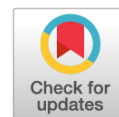


УДК 616.936.1

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

Научная статья



Разработка методов анализа однонуклеотидных полиморфизмов *Plasmodium falciparum* в генах *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) и *PfDHFR* (G > A), определяющих резистентность к хинолиновой, диамино-пиримидиновой и сульфаниламидной группам противомаларийных препаратов

А.Р. Арюков¹, А.И. Соловьев¹, В.А. Капацына², А.А. Крутикова¹, В.А. Романенко¹,
А.Н. Коваленко¹, А.А. Колесник¹, А.С. Зинин¹

¹ Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург, Россия;

² Клиническая инфекционная больница им. С.П. Боткина, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Актуальность. Единичные нуклеотидные полиморфизмы K76T (A403627C), S1034C (A960989T) и S108N (G748410A) ассоциированы с лекарственной резистентностью возбудителей тропической малярии к мефлохину, хлорохину, пириметамину и их производным. Эти мутации связаны с изменением структуры генов *PfCRT* и *PfMDR1 Plasmodium falciparum*.

Цель исследования. Разработка способов идентификации единичных нуклеотидных полиморфизмов, пригодных для ранней диагностики лекарственно устойчивых форм тропической малярии.

Результаты. Для выявления полиморфизма K76T (A403627C) разработан метод на основе анализа длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы *ApoI*. При этом критерием устойчивости паразитов к хлорохину служило появление на электрофореграмме одного бэнда 145 bp. Его разделение на два фрагмента (98 и 47 bp) свидетельствовало о неизменном генотипе возбудителей и сохранении их лекарственной чувствительности. При разработке системы для обнаружения S108N (G748410A) использовалась эндонуклеаза *BseI*. В этом случае признаком мутантного генотипа возбудителей служило появление на электрофореграмме единичного бэнда 507 bp. О неизменном генотипе и сохранении лекарственной чувствительности плазмодиев свидетельствовало появление двух фрагментов (323 и 184 bp). Для идентификации полиморфизма A > T в гене *PfMDR1* в позиции 960989 предложено использовать технологию полимеразной цепной реакции с двумя аллель-специфичными праймерами, один из которых служит для выявления аллеля дикого типа, другой — для мутантного генотипа. Амплифицируемый фрагмент гена *PfMDR1* содержит последовательности 1034-го кодона. В зависимости от генотипа *Plasmodium falciparum* будут получены фрагменты 261 bp с одним из аллель-специфичных праймеров.

Заключение. Исходя из анализа полученных данных, были разработаны критерии для оценки лекарственной устойчивости *P. falciparum*. Гаплотипы K76T (бэнд 145 bp), S1034C (бэнд 262 bp с прямым праймером S1034C-F2) служат признаками относительной устойчивости возбудителей к хлорохину, мефлохину и их производным. Положительные результаты обследования на гаплотип S108N (бэнды 323 и 184 bp) следует рассматривать как признак снижения чувствительности к пириметамину. Разработанные методики могут применяться в клинической практике, а также в целях эпидемиологического мониторинга.

Ключевые слова: аллель-специфичные праймеры; K76T; *PfCRT*; *PfDHFR*; *PfMDR1*; *Plasmodium falciparum*; ПЦР; рестрикционный анализ; S1034C; S108C; тропическая малярия.

Как цитировать

Арюков А.Р., Соловьев А.И., Капацына В.А., Крутикова А.А., Романенко В.А., Коваленко А.Н., Колесник А.А., Зинин А.С. Разработка методов анализа однонуклеотидных полиморфизмов *Plasmodium falciparum* в генах *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) и *PfDHFR* (G > A), определяющих резистентность к хинолиновой, диамино-пиримидиновой и сульфаниламидной группам противомаларийных препаратов // Известия Российской военно-медицинской академии. 2024. Т. 43. № 1. С. 13–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

Рукопись получена: 12.01.2024

Рукопись одобрена: 22.01.2024

Опубликована: 29.03.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

Research Article

Development of methods to analyse *Plasmodium falciparum* single nucleotide polymorphisms in *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) and *PfDHFR* (G > A) genes that determine resistance to quinoline, diamino-pyrimidine and sulfonamide groups of antimalarial drugs

Artem R. Aryukov¹, Aleksey I. Soloviev¹, Vladimir A. Kapatsyna², Anna A. Krutikova¹, Vladimir A. Romanenko¹, Aleksander N. Kovalenko¹, Akim A. Kolesnik¹, Artem S. Zinin¹

¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² S.P. Botkin Clinical infectious hospital, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: The drug resistance of tropical malaria pathogens to mefloquine, chloroquine, pyrimethamine and their derivatives is associated with three single nucleotide polymorphisms: K76T (A403627C), S1034C (A960989T) and S108N (G748410A). These mutations are linked to changes in the structure of the *PfCRT* and *PfMDR1* genes of *Plasmodium falciparum*.

AIM: Develop methods for identifying single nucleotide polymorphisms that are suitable for early diagnosis of drug-resistant forms of tropical malaria.

RESULTS: A method was developed based on restriction fragment length analysis using *ApoI* endonuclease to detect the K76T polymorphism (A403627C). The criterion for determining parasite resistance to chloroquine was the appearance of a single 145 bp band on the electropherogram. The genotype of the pathogens remained unchanged and their drug sensitivity was preserved, as indicated by the separation of two fragments of 98 and 47 bp.

A system for detecting S108N (G748410A) was developed using the *BseI* endonuclease. The appearance of a single 507 bp band on the electropherogram indicated the mutant genotype of the pathogens, while the appearance of two fragments (323 and 184 bp) indicated an unchanged genotype and preservation of drug sensitivity of plasmodiae.

To identify the A > T polymorphism in the *PfMDR1* gene at position 960989, polymerase chain reaction technology will be used with two allele-specific primers. One primer will detect the wild-type allele, and the other will detect the mutant genotype. The amplifiable fragment of the *PfMDR1* gene contains sequences of the 1034th codon. Depending on the *P. falciparum* genotype, 261 bp fragments will be obtained with one of the allele-specific primers.

CONCLUSION: Criteria for assessing drug resistance of *P. falciparum* were developed based on the analysis of obtained data. Haplotypes K76T (band 145 bp) and S1034C (band 262 bp with the direct primer S1034C-F2) serve as indicators of the relative resistance of pathogens to chloroquine, mefloquine, and their derivatives. Positive results of examination for haplotype S108N (bands 323 and 184 bp) should be considered as a sign of decreased sensitivity to pyrimethamine. The developed methods can be used in clinical practice and for epidemiological monitoring.

Keywords: K76T; PCR; *PfCRT*; *PfDHFR*; *PfMDR1*; *Plasmodium falciparum*; S1034C; S108C; tropical malaria.

To cite this article

Aryukov AR, Soloviev AI, Kapatsyna VA, Krutikova AA, Romanenko VA, Kovalenko AN, Kolesnik AA, Zinin AS. Development of methods to analyse *Plasmodium falciparum* single nucleotide polymorphisms in *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) and *PfDHFR* (G > A) genes that determine resistance to quinoline, diamino-pyrimidine and sulfonamide groups of antimalarial drugs. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2024;43(1):13–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

Received: 12.01.2024

Accepted: 22.01.2024

Published: 29.03.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

研究文章

测定抗疟药物喹啉、二氨基嘧啶和磺胺基耐药性的PfCRT (A>C)、PfMDR1 (A>T)和PfDHFR (G>A)基因中恶性疟原虫单核苷酸多态性分析方法的开发

Artem R. Aryukov¹, Aleksey I. Soloviev¹, Vladimir A. Kapatsyna², Anna A. Krutikova¹, Vladimir A. Romanenko¹, Aleksander N. Kovalenko¹, Akim A. Kolesnik¹, Artem S. Zinin¹

¹ Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russia;

² S.P. Botkin Clinical infectious hospital, Saint Petersburg, Russia

简评

论证。单核苷酸多态性K76T (A403627C)、S1034C (A960989T)和S108N (G748410A)与热带疟疾病原体对甲氟喹、氯喹、乙胺嘧啶及其衍生物的耐药性有关。这些突变与恶性疟原虫的PfCRT和PfMDR1基因结构的变化有关。

本研究的目的是开发适合早期诊断耐药热带疟疾的单核苷酸多态性测定方法。

结果。为了检测K76T多态性 (A403627C)，开发了基于ApoI核酸内切酶限制性片段长度分析的方法。寄生虫对氯喹的抗药性标准是在电泳图上出现一个145bp的条带。它被分离成两个片段 (98和47 bp)，表明病原体的基因型没有改变，并保持了对药物的敏感性。Bse1I内切酶被用于开发一种检测S108N (G748410A)的系统。在这种情况下，电泳图上出现一个507 bp的条带是病原体突变基因型的标志。两个片段 (323和184 bp)的出现表明疟原虫的基因型没有改变，并保持了对药物的敏感性。为确定PfMDR1基因第 960989位的A > T多态性，建议使用聚合酶链反应技术，使用两种等位基因特异性引物，其中一种用于检测野生型等位基因，另一种用于检测突变基因型。PfMDR1基因的可扩增片段包含第1034个密码子的序列。根据恶性疟原虫的基因型，使用其中一种等位基因特异性引物可获得261 bp片段。

结论。在对所得资料进行分析的基础上，我们制定了评估恶性疟原虫耐药性的标准。单倍型K76T (145 bp条带)、S1034C (直接引物 S1034C-F2的262 bp条带)可作为病原体对氯喹、甲氟喹及其衍生物相对耐药性的标志。S108N单倍型检测的阳性结果 (323和184 bp条带)应被视为对乙胺嘧啶敏感性降低的标志。所开发的方法既可用于临床实践，也可用于流行病学监测。

关键词：等位基因特异性引物；K76T；PfCRT；PfDHFR；PfMDR1；恶性疟原虫；PCR；S1034C；S108C；热带疟疾。

To cite this article

Aryukov AR, Soloviev AI, Kapatsyna VA, Krutikova AA, Romanenko VA, Kovalenko AN, Kolesnik AA, Zinin AS. 测定抗疟药物喹啉、二氨基嘧啶和磺胺基耐药性的PfCRT (A>C)、PfMDR1 (A>T)和PfDHFR (G>A)基因中恶性疟原虫单核苷酸多态性分析方法的开发. *Russian Military Medical Academy Reports*. 2024;43(1):13–22. DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

收到: 12.01.2024

接受: 22.01.2024

发布日期: 29.03.2024

DOI: <https://doi.org/10.17816/rmmar625584>

АКТУАЛЬНОСТЬ

Лекарственная устойчивость возбудителей тропической малярии является серьезной проблемой в борьбе с этим заболеванием. Она связана с высокой пролиферативной активностью паразитов, а также с изменчивостью генома плазмодиев, которая проявляется в мутациях внутри генетического материала.

Мутации в генах, ответственных за структуру транспортного белка мембраны пищеварительной вакуоли, являются одной из причин формирования устойчивости к действию хлорохина, мефлохина, хинина и хинидина, которые до недавнего времени наиболее часто применялись в лечении различных форм малярии [1, 2].

Гены *PfMDR1* и *PfCRT* кодируют структуру транспортного белка, который играет важную роль в процессах обмена веществ внутри клетки паразита. Мутации в этих генах, например (A > C) в гене *PfCRT* и (A > T) в гене *PfMDR1*, могут приводить к выводу метаболитов лекарственных препаратов из клетки, что снижает их концентрацию и ослабляет эффективность лечения.

Еще одна мутация, которая может влиять на эффективность противомалярийных препаратов, связана с геном *PfDHFR*. Этот ген отвечает за синтез важного фермента, необходимого для синтеза нуклеиновых кислот малярийными плазмодиями. Показано, что мутация (G > A) может уменьшить чувствительность паразитов к пириметамину, который до настоящего времени применяется в комплексном лечении тяжелых форм малярии [3–6].

Идентификация мутаций в генах паразитов часто проводится с помощью полимеразной цепной реакции на основе аллель-специфических праймеров или анализа длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Этот метод особенно эффективен при проведении эпидемиологических исследований [7, 8].

Однако для их широкого применения в практике нужны стандартизованные протоколы исследования. Опыт показывает, что точность и достоверность результатов зависят от качества используемого оборудования и реактивов, что создает определенные трудности. В связи с этим важной задачей является разработка методики для обнаружения маркеров лекарственной устойчивости в генах *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) и *PfDHFR* (G > A) [9–12].

Эта методика будет полезна для оценки эффективности основных противомалярийных препаратов и контроля распространения лекарственной устойчивости тропической малярии в ходе эпидемиологического надзора за малярийной инфекцией.

Цель исследования — разработать способ эффективной идентификации единичных нуклеотидных полиморфизмов генов *PfCRT* (A > C), *PfMDR1* (A > T) и *PfDHFR* (G > A) на основе аллель-специфичной ПЦР и метода рестрикционного анализа.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пробоподготовка. В ходе подготовки образцов крови для анализа ДНК выделялась стандартно при помощи смеси, содержащей фенол-хлороформ [13].

Праймеры. Для разработки праймеров для ПЦР использовалась программа «BLAST» в сочетании с базами данных *Plasmodium falciparum* (далее *P. falciparum*) 3D7 assembly, а также NCBI — NC 004326.2.

Эндонуклеазы рестрикции. Для определения оптимальных эндонуклеаз рестрикции для генотипирования *P. falciparum* был проведен подбор в специализированной базе рестриктаз NEBcutter (<https://nc3.neb.com/NEBcutter/>).

Амплификация ДНК. Полимеразная цепная реакция проводилась на амплификаторе BioRad C1000. Реакционная смесь состояла из деионизированной воды (8 мкл), 5X ScreenMix-HS (ЗАО «Евроген», Россия) — 2,5 мкл, прямых и обратных праймеров (по 0,5 мкл, 20 мкм) и матрицы выделенной ДНК (1 мкл). Каждый ингредиент был добавлен в оптимальном количестве для достижения эффективной амплификации ДНК.

Для достижения максимальной специфичности и эффективности амплификации ДНК были индивидуально настроены параметры циклов амплификации, а именно температура и длительность начальной и основной денатурации, отжига праймеров, основной и финальной элонгации. Для разделения продуктов амплификации использовался электрофорез на 1,5 % агарозном геле. Для создания геля использовалась агароза, разведенная в TAE буфере, с добавлением SYBR Green I. При помощи стандартизованных маркеров длин ДНК определялись размеры амплифицированных участков ДНК. Результаты электрофореза были зафиксированы с помощью системы гель-документации GelDoc Go (Bio-Rad).

Клинический материал. В качестве исследуемых образцов использовались коллекционные препараты крови больных тропической малярией, собранные сотрудниками кафедры биологии Военно-медицинской академии имени С.М. Кирова в различные годы на территории Африки, Юго-Восточной Азии и Океании. Это позволило адаптировать разрабатываемые диагностические системы применительно к различным штаммам малярийных плазмодиев с учетом особенностей их генома.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мутация (A > C) (K76T) представляет собой замену аденина на цитозин в первом нуклеотиде 76 триплета гена *PfCRT*. Это приводит к изменению аминокислоты лизина на треонин в последовательности транспортного белка внутренней мембраны *P. falciparum* [14]. Для определения этой мутации использовалась техника RFLP. В процессе поиска подходящего участка в геноме паразита с мутацией (A > C) для проведения рестрикционного анализа



Рис. 1. Места разреза *Apol* и *MluCI* ампликона 145 bp (https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/PFCRT_K76T)

Fig. 1. *Apol* and *MluCI* cut sites of the 145 bp amplicon (https://nc3.neb.com/NEBcutter/prj/PFCRT_K76T)

5'-TGTCATCATGTGTTAACTTATTTTAAAGAGATTAAGGATAATATTTTATTTATATTTAAGTATTATTTA
TTTAAGTGTATGTGAATGAATAA**TAATT**TTTGCTAAAAGAACTTTAAACAAAATTGGTAACTATAGTTTG-3'

Рис. 2. Амплифицированный фрагмент гена. Сайт рестрикции эндонуклеазы *Apol* находится в позиции 76-го кодона гена *PfCRT*. Места разреза фрагмента ДНК, обусловленные этим сайтом рестрикции, обозначены стрелками. Кодон 76-го фрагмента гена *PfCRT* выделен подчеркиванием

Fig. 2. Amplified gene fragment. The restriction site of the *Apol* endonuclease is located at position 76 of the *PfCRT* codon. The DNA arrows indicate fragment cut sites caused by this restriction site. The 76th codon of the *PfCRT* gene fragment is underlined

5'...ATGAATAA**TAATT**TTTGCTAA...3'

Рис. 3. Участок гена *PfCRT*, содержащий 76-й кодон и сайт рестрикции *AcsI* (*Apol*). Точка 1 — 76-й триплет гена *PfCRT*, кодирующий лизин (дикий аллель) или треонин (мутантный аллель) в структуре транспортного белка внутренней мембраны *P. falciparum*. Точка 2 — место действия эндонуклеазы *AcsI* (*Apol*) в гене *PfCRT*. Точка 3 — второй нуклеотид 76-го кодона (в данном случае аденин). Точка 4 — сайт рестрикции эндонуклеазы *AcsI* (*Apol*)

Fig. 3. Location of the *PfCRT* gene containing the 76th codon and the *AcsI* (*Apol*) restriction site. Point 1 — the 76th triplet of the *PfCRT* gene encoding lysine (wild type allele) or threonine (mutant allele) in the structure of the inner membrane transport protein of *P. falciparum*. Point 2 — is the site of action of the *AcsI* endonuclease (*Apol*) in the *PfCRT* gene. Point 3 — the second nucleotide of the 76th codon (in this case adenine). Point 4 — restriction site of the *AcsI* endonuclease (*Apol*)

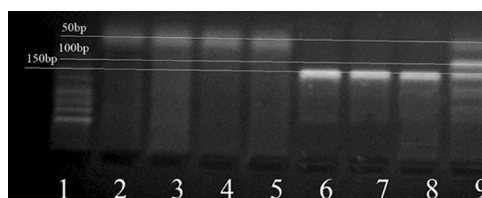


Рис. 4. Электрофореграмма результатов PCR по выявлению мутации (A > C) в гене *PfCRT* (эндонуклеаза *Apol*) (1 — маркер длин фрагментов; 2–5 — отрицательный контроль; 6–8 — дикий генотип плазмодия (A); 9 — дикий и мутантный генотипы (A > C))

Fig. 4. Electrophoregram of PCR results on detection of mutation (A > C) in *PfCRT* gene (*Apol* endonuclease) (1 — marker of lengths fragment length marker; 2–5 — negative control; 6–8 — wild plasmodium genotype (A); 9 — wild and mutant genotypes (A > C))

нашлась только одна подходящая пара специфических праймеров: K76T-F: 5'-TGTCATCATGTGTTAACTT-3' (21 нуклеотид) и K76T-R: 5'-CAAACTATAGTTACCAATTTG-3' (23 нуклеотида). Размер рассматриваемого участка ДНК, подлежащего амплификации, составляет 145 нуклеотидов. Праймеры, применяемые для этой цели, не обладают специфичностью к геному человека и другим известным организмам, что исключает возможность кросс-реакции. При выборе рестриктазы для выявления мутации (A > C) были обнаружены сайты двух эндонуклеаз: *Apol* (5'-R↑AATTY-3'; 3'-YTAA↓R-5') и *MluCI* (5'-↑AATT-3'; 3'-TTAA↓-5'). При этом *Apol* имела только один сайт рестрикции в пределах амплифицируемого участка, в то время как *MluCI* — 2. Так как рестриктаза *Apol*, в отличие от *MluCI*, не имеет других точек рестрикции, помимо мутантного участка 145 bp, это приводит к образованию двух фрагментов в геле (рис. 1).

Поэтому в дальнейшей работе *Apol* использовалась с целью выявления мутации (A > C) (рис. 2).

Область действия эндонуклеазы *Apol* содержит 76 триплет гена *PfCRT* только в случае неизмененного генотипа *P. falciparum* (рис. 3).

Фрагмент гена *PfCRT* является амплифицируемым и содержит один локус, соответствующий сайту рестрикции *Apol*, включающему последовательность кодона 76. В случае дикого генотипа плазмодиев амплифицированный фрагмент ДНК (145 bp) разрезается на два фрагмента (98 и 47 bp), а при мутации в 76-м кодоне участок длиной 145 bp остается неизменным. Сконструированная система для выявления мутации (A > C) была протестирована на клиническом материале. При обследовании контрольных проб ложноположительные результаты отсутствовали.

Методика показала способность распознавать различные штаммы *P. falciparum*, полученные из препаратов крови разных пациентов, что подтверждается клиническими наблюдениями. Это делает разработанную методику потенциальным индикатором лекарственной устойчивости паразитов. Дальнейшее исследование и применение этой системы могут быть полезны в диагностике и контроле эффективности лечения малярийной инфекции (рис. 4).

Мутация (A > T) (S1034C) в гене *PfMDR1* характеризуется заменой первого нуклеотида 1034-го кодона с аденина на тимин. В результате этого изменения аминокислота серин заменяется на цистеин в структуре белка

Таблица 1. Обратные праймеры, включающие последовательность кодона 1034

Table 1. Reverse primers that include the sequence of codon 1034

№	Нуклеотидная последовательность	Размер (bp)	Ампликон (bp)
1	5'-TCCACCATCATCTCTTACATCAA-3'	23	261
2	5'-ACCTGTTTCTCCAACGATTGC-3'	21	411
3	5'-TGCAGATCCAGATTGGTTTGA-3'	21	579

Таблица 2. Праймеры для идентификации SNP (A > T) методом аллель-специфичной ПЦР

Table 2. Primers for SNP (A > T) identification by allele-specific PCR

Название	Нуклеотидная последовательность	Размер (bp)	Назначение праймера
S1034C F1	5'-TGCAGCTTTATGGGGATTCA-3'	22	Прямой для неизмененного (дикого) аллеля
S1034C F2	5'-TGCAGCTTTATGGGGATTCT-3'	22	Прямой для мутантного аллеля
S1034C R	5'-TGTTGTTGCCTGAGCTGTAGT-3'	21	Обратный

Таблица 3. Алгоритм использования праймеров на этапах амплификации

Table 3. Algorithm of primers use at amplification stages

Этапы	Праймеры	
	прямой	обратный
1-й	S1034C F1: 5'-GCAGCTTTATGGGGATTCA-3'	S1034C R: 5'-TGTTGTTGCCTGAGCTGTAGT-3'
2-й	S1034C F2: 5'-TGCAGCTTTATGGGGATTCT-3'	S1034C R: 5'-TGTTGTTGCCTGAGCTGTAGT-3'

5'-TGCAGCTTTATGGGGATTCA(A/T)GTCAAAGCGCTCAATTATTTATTAATAGTTTTCCTA
TTGGTTTGGATCCTTCTTAATTAAGAGGTAAGTATAGTTGATGACTTTATGAAATCCT
TATTTACTTTTATATTTACTGGTAGTTATGCTGGAAAATTAATGTCCTTAAAAGGAGATTCA
GAAAATGCAAAATTATCATTTGAGAAATATTATCCATTAATGATTAGAAAATCAAATAATTGA
TGTAAGAGATGATGGTGA-3'

Рис. 5. Амплифицируемый фрагмент гена *PfMDR1*. Праймеры, точковая мутация и 1034-й кодон выделены курсивом, жирным шрифтом и подчеркиванием соответственно

Fig. 5. Amplifiable fragment of the *PfMDR1* gene. Primers, point mutation and 1034th codon are in italics, bold and underlined, respectively

множественной лекарственной резистентности. Белок, содержащий эту мутацию, является компонентом мембраны пищеварительной вакуоли тропозойта *P. falciparum* [15].

Для идентификации SNP (A > T) предлагается использовать технологию аллель-специфичной ПЦР. Эта технология основана на включении мутантного нуклеотида в последовательность праймера. Длина каждого праймера составляла 21–23 bp, а в 3' конце находились различные варианты анализируемого 1034-го кодона: 5'-GCAGCTTTATGGGGATTCA (A/T)-3'.

В качестве обратных праймеров требуемым критериям отвечали три нуклеотидные последовательности (табл. 1).

В качестве оптимального был выбран праймер (23 bp), обеспечивающий амплификацию фрагмента паразитарной ДНК с наименьшей длиной 261 bp (рис. 5).

Таким образом, окончательный набор праймеров включал два прямых аллель-специфичных и один обратный праймер (табл. 2).

Алгоритм исследования предполагает на первом этапе использование прямого праймера F1. На втором этапе обследуемые пробы вновь амплифицируются, при этом прямой праймер заменяется на F2 соответственно. На каждом из этапов амплификации используется один и тот же обратный праймер (табл. 3).

Бэнд 261 bp появлялся на электрофореграмме при использовании праймера F1 в случае дикого генотипа плазмодиев или праймера F2 как признак мутантного аллеля. Обследование препаратов крови больных тропической малярией подтвердило специфичность результатов разработанной системы (рис. 6).

Мутация (G > A) (S108N) и связанные с ней изменения в гене *PfDHFR*. Мутация (G > A) (S108N) является заменой первого нуклеотида в 108-м кодоне гена *PfDHFR*. Гуанин на этой позиции заменяется на аденин, что приводит к замене серина на аспаргин в полипептиде дигидрофолатредуктазы [16].

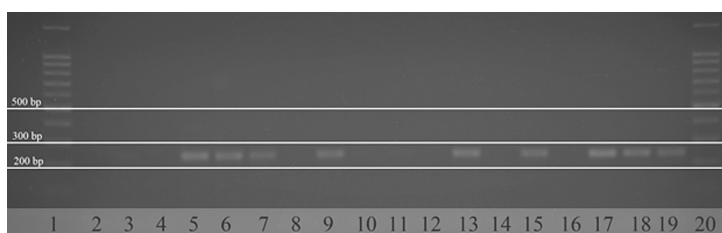


Рис. 6. Электрофореграммы продуктов 1-го этапа аллель-специфичной ПЦР (1, 20 — маркер длин фрагментов; 2–5 — отрицательный контроль; 5–7 и 9 — дикий генотип плазмодия (A); 13, 15, 17–19 — мутантный генотип (T))

Fig. 6. Electrophoregrams of the products of the 1st step of allele-specific PCR (1, 20 — fragment length marker; 2–5 — negative control; 5–7 and 9 — wild plasmodium genotype (A); 13, 15, 17–19 — mutant genotype (T))

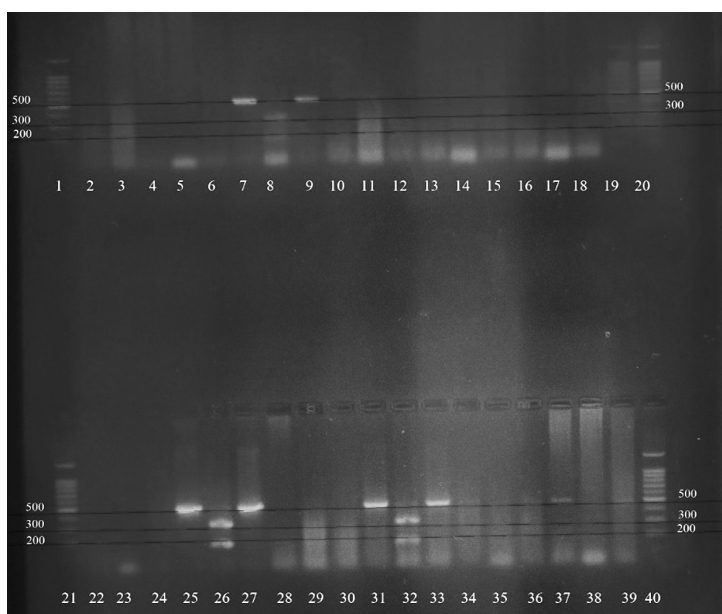


Рис. 7. Результаты PCR-RFLP для выявления S108N в гене *PfDHFR* с использованием фермента *BseI* (21, 40 — маркер длин фрагментов; 22–24 — отрицательный контроль; 25, 27, 31, 33, 37 — дикий генотип плазмодия (G); 26, 32 — мутантный генотип (A))

Fig. 7. PCR-RFLP results for detection of S108N in *PfDHFR* gene using *BseI* enzyme (21, 40 — marker of fragment lengths fragments; 22–24 — negative control; 25, 27, 31, 33, 37 — wild plasmodium genotype (G); 26, 32 — mutant genotype (A))

Для идентификации мутации (G > A) предлагается использовать RFLP с применением ПЦР. На первом этапе исследования с помощью специфических праймеров производится увеличение количества ДНК-фрагментов, содержащих 108-й кодон гена *PfDHFR*. Выбор праймеров для амплификации основывался на известной последовательности этого гена*.

Для специфического участка генома *P. falciparum* (507 bp), включающего (G > A), была подобрана пара специфических праймеров: S108N-F: 5'-ATGATGGAACAAGTCTGCGAC-3' (21 bp) и S108N-R: 5'-AACAACGGAACCTCCTATAATAAAACATT-3' (29 bp). При выборе рестриктазы для идентификации мутации (G > A) было установлено, что ее последовательность содержит сайт распознавания эндонуклеазы *BseI*. Это подтверждает возможность применения этой эндонуклеазы в рестрикционном анализе для обнаружения мутации (G > A) (рис. 7).

* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> (NC_004318.2).

ОБСУЖДЕНИЕ

Анализ полученных данных использовался в целях разработки критериев для оценки и интерпретации результатов исследования биологических образцов, содержащих генетический материал *P. falciparum*. Анализ электрофоретического разделения фрагментов рестрикции ампликона, содержащего SNP (A > C) гена *PfCRT*, позволил выявить несколько ключевых показателей. Для определения положительного результата следует обратить внимание на фрагменты размером 145, 98 и 47 bp. Эти фрагменты генетического материала гена *PfCRT* являются индикаторами присутствия в биологической пробе возбудителей тропической малярии. При этом дикий генотип 76K (лизин) не сопровождается рестрикцией *ApoI* амплифицируемого фрагмента и проявляется одиночным бендом 145 bp. Мутантный аллель 76T (треонин) проявляется на электрофореграмме двумя бендами (98 и 47 bp), возникающими в результате рестрикции исходного фрагмента амплификации. Генотипу 76K/T

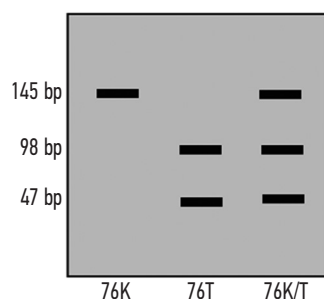


Рис. 8. PCR-RFLP расщепления фрагмента 76 с помощью *ApoI*

Fig. 8. PCR-RFLP cleavage of fragment 76 using *ApoI*

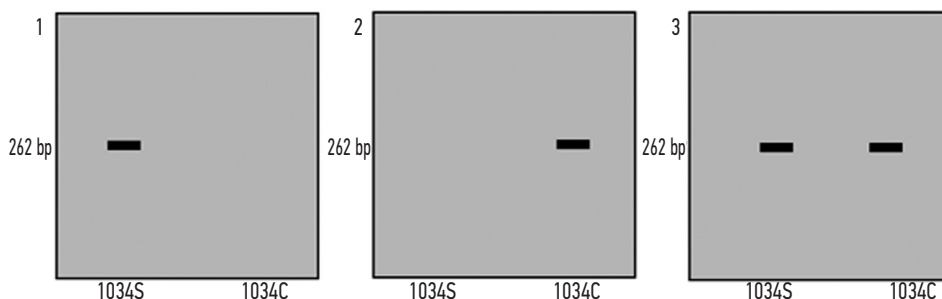


Рис. 9. Схемы электрофореза продуктов ПЦР с аллель-специфичными праймерами

Fig. 9. Schemes for electrophoresis of PCR products with allele-specific primers

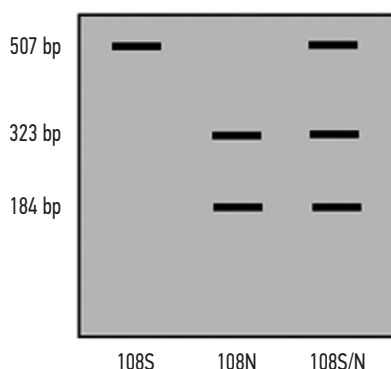


Рис. 10. Структура PCR-RFLP и расщепление амплифицированного фрагмента с помощью *BseI*. 108S — кодон AGC (серин) не соответствует сайту рестрикции, сохраняется одиночный фрагмент 507 bp неизмененный генотип, признак отсутствия резистентности *P. falciparum*; 108N — кодон AAC (аспаргин), произошла рестрикция, появились фрагменты 323 и 184 bp, признак резистентности *P. falciparum*; 108S/G — серин/аспаргин (бенды 507, 323 и 184 bp, персистирование обычных штаммов *P. falciparum*, а также лекарственно устойчивых)

Fig. 10. Structure of PCR-RFLP and cleavage of the amplified fragment using *BseI*. 108S — AGC codon (serine) does not match the restriction site, single fragment 507 bp unaltered genotype is retained, evidence of lack of resistance *P. falciparum*; 108N — AAC codon (asparagine), restriction occurred, fragments 323 and 184 bp appeared, sign of resistance *P. falciparum*; 108S/G — serine/asparagine (bends 507, 323 and 184 bp, persistence of common *P. falciparum* strains as well as of drug-resistant strains)

(лизин/треонин) соответствуют 3 бенда (145, 98 и 47 bp), что указывает на присутствие в пробе как обычных штаммов *P. falciparum*, а также штаммов, устойчивых к лекарственным препаратам (рис. 8).

Мутация (A > T) (S1034C) гена *PfMDR1* может быть выявлена путем обследования крови на наличие ампликона размером 262 bp. Положительный результат электрофореза продуктов первого этапа амплификации свидетельствует о сохранении лекарственной чувствительности паразитов и их неизменном состоянии (1034S). В случае положительного результата электрофореза продуктов второго этапа амплификации можно говорить о наличии мутации (A > T) и возникновении лекарственной устойчивости у возбудителей (1034C). Если при использовании двух видов прямых праймеров обнаруживаются ампликоны размером 262 bp одновременно (1034S/1034C), это может указывать на наличие в биопробе паразитарных штаммов с различной чувствительностью к лекарственным препаратам. В случае отрицательных результатов в продуктах первого и второго этапов амплификации следует повторить исследование пробы (рис. 9).

При анализе образцов крови на наличие мутации (G > A) гена *PfDHFR* положительным результатом считается обнаружение фрагментов ДНК с размером 507, 323 и 184 bp (рис. 10).

Появление фрагмента длиной 507 bp на электрограмме указывает на наличие дикого (неизмененного) генотипа *P. falciparum* (108S) и сохранение чувствительности паразитов к лекарственным препаратам. Ампликоны длиной 323 и 184 bp являются признаками мутантного генотипа *P. falciparum* (108N) и резистентности паразитов к лекарствам. Если на электрограмме одновременно обнаружены три фрагмента (507, 323 и 184 bp), это указывает на микстинфекцию (108S/G) и наличие в крови как чувствительных к лекарственным препаратам, так и резистентных *P. falciparum*. Другие варианты электрофореза следует считать ошибочными.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты демонстрирует высокую эффективность разработанных методик. Они могут быть успешно применены для генотипирования плазмодиев

P. falciparum, содержащихся в образцах крови пациентов, страдающих тропической малярией. Для выявления плазмодиев *P. falciparum* со сниженной чувствительностью к препаратам хинолиновой группы используются генетические маркеры, такие как нуклеотидные полиморфизмы *PfCRT* (K76T) и *PfMDR1* (S1034C). Эти маркеры указывают на устойчивость к лечению с помощью хлорохина и мефлохина, а также их производных. Мутация гена *PfDHFR* (S108N) может служить маркером резистентности возбудителей тропической малярии к производным пириметамин и сульфониламидным препаратам. Обнаружение положительных результатов гаплотипа S108N может свидетельствовать о пониженной чувствительности к пириметамину. Результаты выявления гаплотипов K76T, S1034C и S108N могут быть использованы, например, в ходе эпидемиологического надзора за распространением возбудителей тропической малярии, резистентных к основным противомалярийным препаратам.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Mulenga M.C., Sitali L., Ciubotariu I.I., et al. Decreased prevalence of the *Plasmodium falciparum* *PfCRT* K76T and *Pfmdr1* and N86Y mutations post-chloroquine treatment withdrawal in Katete District, Eastern Zambia // *Malar. J.* 2021. Vol. 20, N. 1. P. 329. doi: 10.1186/s12936-021-03859-z
- Hassen J., Alemayehu G.S., Dinka H., Golassa L. High prevalence of *PfCRT* 76T and *Pfmdr1* N86 genotypes in malaria infected patients attending health facilities in East Shewa zone, Oromia Regional State, Ethiopia // *Malar. J.* 2022. Vol. 21, N. 1. P. 286. doi: 10.1186/s12936-022-04304-5
- Njiro B.J., Mutagonda R.F., Chamani A.T., et al. Molecular surveillance of chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum* in sub-Saharan African countries after withdrawal of chloroquine for treatment of uncomplicated malaria: A systematic review // *J. Infect. Public Health.* 2022. Vol. 15, N. 5. P. 550–557. doi: 10.1016/j.jiph.2022.03.015
- Yobi D.M., Kayiba N.K., Mvumbi D.M., et al. Assessment of *Plasmodium falciparum* anti-malarial drug resistance markers in *pfk13*-propeller, *PfCRT* and *Pfmdr1* genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018–2019 // *Malar. J.* 2021. Vol. 20, N. 1. P. 144. doi: 10.1186/s12936-021-03636-y
- Shrivastava S.K., Gupta R.K., Mahanta J., Dubey M.L. Correlation of molecular markers, *Pfmdr1*-N86Y and *PfCRT*-K76T, with in vitro chloroquine resistant *Plasmodium falciparum*, isolated in the malaria endemic states of Assam and Arunachal Pradesh, Northeast India // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, N. 8. P. e103848. doi: 10.1371/journal.pone.0103848
- Wang X., Zhang X., Chen H., et al. Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in *Plasmodium falciparum* isolates from Central Africa between 2016 and 2021: wide geographic spread of highly mutated *Pfhdfr* and *Pfhdps* alleles // *Microbiol. Spectr.* 2022. Vol. 10, N. 5. P. e0200522. doi: 10.1128/spectrum.02005-22
- Amir A., Cheong F.W., De Silva J.R., Lau Y.L. Diagnostic tools in childhood malaria // *Parasit. Vectors.* 2018. Vol. 11, N. 1. P. 53. doi: 10.1186/s13071-018-2617-y
- Jiang T., Huang Y., Cheng W., et al. Multiple single-nucleotide polymorphism detection for antimalarial pyrimethamine resistance via allele-specific PCR coupled with gold nanoparticle-based lateral flow biosensor // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2021. Vol. 65, N. 3. P. e01063–20. doi: 10.1128/aac.01063-20
- Sharma D., Lather M., Dykes C.L., et al. Disagreement in genotyping results of drug resistance alleles of the *Plasmodium falciparum* dihydrofolate reductase (*Pfhdfr*) gene by allele-specific PCR (ASPCR) assays and Sanger sequencing // *Parasitol. Res.* 2016. Vol. 115, N. 1. P. 323–328. doi: 10.1007/s00436-015-4750-2
- Jiang T., Cheng W., Yao Y., et al. Molecular surveillance of anti-malarial resistance *Pfhdfr* and *Pfhdps* polymorphisms in African and Southeast Asia *Plasmodium falciparum* imported parasites to Wuhan, China // *Malar. J.* 2020. Vol. 19, N. 1. P. 434. doi: 10.1186/s12936-020-03509-w
- Dalimi A., Mosawi S.H., Fotouhi-Ardakani R., Dalirghafari A. Evaluation of Drug Resistant Genotypes to Fansidar and Chloroquine by Studying Mutation in *Pfhdfr* and *Pfmdr1* Genes in *Plasmodium falciparum* Isolates from Laghman Province, Afghanistan // *Iran J. Parasitol.* 2022. Vol. 17, N. 1. P. 18–27. doi: 10.18502/ijpa.v17i1.9012
- Cheng W., Song X., Zhu H., et al. A rapid and specific genotyping platform for *Plasmodium falciparum* chloroquine resistance via allele-specific PCR with a lateral flow assay // *Microbiol. Spectr.* 2022. Vol. 10, N. 2. P. e0271921. doi: 10.1128/spectrum.02719-21
- Sambrook J., Russell D.W. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform // *Cold Spring Harbor Protocols.* 2006. Vol. 2006, N. 1. P. pdb. prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455
- Lakshmanan V., Bray P.G., Verdier-Pinard D., et al. A critical role for *PfCRT* K76T in *Plasmodium falciparum* verapamil-reversible chloroquine resistance // *EMBO J.* 2005. Vol. 24, N. 13. P. 2294–2305. doi: 10.1038/sj.emboj.7600681
- Anderson T.J., Nair S., Qin H., et al. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (*PfCRT*) and multidrug resistance gene (*pfmdr*) associated with antimalarial drug resistance? //

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Источник финансирования. Финансирование данной работы не проводилось.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическая экспертиза. Этическая экспертиза не проводилась, так как статья носит обзорный характер.

Вклад авторов. А.Р. Арюков — разработка методик и написание текста статьи; А.И. Соловьев — анализ литературы и написание текста статьи; А.А. Крутикова — разработка методик и написание текста статьи; В.А. Капачина — анализ и работа с клиническим материалом; А.Н. Коваленко — анализ и работа с клиническим материалом; В.А. Романенко — разработка методик и работа с клиническим материалом; А.А. Колесник — анализ и работа с клиническим материалом; А.С. Зинин — анализ и работа с клиническим материалом. Все авторы внесли существенный вклад в проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Antimicrob. Agents Chemother. 2005. Vol. 49, N. 6. P. 2180–2188. doi: 10.1128/aac.49.6.2180-2188.2005

16. Wernsdorfer W.H., Noedl H. Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology // Curr. Opin. Infect. Dis. 2003. Vol. 16, N. 6. P. 553–558. doi: 10.1097/01.qco.0000104295.87920.fd

REFERENCES

1. Mulenga MC, Sitali L, Ciubotariu II, et al. Decreased prevalence of the Plasmodium falciparum PfCRT K76T and Pfmdr1 and N86Y mutations post-chloroquine treatment withdrawal in Katete District, Eastern Zambia. *Malar J.* 2021;20(1):329. doi: 10.1186/s12936-021-03859-z
2. Hassen J, Alemayehu GS, Dinka H, Golassa L. High prevalence of PfCRT 76T and Pfmdr1 N86 genotypes in malaria infected patients attending health facilities in East Shewa zone, Oromia Regional State, Ethiopia. *Malar J.* 2022;21(1):286. doi: 10.1186/s12936-022-04304-5
3. Njiro BJ, Mutagonda RF, Chamani AT, et al. Molecular surveillance of chloroquine-resistant Plasmodium falciparum in sub-Saharan African countries after withdrawal of chloroquine for treatment of uncomplicated malaria: A systematic review. *J Infect Public Health.* 2022;15(5):550–557. doi: 10.1016/j.jiph.2022.03.015
4. Yobi DM, Kayiba NK, Mvumbi DM, et al. Assessment of Plasmodium falciparum anti-malarial drug resistance markers in pfk13-propeller, PfCRT and pfmdr1 genes in isolates from treatment failure patients in Democratic Republic of Congo, 2018–2019. *Malar J.* 2021;20(1):144. doi: 10.1186/s12936-021-03636-y
5. Shrivastava SK, Gupta RK, Mahanta J, Dubey ML. Correlation of molecular markers, Pfmdr1-N86Y and PfCRT-K76T, with in vitro chloroquine resistant Plasmodium falciparum, isolated in the malaria endemic states of Assam and Arunachal Pradesh, Northeast India. *PLoS One.* 2014;9(8):e103848. doi: 10.1371/journal.pone.0103848
6. Wang X, Zhang X, Chen H, et al. Molecular determinants of sulfadoxine-pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum isolates from Central Africa between 2016 and 2021: wide geographic spread of highly mutated Pfdhfr and Pfdhps alleles. *Microbiol Spectr.* 2022;10(5): e0200522. doi: 10.1128/spectrum.02005-22
7. Amir A, Cheong FW, De Silva JR, Lau YL. Diagnostic tools in childhood malaria. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):53. doi: 10.1186/s13071-018-2617-y
8. Jiang T, Huang Y, Cheng W, et al. Multiple single-nucleotide polymorphism detection for antimalarial pyrimethamine resistance via allele-specific PCR coupled with gold nanoparticle-based lateral flow biosensor. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(3):e01063–20. doi: 10.1128/aac.01063-20

9. Sharma D, Lather M, Dykes CL, et al. Disagreement in genotyping results of drug resistance alleles of the Plasmodium falciparum dihydrofolate reductase (Pfdhfr) gene by allele-specific PCR (ASPCR) assays and Sanger sequencing. *Parasitol Res.* 2016;115(1):323–328. doi: 10.1007/s00436-015-4750-2

10. Jiang T, Cheng W, Yao Y, et al. Molecular surveillance of antimalarial resistance Pfdhfr and Pfdhps polymorphisms in African and Southeast Asia Plasmodium falciparum imported parasites to Wuhan, China. *Malar J.* 2020;19(1):434. doi: 10.1186/s12936-020-03509-w

11. Dalimi A, Mosawi SH, Fotouhi-Ardakani R, Dalirghafari A. Evaluation of Drug Resistant Genotypes to Fansidar and Chloroquine by Studying Mutation in Pfdhfr and Pfmdr1 Genes in Plasmodium falciparum Isolates from Laghman Province, Afghanistan. *Iran J Parasitol.* 2022;17(1):18–27. doi: 10.18502/ijpa.v17i1.9012

12. Cheng W, Song X, Zhu H, et al. A rapid and specific genotyping platform for Plasmodium falciparum chloroquine resistance via allele-specific PCR with a lateral flow assay. *Microbiol Spectr.* 2022;10(2): e0271921. doi: 10.1128/spectrum.02719-21

13. Sambrook J, Russell DW. Purification of nucleic acids by extraction with phenol: chloroform. *Cold Spring Harbor Protocols.* 2006;2006(1): pdb.prot4455. doi: 10.1101/pdb.prot4455

14. Lakshmanan V, Bray PG, Verdier-Pinard D, et al. A critical role for PfCRT K76T in Plasmodium falciparum verapamil-reversible chloroquine resistance. *EMBO J.* 2005;24(13):2294–2305. doi: 10.1038/sj.emboj.7600681

15. Anderson TJ, Nair S, Qin H, et al. Are transporter genes other than the chloroquine resistance locus (PfCRT) and multidrug resistance gene (pfmdr) associated with antimalarial drug resistance? *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2180–2188. doi: 10.1128/aac.49.6.2180-2188.2005

16. Wernsdorfer WH, Noedl H. Molecular markers for drug resistance in malaria: use in treatment, diagnosis and epidemiology. *Curr Opin Infect Dis.* 2003;16(6):553–558. doi: 10.1097/01.qco.0000104295.87920.fd

ОБ АВТОРАХ

***Артём Русланович Арюков**, аспирант; адрес: Россия, 194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, д. 6; ORCID: 0000-0001-8774-5467; eLibrary SPIN: 4073-6487; Researcher Id: IAO-0519-2023; e-mail: Arukov.artem@yandex.ru

Алексей Иванович Соловьев, докт. мед. наук, профессор; ORCID: 0000-0002-3731-1756; eLibrary SPIN: 2502-8831; e-mail: solopiter@gmail.com

Владимир Александрович Капатына, заведующий отделением; ORCID: 0000-0002-8959-0873; eLibrary SPIN: 6401-4611; e-mail: ingashi@mail.ru

AUTHORS' INFO

***Artem R. Ariukov**, postgraduate student; address: 6, Akademika Lebedeva str., Saint Petersburg, 194044, Russia; ORCID: 0000-0001-8774-5467; eLibrary SPIN: 4073-6487; Researcher Id: IAO-0519-2023; e-mail: Arukov.artem@yandex.ru

Aleksey I. Solovyov, MD, Dr. Sci. (Medicine), Professor; ORCID: 0000-0002-3731-1756; eLibrary SPIN: 2502-8831; e-mail: solopiter@gmail.com

Vladimir A. Kapatsyna, the Head of Department; ORCID: 0000-0002-8959-0873; eLibrary SPIN: 6401-4611; e-mail: ingashi@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

ОБ АВТОРАХ

Анна Алексеевна Крутикова, канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0003-2561-145X; e-mail: anntim2575@mail.ru

Владимир Александрович Романенко;
eLibrary SPIN: 9855-9483

Александр Николаевич Коваленко, докт. мед. наук, доцент;
ORCID: 0000-0002-2976-8051; eLibrary SPIN: 9131-6360;
e-mail: ank561@mail.ru

Аким Алексеевич Колесник; ORCID: 0009-0001-5809-9694

Артём Сергеевич Зинин; ORCID: 0009-0000-4308-7554

AUTHORS' INFO

Anna A. Krutikova, MD, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0003-2561-145X; e-mail: anntim2575@mail.ru

Vladimir A. Romanenko;
eLibrary SPIN: 9855-9483

Aleksander N. Kovalenko, MD, Dr. Sci. (Medicine), Associate
Professor; ORCID: 0000-0002-2976-8051; eLibrary SPIN: 9131-6360;
e-mail: ank561@mail.ru

Akim A. Kolesnik; ORCID: 0009-0001-5809-9694

Artem S. Zinin; ORCID: 0009-0000-4308-7554