

Ответственный автор

Прохватилова Елена Валерьевна – зам. директора по научно-производственной работе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора канд. мед. наук, доцент. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.841.11Pseudomonas:57.083

АНАЛИЗ ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ, ПОЗВОЛЯЮЩИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИРОВАТЬ *BURKHOLDERIA MALLEI* И *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* МЕТОДОМ ПЦР

Л.В. Лемасова, С.С. Савченко, Г.А. Ткаченко, В.А. Антонов

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, г. Волгоград

Проведено сравнение праймеров и зондов, комплементарных к разным ДНК-мишеням, позволяющих дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза между собой с помощью ПЦР в реальном времени. В работе представлены результаты исследований с оригинальными олигонуклеотидами на основе фрагмента гена *fliP* для идентификации *B. mallei*, а так же олигонуклеотидными затравками, комплементарными участку гена, кодирующего белок *gp68* для идентификации *B. pseudomallei*.

Ключевые слова: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, полимеразная цепная реакция.

EVALUATION OF PCR PRIMERS AND PROBES FOR *BURKHOLDERIA MALLEI* AND *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* DIFFERENTIATION

L.V. Lemasova, S.S. Savchenko, G.A. Tkachenko, V.A. Antonov

Volgograd Plague Control Research Institute of Rospotrebnadzor, Volgograd

We compared several primer and probe sets developed for real-time PCR method enabling specific differentiation of glanders and melioidosis causative agents. The oligonucleotides constructed in this study were based on the sequence of the *fliP* gene and *gp68*-protein coding sequence for identification of *B. mallei* and *B. pseudomallei*, respectively.

Key words: *B. pseudomallei*, *B. mallei*, polymerase chain reaction.

Burkholderia mallei и *Burkholderia pseudomallei* относятся к возбудителям особо опасных инфекционных заболеваний II группы патогенности – сапа и мелиоидоза, являющихся потенциальными агентами биотерроризма группы В. Высокий уровень сходства геномов этих бактерий определяет трудности при конструировании амплификационных тест-систем, с помощью которых возможно дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза друг от друга. Многими авторами проводятся исследования по поиску видоспецифичных ДНК-мишеней. В качестве целевой ДНК для создания такой тест-системы может стать участок генома, присутствующий у *B. pseudomallei*, но отсутствующий у *B. mallei*.

В настоящее время в Российской Федерации не зарегистрированы ПЦР тест-системы для дифференциации патогенных буркхольдерий. Важная роль в обеспечении этих исследований отводится созданному на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора Референс-центру по мониторингу за возбудителями сапа и мелиоидоза, в задачи которого входит изучение биологических, молекулярно-генетических и биохимических свойств *B. mallei* и *B. pseudomallei*, в том числе разработка идентификационных тестов для дифференциации штаммов патогенных буркхольдерий.

Цель работы – сравнительный анализ различных праймеров, сконструированных на основе видоспецифических последовательностей генома *B. mallei* и *B. pseudomallei* для диагностики методом полимеразной цепной реакции.

Материалы и методы

В ходе исследований было протестировано 10 штаммов возбудителя сапа, 20 штаммов возбудителя мелиоидоза и по пять штаммов гетерологичных микроорганизмов *B. ceracia* и *B. thailandensis*, полученные из коллекционного центра ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Штаммы буркхольдерий выращивали на плотных питательных средах в течение 1-2 суток при 37 °С. Готовили бактериальные взвеси клеток в 4 мл 0,15 М раствора натрия хлорида в концентрации 1×10^9 м.к./мл по отраслевому стандартному образцу мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича (ОСО 42- 28-85 П) и разводили таким образом, чтобы концентрация возбудителей сапа, мелиоидоза и гетерологичных микроорганизмов составляла от 1×10^9 до 1×10^4 м.к./мл.

В работе проведен анализ специфичности праймеров и зондов, предложенных в 2013 г. J. Janse et al. [3]. Одна из ДНК-мишеней на основе нуклеотидной последовательности транспозазы ISBma2 для обнаружения двух видов патогенных буркхольдерий одновременно и две другие мишени, позволяющие дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза между собой. Праймеры и зонд на основе гена *psu* для идентификации *B. pseudomallei*, кодирующего ацетилтрансферазу, которая является частью кластера генов, ассоциированных с системой секреции III типа генов, а также гена *tau* для идентификации *B. mallei*, кодирующего белок семейства фаговых интеграз.

В ходе исследований нами подобраны оригинальные праймеры и зонд на основе фрагмента гена *fliP* *B. mallei*, кодирующего белок биосинтеза флагеллина, а так же комплементарные участку гена, кодирующего белок *gr68* *B. pseudomallei*, которые позволяют дифференцировать возбудителей сапа и мелиоидоза между собой.

Олигонуклеотидные праймеры синтезированы в ЗАО «Синтол», г. Москва. ПЦР с изучаемыми олигонуклеотидными затравками проводили на приборе Rotor-Gene 6000 («Corbett Research», Австралия). Результат амплификации каждого штамма *B. pseudomallei*, *B. mallei* считался положительным, в случае если кривая накопления флуоресценции по каналу детекции пересекала пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции, на цикле, не превышающем граничное значение порогового цикла реакции (Ct) в соответствующей графе в таблице результатов.

Пробоподготовка для проведения ПЦР проводилась в соответствии с СП 1.3.1285-03 и МУ 1.3.2569-09 [1]. Обеззараживание исследуемых проб проводили добавлением раствора мертиолята натрия до конечной концентрации 0,01 % и прогреванием в течение 30 мин при температуре 56 °С. Выделение ДНК из чистых культур буркхольдерий, близкородственных и гетерологичных микроорганизмов проводили путем нуклеосорбции и лизиса клеток гуанидинтиоцианатом с помощью набора «ДНК-сорб В» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора).

Результаты и обсуждение

При сравнительном исследовании специфичности олигонуклеотидов, предложенных Janse I. et al. показано, что праймеры и зонд, комплементарные гену *psu*, позволяли обнаруживать ДНК *B. pseudomallei* только у 17 из 20 штаммов. Олигонуклеотидные затравки, комплементарные гену *tau* возбудителя сапа, позволяли обнаруживать ДНК *B. mallei* у 10 штаммов, однако также выявлены положительные результаты ПЦР с ДНК двух штаммов возбудителя мелиоидоза. Следовательно, при их использовании есть вероятность получения ложноположительных результатов ПЦР. Праймеры, сконструированные для одновременного выявления возбудителей сапа и мелиоидоза, детектировали ДНК *B. pseudomallei* только у 16 штаммов из 20 и ДНК *B. mallei* у всех 10 штаммов. Вышеуказанные пары праймеров и зонды не выявляли ДНК гетерологичных видов микроорганизмов даже в концентрации 10^7 м.к./мл.

Результаты исследований с разработанными нами оригинальными праймерами и зондом на основе фрагмента гена *fliP* *B. mallei* и гена, кодирующего белок *gr 68* *B. pseudomallei*, позволили осуществить идентификацию 10 штаммов возбудителя сапа, 20 штаммов возбудителя мелиоидоза и дифференциацию их между собой. Получены отрицательные результаты с ДНК *B. ceracia* и *B. thailandensis*, что свидетельствовало об аналитической специфичности тест-системы.

Заключение

В результате проведенного исследования установлено, что праймеры и зонды, сконструированные на основе последовательности гена *fliP* *B. mallei*, а так же олигонуклеотидные затравки, комплементарные участку гена, кодирующего белок *gr68* *B. pseudomallei*, оказались наиболее эффективными для создания видоспецифических амплификационных тест-систем. Быстрая и точная дифференциальная диагностика патогенных буркхольдерий методом ПЦР позволит правильно установить

этиологию заболевания, подобрать лечение и проводить эпидемиологический мониторинг.

Литература

1. Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности): Санитарно-эпидемиологические правила. СП 1.3.1285-03
2. 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
3. Janse I., Hamidjaja R.A., Hendriks AC, van Rotterdam BJ. Multiplex qPCR for reliable detection and differentiation of *Burkholderia mallei* and *Burkholderia pseudomallei* // BMC Infect Dis. – 2013. – Vol. 13. – P. 86.

Ответственный автор:

Лемасова Людмила Викторовна – научный сотрудник ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Тел.: (3952) 22-13-12. E-mail: confirk2014@mail.ru

УДК: 579.61:616.982.27-078

ДИАГНОСТИЧЕСКИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ НА ОСНОВЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К АНТИГЕНУ 200 KDA *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI*

Е.Э. Ким¹, Н.П. Храпова^{1,2}, Т.В. Замарина¹

¹ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, Волгоград;

²ГБОУ ВПО Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград

Представлена детальная характеристика флуоресцирующих иммуноглобулинов на основе моноклональных антител к антигену 200 kDa капсулы возбудителя мелиоидоза. Статья содержит данные об их применении для исследования материала, полученного от биопробных животных.

Ключевые слова: мелиоидоз, антиген 200 kDa, моноклональные антитела, метод флуоресцирующих антител.

DIAGNOSTIC CAPABILITIES OF EXPERIMENTAL FLUORESCENT IMMUNOGLOBULINS BASED ON MONOCLONAL ANTIBODIES TO *BURKHOLDERIA PSEUDOMALLEI* ANTIGEN 200KDA

E.E. Kim¹, N.P. Khrapova^{1,2}, T.V. Zamarina¹

Volgograd Plague Control Research Institute, Volgograd¹; Volgograd State Medical University, Volgograd²

Detailed characteristic of experimental fluorescent immunoglobulins based on monoclonal antibodies