

УДК 577.2:573.6

ДЕТЕКТУВАННЯ ЗБУДНИКА СИБІРКИ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

О. Ю. Лиманська^{1,2}
Л. О. Муртазаєва¹
С. Клі³
О. П. Лиманський¹

¹ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І. І. Мечникова
НАМН України», Харків

²Національний науковий центр «Інститут експериментальної
і клінічної ветеринарної медицини» НААН України, Харків

³Інститут Роберта Коха, Берлін, Німеччина

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Отримано 20.04.2012

Точна ідентифікація бацил *Bacillus anthracis* залишається складним завданням при диференціації збудника сибірки від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* через існування високого ступеня гомології нуклеотидних послідовностей з представниками групи *Bacillus cereus sensu lato*.

Розроблено молекулярно-генетичні набори праймерів та проб для полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з гібридаційно-флуоресцентною детекцією для диференціації бацил *B. anthracis* від *B. cereus* та *B. thuringiensis*.

Цільовою мішенню для праймерів та проб визначено фрагмент гена *ssp* хромосомної ДНК, що характеризується гексануклеотидною інсерцією тільки для ізолятів *B. anthracis*. Використання проб у форматах TaqMan та молекулярного маяка дало змогу за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі надійно диференціювати бактерії *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Сигнал флуоресценції для шпилькових проб із форматом молекулярного маяка був позитивний тільки для штамів *B. anthracis*, а для близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* — негативний. У разі використання лінійних проб TaqMan реєстрували високоінтенсивний сигнал флуоресценції для всіх ізолятів *B. anthracis* і сигнал значно нижчої інтенсивності — для *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Розроблені підходи можуть бути корисними для клінічних, епідеміологічних та епізоотологічних досліджень.

Ключові слова: збудник сибірки, *Bacillus anthracis*, полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі.

Технологія ДНК-діагностики невпинно вдосконалюється — від високовартісної низькоєфективної, з використанням декількох процедур, до недорогої, високоефективної, із застосуванням автоматизованої процедури. До сучасних технологій ПЛР-детекції (ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція) та типування патогенів можна віднести ПЛР з використанням проб у різних форматах — лінійних TaqMan, шпилькових молекулярних маяків, скорпіонових праймерів-проб, LUX праймерів-проб (LUX — light upon extension), Sunrise праймерів-проб, LNA-модифікованих праймерів (LNA — locked nucleic acid, або замкнена нуклеїнова кислота) [1–5].

Здійснюючи пошук молекулярно-генетичних маркерів та розробляючи відповідні набори праймерів для детекції та типування патогенів, ми виходимо з того, що раніше створені тест-системи втрачають актуальність через появу нової інформації щодо молекулярної організації патогенів, а також

нових сиквенсів генів та їхніх фрагментів у базах даних. Так, наприклад, у 2006 р. компанією Cepheid (США) було розроблено тест-систему на основі ПЛР у реальному часі (ПЛР-РЧ) з використанням скорпіонової проби для детекції збудника сибірки *B. anthracis* на основі виявлення обох плазмід рХО1 та рХО2, що визначають його патогенність, яка залежить від двох факторів — капсули і токсину виразки. Вироблення капсули зумовлено генами *capA*, *capB* та *capC*, локалізованими на плазміді рХО2. Компоненти токсину кодуються трьома генами: *pag*, *cyt* і *lef*, локалізованими на плазміді рХО1 [6, 7].

Донедавна вважали, що наявність обох зазначених плазмід є відмінною особливістю патогенних штамів *B. anthracis*. Проте існують штами близькоспоріднених бактерій *B. cereus* та *B. thuringiensis*, які містять послідовності більше половини відкритих рамок зчитування плазмід рХО1 та рХО2

B. anthracis [8, 9]. А в 2009 р. з'явилося повідомлення [10], що знайдено штами близькоспорідненого виду *B. cereus*, які містять обидві плазмиди рХО1 та рХО2. Отже, тільки наявність цих двох плазмід не дозволяє диференціювати штами *B. anthracis* від інших представників групи *B. cereus sensu lato* (яка також включає близькоспоріднені бактерії *B. thuringiensis*, *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* та *B. weihenstephanensis*).

B. anthracis, грампозитивна аеробна бактерія, що утворює ендоспори, є етіологічним агентом сибірки, небезпечного, а часом із летальним наслідком, захворювання людини і тварин, що може інфікувати людей шкірним, респіраторним або шлунково-кишковим шляхами [11–15].

У цій роботі на основі аналізу поліморфізму поодиноких нуклеотидів гена *ssp* хромосомної ДНК близькоспоріднених видів бактерій групи *Bacillus cereus sensu lato* визначено праймери і проби та проведено диференціацію *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* і *B. thuringiensis* за допомогою ПЛР-РЧ з пробами у форматах TaqMan та молекулярного маяка.

Матеріали і методи

Множинне вирівнювання та наступний статистичний аналіз проводили на основі комп'ютерного аналізу нуклеотидних послідовностей гена *ssp* бактерій *B. anthracis*, *B. cereus* і *B. thuringiensis* та їхніх фрагментів за допомогою ліцензійного пакета прикладних програм GeneBee [16], термодинамічний аналіз праймерів, проб та ампліконів — за допомогою програм MeltCalc [17], Exiqon (Exiqon, Данія; <http://www.exiqon.com>) та Oligo (версія 3.0, США) [18]. Дизайн системи праймерів та проб було виконано за традиційною схемою: множинне вирівнювання (для можливості побудови філогенетичного дерева) → філогенетичний аналіз (для контролю надійності класифікації ізолятів видів, що аналізують, → множинне вирівнювання (з метою визначення позицій однонуклеотидних поліморфізмів та фрагментів з високим ступенем подібності).

Тестування набору праймерів для детекції *B. anthracis* здійснювали із застосуванням зразків ДНК, екстрагованої з ізолятів *B. cereus*, *B. pseudomycoides*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*, *B. fluorensens*, *B. mycoides*, наданих д-ром S. Klee (Інститут Роберта Коха, Берлін, Німеччина). ПЛР-РЧ проводили на термоциклері ABI7500 (Applied Biosystems, США) за

таких температурних і часових параметрів: початкова інкубація для денатурації ДНК-матриці та активації FastStart Taq ДНК-полімерази — 95 °С, 4 хв; денатурація — 95 °С, 15 с; відпал — 60 °С, 60 с; синтез — 72 °С, 20 с; кількість циклів — 40. Для проведення ПЛР-РЧ використовували універсальний набір реагентів TaqMan Environmental Master mix від фірми Applied Biosystems (США), до складу якого входить референсний барвник ROX (6'-карбоксі-Х-родамін). ПЛР-РЧ проводили в об'ємі реакційної суміші 20 мкл, що містила: 4 мкл реакційного буфера TaqMan; 0,8 мкМ кожного праймера; 0,07 мкМ специфічної проби; 5 мкл ДНК.

Для ампліфікації фрагмента гена *ssp B. anthracis* використовували розроблений набір праймерів Banssp9 — Banssp10 і проб, послідовності та позиції яких наведено нижче:

Banssp9 (98-123) 5'-gcgactgaacaatgta-caagcagt -3';

Banssp10 (230-203) 5'-cgtctgtttcagttg-caaattctgtacc -3'.

Лінійна проба у форматі TaqMan:

(156–180) 5'-FAM-cgcaagcttctggtgctag-cattcaaacg -3'-RTQ1.

Шпилькова проба у форматі молекулярного маяка:

5'-FAM-cggcgcgcaagcttctggtgctagcattcaaacgcccg -3'- RTQ1,

де FAM — флуорофор (флуоресцеїн), а RTQ1 — відповідний йому гасник флуоресценції (з максимумом спектра поглинання за довжини хвилі 515 нм). Для шпилькової проби підкреслено комплементарні фрагменти, які утворюють стебло шпильки, а не позначена послідовність відповідає послідовності мішені, що впізнається. Синтезовані праймери та проби отримано від компанії «Синтол» (Російська Федерація).

Результати та обговорення

Увага до визначення цільових мішеней, зумовлено декількома обставинами. По-перше, дані літератури [19, 20] та наші дискусії з фахівцями в галузі детекції *B. anthracis* (зокрема з проф. W. Beyer, приватна інформація) свідчать, що, наприклад, ген *plcR* є нетривіальною мішенню і має достатню дискримінуючу потужність для диференціації *B. anthracis* від близькоспоріднених видів *B. cereus* та *B. thuringiensis* [21]. По-друге, спроби відтворити надійну ПЛР-детекцію *B. anthracis* (що є надзвичайно важливим в умовах сьогодення для захи-

сту населення України, зважаючи на біотерористичний потенціал *B. anthracis*) можуть призвести до хибнонегативних результатів через помилковість наведених у літературі праймерів. Вибірково проведений авторами комп'ютерний аналіз відомих наборів праймерів на основі гена *plcR* показав, що в роботі [20] наведено не послідовності праймерів, а комплементарні фрагменти, у роботі [19] прямим і зворотним праймерами для детекції *B. anthracis* слугували послідовності праймерів, специфічних до *B. cereus* та *B. thuringiensis* (результати не показано).

На основі комп'ютерного аналізу низки генів хромосомної ДНК близькосторідних видів *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis* нами визначено, що ген *ssp* характеризується достатньою дискримінуючою потужністю, тобто містить точкові мутації, або одонуклеотидні поліморфізми, що дає змогу встановити молекулярні мішені та позиції, які можуть бути використані як дискримінуючі нуклеотиди для створення наборів праймерів і проб. Множинне вирівнювання нуклеотидних послідовностей повномірного гена *ssp* (завдовжки 301 п. н. для *B. anthracis* та 295 п. н. — для *B. cereus* і *B. thuringiensis*), що кодує низькомолекулярний кислоторозчинний протеїн, для ізолятів групи *B. cereus sensu lato* дозволило виявити таку особливість геномної організації, як наявність гексануклеотидної вставки, яка є характерною тільки для ізолятів *B. anthracis* та делетованою для ізолятів *B. cereus* і *B. thuringiensis*. Тому цю інсерцію використали як хромосомний маркер для розроблення видоспецифічних проб для детекції *B. anthracis*, частиною мішені для якої є зазначений гексануклеотид (рис. 1).

Локалізацію розроблених праймерів (прямого Banssp9 та зворотного Banssp10) і проб стосовно «+»- та «-»-нитки ДНК наведено на рис. 2. Важливою особливістю нуклеотидної послідовності гена *ssp* є наявність прямого повтору завдовжки 46 п. н., що враховували під час розроблення як даного набору праймерів і проб, так і раніше створеного набору праймерів для детекції збудника сибірки за допомогою стандартної ПЛР з електрофоретичною детекцією [22].

Сучасні технології ПЛР-РЧ передбачають використання різноманітних флуорогенних гібридаційних проб (сигнал флуоресценції яких змінюється за гібридації з мішенню). Відомі типи таких проб можна розподілити на два класи — з двома або з одним флуорофором. Перша група проб

базується на зміні взаємодії між лігандами під час гібридації з послідовністю мішені, що зумовлює зміну інтенсивності флуоресценції. До цієї групи належать молекулярні маяки — шпилькові структури з локалізованою у петлі послідовністю впізнавання та стеблом, на кінцях якого у просторовій близькості розташовані флуорогенний барвник та нефлуорогенний гасник. У процесі гібридації з мішенню флуорофор просторово відділяється від гасника, що спричинює значне збільшення флуоресценції. До цієї групи також належать скорпіонові праймери-проби, що є біфункціональними молекулами, у яких праймер ковалентно з'єднаний із пробою. Важливо, що кількісні методи аналізу дозволяють вимірювати флуоресценцію в кожному циклі ПЛР, а не тільки після закінчення аналізу.

Для ПЛР-РЧ з лінійною пробою у форматі TaqMan сигнал флуоресценції був високоінтенсивний для всіх ізолятів *B. anthracis* і значно нижчий або взагалі відсутній для інших представників групи *B. cereus sensu lato* (для деяких ізолятів — негативний). Для ПЛР-РЧ з пробою у форматах молекулярного маяка позитивний сигнал реєстрували тільки для штамів *B. anthracis* (рис. 3).

На відміну від ПЛР-РЧ із шпильковою пробою у форматі молекулярного маяка, при проведенні ПЛР з лінійною пробою TaqMan реєстрували різний рівень сигналу флуоресценції для різних представників групи *B. cereus sensu lato*. На думку авторів, наступне секвенування фрагмента гена *ssp*, що ампліфікується, дасть змогу з'ясувати це питання.

Численні молекулярно-діагностичні компанії розробляють і випускають комплексні системи і тести для генетичного аналізу для клінічного, промислового ринків та ринку біозахисту. Такі системи уможливають швидке тестування генетичних та інфекційних захворювань завдяки автоматизації складних ручних лабораторних процедур. Інтеграція таких трьох складних і тривалих процедур, необхідних для проведення ПЛР у реальному часі, як підготовка зразка, ампліфікація ДНК та детекція результатів аналізу в одному картриджі, дає можливість проводити швидке надійне молекулярне тестування, що особливо важливо для ідентифікації збудників інфекційних захворювань та патогенів з біотерористичним потенціалом.

Поява перших високотехнологічних систем закритого типу, зокрема GeneXpert System (Cepheid Inc., США) [23], що базуються на



Рис. 1. Фрагмент множинного вирівнювання гена *ssp* для 1 ізоляту *Bacillus anthracis*, 20 ізолятів *B. cereus* та 25 ізолятів *B. thuringiensis*, на основі якого створено проби у форматах TaqMan і молекулярного маяка для ПЛР-РЧ. Наведено номери, що відповідають номерам ізолятів у базі даних GenBank: в ізоляті *B. anthracis* DQ146892 виділено унікальну для *B. anthracis* інсерцію завдовжки 6 н. Для ізолятів *B. cereus* та *B. thuringiensis* виділено нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами послідовності ізоляту *B. anthracis* DQ146892, що сприяє підвищенню специфічності проб. Чорна смуга під нуклеотидними послідовностями вказує на наявність висококонсервативних ділянок гена, а провали на ній відповідають варіабельним позиціям. Проблема TaqMan 5'-FAM-cgcaagcttctgggtgctagcattcaaacg-3'-RTQ1. Для проби у форматі молекулярного маяка підкреслено комплементарні фрагменти, які утворюють стебло шпильки (5'-FAM-cggcgcgcaagcttctgggtgctagcattcaaacg-3'-RTQ1)

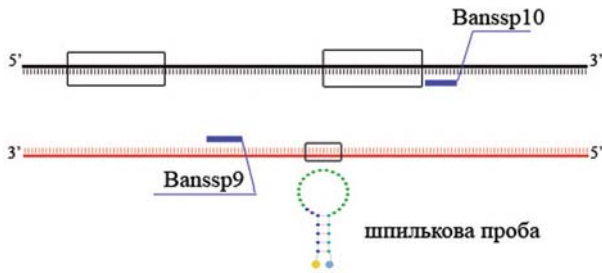


Рис. 2. Локалізація праймерів та проби на гені *ssp* хромосомної ДНК збудника сибірки:

набір праймерів Banssp9 — Banssp10 дозволяє ампліфікувати фрагмент гена *ssp* завдовжки 133 п. н., що містить цільову мішень для шпилькової (або лінійної) проби. Двома прямокутниками виділено прямий повтор

ПЛР-РЧ зі скорпіоновими праймерами-пробами, дозволила скоротити час генотипування або аналізу зразка на наявність інфекційного збудника до 30–45 хв. Такі системи можуть, з одного боку, слугувати альтернативою високовартісним референс-лабораторіям, оскільки не потребують спеціалізованого персоналу та лабораторних приміщень. А з другого боку, такі прилади закритого типу орієнтовані тільки на набори реагентів від конкретного виробника і не дають змоги використовувати реакційні компоненти від інших компаній. Створені в цій роботі набори праймерів та проб для детекції збудника сибірки можуть бути використані в системах відкритого типу в лабораторіях з обладнанням для проведення ПЛР-РЧ, яка увійшла в практику дослідних та клінічних лабораторій у всьому світі [24].

Таким чином, проведено порівняння проб у форматах TaqMan і молекулярного маяка для детекції бацил *B. anthracis* та диференціації їх від близькоспоріднених видів *B. cereus* і *B. thuringiensis* за допомогою ПЛР у реальному часі. Аналіз графіків ампліфікації показав, що шпилькова проба у форматі молекулярного маяка, молекулярною мішенню для якої є фрагмент гена *ssp* хромосомної ДНК, характеризується позитивним сигналом флуоресценції для ізолятів *B. anthracis*, тимчасом як для інших представників групи *B. cereus sensu lato* такий сигнал — відсутній. Висока специфічність шпилькової проби у форматі

ЛІТЕРАТУРА

1. Lukhtanov E., Lokhov S., Gorn V. et al. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence // Nucl. Acids. Res. — 2007. — V. 35, N 5. — e30.

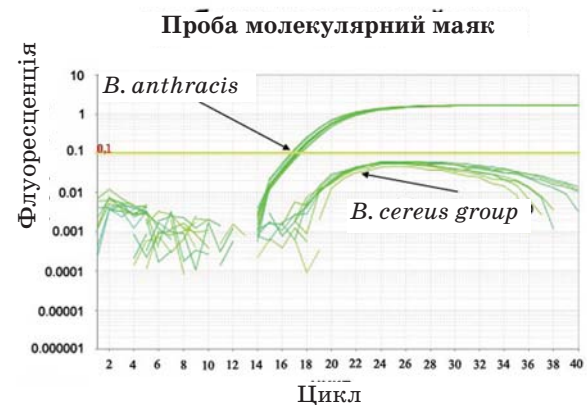
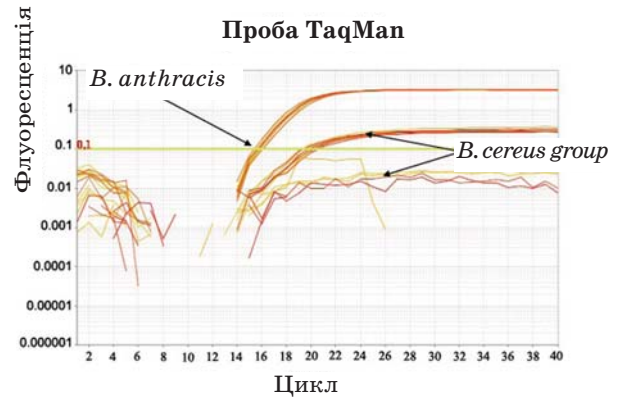


Рис. 3. Ампліфікація ДНК представників групи *B. cereus sensu lato* за допомогою ПЛР-РЧ з різними форматами проб:

А — лінійна проба TaqMan;

Б — шпилькова проба у форматі молекулярного маяка

молекулярного маяка при детекції *B. anthracis* зумовлена гексануклеотидною делецією в сайті зв'язування проби в гені *ssp* хромосомної ДНК для ізолятів *B. cereus* та *B. thuringiensis*. Важливою якістю розробленого набору праймерів і проб, на відміну від існуючих наборів на основі хромосомних генів *rpoB* [25, 26], *gyrB* [27], *gyrA* [28], *16S rRNA* [7], *plcr* [20, 29], є здатність надійно диференціювати збудник сибірки від близькоспоріднених видів, які характеризуються високим рівнем гомології нуклеотидних послідовностей.

Роботу виконано за фінансової підтримки д-ра Лиманського О. П., а також частково підтримано грантом АМН 95/2010 від НАМН України.

2. Chen C., Ridzon D., Broomer A. et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR // Ibid. — 2005. — V. 33, N 20. — e179.
3. Afonina I., Mills A., Sanders S. et al. Improved biplex quantitative real-time polymerase

- chain reaction with modified primers for gene expression analysis // *Oligonucleotides*. — 2006. — V. 16. — P. 395–403.
4. *Afonina I., Ankoudinova I., Mills A. et al.* Primers with 5' flaps improve real-time PCR // *Bio-Techniques*. — 2007. — V. 43. — P. 770–774.
 5. *Лиманская О. Ю., Мухина Т. Н., Степаншина В. Н. и др.* Детекция изолятов дикого типа и точечных мутаций в геноме устойчивых к изониазиду микобактерий туберкулеза // *Мол. биол.* — 2010. — Т. 44, № 4. — С. 635–645.
 6. *Ulrich M. P., Christensen D. R., Coyne S. R. et al.* Evaluation of the Cepheid GeneXpert System for detecting *Bacillus anthracis* // *J. Appl. Microbiol.* — 2006. — V. 100, N 5. — P. 1011–1016.
 7. *Hadjinicolaou A. V., Demetriou V. L., Hezka J. et al.* Use of molecular beacons and multi-allelic real-time PCR for detection of and discrimination between virulent *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* isolates // *J. Microbiol. Meth.* — 2009. — V. 78, N 1. — P. 45–53.
 8. *Pannucci J., Okinaka R. T., Sabin R., Kuske C. R.* *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species // *J. Bacteriol.* — 2002. — V. 184, N 1. — P. 134–141.
 9. *Pannucci J., Okinaka R. T., Williams E. et al.* DNA sequence conservation between the *Bacillus anthracis* pXO2 plasmid and genomic sequence from closely related bacteria // *BMC Genom.* — 2002. — V. 9, N 1. — P. 34–41.
 10. *Kolsto B., Tourasse N. J., Okstad O. A.* What sets *Bacillus anthracis* apart from other *Bacillus* species? // *Annu. Rev. Microbiol.* — 2009. — V. 63. — P. 451–476.
 11. *Anthrax in humans and animals.* Edited by Turnbull P. — Geneva: WHO Press, 2008. — 219 p.
 12. *Ellerbrok H., Nattermann H., Ozel M. et al.* Rapid and sensitive identification of pathogenic and apathogenic *Bacillus anthracis* by real-time PCR // *FEMS Microbiol. Lett.* — 2002. — V. 214, N 1. — P. 51–59.
 13. *Beyer W., Pociwalsek S., Bohm R. J.* Polymerase chain reaction-ELISA to detect *Bacillus anthracis* from soil samples-limitations of present published primers // *Appl. Microbiol.* — 1999. — V. 87, N 2. — P. 229–236.
 14. *Herzog A. B., McLennan S. D., Pandey A. K. et al.* Implications of limits of detection of various methods for *Bacillus anthracis* in computing risks to human health // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2009. — V. 75, N 19. — P. 6331–6339.
 15. *Szinicz L.* History of chemical and biological warfare agents // *Toxicology*. — 2005. — V. 214. — P. 161–181.
 16. *Бродский Л. И., Драчев А. Л., Татузов Р. Л., Чумаков К. М.* Пакет прикладных программ для анализа последовательностей биополимеров: GeneBee // *Биополимеры и клетка*. — 1991. — Т. 7, Вып. 1. — С. 10–14.
 17. *Schütz E., von Ahse N.* Spreadsheet software for thermodynamic melting // *Biotechniques*. — 1999. — V. 27, N 6. — P. 1218–1224.
 18. *Rychlik W., Spencer W., Rhoads R.* Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro // *Nucl. Acids Res.* — 1990. — V. 18, N 21. — P. 6409–6417.
 19. *Ko K. S., Kim J.-W., Kim J.-M. et al.* Population structure of the *Bacillus cereus* group as determined by sequence analysis of six housekeeping genes and the *plcR* gene // *Infect. Immun.* — 2004. — V. 72, N 9. — P. 5253–5261.
 20. *Easterday W. R., Van Ert M. N., Simonson T. S. et al.* Use of single nucleotide polymorphisms in the *plcR* gene for specific identification of *Bacillus anthracis* // *J. Clin. Microbiol.* — 2005. — V. 43, N 4. — P. 1995–1997.
 21. *Патыка Т. И., Патыка Н. В., Патыка В. Ф.* Филогенетические взаимосвязи серологических вариантов *Bacillus thuringiensis* // *Биополимеры и клетка*. — 2009. — Т. 25, № 3. — С. 240–244.
 22. *Лиманська О. Ю., Муртазаева Л. О., Лиманський О. П.* Видоспецифічна детекція збудника сибірки // *Біотехнологія*. — 2012. — Т. 5, № 1. — С. 92–99.
 23. *Helb D., Jones M., Story E. et al.* Rapid Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampin resistance by use of on-demand, near-patient technology // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — V. 48, N 1. — P. 229–237.
 24. *ПЦР «в реальном времени»* / Под общ. ред. Ребрикова Д. В. — М.: Бином. Лаборатория знаний, 2009. — 215 с.
 25. *Qi Y., Patra G., Liang X. et al.* Utilization of the *rpoB* gene as a specific chromosomal marker for real-time PCR detection of *Bacillus anthracis* // *Appl. Environ. Microbiol.* — 2001. — V. 67, N 8. — P. 3720–3727.
 26. *Ko K., Kim J.-M., Kim J.-W. et al.* Identification of *Bacillus anthracis* by *rpoB* sequence analysis and multiplex PCR // *J. Clin. Microbiol.* — 2003. — V. 41, N 7. — P. 2908–2914.
 27. *Лиманская О. Ю., Лиманский А. П.* Маркеры для видоспецифической детекции бацилл группы *Bacillus cereus* // *Журн. микробиол. эпидемиол. иммунобиол.* — 2008. — N 3. — С. 20–26.
 28. *Satterfield B., Kulesh D., Norwood D. et al.* Tentacle Probes™: differentiation of difficult single-nucleotide polymorphisms and deletions by presence or absence of a signal in real-time PCR // *Clin. Chem.* — 2007. — V. 53, N 12. — P. 2042–2050.
 29. *Bavukin S., Lysov Y., Zakhariyev V. et al.* Use of 16S rRNA, 23S rRNA, and *gyrB* gene sequence analysis to determine phylogenetic relationships of *Bacillus cereus* group microorganisms // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — V. 43, N 8. — P. 3711–3730.

ДЕТЕКЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

О. Ю. Лиманская^{1,2}
Л. А. Муртазаева¹
С. Кли³
А. П. Лиманский¹

¹ГУ «Институт микробиологии и иммунологии им. И. И. Мечникова НАМН Украины», Харьков

²Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины» НААН Украины, Харьков

³Институт Роберта Коха, Берлин, Германия

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Точная идентификация бактерий *Bacillus anthracis* остается сложной задачей при дифференциации возбудителя сибирской язвы от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* из-за высокой степени гомологии нуклеотидных последовательностей с представителями группы *Bacillus cereus sensu lato*. Разработаны молекулярно-генетические наборы праймеров и проб для полимеразной цепной реакции в реальном времени с гибридационно-флуоресцентной детекцией для дифференциации бактерий *B. anthracis* от *B. cereus* и *B. thuringiensis*.

Целевой мишенью для праймеров и проб определен фрагмент гена *spp* хромосомной ДНК, характеризующийся гексануклеотидной инсерцией только для изолятов *B. anthracis*. Использование проб в форматах TaqMan и молекулярного маяка позволило с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени надежно дифференцировать бактерии *B. anthracis* от близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Сигнал флуоресценции для шпилечных проб с форматом молекулярного маяка был положительным только для штаммов *B. anthracis*, а для близкородственных видов *B. cereus* и *B. thuringiensis* — отрицательным. При использовании линейных проб TaqMan регистрировали высокоинтенсивный сигнал флуоресценции для всех изолятов *B. anthracis* и сигнал значительно более низкой интенсивности — для *B. cereus* и *B. thuringiensis*. Разработанные подходы могут быть полезными для клинических, эпидемиологических и эпизоотологических исследований.

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, *Bacillus anthracis*, полимеразная цепная реакция в реальном времени.

DETECTION OF CAUSATIVE AGENT OF ANTHRAX BY REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION

O. Yu. Limanskaya^{1,2}
L. A. Murtazaeva¹
S. Klee³
A. P. Limanskii¹

¹Mechnikov Institute of Microbiology and Immunology of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kharkiv

²National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» of National Academy of Agrarian Sciences of Ukraine, Kharkiv

³Robert Koch-Institut, Berlin, Germany

E-mail: olga.limanskaya@mail.ru

Correct identification of *Bacillus anthracis* bacilli remains a challenge for differentiation of the anthrax infectious agent from closely related species *B. cereus* and *B. thuringiensis* because of a high homology level of nucleotide sequences with the *Bacillus cereus sensu lato* instances. In this paper, we have developed molecular genetic sets of primers and probes for real-time polymerase chain reaction with hybridization-fluorescence detection for differentiation of *B. anthracis* bacilli from *B. cereus* and *B. thuringiensis*.

Fragment of *spp* gene of chromosomal DNA characterized by hexanucleotide insertion only for *B. anthracis* isolates was determined as final target for primers and probes. Applying of TaqMan and molecular beacon probes enabled reliable discrimination between *B. anthracis* bacteria and closely related species *B. cereus* and *B. thuringiensis* by real-time polymerase chain reaction. The fluorescence signal for hairpin probes with a molecular beacon format was positive only for *B. anthracis* strains but for closely related *B. cereus* and *B. thuringiensis* species it was negative. Using line TaqMan probes, we registered high-intensity fluorescent signal for all *B. anthracis* isolates and a signal for *B. cereus* and *B. thuringiensis* was much low intensity. The developed approaches could be useful for clinical, epidemiological and epizootiological studies.

Key words: anthrax causative agent, *Bacillus anthracis*, real-time polymerase chain reaction.