
27. George G., Mony P., Kenneth J. Comparison of the efficacies of loop-mediated isothermal amplification, fluorescence smear microscopy and culture for the diagnosis of tuberculosis. *PLoS ONE*. 2011; 6:e21007.
28. Chen S.Y., Wang F., Beaulieu J.C., Stein R.E., Ge B.L. Rapid detection of viable salmonellae in produce by coupling pyridinium monoazide with loop-mediated isothermal amplification. *Appl. Environ. Microbiol*. 2011; 77:4008–16.
29. Tomita N., Mori Y., Kea H., Notomi T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of Gene Sequences and Simple Visual Detection of Products. *Nature Protocols*. 2008; 3:877–82.

Поступила 26.03.18  
Принята к печати 13.04.18