

**РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И
ИДЕНТИФИКАЦИИ БАКТЕРИЙ *Y. ENTEROCOLITICA*, *SALMONELLA*
SPP., ТЕРМОФИЛЬНЫХ *CAMPYLOBACTER***

Носова Е.С., Титов Л.П., Ключко Н.Л., Левшина Н.Н.

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии, УЗ ГДИКБ, УЗ МГЦГиЭ, г.

Минск, Республика Беларусь

Резюме: Разработана мультиплексная ПЦР (мПЦР) для качественного определения ДНК *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Y. enterocolitica* с детекцией методом горизонтального электрофореза в агарозном геле.

Основой являются праймеры к генам, кодирующим факторы патогенности наиболее значимых возбудителей острых кишечных инфекций бактериальной этиологии.

Ключевые слова: мультиплексная ПЦР, молекулярная диагностика, бактериальные кишечные инфекции, идентификация энтеробактерий

Summary: A multiplex PCR assay for the simultaneous detection, in one tube, of *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Y. enterocolitica* using species-specific primers has been developed. The mPCR employed the *Salmonella spp.* specific primer omp, *Campylobacter spp.* specific primer 16S, *Y. enterocolitica* specific primer Yst .

Keywords: multilex PCR, molecular diagnostic, bacterial intestinal infections, identification enterobacteriaceae

Введение. Уровень заболеваемости острыми кишечными инфекциями (ОКИ) в стране остается высоким и сохраняет одно из ведущих мест среди инфекционной заболеваемости населения [1, 2]. В этиологической структуре бактериальных диарей преобладают энтеробактерии (*Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, диареегенные *E. coli*) и *Campylobacter spp.* [3-5]. Диагностика с использованием культурального метода требует длительности исследований и осложняется присутствием труднокультивируемых форм бактерий, требовательностью возбудителей ОКИ к температурному режиму и питательным свойствам сред [6, 7]. Мультиплексная ПЦР является реакцией, при которой используют более одной пары олигонуклеотидов для амплификации нескольких ДНК-матриц и позволяет экономить время и реактивы [8-11]. Метод расширяет возможности диагностики по сравнению с бактериологическими методами и обычной ПЦР, так как позволяет получать результаты в течение нескольких часов, используя клинический материал без предварительного этапа культивирования.

Материалы и методы. В работе использованы культуры и образцы ДНК клинических и референтных штаммов (*Y. enterocolitica*, *Salmonella spp.*, *C. jejuni*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *Y. pseudotuberculosis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, *Enterobacter*). Для выделения ДНК использовали 12-ти часовые культуры, предварительно стандартизированные согласно стандарту мутности, равному 4 единицам МакФарланда, что соответствует $12,6 \times 10^8$ КОЕ/мл. Экстракцию бактериальной ДНК проводили с использованием набора «ДНК-сорбБ» (АмплиСенс), в соответствии с инструкцией предлагаемой производителем.

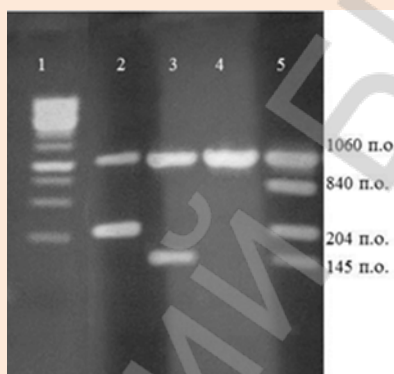
На основании анализа представленных в компьютерной базе данных GenBank нуклеотидных последовательностей были разработаны праймеры для амплификации наиболее консервативных участков выбранных для исследования генов *Salmonella spp.*, *Y. enterocolitica*, *Campylobacter spp.* На

первом этапе работы были разработаны праймеры для экспресс-идентификации ДНК нетифоидных *Salmonella spp.* по наличию гена *omp*, кодирующий белок наружной мембраны (фланкирующие фрагмент размером 204 п.о. гена), *Y. enterocolitica* по наличию гена *Yst*, кодирующего термостабильный энтеротоксин (фланкирующие фрагмент размером 145 п.о.), *Campylobacter spp.* (на основе нуклеотидной последовательности фрагмента гена *16S rРНК* для родовой идентификации, 840 п.о.).

Результаты и обсуждение. Эффективность и специфичность метода ПЦР зависит от универсальности подобранных праймеров, температурно-временного режима, буферного состава реакционной смеси. При подборе оптимальных условий амплификации с целью исключения формирования димеров праймеров был подобран состав праймер-смеси. В состав были дополнительно введены универсальные олигонуклеотиды для амплификации фрагмента размером 1026 п.о. внутреннего позитивного контроля (ВПК) [9]. ВПК показывает, насколько эффективно произошло выделение ДНК в каждой конкретной пробирке, а так же о присутствии ингибиторов ПЦР в реакционной смеси. Для амплификации всех фрагментов с равной эффективностью концентрации 4-х пар праймеров оптимизировали [8, 9]. Важным условием оптимизации мультиплексной ПЦР является соотношение праймеров, поскольку присутствие в смеси более чем одной пары увеличивает возможность амплификации неспецифических продуктов и снижает чувствительность реакции в связи с конкуренцией за компоненты реакционной смеси при синтезе нескольких ампликонов. Для того чтобы избежать ингибирования синтеза ампликонов при наличии ДНК исследуемых групп микроорганизмов была подобрана пропорция праймеров достаточная для синтеза всех ампликонов. Праймеры на ВПК, иерсинии, сальмонеллы и кампилобактерии должны добавляться в реакционную смесь в соотношении 0,5:0,5:1:1 (5 пмоль/мкл).

Чувствительность ПЦР находится в большой зависимости от концентрации $MgCl_2$ и ПЦР-буфера. Изменения в буфере для ПЦР вызывают качественное или количественное изменение выхода ампликонов [10, 11]. Разница в длине амплифицируемых фрагментов будет способствовать амплификации более коротких последовательностей в ущерб более длинным. При отработке параметров ПЦР было уделено внимание определению оптимального времени синтеза для амплификации продуктов разных размеров 145 п.о. (*Yst*), 204 п.о. (*omp*), 840 п.о. (*Campy*), 1026 п.о. (ВПК). Наиболее стабильные профили амплификации были получены с применением полимеразы для мультиплексной ПЦР (MaximaHotStart Taq-полимеразы). Амплификацию специфических ПЦР продуктов проводили в реакционной смеси, состоящей из: 10x ПЦР буфера- 2,0 мкл, дНТФ - 0,5 мкл,

праймер-смеси - 1,0 мкл, Taq ДНК полимеразы - 0,5 мкл, ДНК - 1 мкл. В процессе тестирования оптимальных параметров времени и температур была выбрана универсальная программа амплификации (96°C – 5 мин, (95°C – 40 с, 57°C – 40 с, 72°C – 40 с) – 25 циклов, 72°C – 10 мин. При проведении ПЦР с ДНК *Salmonella* были выявлены специфичные фрагменты генов omp и 16S (размерами 240 п.о. и 1026 п.о., соответственно), с ДНК *Yersinia* – фрагменты генов yst и 16S (размерами 145 п.о. и 1026 п.о., соответственно), с ДНК *Campylobacter* – фрагменты генов camp и 16S (размерами 840 п.о. и 1026 п.о., соответственно) (рисунок 1).



Дорожки: 1 – маркер молекулярного веса ДНК GeneRuler 1kb, 2 – ДНК *Salmonella enteritidis* биовар А со смесью праймеров (yts:omp:campy:ВПК), 3 – ДНК *Y. enterocolitica*, 4 – ДНК *E. coli*, 5 – положительный контроль

Рисунок 1 – Результаты мультиплексной ПЦР для идентификации *Salmonella*, *Campylobacter*, *Yersinia*

У представителя *E. coli* амплифицировался один фрагмент размеров 1026 п.о. Внутренний контроль ПЦР, который используется для контроля выделения ДНК, облегчает учет отрицательных результатов.

Чувствительность мПЦР определяли как минимально детектируемое количество клеток выделенных из чистой культуры бактерий и фекалий – смеси с высоким количеством посторонних клеток. ДНК экстрагировали из серийных разведений убывающей концентрации (10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 КОЕ/мл) чистых культур *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*. При использовании праймеров специфические фрагменты ДНК определялись в образцах ДНК выделенной из чистых культур сальмонелл, иерсиний и кампилобактер, полученные из концентрации 10^2 – 10^6 КОЕ/мл.

Фекалии являются сложным материалом для молекулярно-генетической диагностики, так как представляют гетерогенную популяцию микроорганизмов, содержат промежуточные продукты метаболизма, соли желчных кислот, сложные полисахариды и жиры, а при патологических состояниях – кровь, гной и слизь, что являются ингибиторами ПЦР. ДНК, выделенная из фекалий, может содержать примеси ингибиторов, заметно

снижающих эффективность реакции, а в некоторых случаях приводящих к отсутствию специфических ампликонов даже при наличии искомого возбудителя. При исследовании ДНК, выделенных из контаминированных проб фекалий бактериями *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica* чувствительность мПЦР была меньше, по сравнению с ДНК, выделенной из чистых культур. В реакции с ДНК, выделенной из фекалий, обнаруживалось присутствие бактерий 10^3 - 10^6 для *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*. Согласно результатам исследования с помощью мПЦР в фекалиях при одновременном присутствии посторонних клеток возможно идентифицировать наличие от 10^3 *C. jejuni*, *S. enteritidis*, *Y. enterocolitica*. Аналитическая чувствительность мПЦР составила в количественном выражении – 10^3 геномных эквивалентов в 1 мл тестируемого образца.

Специфичность мПЦР была проверена при тестировании ДНК бактерий близкродственных видов представителей нормальной микрофлоры и других возбудителей кишечных инфекций – *K. pneumonia*, *P. vulgaris*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *H. pylori*, *Streptococcus*, *Micrococcus*. Ложно-положительные результаты не были зарегистрированы. У представителей исследованных видов амплифицировался фрагмент размеров 1062 п.н. внутреннего позитивного контроля.

Выводы. Применение метода ПЦР делает возможность выявления в исследуемом материале тех бактерий, учет которых затруднен из-за сложности или невозможности их культивирования методами классической бактериологии. Применение метода мПЦР позволяет уточнить вклад патогенных бактерий в этиологию кишечных инфекций у детей и взрослых. ПЦР может использоваться для скрининговой детекции бактериальных возбудителей ОКИ в лабораторной диагностике.

Литература

1. The changing panorama of bacterial enteric infections / Stein-Zamir C. [et al.] // *Epidemiol. Infect.* – 2009. – Vol.137. – P. 1531–1537.
2. Causative pathogens of severe diarrhea in children / Ismaeel A.Y. [et al.] // *Saudi Med. J.* – 2002. – Vol. 23. – P. 1064.
3. Abubakar I. A systematic review of the clinical, public health and cost-effectiveness of rapid diagnostic tests for the detection and identification of bacterial intestinal pathogens in faeces and food // *Health Technology Assessment.* – 2007. – Vol. 11. № 36.
4. Stein-Zamir C. The changing panorama of bacterial enteric infections // *Epidemiol. Infect.* – 2009. – Vol. 137. – P. 1531–1537.
5. Thielman N. Clinical practice: acute infectious diarrhea // *N. Engl. J. Med.* – 2004. – Vol. 350. – P. 38–47.

6. Multiplex PCR for direct identification of *Campylobacter* spp. in human and chicken stools / A.A. Amri [et al.] // *Journal of Medical Microbiology*. – 2007 – Vol. 56. – P. 1350–1355.
7. Molecular diagnostics of medically important bacterial infections / B.C. Millar [et al.] // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2006. – Vol. 9. – P. 21–40.
8. Persson, S. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples / S. Persson, K. Olsen // *Journal of Medical Microbiology*. – 2005. – Vol. 54. – P. 1043–1047.
9. Gomez-Duarte O. Detection of *E. coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio cholerae*, and *Campylobacter* spp. enteropathogens by three-reaction multiplex PCR // *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* – 2009. – Vol. 63. – P. 1–9.
10. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol / O. Henegariu [et al.] // *Biotechniques*. – 1997. – Vol. 23. – P. 504-511.
11. Edwards, M. Multiplex PCR: advantages, development and applications / Edwards M. and R. Gibbs // *PCR Methods and Applications*. – 1994. – Vol. 3. – P. S65-S75.