

УДК 616.981.51

А.А. АБДИРАСИЛОВА¹, Б.К. КУРМАНОВ¹, А.К. КАСЕНОВА¹, Ш. БАХТЫБЕККЫЗЫ¹,
А.С. ЖУНУСОВА¹, Н.К. МУКАШЕВ¹, Н.П. КАБЫШЕВА¹, С.Т. АБДИКАРИМОВ²,
А.К. ЖАПАРОВА², А.Е. АБИДОВА²

¹Казахский научный центр карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева
Комитета по защите прав потребителей, МНЭ РК, г. Алматы, Казахстан.

²Республиканский центр карантинных и особо опасных инфекций МЗ КР,
г. Бишкек, Кыргызская Республика

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ ТЕСТ-СИСТЕМЫ В ФОРМАТЕ ТРИПЛЕКС ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ СИБИРЕЯЗВЕННОГО МИКРОБА



Абдирасилова А.А.

Для обеспечения биологической безопасности страны необходимо развитие приоритетных направлений биотехнологии, создание совершенных средств обнаружения патогенных биологических агентов. Сибирская язва – зоонозная инфекция, возбудителем которой является *Bacillus anthracis*, продолжает оставаться серьезной проблемой для ветеринарии и здравоохранения Казахстана.

Цель исследования. Конструирование генодиагностической тест-системы для детекции и идентификации возбудителя сибирской язвы в биологическом материале и объектах окружающей среды на основе ПЦР в формате мультиплекс.

Материал и методы. Вирулентные и вакцинные (Ценковского и СТИ) штаммы *B. anthracis*; изоляты, подозрительные на *B. anthracis*; 30 штаммов гетерологичных микроорганизмов. Для характеристики исследуемого материала использовались стандартные микробиологические методы. Для тестирования сконструированной ПЦР системы был использован метод ПЦР в форматах униплекс и мультиплекс с последующим учетом результатов методом гель-электрофореза.

Результаты и обсуждение. Разработана система из трех пар праймеров GBAA-F/R, pag-F/R и sar-F/R для амплификации фрагментов, специфических для сибиреязвенного микроба локусов GBAA_4239 (хромосома), pagA (плазмида pXO1) и sarA (плазмида pXO2), соответственно. На основе разработанных праймеров сконструирована диагностическая тест-система, позволяющая проводить высокоспецифическую детекцию и идентификацию штаммов вида *B. anthracis*. Праймеры разработаны с учетом их использования в формате мультиплекс. Молекулярный вес получаемых ампликонов составляет 452 (ген pagA), 347 (ген sarA) и 240 (ген GBAA_4239) пар нуклеотидов, что позволяет легко их дифференцировать. Подобрана оптимальная для всех трех пар праймеров температура отжига (54°C). Проведено тестирование эффективности, чувствительности и специфичности разработанных праймеров и ПЦР тест-систем на вирулентных и вакцинных штаммах *B. anthracis*, а также на штаммах гетерогенных микроорганизмов. Учет результатов производился по конечной точке методом гель-электрофореза.

Выводы. Сконструирована новая эффективная тест-система для детекции и идентификации штаммов возбудителя сибирской язвы методом ПЦР в форматах униплекс, дуплекс и триплекс. Чувствительность разработанной ПЦР тест-системы составляет 3,9 пг/мкл ДНК *B. anthracis*,

Ключевые слова: возбудитель сибирской язвы, *B. anthracis*, праймеры, мультиплекс ПЦР, тест-система.

Сибирская язва является тяжелым, особо опасным инфекционным заболеванием, поражающим человека и животных. По данным ВОЗ, в мире ежегодно около 20 тысяч человек заражаются этой инфекцией. Заболевание встречается более чем в 40 странах мира. В 2016 году на территории Казахстана зарегистрировано 19 случаев заболевания человека сибирской язвой.

Возбудитель сибирской язвы – грамположительная бактерия *Bacillus anthracis*, способная образовывать капсулу и эндоспоры. Вирулентный профиль сибиреязвенной палочки обусловлен генетическими детерминантами,

расположенными на двух плазмидах pXO1 и pXO2. Среди них можно указать гены *суа*, *lef* и *pagA*, кодирующие компоненты сибиреязвенного токсина (фактор отека, летальный фактор и протективный антиген, соответственно), а также гены группы *SAR*, отвечающие за образование полипептидной капсулы.

Споры *B. anthracis* крайне устойчивы к факторам окружающей среды и могут сохраняться в почве десятки лет [1, 2]. Российские исследователи, используя метод ПЦР с праймерами к генам *pag*, *lef*, *суа*, *sar* и *Ba13*, выделили 2 типичные культуры *B. anthracis* в пробах почвы старого (более

Контакты: Абдирасилова Айгуль Акзамовна, канд. мед. наук, зав. референс-лабораторией Казахского научного центра карантинных и зоонозных инфекций им. М. Айкимбаева, КЗПП МНЭ РК, г. Алматы. Тел.: + 7 701 883 0077, e-mail: aigul.abdirassilova@mail.ru

Contacts: Aigul Akzamovna Abdirassilova, PhD, Head of reference laboratory Aikimbayev's Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection of Ministry of National Economy of the Republic of Kazakhstan, Almaty c., Kazakhstan. Ph.: + 7 701 883 0077, e-mail: aigul.abdirassilova@mail.ru

70 лет) скотомогильника [3]. Такая высокая резистентность спор возбудителя сибирской язвы делает его потенциальным объектом для разработки биологического оружия массового поражения. Биотеррористическая атака в США в 2001 году показала необходимость разработки чувствительного, воспроизводимого, скоростного лабораторного теста для подтверждения диагноза «сибирская язва» у человека.

На данный момент наиболее эффективным, простым и популярным методом диагностики инфекционных заболеваний является метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), отличающийся высокой специфичностью и чувствительностью. При этом гораздо упростить и ускорить процедуру проведения ПЦР анализа позволяет применение готовых наборов – тест-систем.

Целью данного исследования являлось конструирование отечественной генодиагностической тест-системы для детекции и идентификации возбудителя сибирской язвы в биологическом материале и объектах окружающей среды на основе метода ПЦР в формате мультиплекс.

МАТЕРИАЛ

Для тестирования эффективности, чувствительности и специфичности разработанных праймеров и экспериментальной ПЦР тест-системы использовались вирулентные и вакцинные штаммы *B. anthracis*, а также штаммы гетерогенных микроорганизмов (табл. 1).

МЕТОДЫ

Экстракция ДНК проводилась с помощью коммерческих наборов «ДНК-сорб-В» (АмплиСенс, Россия) и «QIAamp-DNA Mini Kit» (Promega, США). Концентрация ДНК измерялась на спектрофотометре «NanoPhotometer P-300» (Implen, Германия).

Дизайн праймеров к подобранным ДНК-мишеням осуществляли с использованием программного обеспечения «MPprimer 1.4». Проверка разработанных праймеров на специфичность к геному *B. anthracis* и отсутствие перекрестной реакции с бактериями других видов осуществлялась с помощью программного обеспечения «BLAST».

Праймеры синтезировались стандартным фосфоамидитным способом на автоматическом синтезаторе ДНК/РНК «H6» (K&ALaborgeraete, Германия), очищались от примесей на колонках «CentriPureN» (emp Biotech GmbH, Германия) и концентрировались на вакуумном концентраторе «CentriVap» (Labconco, США). Стоковые растворы праймеров (100 pmol/ul) разводились до рабочей концентрации 10 pmol/ul и тестировались на специфичность и чувствительность методом ПЦР в форматах униплекс, дуплекс и триплекс.

Полимеразную цепную реакцию выполняли на амплификаторах «Veriti» (Applied Biosystems, США) и «Терцик» (НПО «ДНК-технология», Россия). Учет результатов ПЦР с использованием разработанных праймеров и экспериментальной тест-системы производили путем электрофореза продуктов амплификации в 1,2% агарозном геле. Размер фрагментов определяли с помощью маркеров молекулярного веса «GeneRuler» (Thermo Fisher Scientific, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как показал анализ используемых методов для диагностики сибирской язвы в Казахстане, преимущество по эффективности, скорости получения результата и достоверности имеет метод ПЦР. В настоящее время в республиканских и областных лабораториях здравоохранения и ветеринарии Казахстана для молекулярно-генетических исследований возбудителя сибирской язвы используют тест-системы, произведенные в России. Эти наборы характеризуются небольшим сроком годности (около 0,5 года), высокой стоимостью и отсутствием регистрации в Государственном реестре изделий медицинского назначения Республики Казахстан, вследствие чего не могут в полной мере использоваться в диагностических целях. Также часто возникают сложности со своевременной доставкой этих наборов казахстанскому потребителю.

Для обеспечения биологической безопасности Казахстана необходимо собственное производство диагностических тест-систем, что позволит снизить их стоимость и сделать доступными для лабораторий всех уровней.

Чаще всего в качестве принципиальных мишеней для ПЦР-систем выбирают плазмидные видоспецифичные гены *capA* и *pag*, что определяется решающей ролью капсулы и протективного антигена возбудителя в патогенезе сибирской язвы [8, 9]. Однако в последнее время появились данные о наличии в геномах некоторых штаммов близкородственных бацилл последовательностей, подобных токсинной и капсульной плазмидам сибиреязвенного микроба [10, 11]. Существуют также моно- и бесплазмидные штаммы *B. anthracis*. Вследствие этого оптимальным решением является разработка мультиплексной ПЦР тест-системы для одновременной детекции как минимум трех мишеней, расположенных на трех генетических элементах *B. anthracis*: хромосоме, плазмиде рХО1 и плазмиде рХО2.

Для создания тест-системы нами были сконструированы три пары праймеров (GBAA-F/R, pag-F/R и cap-F/R), обеспечивающие синтез фрагментов генов GBAA_4239 (хромосома), *pagA* (плазмида рХО1) и *capA* (плазмида рХО2). Структура праймеров и размеры ожидаемых ампликонов указаны в таблице 2. Программа амплификации состояла

Таблица 1 – Перечень материалов, использованных для тестирования разработанных праймеров и ПЦР тест-системы

Вид пробы	Описание
Штаммы, полученные из музея живых культур КНЦКЗИ	22 штамма <i>B. anthracis</i> , 4 штамма <i>B. cereus</i> , вакцинный штамм Ценковского, вакцинный штамм СТИ; 30 штаммов гетерологичных микроорганизмов: <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>B. melitensis</i> , <i>B. suis</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>Salmonella spp.</i> , и <i>S. flexneri</i> .
Клинический материал	4 пробы от больных с подозрением на заболевание сибирской язвой
Объекты внешней среды	3 пробы почвы с места забоя КРС

Таблица 2 – Праймеры для детекции видоспецифических генов *B. anthracis*

Ген	Прямой праймер (F)	Обратный праймер (R)	Размер ампликона
pagA	5'-CCGCTGATACAGCAAGATTA-3'	5'-CCGCCTTTCTACCAGATTT-3'	452 п.н.
capA	5'-GTACAACGTACAGAAGCAGTAG-3'	5'-GTTCCCTTAGCACCATAATCC-3'	347 п.н.
GBAA_4239	5'-GAAACCGTCATTTGGTGTATTG-3'	5'-CCTTATTGCTTACCCGCTATC-3'	240 п.н.

из следующих этапов: предварительная денатурация при 95°C в течение 5 мин.; далее следуют 35 циклов, состоящих из стадии денатурации (95°C, 35 сек.), отжига праймеров (54°C, 35 сек.) и элонгации (72°C, 35 сек.); финальная элонгация при 72°C в течение 5 мин.; удержание температуры в пределах 4°C для сохранения продукта.

Общий объем реакционной смеси на одну реакцию, включая разработанные праймеры и образец ДНК, составлял 25 мкл: 12,5 мкл ПЦР-смеси, 1,5 мкл молекулярно чистой воды, 6,0 мкл смеси праймеров (по 1,0 мкл каждого из разработанных праймеров) и 5,0 мкл исследуемой ДНК.

В качестве положительного контроля реакции использовалась ДНК типичного представителя *B. anthracis* – штамма 131, полученного из музея живых культур КНЦКЗИ. В качестве отрицательного контроля использовалась деионизированная вода.

На рисунке 1 представлены результаты ПЦР с использованием разработанных праймеров в формате триплекс.

Как видно из рисунка 1, разработанная система праймеров позволяет выявлять как типичные штаммы *B. anthracis*, так и штаммы, лишенные плазмиды рХО1 (вакцинный штамм Ценковского) или рХО2 (вакцинный штамм СТИ). В то же время перекрестной реакции на ДНК родственного вида, *B. cereus*, не наблюдалось, что говорит о высокой специфичности разработанных праймеров.

Далее был проведен отдельный тест на специфичность разработанных праймеров по отношению к ДНК *B. anthracis*. Для анализа использовалась ДНК типичного штамма *B. anthracis* 131 (положительный контроль), а также ДНК ряда гетерогенных бактерий: *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Francisella tularensis*, *Brucella abortus*, *B. melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* и *Escherichia coli*. Результаты теста приведены на рисунке 2.

Как видно из рисунка 2, тест на специфичность не выявил перекрестной реакции разработанных

праймеров с ДНК гетерогенных видов бактерий, что говорит об их высокой специфичности.

Далее проводился тест на выявление порога чувствительности разработанной тест-системы с использованием ДНК типичного штамма *B. anthracis* 131 в 15-ти разных разведениях: от 0,125 нг/мкл до 7,5 фг/мкл. Результаты теста представлены на рисунке 3.

Как видно из рисунка 3, минимальной концентрацией ДНК, при которой возможно достоверное выявление бактерии *B. anthracis* методом стандартной ПЦР в формате мультиплекс, является 3,9 пг/мкл.

На основе разработанных праймеров создана ПЦР тест-система для детекции и идентификации бактерий вида

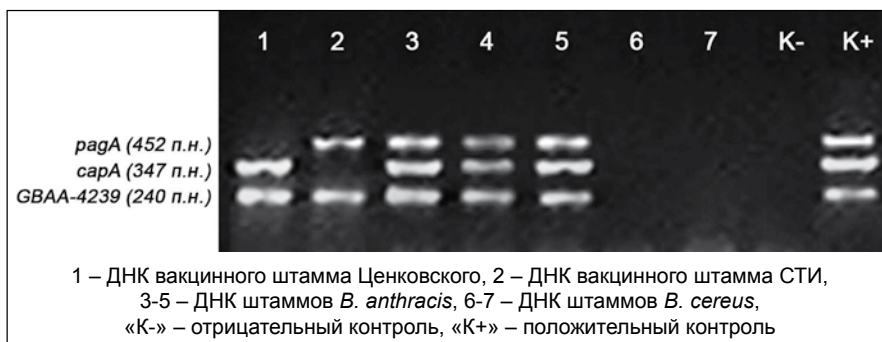


Рисунок 1 – Электрофореграмма с результатами ПЦР в формате триплекс

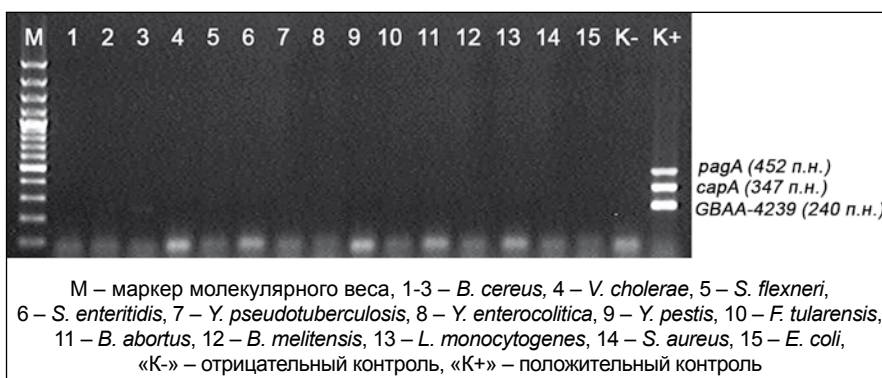


Рисунок 2 – Электрофореграмма с результатами теста на специфичность

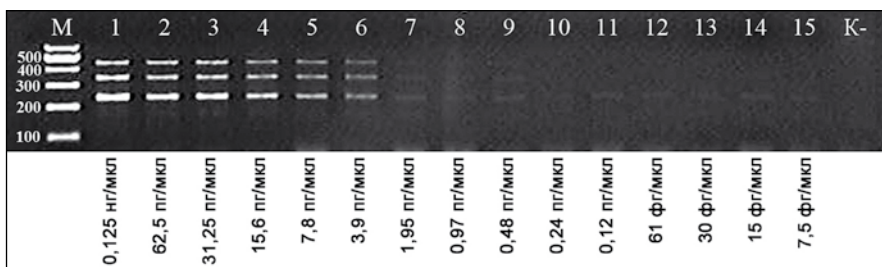


Рисунок 3 – Электрофореграмма с результатами теста на чувствительность

B. anthracis. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 20 mM Трис-HCl (pH 8,9), 50 mM KCl, 30 mM NH₄Cl, 2,5 mM MgCl₂, 3,2% глицерола, 0,08% Nonidet P-40, 0,07% Tween 20, 67 единиц/мл Taq ДНК полимеразы и 200 мкМ нуклеотидов. К реакционной смеси добавлялась смесь праймеров в концентрации 10 пмоль/мкл.

Разработанная тест-система была апробирована на чистых культурах *B. anthracis*, а также на изолятах, выделенных из различных объектов: клинического материала от больного сибирской язвы, выявленного в 2016 г. в Кыргызстане, образцов крови больного человека и проб почвы с мест забоя больных животных. Результаты амплификации представлены на рисунке 4.

Как видно из рисунка 4, разработанная ПЦР тест-система оказалась эффективной при выявлении ДНК возбудителя сибирской язвы в чистой культуре и в клинических образцах. В то же время при изучении образцов крови больного человека и почвы с места забоя больных животных ожидаемых ампликонов обнаружено не было, либо они были слабо выражены (дорожки 6 и 7 на рисунке). Это может быть обусловлено низким титром возбудителя в данных пробах.

ВЫВОДЫ

Сконструирована тест-система для выявления трех мишеней в геноме сибиреязвенного микроба методом стандартной ПЦР в формате мультиплекс с детекцией результатов по конечной точке методом гель-электрофореза. В качестве мишеней использованы гены *GBAA-4239*, *pagA* и *capA*, расположенные на хромосоме, плазмиде pXO1 и плазмиде pXO2, соответственно. В связи с этим тест-система способна выявлять не только типичные штаммы *B. anthracis*, обладающие двумя указанными плазмидами, но и штаммы, лишенные одной или обеих плазмид.

Разработанная ПЦР тест-система обладает высокой специфичностью и чувствительностью (3,9 пг/мкл ДНК *B. anthracis*) и может использоваться для выявления возбудителя сибирской язвы в клиническом материале.

Прозрачность исследования

Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

Декларация о финансовых и других взаимоотношениях

Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1 Айкимбаев А.М., Есмагамбетова А.С., Жолшоринов А.Ж. и др. Почвенные очаги сибирской язвы – потенциально

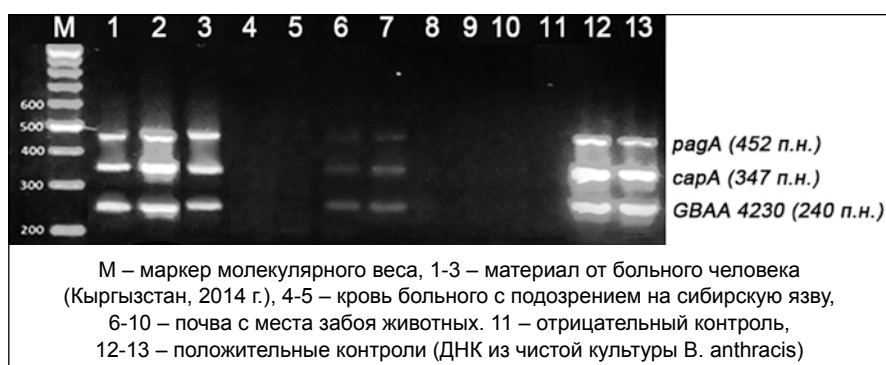


Рисунок 4 – Результаты проверки разработанной ПЦР тест-системы

опасные объекты без срока давности // Окружающая среда и здоровье населения. – 2013. – №2. – С. 39-50

2 Султанов А.А., Горелов Ю.М., Сущих В.Ю., Атшабар Б.Б., Лухнова Л.Ю., Мека-Меченко Т.В., Пазылов Е.К. Методические рекомендации: Почвенные очаги сибирской язвы в Республике Казахстан. Порядок организации и проведения мероприятий по подготовке проб к исследованию. – Алматы: ТОО «КазНИВИ», 2015. – 53 с.

3 Шишкова Н.А., Кравченко Т.Б., Маринин Л.И. и др. Идентификация возбудителя сибирской язвы, выделенного из скотомогильника // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып.110. – С. 53-56

4 Inside America's secretive biolabs investigation reveals hundreds of accidents, safety violations and near misses put people at risk. USA Today, 28 May 2015 Source: USA today. <http://www.usatoday.com/story/news/2015/05/28/biolabs-pathogens-location-incidents/26587505/>.

5 White House releases detailed lab biosafety plan. CIDRAP. <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2015/10/white-house-releases-detailed-lab-biosafety-plan>.

6 Бекенов Ж.Е., Айкимбаев А.М., Лухнова Л.Ю. Проблемы биотехнологических исследований двойного использования // Medicine (Almaty). – 2015. – №11(161). – Р. 67-72

7 The Virginian Pilot [edited] Date: 29 Sep 2016. http://pilotonline.com/news/military/local/the-army-mistakenly-shipped-live-anthrax-to-hampton-roads-gao/article_d45608f3-8b58-5372-89f8-2b5fab1e5e81.html.

8 Тучков И.В., Куличенко А.Н., Еремин С.А. и др. Детекция штаммов сибиреязвенного микроба с использованием полимеразной цепной реакции. В кн.: Генетика, микробиология и совершенствование методов лабораторной диагностики особо опасных инфекций. – Саратов: Издательство Саратовского университета, 1991. – С. 89-90

9 Абрамов Д.Д., Воробьев А.А., Кузнецовский А.В. и др. Разработка и испытания молекулярно-биологической тест-системы для выявления ДНК возбудителя сибирской язвы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Клиническая лабораторная диагностика. – 2011. – №3. – С. 46-50

10 PRO/AN> Bacillus cereus, anthrax-like infection – USA (02): (TX) discussion Archive Number: 20110816.2475). Marston CK, Ibrahim H, Lee P, et al. Anthrax toxin-expressing Bacillus cereus Isolated from an anthrax-like eschar // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11(6)0156987. doi:10.1371/journal.pone.0156987.

11 Цыганкова Е.А., Еременко Е.И., Рязанова А.Г. и др.

Мультиплексная ПЦР-тест система для обнаружения возбудителя сибирской язвы с детекцией результатов в формате «реального времени» // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – Вып. 1. – С. 81-84

12 Supotnitskiy M.V., Borisevich I.V., Klimov V.I., Shevtsov A.N., Lub M.Yu., Tumanov A.A. The role of the Russian and Soviet scientists in the development of anthrax vaccine // Biopreparation (Biopharmaceuticals). – 2015. – No. 2. – P. 45-52.

13 Качественная клиническая практика с основами доказательной медицины. Учебное пособие для системы послевузовского и дополнительного профессионального образования врачей / Под общей редакцией академика РАМН, профессора Р. Г. Оганова. – М.: Силиция-Полиграф, 2011. – 136 с., с приложениями.

REFERENCES

1 Aykimbaev AM, Esmagametova AS, Zholshorinov AZ. et al. Soil pockets Anthrax – a potentially dangerous objects without time limitation. *Okruzhaiushchaya sreda i zdorovie naseleniya = Environment and Public Health*. 2013;2:39-50

2 Sultanov AA, Gorelov YM, Sushikh VY, Atshabar BB, Lukhnova LY, Meca-Mechenko TV, Pazylov EK. *Metodicheskie rekomendacii: Pochvennye ochagi sibirskoi yazvy v Respublike Kazakhstan. Poryadok organizacii i provedeniya meropriyatiy po podgotovke prob k issledovaniyu* [Guidelines: Soil foci of anthrax in the Republic of Kazakhstan. The procedure for organizing and conducting training activities to the study of samples]. Almaty: LLP “KazNIVI”; 2015. P. 53

3 Shishkova NA, Kravchenko TB, Marinin LI. et al. Identification of anthrax isolated from cattle burial. *Problemy osobo opasnykh infekcii = Plague*. 2011;110:53-6 (In Russ.)

4 Inside America's secretive biolabs investigation reveals hundreds of accidents, safety violations and near misses put people at risk. USA Today, 28 May 2015 Source: USA today. Available from: <http://www.usatoday.com/story/news/2015/05/28/biolabs-pathogens-location-incidents/26587505/>.

5 White House releases detailed lab biosafety plan. CIDRAP, Available from: <http://www.cidrap.umn.edu/news-perspective/2015/10/white-house-releases-detailed-lab-biosafety-plan>.

6 Bekenov ZhE, Aykimbaev AM, Lukhnova LY. Problems of dual use biotechnology research. *Medicine (Almaty)*. 2015;11(161):67-72 (In Russ.)

7 The Virginian Pilot [edited] Date: 29 Sep 2016. Available from: http://pilotonline.com/news/military/local/the-army-mistakenly-shipped-live-anthrax-to-hampton-roads-gao/article_d45608f3-8b58-5372-89f8-2b5fab1e5e81.html.

8 Tuchkov IV, Kulichenko AN Eremin SA et al. Strains of anthrax microbe detection using the polymerase chain reaction. In: *Genetika, mikrobiologiya i sovershenstvovanie metodov laboratornoi diagnostiki osobo opasnykh infekcii* [Genetics, Microbiology and improved laboratory methods for diagnosis of particularly dangerous infections]. Saratov: Saratov University Publishing; 1991. P. 89-90

9 Abramov DD, Vorobyev AA, Kuznetsovsky AV. et al. Development and testing of molecular biological test systems for the detection of anthrax DNA by polymerase chain reaction in real time. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Services*. 2011;3:46-50 (In Russ.)

10 PRO/AN> Bacillus cereus, anthrax-like infection – USA (02): (TX) discussion Archive Number: 20110816.2475). Marston CK, Ibrahim H, Lee P, et al. Anthrax toxin-expressing Bacillus cereus Isolated from an anthrax-like eschar. *PLoS ONE*. 2016; 11(6):0156987. doi:10.1371/journal.pone.0156987.

11 Tsygankova EA, Eremenko EI, Ryazanova AG. et al. Multiplex PCR Test system for the detection of anthrax with detektsieyrezultatov in “real time” format. *Problemy osobo opasnykh infekcii = Plague*. 2013;1:81-4 (In Russ.)

12 Supotnitskiy MV, Borisevich IV, Klimov VI, Shevtsov AN, Lub MYu, Tumanov AA. The role of the Russian and Soviet scientists in the development of anthrax vaccine. *Biopreparation (Biopharmaceuticals)*. 2015;2:45-52

13 *Kachestvennaya klinicheskaya praktika s osnovami dokazatelnoi mediciny. Uchebnoe posobie dlya sistemy poslevuzovskogo i dopolnitelnogo professionalnogo obrazovaniya vrachei. Pod obshhei redakciei akademika RAMN, professora R.G. Oganova* [Good clinical practice with the basics of evidence-based medicine. A manual for the system of postgraduate and additional professional education of physicians. Under the general editorship of academician, Professor RG Oganov]. Moscow: Silitseya-Poligraf; 2011. P. 136 (applications.)

ТҰЖЫРЫМ

**А.А. ӘБДІРӘСІЛОВА¹, Б.К. ҚҰРМАНОВ¹,
А.К. ҚАСЕНОВА¹, Ш. БАҚТЫБЕКҚЫЗЫ¹,
А.С. ЖҮНІСОВА¹, Н.К. МҰҚАШЕВ¹, Н.П. ҚАБЫШЕВА¹,
С.Т. ӘБДІКӘРІМОВ², А.К. ЖАПАРОВА², А.Е. ӘБДІОВА²**

¹М. Айқымбаев атындағы Қазақ Карантиндік және

зооноздық инфекциялар ғылыми орталығы,

ҰЭМ Тұтынушылардың құқықтарын қорғау комитеті
Алматы қ., Қазақстан,

²ҚР ДСМ республикалық карантиндік және аса қауіпті
инфекциялар орталығы, Бішкек қ.

КҮЙДІРГІ МИКРОБЫН АНЫҚТАУҒА ЖӘНЕ ИДЕНТИФИКАЦИЯЛАУҒА АРНАЛҒАН ТРИПЛЕКС ФОРМАТЫНДАҒЫ ПТР ТЕСТ-ЖҮЙЕЛЕРІ

Еліміздің биологиялық қауіпсіздігін қамтамасыз ету үшін биотехнологияның басым бағыттарын дамыту және патогенді биологиялық агенттерді анықтаудың жетілген құралдарын құру қажет. Күйдіргі ауруының қоздырғышы Bacillus anthracis болып табылатын зоонозды инфекция, Қазақстандағы денсаулық сақтау мен ветеринария үшін күрделі мәселе болып қала беруде.

Зерттеу мақсаты. Мультиплекс форматында ПТР көмегімен биологиялық материал мен қоршаған орта сынамаларында күйдіргі ауруының қоздырғышын анықтау үшін гендиагностикалық тест-жүйелерді құру.

Материал және әдістері. B. anthracis штаммдары, Ценковский және СТИ түйнеме вакциналық штаммдары, B. anthracis күдікті изолаттары, 30 гетерологиялық микроорганизмдер штамдары. Күйдіргі қоздырғышының ДНК мен нуклеотидтік тізбегі, амплификация өнімдері. Құрастырылған ПТР жүйені сипаттау үшін келесі әдістер қолданылды: униплекс, мультиплекс ПТР, гель-электрофорез, электрофорезді құжаттау жүйесі.

Нәтижелері және талқылауы. Күйдіргі микробының ДНК арнайы учаскелерін амплификациялау үшін келесі праймерлер құрастырылды: рХО1 плазмидасының ДНК арнайы учаскесіне сәйкес раg F/R және рХО2 плазмидасының ДНК арнайы учаскесіне сәйкес сарA F/R. Хромосомалық ДНК учаскесіне сәйкес GBAA F/R праймерлері құрастырылған, бұл ПТР жүйесінің арнайылығын күшейтеді. Осы үш праймерлердің негізінде B. anthracis анықтау және идентификациялау үшін диагностикалық тест-жүйесі құрастырылды. Агарозалық гелде ампликондардың (амплификацияның соңғы өнімнің)

молекулалық салмағы бір-бірінен айтарлықтай жақсы ажырауы және жолақтары анық көрінуі үшін праймерлер 452 ж.н. (pag), 347 ж.н. (cap), 240 ж.н. (GBAA) сәйкес таңдалынды. Тәжірибе жүзінде барлық үш жұп праймерлер үшін оңтайлы күйдіру температурасы (54°C) таңдап алынды. Құрастырылған праймерлер мен ПТР тест-жүйелердің амплификациялық тиімділігін, сезімталдығы мен арнайылығын тексеру үшін *B. anthracis* штамдары, микроорганизмдердің жақын туыс және гетерогенді штамдары таңдалынды. Нәтижелер соңғы нүкте бойынша гель электрофорез әдісі арқылы өңделді.

Қорытынды. Алғаш рет, униплекс, диплекс, триплекс ПТР форматтарында қолдануға болатын отандық тест-жүйелері құрастырылды. Күйдіргі қоздырғышының GBAA4239, capA және pag гендерін анықтау үшін ПТР тест-жүйесі арнайы болып табылды және 0,25 нг/мкл сұйылтылған бастапқы ДНҚ мөлшерін анықтап, жоғары сезімталдылығын көрсетті.

Негізгі сөздер: күйдіргі қоздырғышы, униплекс, мультиплекс ПТР, праймерлер, амплификация.

SUMMARY

A.A. ABDIRASSILOVA¹, B.K. KURMANOV¹,
A.K. KASSENOVA¹, Sh. BAKHTYBEKKYZY¹,
A.S. ZHUNUSOVA¹, N.K. MUKASHEV¹, N.P. KABYSHEVA¹,
S.T. ABDYKARIMOV², A.K. ZHAPAROVA², A.E. ABIDOVA²

¹M. Aikimbayev Kazakh Scientific Center for Quarantine and Zoonotic Diseases, Committee on Consumer Protection, MNE RK, Almaty c., Kazakhstan,

²Republican Centre for Quarantine and Extremely Dangerous Infections, Bishkek c., Kyrgyzstan

POLYMERASE CHAIN REACTION OF A TEST-SYSTEM IN A FORMAT OF TRIPLEX FOR DETECTION AND IDENTIFICATION OF ANTHRACIS MICROBE

In order to ensure the biological safety of the country it is necessary to develop the priority areas of biotechnology, create a sophisticated means of detection of pathogenic biological agents. Anthrax is a zoonotic infection, which causative agent is *Bacillus*

anthracis, keeps being a serious problem for animal and human health in Kazakhstan.

Objective. Construction of gene diagnostics test systems for the detection and identification of the causative agent of anthrax in the biological material and objects of the environment on the basis of PCR in a multiplex format.

Material and methods. Virulent and vaccine (Tsenkovsky and STI) strains of *B. anthracis*; isolates suspicious to *B. anthracis*; 30 heterologous strains of microorganisms.

There were used standard microbiological methods to characterize studied material. In order to test designed PCR test system, the method of PCR was used in the format of multiplex and uniplex followed by results analysis by gel electrophoresis.

Results and discussion. There have been developed a system consisted of three pairs of primers GBAA-F / R, pag-F / R and the cap-F / R to amplify a fragment specific to loci GBAA_4239 (chromosome), pagA (plasmid pXO1) and capA (plasmid pXO2), respectively of anthrax microbe. On the basis of the developed primers there have been designed diagnostic test system that enables highly specific detection and identification of the strains of *B. anthracis*. The Primers are designed with regard to their use in a multiplex format. The molecular weight of the produced amplicons are 452 bp (Pag A gene), 347 bp (CapA) and 240 bp (GBAA_4239), which allow to easily differentiate them. The annealing temperature for all three pairs of primers have been optimized (54°C). There have been carried out testing of the efficiency, sensitivity and specificity of the designed primers and PCR test systems by using virulent and vaccine strains of *B. anthracis*, as well as strains of heterogeneous microorganisms. The record of the results was made based on the endpoint by gel electrophoresis.

Conclusion. It was constructed a new effective test system for the detection and identification of the strains *B. anthracis* by PCR in uniplex, duplex and triplex formats. The sensitivity of the developed PCR test system is 0.25 ng / ml DNA of *B. anthracis*.

Key words: anthrax, *B. anthracis*, primers, a multiplex PCR, test-system.

Для ссылки: Абдирасилова А.А., Курманов Б.К., Касенова А.К., Бахтыбеккызы Ш., Жунусова А.С., Мукашев Н.К., Кабышева Н.П., Абдыкаримов С.Т., Жапарова А.К., Абидова А.Е. Полимеразная цепная реакция тест-системы в формате триплекс для детекции и идентификации сибиреязвенного микроба // *Medicine (Almaty)*. – 2016. – No 12 (174). – P. 68-73

Статья поступила в редакцию 22.11.2016 г.

Статья принята в печать 12.12.2016 г.