

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ПЦР ДЛЯ ЭКСПРЕСС-ИДЕНТИФИКАЦИИ САЛЬМОНЕЛЛ

В.В. Слизень, Е.И. Гудкова, Г.А. Скороход

Белорусский государственный медицинский университет

Актуальность проблемы сальмонеллезов связана с высокими уровнями заболеваемости и сохраняющейся тенденцией к ее росту, трудностями в эпидемиологическом расследовании причин сальмонеллезов, формированием резистентности к противомикробным препаратам, отсутствием эффективной специфической профилактики. Разработка методов экспресс-диагностики сальмонеллезов и методов типирования сальмонелл является одним из важных моментов сдерживания распространения возбудителей [1].

Цель исследования: разработать метод генетической экспресс-идентификации сальмонелл.

Материалы и методы. Разработка праймеров и TaqMan зондов. Из GenBank, NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/> или <http://www.xbase.ac.uk>) были получены сиквенсы гена *invA* для разных серовариантов сальмонелл (код доступа NC_011294.1, GenBank, NCBI *Salmonella typhimurium* (рис.1)).

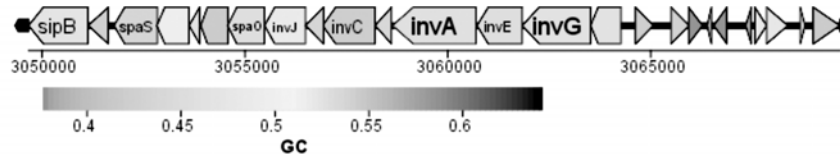


Рисунок 1 – Структура локуса в 20000 п.о. *Salmonella typhimurium*, несущего *invA* ген

С помощью программы Mega 5 проводили выравнивание сиквенсов *invA* гена, выбирали идентичные у всех серовариантов сальмонелл фрагменты, локализующиеся в первой половине гена. В процесс разработки олигонуклеотидов их последовательности генерировали *in silico* с помощью программы <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> или <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/input.htm>, проверку специфичности праймеров и зондов проводили с использованием web-ресурса <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>. Оценку конформации шпилечных структур, образуемых праймерами и зондами, силу их связей и температуру плавления осуществляли с использованием

web-ресурсов <http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Quickfold>, <http://www.atdbio.com/tools/oligo-calculator>. Расчет образования гетеро- и аутодимеров и энергию их связи проводили с использованием программы «OligoAnalyzer» (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>). Место отжига праймеров и зондов проверяли с помощью программы <http://bioinformatics.org/seqext/>.

ПЦР. Экстракцию бактериальной ДНК проводили кипячением (10 минут) одной бактериальной петли 16–20 часовой чистой культуры сальмонелл в 100 мкл 5% Chelex-100 в 1хTAE буфере, после чего центрифугировали при 14000 об./мин в течение 10 минут.

Экстракт ДНК в количестве 10 мкл вносили в 40 мкл мультипраймерной ПЦР-смеси, содержащей из расчета на одну реакцию: а) 10хПЦР буфера – 7 мкл; б) 3 mM MgCl₂; в) раствор нуклеотидов (2 mM) — 7 мкл; г) Taq-полимеразу — 2 ед; д) праймеры прямые и обратные для генов *invA* и *sefA* – по 20 пкмоль каждого; е) зонды, специфичные для *invA* и *sefA* гена, – по 10 пкмоль; ж) присадки, улучшающие ход реакции; з) деионизованную воду – add 40 мкл.

Амплификацию осуществляли с использованием следующего режима: 94 °C — 4 мин, 45 циклов (95 °C — 30 с, 60 °C — 70 с). Детекцию флюоресценции проводили после каждой стадии отжига на каналах FAM и JOE. Верификацию образования ПЦР продуктов осуществляли электрофорезом 14 мкл образцов в 2% агарозном геле с бромидом этидия (0.5 мкг/мл); параметры электрофореза – 200 В, 100 мА, 1 час.

Для проведения ПЦР, позволяющей выявлять сальмонеллы и среди них *S. enteritidis*, были использованы праймеры и зонды, приведенные в таблице 1.

Таблица 1

Использованные праймеры и зонды для идентификации сальмонелл и среди них *S. enteritidis*

Ген	Праймеры и зонды	Размер, п.о.	Признак
SEFA-1	GGCTTCGGTATCTGGTGGTGTG	97	Выявление <i>S. enteritidis</i> по специфическим для них маркерам
SEFA-2	GTCATTAATATTGGCTCCCTGAATA		
Флюоресцирующий зонд SEFA	CCACTGTCCCGTTCGTTGATGGACA		
Inv-1	TGTCGTCATTCCAATTACCTACC	288 п.о.	Выявление специфического маркера для рода сальмонелл
Inv-2	ACGGTGACAATAGAGAAGACAAC		
Флюоресцирующий зонд INVA	TCTGGTTGATTTCCCTGATCGCA		

Результаты и их обсуждение. В качестве генетических маркеров сальмонелл могут выступать различные гены. Ряд исследователей используют метод идентификации *S. enteritidis* по их генетическому маркеру — гену *srpA*, локализованному на большой плазмиде вирулентности, имеющейся у 80% изолятов сальмонелл. [2, 3]. Опубликованы несколько сообщений о применении метода ПЦР для выявления сальмонелл по гену *invA*, необходимому для инвазии [4, 5]. Ряд исследователей использовали для идентификации сальмонелл видоспецифический фрагмент гена *fimA*, кодирующий основную субъединицу фимбрий, который присутствует у всех представителей рода сальмонелл и даже у не имеющих жгутиков представителей, таких как *S. pullorum* [6]. Ряд исследователей используют детекцию гена *sefA* для идентификации сероваров: *S. enteritidis*, *S. pullorum* и *S. gallinarum* [6].

В связи с тем, что специфичность ПЦР реакции зависит от свойств используемых праймеров и зондов, для дизайна зондов и праймеров для *invA* и *sefA* гена были разработаны следующие критерии:

А) Для праймеров. Температура плавления (T_m) у обоих праймеров должна быть идентичной и составлять 58–60 °C, при этом температура плавления зонда должна быть на 5 – 10 °C выше, чем праймеров. Содержание G+C должно варьировать в пределах 30–80%. Более высокое содержание G+C требует использование присадок (глицерола, ДМСО, 7-деаза-ГТФ, бетаина, трегалозы, твина, бычьего сывороточного альбумина), снижающих температуру плавления. В праймерах не должно быть более четырех повторяющихся подряд однотипных нуклеотидов. Общее количество остатков гуанина и цитозина в пяти последних нуклеотидах на 3' конце праймера не должно превышать 2.

На 3' конце предпочтительно располагать аденин, что позволяет образуемым димерам легко разрушаться. Максимальный размер образуемого в ПЦР ампликона должен быть не более 400 п.о., при этом идеальный размер составляет 50 — 150 оснований.

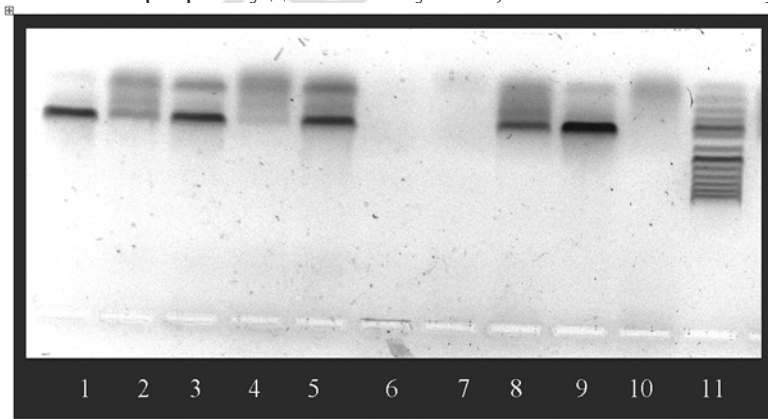
В) Для зондов. В зонде не должно содержаться тандема из четырех или более однотипных нуклеотидов, содержание GC должно варьировать в пределах 30–80%, при этом должно быть больше гуанина, чем цитозина. Зонд не должен заканчиваться на 5' конце гуанином, который может вызывать гашение флюоресценции FAM. В случае образования вторичной шпильки на 3' конце, рассчитанная энергия внутренних связей ее не должна превышать «-2ккал», в случае образования шпильки внутри олигонуклеотида – не более «-3 ккал». В случае образования аутодимеров, их энергия взаимодействия не должна превышать на 3' конце – «- 5ккал», внутри – «-6 ккал». Рассчитанная энергия взаимодействия гетеродимеров по 3' концам должна быть не более «-5ккал», внутри — не более «-6 ккал».

В) Для реакционной смеси. В реакционной ПЦР-смеси концентрация MgCl₂ должна быть 4–7 мМ (в среднем — 5,5 мМ), концентрация нуклеотидов — 200 мМ каждого. Оптимальная концентрация пробы — 50–200 нМ, концентрация праймеров 100–900 нМ. Праймер, амплифицирующий цепь, к которой приваривается зонд, должен быть взят в концентрации в два раза большей, чем другой праймер.

Использование этих критериев позволяет разработать праймеры и зонды, обеспечивающие высокие уровни специфической флюоресценции.

Оценку возможности выявления сальмонелл по *invA* гену, а *S. enteritidis* по *sefA* гену осуществляли сначала в ПЦР, а потом в ПЦР в реальном времени.

В процессе постановки мультиплексной ПЦР-реакции с применением праймеров, специфичных для генов *invA* и *sefA*, образуются различные профили фрагментов, в зависимости от сероварианта сальмонелл. В случае присутствия в образце *S. enteritidis* образуются два фрагмента размером 100 и 288 п.о. Если в пробе присутствуют сальмонеллы других серовариантов, то образуется один ампликон, размером 288 п.о., в случае присутствия генетического материала *E. coli* или *S. aureus* ПЦР-продукты не выявляются (рис. 2). Сальмонеллы различных серовариантов – *S. derby*; *S. tythimurium*, *S. infantis*, *S. agama*, *S. london*, *S. brandenburg*, *S. virchow*, *S. enteritidis* – образуют ампликоны размером 288 п.о, что позволяет использовать разработанные праймеры для специфической детекции сальмонелл по маркерному для них гену *invA*, а *S. enteritidis* по гену *sefA*.

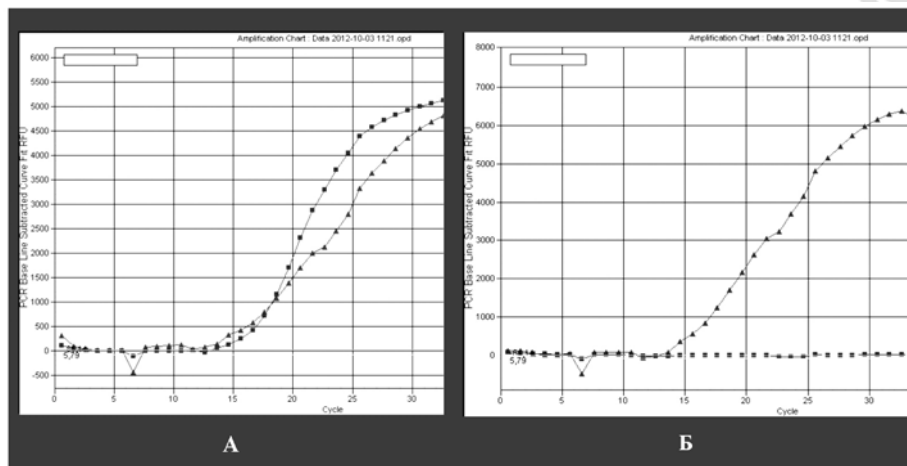


1, 10 – *S. tythimurium*, 2,3,4,5 – *S. enteritidis*, 6 – *E. coli*, 7 – *S. aureus*, 9 – *S. london*,
11 – маркер молекулярного веса ДНК 50 bp

Рисунок 2. Результаты амплификации *sefA* и *invA* гена. В положительных случаях образуются ампликоны 100 п.о. и 288 п.о. соответственно

В последние годы в диагностическую практику внедряются молекулярно-биологические методы диагностики, в частности полимеразная цепная реакция в реальном времени, которая существенно повышает чувствительность исследования и снижает время детекции возбудителя, в связи с отсутствием стадии электрофореза [4–6]. Нами была оценена способность разработанных флюоресцирующих зондов к *invA* и *sefA* генам дискриминировать *S. enteritidis* среди остальных серовариантов сальмонелл. В процессе проведения ПЦР в реальном времени в случае присутствия

в пробе *S. enteritidis*, флюоресценция выше пороговой отмечается на двух каналах FAM и JOE, при этом формирующие кривые флюоресценции имеют специфическую форму, уровни флюоресценции достигают порогового уровня на 15 – 20 цикле и регистрируемая конечная флюоресценция на 35 цикле составляет 4000–6000 RFU (рис. 3 А). В случае присутствия сальмонелл других серовариантов (*S. derby*; *S. tythimurium*, *S. infantis*, *S. agama*, *S. london*, *S. brandenburg*, *S. virchow*, *S. enteritidis*), флюоресценция регистрируется только на канале FAM, при этом флюоресценция на канале JOE ниже пороговой (рис. 3Б). Контроли, которые не содержат ДНК, либо содержат ДНК иных микроорганизмов, чем сальмонеллы, характеризуются отсутствием флюоресценции выше пороговой на обоих каналах.



- ▲—▲—▲—▲— Флюоресценция на канале FAM, специфичная для всех сальмонелл
- Флюоресценция на канале JOE, специфичная для *S. enteritidis*
- А – Профиль флюоресценции *S. enteritidis* (сигналы на FAM и JOE каналах)
- Б – Профиль флюоресценции других серовариантов (сигнал только на FAM канале)

Рисунок 3 – Результаты идентификации сальмонелл с использованием *invA* и *sefA* генов в качестве маркеров сальмонелл и *S. enteritidis* соответственно

Таким образом, в данной работе показана возможность использования праймеров и флюоресцирующих зондов к генам *invA* и *sefA* в родовой идентификации сальмонелл и в выявлении среди них *S. enterica* сероварианта *enteritidis*, на долю которого приходится от 80 до 90% сальмонеллезов, регистрируемых в РБ. В дальнейших исследованиях с использованием присадок будут стабилизированы параметры флюоресценции, оценено их влияние на уровни и кривые флюоресценции. Также в дальнейших исследованиях будет оценена специфичность и чувствительность разработанного метода.

Выражаем искреннюю благодарность Левшиной Н.Н. и Глаз О.Ч. за предоставленные культуры сальмонелл.

Литература.

1. Токарев В.А., Гудкова Е.И., Адарченко А.А. Варианты мониторинга госпитальных штаммов ВБИ, сальмонеллезной этиологии // Внутрибольничные инфекции – проблемы эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики : Тез. докл. 2 Рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием, М., 1999, с. 236-237.
2. Multiplex PCR for Distinguishing the Most Common Phase-1 Flagellar Antigens of Salmonella spp.// S. Herrera-Leo, J.R. McQuiston, M. A. Usera// J. Clin. Microbiol. 2004. Vol. 42, No. 6. P. 2581–2586
3. Hoorfar J., Ahrens P., Radstrom P. "Automated 5' Nuclease PCR Assay for Identification of Salmonella enterica// J.Clin. Microbiol. – 2000. - Vol. 38, No. 9. - P. 3429–3435
4. Multiplex PCR-Based Method for Identification of Common Clinical Serotypes of Salmonella enterica subsp. Enterica/ Seonghan Kim, Jonathan G. Frye, Jinxin Hu ea.// J. Clin. Microb. – 2006. - P. 3608–3615.
5. Detection of Salmonella spp. in fecal specimens by use of real-time polymerase chain reaction assay/ R.Knutsson, H. Grage, J. Hoorfar e.a. // Am. J. Vet. Res. – 2002 – Vol. 63. - P.1265–1268.
6. Diagnostic Real-Time PCR for Detection of Salmonella in Food / B. Malorny, E. Paccassoni, P. Fach e.a.// Appl. Environm. Microbiol. – 2004. - Vol. 70, No. 12. - P. 7046–7052.

APPROACH FOR RAPID QPCR IDENTIFICATION OF *SALMONELLA SPP.*

V.V. Slizen, E.I. Gudkova, G.A. Skarakhod

The development of methods for rapid diagnosis and typing of *Salmonella spp.* is one of the approaches for controlling the spread of these pathogens. The aim of the study is to improve express identification of *Salmonella* using qPCR approach.

We have evaluated the ability of designed primers and fluorescent probes, specific to *invA* and *sefA* genes, to discriminate *Salmonella enteritidis* from other *Salmonella* isolates. In case of presence of *S. enteritidis* in samples two (FAM and JOE) curves of fluorescent signals are simultaneously generated. In case of other serological variants presence (*S. derby*; *S. tythimurium*, *S. infantis*, *S. agama*, *S. london*, *S. brandenburg*, *S. virchow*, *S. enteritidis*) fluorescence is detected only on FAM channel meanwhile control samples (with no DNA or with DNA of other genera of microorganisms) are characterized by the absence of fluorescence on both channels. In case of difficulties in fluorescent signals interpretation electrophoresis of PCR products can be undertaken. Presence of both 100 and 288 bp DNA fragments confirms the *S. enteritidis* occurrence in the sample whereas amplicons with the 100 bp size are specific for *Salmonella spp.* other than *enteritidis*. The method of *Salmonella enteritidis* identification on the basis of *invA* and *sefA* genes detection can be a helpful tool for express-diagnosis of *Salmonella enteritidis* gastroenteritis comprising 80–90% of salmonellosis in Republic of Belarus.