

Е.А.Цыганкова, Е.И.Еременко, А.Г.Рязанова, О.И.Цыганкова, А.Н.Куличенко

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР-ТЕСТ СИСТЕМА ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ С ДЕТЕКЦИЕЙ РЕЗУЛЬТАТОВ В ФОРМАТЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

ФКУЗ «Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт», Ставрополь

Разработана мультиплексная ПЦР-РТ тест-система для обнаружения возбудителя сибирской язвы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «*Bacillus anthracis* multiplex 3 FRT». Тест-система содержит внутренний контрольный образец для контроля этапа выделения ДНК, праймеры и зонды к специфическим мишеням ДНК двух плазмидных и хромосомного гена *B. anthracis*. Это позволяет идентифицировать ди-, моно- и бесплазмидные штаммы *B. anthracis*, определяя их генетический потенциал патогенности, дифференцировать штаммы возбудителя сибирской язвы и близкородственных сапрофитов рода *Bacillus*.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, тест-система, детекция, ПЦР.

E.A.Tsygankova, E.I.Eremenko, A.G.Ryazanova, O.I.Tsygankova, A.N.Kulichenko

Multiplex Real Time PCR Test-System for the Detection of Anthrax Causative Agent

Stavropol Research Anti-Plague Institute, Stavropol

Designed is a multiplex PCR-RT test-system for the detection of anthrax causative agent using hybridization fluorescence detection – “*Bacillus anthracis* multiplex 3 FRT”. This test-system contains enclosed reference sample for carrying out control procedure in the phase of DNA purification, primers and probes to specific DNA target sequences of the two plasmid and one chromosomal *B. anthracis* genes. It allows for identification *B. anthracis* strains both possessing plasmids (one or two) and plasmidless, revealing their genetic pathogenicity potential, and for differentiation between anthrax agent strains and closely related saprophytes belonging to *Bacillus* species.

Key words: *Bacillus anthracis*, test-system, detection, PCR.

Трудность создания высокоспецифичной ПЦР тест-системы для идентификации ДНК сибиреязвенного микроба обусловлена значительным фенотипическим и генетическим сходством внутри группы близкородственных бацилл, в которую входят *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* и *Bacillus weichenstephanensis*. Чаще всего в качестве принципиальных мишеней для детекции выбирали плазмидные гены [1, 3, 10], однако в последнее время появились данные о наличии в геномах некоторых штаммов близкородственных бацилл последовательностей, подобных токсинной и капсульной плазмидам сибиреязвенного микроба [6, 8]. Существуют также моно- и бесплазмидные штаммы *B. anthracis*, поэтому для надежной идентификации возбудителя сибирской язвы методом ПЦР необходим подбор высокоспецифичных последовательностей обеих плазмид и хромосомы. Оптимальным технологическим решением является одновременная детекция минимум трех мишеней в одной мультиплексной ПЦР, содержащей также матрицу для внутреннего контроля.

Первая мультиплексная тест-система для идентификации сибиреязвенного микроба содержала праймеры к генам, локализованным на плазмидах pXO1, pXO2, и к хромосомному локусу *Ba813* [9]. Однако позже появился ряд работ, свидетельствующих о недостаточной специфичности хромосомного локуса *Ba813* [2, 3]. В качестве альтернативных

хромосомных маркеров были предложены последовательности гена *sap*, кодирующего синтез белка S-слоя [12, 13], бактериофаг-связывающий участок *E4* [4], ген плейотропного регулятора экстрацеллюлярных факторов патогенности *plcR* *B. anthracis* [5]. Следует отметить, что все последние разработки амплификационных тест-систем для индикации и идентификации *B. anthracis* рассчитаны на работу в режиме реального времени [5, 7, 11].

В Российской Федерации в настоящее время выпускается пять коммерческих ПЦР тест-систем для выявления ДНК *B. anthracis* разных производителей. Мишенями для всех вышеперечисленных тест-систем служат специфические фрагменты гена ПА (*pagA*) и/или одного из структурных генов капсулообразования (*capA* или *capB*). Ни одна из предлагаемых тест-систем не содержит в качестве специфической мишени для амплификации фрагмента гена, имеющего хромосомную локализацию. Таким образом, в настоящее время в Российской Федерации отсутствует мультиплексная тест-система для одновременной индикации в исследуемом материале ДНК *B. anthracis*, идентификации ди-, моно- и бесплазмидных штаммов возбудителя сибирской язвы и их дифференциации от близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* в режиме реального времени.

Целью работы была разработка мультиплексной тест-системы для индикации и идентификации *B. anthracis* с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени».

Материалы и методы

В исследовании использованы 71 штамм *B. anthracis* различного плазмидного состава: 42 – диплазмидных ($pXO1^+pXO2^+$), 24 – моноплазмидных ($pXO1^+pXO2^-$), 3 – моноплазмидных ($pXO1^-pXO2^+$), 2 – бесплазмидных ($pXO1^-pXO2^-$); 73 штамма близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* (18 – *B. cereus*, 14 – *B. thuringiensis*, 19 – *B. species (spp.)*, 17 – *B. subtilis*, 4 – *B. megaterium*, 1 – *B. mesentericus*); 27 штаммов гетерологичных микроорганизмов, среди которых: 1 – *Corynebacterium (C.) diphtheriae gravis*, 3 – *Escherichia (E.) coli*, 1 – *Proteus (P.) vulgaris*, 3 – *Pseudomonas (P.) aeruginosa*, 2 – *Serratia (S.) marcescens*, 2 – *Staphylococcus (S.) aureus*, 1 – *Streptococcus (S.) faecalis*, 1 – *S. pneumonia*, 2 – *Yersinia (Y.) enterocolitica*, 2 – *Y. kristensenii*, 1 – *Y. frederiksenii*, 7 – *Y. pseudotuberculosis*.

Все штаммы были получены из лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов» Ставропольского научно-исследовательского противочумного института.

Подготовку бактериальных штаммов для выделения ДНК проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–II групп патогенности».

Для проверки чувствительности разработанной тест-системы готовили споровые взвеси штаммов *B. anthracis* разного плазмидного состава заданной концентрации: взвесь спор в 0,1 % растворе Твина-80 под отраслевой стандарт оптической мутности ГИСК Л.А.Тарасевича 10 единиц (ОСО 42-28-85-08П) и делали десятикратные разведения в 0,1 % растворе Твина-80. Из разведений $1 \cdot 10^{-5}$ – $1 \cdot 10^{-7}$ спор/мл споры засеивали по 0,1 мл на 3 чашки с агаром Хоттингера. Учет количества выросших колоний проводили через 18–24 ч инкубации при 37 °С, определяя концентрацию жизнеспособных спор в исходной взвеси. Среднее значение концентрации определено по 3 посевам из разведений $1 \cdot 10^{-5}$ и $1 \cdot 10^{-6}$. Для тестирования разработанной тест-системы были выбраны взвеси спор штаммов *B. anthracis* в концентрациях $1 \cdot 10^5$, $1 \cdot 10^4$, $1 \cdot 10^3$, $1 \cdot 10^2$ спор/мл. Далее, 0,1 мл взвеси из каждого разведения засеивали в 0,9 мл бульона Хоттингера и проводили пробоподготовку и обеззараживание согласно МУ 1.3.2569-09.

В работе использовали комплект реагентов для выделения ДНК из клинического материала «ДНК-сорб-В» и реактивы для амплификации (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора), буфер для элюции (ЗАО «Силекс», Россия), маркеры молекулярных размеров (НПО «СибЭнзим», Россия; «Fermentas», Латвия, НПФ «ГенЛаб»). Для клонирования использовали набор «Ins T/A clone» и штаммы *E. coli* GM2163 и JM107, готовые сухие среды «Fast Media LB agar», «Fast Media LB Liquid Amp», «Fast Media LB agar Amp», «Fast Media LB agar IPTG/X-Gal»

(«Fermentas», Латвия), вектор «pGEM-T» («Promega», США). Для очистки ампликонов и плазмидной ДНК использовали наборы «АхуPrep Plasmid Mini-prep Kit» («Ахуген», США).

Олигонуклеотидные праймеры и зонды *TaqMan* были синтезированы в НПФ «ДНК-Синтез» (Россия). Дизайн праймеров и зондов *TaqMan*, *Molecular Beacon* к подобранным ДНК-мишеням осуществляли с использованием программного обеспечения «Beacon Designer 7.60» («Premier Biosoft International», США). Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы BLAST.

Результаты и обсуждение

Для конструирования мультиплексной тест-системы в качестве видоспецифичных ДНК-мишеней были выбраны ген отечного фактора *суа* ($pXO1$), ген капсулообразования *capC* ($pXO2$), хромосомный ген *sap* (белок S-слоя *B. anthracis*).

Для контроля этапа выделения ДНК нами был разработан неконкурентный внутренний контрольный образец (ВКО), который представляет собой модифицированный фрагмент генома фага лямбда, подобранный таким образом, чтобы соответствовать температуре отжига праймеров и зонда сконструированной тест-системы, длине ампликонов и их GC-составу. С использованием компьютерных программ Gene 2 Oligo Server и Gene Runner (v. 1.3.) фрагмент ВКО 127 был разбит на 10 частично перекрывающихся фрагментов (прямых и обратных праймеров), чтобы область перекрывания с двумя соседними праймерами составила 15–50 п.н., что дает возможность после ряда последовательных амплификаций синтезировать фрагмент ВКО размером 127 п.н. Праймеры были проверены на возможность образования устойчивых вторичных структур с использованием интерактивной программы Mfold v 3.2. 3.

Клонирование фрагмента проводили в соответствии с инструкцией производителя, прилагаемой к набору «Ins TAclone».

Полученный препарат ДНК ВКО тестировали после серии последовательных десятикратных разведений, добавляя по 10 мкл каждого разведения в качестве ВКО в пробы ДНК диплазмидных вирулентных штаммов *B. anthracis* 81/1 и 1СО. Те же препараты ДНК использовали для оптимизации ПЦР-РТ и отработки параметров амплификации и компонентов реакционной смеси. Данные о локализации специфических мишеней, красителях и гасителях флуоресценции приведены в табл. 1.

На первом этапе были проведены моноплексные реакции для каждого канала детекции отдельно, для определения оптимального диапазона флуоресцентного сигнала, достаточного для детекции специфической флуоресценции и не перекрывающегося с сигналами других детектируемых каналов, а также выбора программы амплификации и соотношения

Таблица 1

Характеристика специфических мишеней, входящих в состав экспериментальной мультиплексной ПЦР тест-системы для выявления *B. anthracis* в режиме «реального времени»

Ген	Локализация	Канал детекции	Комбинация флуорофора и гасителя
<i>суа</i>	pXO1	GREEN	(FAM) – (BHQ1)
<i>cap</i>	pXO2	RED	(Cy5) – (BHQ3)
<i>sap</i>	chr	YELLOW	(VIC) – (BHQ2)
VKO 127	контроль	ORANGE	(ROX) – (BHQ2)

концентрации праймеров и зонда в каждой реакционной смеси, не дающего повышенной фоновой флуоресценции.

При подборе оптимальных условий проведения ПЦР-РТ как в моно-, так и в мультиплексном формате определяли следующие параметры реакции: состав реакционной смеси – концентрация праймеров, зондов, *Taq*-полимеразы, Mg^{2+} ; программа амплификации – температура отжига праймеров, продолжительность каждого шага цикла амплификации, количество циклов, длительность предварительной денатурации. Далее, используя данные, полученные при проведении моноплексных реакций, был подобран состав реакционной смеси для мультиплексной ПЦР-РТ тест-системы, обеспечивающий стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналу детекции (*Orange*, *Green*, *Red* или *Yellow*), не приводящее к искажению сигнала по другим каналам (табл. 2).

Разработанная тест-система может быть использована в двух форматах: в микропробирках объемом 0,2 мл (с использованием *Taq*- или *TaqF*-полимеразы) и в стрипованных пробирках объемом 0,1 мл (с *TaqF*-полимеразой).

Анализ данных, полученных в моно- и мультиплексных реакциях, позволил определить необходимые параметры работы разрабатываемой мультиплексной тест-системы:

Программа амплификации: 1-й этап (предварительная денатурация): 95 °C – 15 мин (для *TaqF*-полимеразы) или 5 мин (для *Taq*-полимеразы); 2-й этап (образование специфических продуктов реакции): 95 °C – 15 с; 65 °C – 15 с; 72 °C – 15 с – 10 циклов; 3-й этап (учет флуоресцентного сигнала): 95 °C – 15 с; 61 °C – 20 с; 72 °C – 15 с – 35 циклов.

Учет флуоресцентного сигнала проводят при 61 °C. Уровень минимального и максимального сигналов составил: для канала ROX/*Orange* – 2–8 FI, для FAM/*Green* – 5–10 FI, для VIC/*Yellow* – 15–20 FI, для Cy5/*Red* – 5–10 FI.

Были установлены значения пороговой линии: по каналу *Orange* – 0,01; для каналов специфической детекции *Green* – 0,015, *Yellow* – 0,07, *Red* – 0,05. На основании проведенных исследований определена максимальная величина порогового цикла (C_t), при котором результат реакции считается положительным: < 32 – для *Green*, < 32 – для *Yellow*, < 31 – для *Red* и < 32 – для *Orange*. Учет результатов осуществляли по каждому каналу отдельно.

Все качественные и количественные характеристики экспериментальной тест-системы адаптированы для прибора «RotorGene 6000» («Corbett Research», Австралия). Для анализа данных, получаемых при использовании данной тест-системы, были определены критерии оценки результатов исследования проб ДНК, представленные в табл. 3.

Определение специфичности тест-системы проводили с использованием ДНК штаммов *B. anthracis* разного плазмидного состава, ДНК штаммов близкородственных сапрофитов рода *Bacillus* и гетерологичных микроорганизмов (перечень протестированных штаммов с указанием видовой принадлежности и плазмидного состава для штаммов *B. anthracis* представлен в разделе «Материалы и методы»).

Разработанная тест-система при проведении ПЦР-РТ с ДНК штаммов *B. anthracis* демонстрировала стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналу *Yellow*/VIC (хромосомный ген *sap*) с ДНК всех исследованных штаммов сибирезвездного микроба; флуоресценция по каналам *Green* /FAM (ген *суа*, pXO1) и *Red*/Cy5 (ген *cap*, pXO2) регистрировалась у штаммов в соответствии с их плазмидным составом; флуоресценция по каналу *Orange*/ROX регистрировалась во всех случаях в отрицательных пробах и, в ряде случаев, в положительных образцах.

Таким образом, разработана мультиплексная трехлокусная ПЦР-РТ тест-система для индикации и идентификации возбудителя сибирской язвы с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в

Таблица 2

Состав реакционной смеси ПЦР-РТ мультиплексной трехлокусной амплификационной тест-системы для выявления возбудителя сибирской язвы

Праймеры		Зонды		Концентрация компонентов реакционной смеси			
				дНТФ, мкМ	ПЦР-буфер	MgSO ₄ , мМ	Taq-(TaqF) полимеразы, ЕД
обозначение	концентрация, мМ	обозначение	концентрация, мМ	200	x1	1,5	2,5
суа RT-F	0,25	суа RT	0,1				
суа RT-R	0,25						
cap C RT-F	0,25	cap C RT	0,1				
cap C RT-R	0,25						
bas 3-4 RT-F	0,25	bas 3-4 RT	0,1				
bas 3-4 RT-R	0,25						
VKO 127 RT-F	0,25	VKO 127 RT	0,1				
VKO 127 RT-R	0,25						

Схема оценки результатов исследования проб ДНК

Значения Ct (пороговый цикл) по детектируемым каналам				Результат анализа
Fam/Green (суа)	Red/Cy5 (capC)	Joe/Yellow (sap)	Rox/orange (BK)	
Th (пороговая линия) = 0,015	Th (пороговая линия) = 0,05	Th (пороговая линия) = 0,07	Th (пороговая линия) = 0,01	
Нет значений	Нет значений	Нет значений	≤ 32	Не обнаружена ДНК <i>Bacillus anthracis</i>
< 32	< 31	≤ 32	≤ 32 (или нет)	Обнаружена ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO1 ⁺ pXO2 ⁺
Нет значений	< 31	≤ 32	≤ 32 (или нет)	Обнаружена ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO1 ⁺ pXO2 ⁺
< 32	Нет значений	≤ 32	≤ 32 (или нет)	Обнаружена ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO1 ⁺ pXO2 ⁺
Нет значений	Нет значений	≤ 32	≤ 32 (или нет)	Обнаружена ДНК <i>Bacillus anthracis</i> pXO1 ⁺ pXO2 ⁺
Нет значений	Нет значений	Нет значений	Нет или > 32	Анализ повторить с этапа выделения ДНК

режиме «реального времени» «*Bacillus anthracis* multiplex 3 FRT», включающая внутренний контрольный образец для контроля этапа выделения ДНК. Характеристики тест-системы соответствуют предъявляемым требованиям: специфичность разработанных тест-систем составила 100 %, специфическая активность (чувствительность) – $1 \cdot 10^2$ м.к./мл ($1 \cdot 10^2$ спор/мл).

Тест-система «*Bacillus anthracis* multiplex 3 FRT» позволяет проводить индикацию сибиреязвенного микроба, идентифицировать ди-, моно- и бесплазмидные штаммы *B. anthracis*, определять их генетический потенциал патогенности, дифференцировать их между собой, а также между бесплазмидными штаммами возбудителя сибирской язвы и штаммами близкородственных сапрофитов рода *Bacillus*.

Результаты исследований по конструированию тест-системы легли в основу проекта инструкции по ее применению для выявления ДНК *B. anthracis* в биологическом материале и объектах окружающей среды методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» «*Bacillus anthracis* multiplex 3 FRT».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Тучков И.В., Куличенко А.Н., Еремин С.А., Норкина О.В., Дроздов И.Г. Детекция штаммов сибиреязвенного микроба с использованием полимеразной цепной реакции. В кн.: Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. Саратов: Изд-во Саратов. ун-та; 1991. С. 89–90.

Источники 2–13 см. в References.

References

1. Tsuchkov I.V., Kulichenko A.N., Eremin S.A., Norkina O.V., Drozdov I.G. [Detection of anthrax microbe strains using PCR]. In: [Genetics, Microbiology and Improvement of Methods for Laboratory Diagnostics of

Particularly Dangerous Infections]. Saratov: SSU Publishing House; 1991. P. 89–90.

2. Böhm R., Pocivalsek S., Beyer W. PCR-Elisa for detection of *B. anthracis* in environmental samples. Abstract Book. 3-rd International Conference on Anthrax. Plymouth, England. 7–10 September 1998. P. 11.

3. Carl M., Hawkins R., Coulson N. Detection of spores of *Bacillus anthracis* using the polymerase chain reaction. J. Infect. Dis. 1992; 165(6):1145–8.

4. Dwyer K.G., Lamonica J.M., Schumacher J.A. Identification of *Bacillus anthracis* specific chromosomal sequences by suppressive subtractive hybridization. BMC Genomics. 2004; 12(5):15.

5. Easterday W.R., Van Ert M. N., Simonson T.S. Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis*. J. Clin. Microbiol. 2005; 43(4):1995–7.

6. Hoffmaster A.R., Ravel J., Rasko D.A., Chapman G.D., Chute M.D., Marston C.K. et al. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004 June 1; 101(22):8449–54.

7. Kenar L., Ortatatli M., Karayilanoglu T., Yaren H., Sen S. Comparison of real-time polymerase chain reaction and conventional polymerase chain reaction methods for the rapid identification of *Bacillus anthracis*. Mil. Med. 2007; 172(7):773–6.

8. Pannucci J., Okinaka R.T., Williams E., Sabin R., Ticknor L.O., Kuske Ch.R. DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria. BMC Genomics. 2002; 3:34.

9. Ramisse V., Patra G., Garrigue H. Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. FEMS Microbiol. Lett. 1996; 145:9–16.

10. Reif T.C., Johns M., Pillai S.D., Carl M. Identification of capsule-forming *Bacillus anthracis* spores with the PCR and a novel dual-probe hybridization format. Appl. Environ. Microbiol. 1994; 60(5):1622–5.

11. Szymajda U., Bartoszcze M. Application of the multiplex PCR-RFLP method in the identification of the *Bacillus anthracis*. Med. Dosw. Mikrobiol. 2005; 57(3):277–85.

12. Ryu C., Lee K., Yoo C., Seong W.K., Oh H.B. Sensitive and rapid quantitative detection of anthrax spores isolated from soil samples by real-time PCR. Microbiol. Immunol. 2003; 47(10):693–9.

13. Cheun H.I., Makino S.-I., Watarai M., Erdenebaatar J., Kawamoto K., Uchida I. Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. J. Appl. Microbiol. 2003; 95(4):728–33.

Authors:

Tsygankova E.A., Eremin S.A., Ryazanova A.G., Tsygankova O.I., Kulichenko A.N. Stavropol Research Anti-Plague Institute. 13–15, Sovetskaya St., Stavropol, 355035, Russia. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Об авторах:

Цыганкова Е.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г., Цыганкова О.И., Куличенко А.Н. Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт. 355035, Ставрополь, ул. Советская, 13–15. E-mail: snipchi@mail.stv.ru

Поступила 13.01.12.