

жизнедеятельности.–2007.–№ 2.–С. 13–18.

4. Романова, Е. М. Экологическая обусловленность распространения дирофиляриоза в Ульяновской области / Е. М. Романова, Т. А. Индирякова, Н. В. Зонина // Известия Самарского научного центра Российской академии наук.–2009.–Том 11.–№ 1-4.– С. 793–795.

5. Видеркер, М. А. Биобезопасность окружающей среды при формировании гельминтофаунистических комплексов паразитарных систем в Ульяновской области: автореферат дисс. ... канд. биологических наук / М. А. Видеркер. – Ульяновск, 2005. – 21 с.

6. Эпизоотологические и экологические аспекты трематодозов в Ульяновской области / Д. С. Игнаткин, Е. М. Романова, Т. А. Индирякова, М. А. Видеркер // Ветеринарный врач. – 2008. – № 4. – С. 53–55.

7. Роль моллюсков рода LYMNÆA в формировании очагов трематодозной инвазии в Ульяновской области / Д. С. Игнаткин, Е. М. Романова, Т. А. Индирякова, М. А. Видеркер // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Экология и безопасность жизнедеятельности.–2007.–№ 2.– С. 60–65.

8. Романова, Е. М. Перспективность использования моллюсков в биоиндикации загрязнения водных объектов / Е. М. Романова, О. А. Индирякова, А. П. Куранова // Известия Оренбургского государственного аграрного университета.–2008.–Том 4. – № 20-1.–С. 157–159.

9. Индирякова, Т.А. Оценка экологического состояния пригородных биотопов р. Свияга по показателям биоразнообразия паразитофауны RANA RIDIBUNDA PALLAS, 1971 / Т. А. Индирякова, Е. М. Романова, О. А. Индирякова // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2012.–№1 (17). – С. 49–54.

10. Рассадина, Е. В. Особенности биологии, экологии, этологии и разведения медицинской пиявки в лабораторных условиях [монография] / Е. В. Рассадина, Е. М. Романова. – Ульяновск: Ульяновская государственная сельскохозяйственная академия, Ульяновский государственный университет, 2008. – 185 с.

11. Беэр, С. А. Биология возбудителя описторхоза / С. А. Беэр. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – 336 с.

УДК 579:57.083:576.85

РАЗРАБОТКА СИСТЕМЫ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ *V. BRONCHISEPTICA* И *V. PERTUSSIS* НА ОСНОВЕ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ «РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ»

Мастиленко Андрей Владимирович, кандидат биологических наук, старший преподаватель кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

Васильев Дмитрий Аркадьевич, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

Борисова Ольга Юрьевна, доктор медицинских наук, руководитель центра по дифтерии и коклюшу **

Васильева Юлия Борисовна, кандидат ветеринарных наук, доцент кафедры «Микробиология, вирусология, эпизоотология и ветеринарно-санитарная экспертиза»*

* ФГБОУ ВПО «Ульяновская ГСХА им. П.А. Столыпина»

432017, г. Ульяновск, бульвар Новый Венец, 1; тел.: 8(8422)559547

e-mail: mav0608@yandex.ru

** ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора
125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

Ключевые слова: бактерии рода *Bordetella*, видовая дифференциация, мультиплексная ПЦР.

Статья посвящена проблеме разработки системы молекулярно-генетической дифференциации патогенных бактерий рода *Bordetella*, являющихся возбудителями респираторных заболеваний человека и животных. Авторами показано, что использование праймеров и флуоресцентных зондов, фланкирующих фрагмент гена *bfrZ* позволяет проводить видовую дифференциацию *B. bronchiseptica*. Использование в качестве видоспецифической мишени праймеров и флуоресцентного зонда, фланкирующих фрагмент гена транспозазы IS481 не позволяет проводить видовую идентификацию *B. pertussis*.

Введение

Микробиологическая дифференциация бактерий рода *Bordetella*, являющихся возбудителями респираторных заболеваний человека и животных, в настоящее время представляет определенную сложность, обусловленную слабой биохимической активностью данных возбудителей, а также высокой гомологией генетического состава бактериального нуклеоида. Установлено, что бактериальные виды *Bordetella pertussis* и *Bordetella parapertussis*, по данным ряда исследователей [1], являются самостоятельными ответвлениями *Bordetella bronchiseptica*, потерявшими в ходе эволюционного процесса часть генов, отвечающих за метаболические процессы, или их промотеры претерпели значительные для своего выражения изменения.

B. bronchiseptica так же, как и *B. pertussis* и *B. parapertussis*, экспрессирует ряд факторов патогенности: адгезины (филаментозный гемагглютинин, пертактин и фимбрии), токсины (дермонекротический, аденилатциклазу-гемолизин и липополисахарид) [2, 3]. Однако нуклеотидный состав генов, кодирующих эти факторы, имеет гомологию не менее 90% среди данных возбудителей [1], поэтому их использование в качестве мишеней для систем молекулярно-генетической идентификации нецелесообразно.

Результаты исследований [1, 4, 5] свидетельствуют, что молекулярно-генетическая дифференциация *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* может быть основана на вставочных элементах (IS), делеци-

ях или тандемных повторах отдельных элементов генома. Так, авторы считают, что для *B. pertussis* уникальными являются IS481 и IS1663, а для *B. parapertussis* IS1001; IS1002 имеет до 90 включений в геном *B. parapertussis* и до 6 – в геном *B. pertussis*.

Основываясь на этих данных, мы разработали олигонуклеотиды и флуоресцентные зонды для дифференциации *B. bronchiseptica* и *B. pertussis* при использовании метода ПЦР в режиме «реального времени». В качестве мишени для *B. pertussis* был выбран участок гена транспозазы IS481, а для *B. bronchiseptica* – фрагмент гена *bfrZ* системы утилизации железа. Специфичность гена *bfrZ* в отношении *B. bronchiseptica* была доказана в ранее опубликованных работах авторов [6, 7, 8, 9].

Объекты и методы исследований

Работа была выполнена на базе отдела молекулярной биотехнологии кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина.

В работе использованы штаммы *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* из музея кафедры микробиологии, вирусологии, эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы Ульяновской ГСХА им П.А. Столыпина. Для выделения ДНК использовали «ДНК–сорб–АМ» («ИнтеЛабСервис», Москва), в основе метода лежит лизис бактериальных клеток, сорбция ДНК на силикагеле и отмывка ДНК спиртово-солевым буфером. Подбор и дизайн олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов проводили

при помощи программы [Primer-Blast web-ресурса NCBI](#), а проверку их специфичности при помощи программы [Nucieotide-Blast](#) данного web-ресурса. В работе были использованы олигонуклеотиды *BPR-f* TTCCGCATGAATGTCTTCGC, *BPR-r* CACCTAGTGGCGTCTGCAC, *BFR-f* GGACGACCAGGATCACATCTTCC, *BFR-r* GCTTTCCTGGTAGTTGGCGTAGG, и флуоресцентные зонды *BPR-oligo* CAGCACAGGCTGTGGGTCCG-Fam-BHQ, *BBR-oligo* AACAA-CATGCGCATCAGCAACCGGAACA-R6G-BHQ. Для амплификации в работе использовали «Набор реагентов для проведения ПЦР-РВ с Taq-ДНК-полимеразой и ингибирующими активностью фермента антителами» (состав набора: дезоксинуклеозидтрифосфаты, 2.5 мМ, 500 мкл; 10-кратный ПЦР буфер, 500 мкл; MgCl₂, 25 мМ, 500 мкл; Taq ДНК-полимераза с ингибирующими активностью фермента антителами, 5 Е/мкл, 50 мкл; деионизированная вода, 2x1,7 мл.) («Синтол», Москва), а также детектирующий амплификатор ДТ-96 («ДНК-Технология», Москва).

Результаты исследований

Согласно данным исследований [2, 4, 5], в системе web-ресурса NCBI нами были определены полные нуклеотидные последовательности генов транспозазы IS481 *B. pertussis* и *bfrZ B. bronchiseptica*. После этого они были просканированы системой Blast на предмет совпадения с последовательностями депонированных бактериальных штаммов известных родов и видов. Полного совпадения по вышеуказанным последовательностям с исследуемыми бактериальными патогенами данной системой обнаружено не было. Аналогичным алгоритмом нами были определены наиболее консервативные участки генов транспозазы IS481 и *bfrZ*, которые были представлены у всех депонированных в данной системе штаммов *B. pertussis* и *B. bronchiseptica*.

После этого с использованием системы Primer-Blast был проведен подбор и дизайн олигонуклеотидов и флуоресцентных зондов для исследуемых последовательностей [10]. Флуоресцентные зонды были разработаны таким образом, что специфичность реакции для *B. bronchiseptica* детектируется по каналу Hex, а для *B. pertussis* – по

каналу Fam.

Одним из этапов подготовки к амплификации была экстракция геномной ДНК из проб биоматериала (суспензии бактериальных клеток и исходного клинического материала). Для этого нами была использована методика сорбции ДНК на силикагеле после предварительного лизиса бактериальных клеток и клинического материала. Методика экстракции заключалась в следующем:

1) по 100 мкл суспензии бактериальных клеток или клинического материала помещали в конические микропробирки типа «Eppendorf», имеющих маркировку «DNA/RNA free»;

2) в каждую из микропробирок вносили по 300 мкл лизирующего раствора и по 20 мкл сорбента (силикагеля);

3) после тщательного встряхивания и гомогенизации на вортексе все пробы инкубировали 5 минут при 56°C;

4) затем все пробы центрифугировали 1 минуту при 13000 об/мин при комнатной температуре;

5) супернатант удаляли с помощью колбы-ловушки, а полученный осадок промывали 1,0 мл спирто-солевого буфера;

6) после повторного центрифугирования в течение 1 минуты при 13000 об/мин при комнатной температуре удаляли супернатант;

7) полученный осадок подсушивали при открытых крышках при 56°C в течение 10 минут;

8) к осадку добавляли по 100 мкл трис-ЭДТА буфера и инкубировали в течение 10 минут при 56°C;

9) после гомогенизации осадка в буфере все пробы центрифугировали 1 минуту при 13000 об/минуту при комнатной температуре;

10) супернатант, содержащий ДНК, использовали в дальнейших исследованиях.

После выделения ДНК из бактериальных культур *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* нами была проведена одновременная амплификация фрагментов генов транспозазы IS481 и *bfrZ* в микропробирках 0,2 мл с реакционной смесью, содержащей по 10 пмоль каждого из олигонукле-

Таблица 1
Программа для амплификации ДНК

№ цикла	Шаг	Температура	Длительность	Детекция	Количество повторов
1	1	95°C	5 мин		1
2	1	95°C	10 сек	*	40
	2	62°C	40 сек		

отидов и по 2,5 пмоль каждого из флуоресцентных зондов. После ряда экспериментов по оптимизации температуры отжига праймеров была определена программа амплификации (табл. 1).

Использование детектирующего амплификатора позволило в данной работе регистрировать уровень роста флуоресцентного сигнала на каждом цикле реакции. В методе ПЦР с регистрацией в режиме «реального времени» основной величиной является не количество флуоресцентного сигнала, а номер цикла, на котором уровень сигнала начал экспоненциальный рост по сравнению с фоновой величиной. При этом в данной работе нами была учтена также эффективность самой реакции, которая составила более 95%. Однако применяемый в большинстве случаев метод оценки результатов с использованием порогового уровня (Ct) был заменен нами на метод прямого сравнения графиков накопления флуоресцентного сигнала с использованием первой и второй производной (Cp). Преимуществом использования производных является то, что при умножении кривой на любые множители положение максимумов производных не меняется. Это позволило нам избежать неоднородности расчета коэффициента пропорциональности числа молекул ДНК в реакции к уровню сигнал флуоресценции.

Результаты роста флуоресцентного сигнала по каналам Fam и Hex представлены на рис. 1 и 2.

Результаты обработки данных экспоненциального роста флуоресценции по каналам Fam и Hex отражены в таблице 2.

Выводы

В результате проведенных экспери-

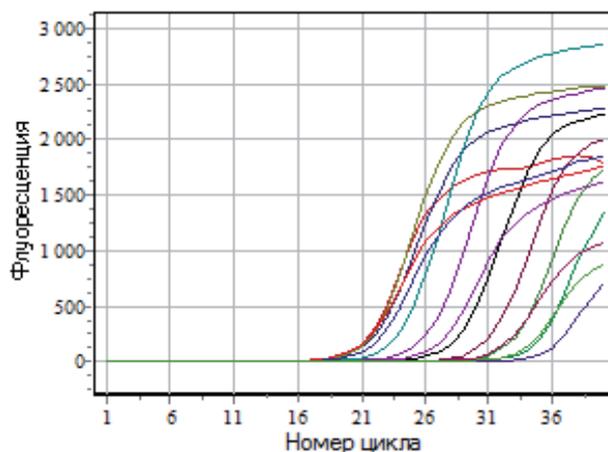


Рис. 1 – Кривая роста флуоресценции по каналу FAM в эксперименте с праймерами к участку гена транспозазы IS481 *B. pertussis*

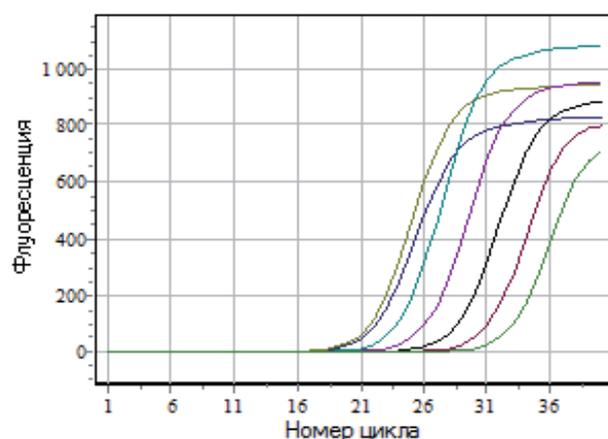


Рис. 2 – Кривая роста флуоресценции по каналу HEX в эксперименте с праймерами к участку гена *bfrZ B. bronchiseptica*

ментов нами было обнаружено, что олигонуклеотиды и флуоресцентный зонд с красителем R6G, фланкирующие фрагмент гена *bfrZ*, являются видоспецифичными для *B. bronchiseptica*. Олигонуклеотиды и флуоресцентный зонд, фланкирующие специфический фрагмент гена транспозазы IS481 *B. pertussis*, не являются видоспецифичными; при их отжиге наблюдается экспоненциальный рост флуоресцентного сигнала красителя Fam также для *B. bronchiseptica* и *B. paraptussis*. Исходя из этого, использование гена транспозазы IS481 в качестве видоспецифичной мишени для *B. pertussis*, по нашему мнению, нецелесообразно, однако возможно использование данных оли-

Таблица 2

Ср Fam/Hex при RT-PCR проб с содержанием ДНК *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis*

Лун-ка	Идентификатор	Ср Fam	Ср Hex
A1	<i>B. bronchiseptica</i> 123	21,5	20,4
A2	<i>B. bronchiseptica</i> 107	22,3	22
A3	<i>B. bronchiseptica</i> 342	34,3	29,9
A4	<i>B. bronchiseptica</i> 45	26,7	25,4
A5	<i>B. bronchiseptica</i> 156	25,9	23,2
A6	<i>B. bronchiseptica</i> 178	24,8	22,1
A8	<i>B. bronchiseptica</i> 112	25	24,8
A9	<i>B. pertussis</i> 24/08	29,2	
A10	<i>B. pertussis</i> 256/3	31,4	
A11	<i>B. pertussis</i> 124	27,5	
A12	<i>B. pertussis</i> 36/11	26,4	
B1	<i>B. parapertussis</i> 109	22,6	
B2	<i>B. parapertussis</i> 34	27,2	
B3	<i>B. parapertussis</i> 413	26,8	
F12	K-		

гонуклеотидов и флуоресцентного зонда в качестве родоспецифической мишени при проведении ПЦР в режиме «реального времени» для идентификации *B. bronchiseptica*, *B. pertussis* и *B. parapertussis* без видовой дифференцировки.

Библиографический список

1. A real-time PCR assay with improved specificity for detection and discrimination of all clinically relevant *B. species* by the presence and distribution of three Insertion Sequence elements / L. Roorda [et al.] // BMC Res Notes. – 2011. – V.21. – P.4-11.
2. Comparative analysis of the genome sequences of *B. pertussis*, *B. parapertussis* and *B. bronchiseptica* / J. Parkhill [et al.] // Nature genetics Advance online publication. – 2003. – V.10. – P.1038-1227.
3. Gueirard, P. Human *B. bronchiseptica* infection related to contact with infected animals: Persistence of bacteria in host / P. Gueirard, C. Weber, N. Guiso // J Clin Microbiol. – 1995. – V.33. – P.2002-2006.
4. Triplex real-time PCR assay for detection and differentiation of *B. pertussis* and *B.*

parapertussis / Y. Xu [et al.] // Apmis. – 2010. – V.118. – P.685-91.

5. Woolfrey, B.F. Human infections associated with *B. bronchiseptica* / B.F. Woolfrey, J.A. Moody // Clin. Microbiology. Rev. – 1991. – V.4. – P.243-255.

6. Использование количественной ПЦР для идентификации *Bordetella bronchiseptica* / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Молекулярная диагностика – 2010: Сборник трудов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 24-26 ноября, 2010. – Москва, 2010. – С.68-70.

7. Разработка методики выявления специфического участка ДНК *Bordetella bronchiseptica* с помощью ПЦР в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Д.Г. Сверкалова, Ю.Б. Никульшина // Современный мир, природа и человек: Сборник научных трудов. – Томск, 2009. – С. 115-117.

8. Разработка методики идентификации *Bordetella bronchiseptica* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» / Д.А. Васильев, А.В. Мاستиленко, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова // Актуальные проблемы инфекционной патологии ветеринарной медицины: Материалы конференции молодых ученых, посвященной памяти члена-корреспондента РАСХН Вишнякова И.Ф. 70-летию со дня рождения, 3-4 декабря, 2009. – Покров, 2009. – С. 78-80.

9. Определение эффективности разработанных зондов в реакции РВ-ПЦР для повышения специфичности выявления *Bordetella bronchiseptica* / А.В. Мاستиленко, Д.А. Васильев, Ю.Б. Васильева, Д.Г. Сверкалова / «Молекулярная эпидемиология актуальных инфекций»: материалы международной конференции, Санкт-Петербург, 5–7 июня 2013 года. – Санкт-Петербург: НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. – «Инфекция и иммунитет». – Том 3. – №2. – С. 152.

10. ПЦР «в реальном времени» / Д.В.Ребриков [и др.] - М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. - 223 с.