

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

УДК 616.98:579.852.11

А.С. Низкородова^{1,2}, Э.Р. Мальцева², Ж.А. Бердыгулова², Д.А. Найзабаева², С.А. Куатбекова²,
А.В. Жигайлов^{1,2}, Н. Абдолла^{1,2}, А.С. Машжан², И.А. Ахметоллаев², Ю.А. Скиба², С.М. Мамадалиев²

Детекция *Bacillus anthracis* по генам профага lambda_Ba03 посредством ПЦР в реальном времени

¹РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина», Алма-Ата, Республика Казахстан;
²Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии», Алма-Ата, Республика Казахстан

Цель исследования – разработка набора праймеров и флуоресцентных зондов для детекции двух хромосомных мишеней *Bacillus anthracis* методом ПЦР в реальном времени на основе генов профага lambda_Ba03. **Материалы и методы.** При BLAST-анализе хромосомной ДНК *B. anthracis* в качестве мишеней определены два гена профага lambdaBa03: BA_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642) и BA_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278). Разработанные праймеры и флуоресцентные гидролизующие пробы TaqMan для одновременной детекции хромосомной ДНК *B. anthracis* по двум указанным генам проверены в реакциях ПЦР в реальном времени на чувствительность и специфичность. **Результаты и обсуждение.** Проведенные исследования на образцах хромосомной ДНК близкородственных бактерий (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*) показали 100 % специфичность разработанных сетов праймеров/зондов. Чувствительность разработанного мультиплексного набора, исследованная на образцах ДНК вакцинного штамма м55-ВНИИВВиМ и архивных образцах ДНК *B. anthracis*, составила 100 фг бактериальной ДНК, что в пересчете определяет предел чувствительности в 16,72 бактериального генома на реакцию. Разработанный мультиплексный набор позволяет использовать его как отдельный инструмент для исследовательских лабораторий, изучающих сибирскую язву.

Ключевые слова: *Bacillus anthracis*, ПЦР в реальном времени, lambdaBA_5358, lambdaBA_5361, сибирская язва.

Корреспондирующий автор: Низкородова Анна Сергеевна, e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz.

Для цитирования: Низкородова А.С., Мальцева Э.Р., Бердыгулова Ж.А., Найзабаева Д.А., Куатбекова С.А., Жигайлов А.В., Абдолла Н., Машжан А.С., Ахметоллаев И.А., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Детекция *Bacillus anthracis* по генам профага lambda_Ba03 посредством ПЦР в реальном времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2022; 3:170–172. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

Поступила 08.04.2022. Отправлена на доработку 16.05.2022. Принята к публ. 15.07.2022.

A.S. Nizkorodova^{1,2}, E.R. Mal'tseva², Zh.A. Berdygulova², D.A. Naizabaeva², S.A. Kuatbekova²,
A.V. Zhigailov^{1,2}, N. Abdolla^{1,2}, A.S. Mashzhan², I.A. Akhmetollaev², Yu.A. Skiba², S.M. Mamadaliev²

Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* by Lambda_Ba03 Prophage Genes

¹Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin, Almaty, Republic of Kazakhstan;

²Almaty Branch of the National Center for Biotechnology, Almaty, Republic of Kazakhstan

Abstract. The aim of the study was to develop a set of primers and fluorescent probes for the detection of two chromosomal targets of *Bacillus anthracis* using real-time PCR based on the lambda_Ba03 prophage genes. **Materials and methods.** BLAST analysis of *B. anthracis* chromosomal DNA identified two target genes in the region of lambdaBa03 prophage, BA_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642) and BA_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278). The designed primers and fluorescent hydrolyzable TaqMan probes for simultaneous detection of *B. anthracis* chromosomal DNA by two stated genes were tested in qPCR for sensitivity and specificity. **Results and discussion.** Studies performed on chromosomal DNA samples of closely related bacteria (*B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*) have shown 100 % specificity of the developed sets of primers/probes. The sensitivity of the devised multiplex kit, tested on DNA samples of the m55-VNIIVViM vaccine strain and archival DNA samples of *B. anthracis*, reached 100 fg of bacterial DNA, which sets the limit of sensitivity at 17 genomes per reaction. The developed multiplex kit can be used as a separate tool for research laboratories studying anthrax.

Key words: *Bacillus anthracis*, real-time PCR, lambdaBA_5358, lambdaBA_5361, anthrax.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Funding: The study was carried out within the framework of the program BR10764975 of the Ministry of Agriculture of the Republic of Kazakhstan.

Corresponding author: Anna S. Nizkorodova, e-mail: a.nizkorodova@imbb.org.kz.

Citation: Nizkorodova A.S., Mal'tseva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabaeva D.A., Kuatbekova S.A., Zhigailov A.V., Abdolla N., Mashzhan A.S., Akhmetollaev I.A., Skiba Yu.A., Mamadaliev S.M. Real-Time PCR Detection of *Bacillus anthracis* by Lambda_Ba03 Prophage Genes. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 3:170–172. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-3-170-172

Received 08.04.2022. Revised 16.05.2022. Accepted 15.07.2022.

Nizkorodova A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1597-7207>
 Mal'tseva E.R., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9198-695X>
 Berdygulova Zh.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0379-2472>
 Naizabaeva D.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0606-4289>
 Kuatbekova S.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1091-0150>
 Zhigailov A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9646-033X>

Abdolla N., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4769-7824>
 Mashzhan A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9516-5566>
 Akhmetollaev I.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6219-4002>
 Skiba Yu.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4895-1473>
 Mamadaliev S.M., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7767-0251>

Возбудителем сибирской язвы является грам-положительная спорообразующая инкапсулированная бактерия *Bacillus anthracis*, характеризующаяся тем, что ее генетический материал, помимо хромосомы, включает две вирулентные плазмиды: рХО1 и рХО2 [1]. Эти плазмиды несут гены токсинов [2] и гены, отвечающие за синтез, деградацию и регуляцию капсулы. Последняя обладает антифагоцитарной активностью, препятствует фагоцитозу бактерий и способствует их фиксации на клетках хозяина [3].

Основной проблемой при разработке чувствительной и специфичной тест-системы является высокое сходство *B. anthracis* с *B. cereus* и *B. thuringiensis*; некоторые исследователи рассматривают их как изолированные виды из-за высокого генетического подобия [4]. Предлагаемые в настоящее время системы ПЦР для обнаружения *B. anthracis* основаны в основном на обнаружении мишеней, расположенных на мегаплазмидах рХО1 и рХО2. Такие тест-системы имеют высокую чувствительность; тем не менее существует также необходимость в одновременном обнаружении хромосомного маркера. Это связано с тем, что некоторые изоляты *B. anthracis* не содержат плазмид, а некоторые изоляты *B. cereus* и *B. thuringiensis* содержат рХО1 [5] или рХО2 [6]. В настоящее время предложен ряд хромосомных мишеней, но большинство из них не являются уникальными для *B. anthracis* [7].

Цель исследования – предложить новый вариант хромосомного маркера для *B. anthracis*, основанный на одновременном обнаружении двух генов-мишеней, уникальных для *B. anthracis*.

Материалы и методы

Штаммы *B. cereus* и *B. subtilis* получены у фирмы Liofilchem (Италия), *B. thuringiensis* – из Республиканской коллекции микроорганизмов (Астана, Казахстан), *B. clausii* – из медицинского препарата «Энтерожермина» («Санофи С.П.А.», Италия). Вакцинный штамм 55-ВНИИВВиМ приобретен в виде препарата «Вакцина против сибирской язвы животных из штамма 55-ВНИИВВиМ жидкая» (BIOTRON GROUP, Казахстан). *B. cereus*, *B. thuringiensis* и *B. subtilis* получены в виде вегетативных клеток, *B. clausii* и 55-ВНИИВВиМ – в виде спор. Все штаммы высевались на чашки со стерильной агаризованной средой LB без антибиотиков в боксе биобезопасности (класс II). Чашки культивировали при 37 °С 16 часов. Образцы ДНК *B. anthracis* получены из «Национального центра биотехнологии» (РГП «НЦБ») [8]. Все образцы ДНК, использованные в исследовании, предварительно протестированы путем амплификации фрагмента 16S рДНК

(универсальные праймеры 784F и 926R [9]) для подтверждения наличия бактериальной ДНК.

Выделение препаратов бактериальной ДНК проводили стандартно методом фенол-хлороформной экстракции согласно [10]. Определение количества нуклеиновых кислот проводили измерением ультрафиолетового поглощения на спектрофотометре NanoDrope (Thermo) при длине волны 260 нм.

Праймеры и флуоресцентные зонды синтезировали в лаборатории органического синтеза РГП «НЦБ». Праймеры и зонд для определения гена *lambdaBA_5361* имели следующую последовательность: GCCAAATTCAGCATCTTGGATG (Fw), TTTGTCCTGAACCTGTAATGCCT (Rv), Cy5-CGCAACATTCCTTGGTTTACCTG-BHQ3.

Праймеры и зонд для определения гена *lambdaBA_5358* имели следующую последовательность: GAAAATTCCTACAGCTCGTTCGTG (Fw), AGCAAATGAACACGATTGTCGTCT (Rv), Cy5-AGGAAAATGCTGATGGCTCAGTCG-BHQ3.

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили на приборах QuantStudio 5 и QuantStudio 6 Pro (Applied Biosciences) в следующем режиме: 1) 95 °С, 7 мин – 1 цикл; 2) 95 °С, 10 с; 59 °С, 30 с (сбор данных); 72 °С, 10 с – 40 циклов. Для ПЦР-РВ использовали HotStart-Тaq-полимеразу («СибЭнзим») со стандартным HS-Тaq-буфером («СибЭнзим»), дополнительно включающим 0,15 мг BSA (Thermo), 0,5 мМ дНТФ («СибЭнзим»), 2 мМ MgCl₂ («СибЭнзим»). Праймеры и зонды ТaqMan добавляли в концентрации 400 нМ и 100 нМ соответственно. В качестве матрицы в реакции использовали от 1 фг до 1 нг тотальной ДНК бактерий.

Результаты и обсуждение

Анализ хромосомы *B. anthracis* показал, что гены лямбодных профагов Ва01-Ва04 являются наиболее видоспецифичными. Для анализа использовали последовательность генома вакцинного штамма *B. anthracis* Ames (AE016879.1). В качестве генов-мишеней выбраны два гена профага *lambda*-Ва03: главный капсидный белок ВА_5361 (AE016879.1: 4855298..4856278) и порталный белок фага ВА_5358 (AE016879.1: 4852332..4853642). Следует отметить, что ген *lambdaBA_5358* более известен как PL3 [7] и рекомендован в качестве специфической мишени с 2011 г., но в данном исследовании нами выбрана 5'-концевая часть последовательности данного гена.

BLAST-анализ (ncbi.nlm.nih.gov) показал, что последовательности генов *lambdaBA_5361* и *lambdaBA_5358* не имеют гомологий среди других представителей семейства бактерий, даже при расширении границ поиска с megablast (высокогомо-

гичные последовательности) до blastn (сколько-то схожие последовательности). Последовательности праймеров и зондов TaqMan подобраны в программе Vector NTI Suite 11.0. Длина ПЦР продуктов составляла 134 н. для *lambdaBA_5361* и 132 н. для *lambdaBA_5358*. Оба зонда TaqMan мечены флуоресцентным красителем Cy5, чтобы иметь возможность включать их в реакцию одновременно, не используя лишний канал для детекции хромосомных генов.

Для определения чувствительности разработанных наборов праймеров и зондов проведена ПЦР-РВ с положительными контрольными образцами ДНК изолятов *B. anthracis* [8]. Также использовалась ДНК, выделенная из вакцинного штамма 55-ВНИИВВиМ. Реакцию проводили как ПЦР-РВ на множественные мишени, так и на одиночные мишени для сравнения эффективности. Выяснено, что множественный вариант ПЦР-РВ на оба гена показывает большую эффективность, чем при постановке реакций на одиночные мишени. Дальнейшее исследование проводилось только с использованием ПЦР-РВ на обе мишени.

На следующем этапе мы определили чувствительность разработанной системы на множественные мишени на ряде разведений контрольных ДНК *B. anthracis*. Анализ данных проводился в программе Q-Gene. Определенная нами чувствительность разработанного набора праймеров/зондов составила 100 фг тотальной бактериальной ДНК. В пересчете на количество геномов, исходя из размера генома *B. anthracis* $5,504 \cdot 10^6$ н., предел чувствительности составил 16,72 генома. Таким образом, мы показали, что линейный динамический диапазон, при котором коэффициент аппроксимации R^2 равен 0,99, имел протяженность от 16,72 до 167200,00 копий генома на реакцию. Эффективность реакции ПЦР РВ колебалась от 84 до 116 % (угол наклона = -3,77).

Для определения специфичности разработанного набора поставлена ПЦР-РВ с образцами ДНК *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis*, *B. clausii*. В качестве положительного контроля использовали ДНК вакцинного штамма. Реакцию ставили в пяти повторях; специфичность набора составила 100 %, поскольку ни в одном образце помимо положительного контроля не детектировался сигнал флуоресценции. Стоит отметить, что в качестве контрольных образцов для проверки специфичности использовались в числе прочих *B. cereus* и *B. thuringiensis*, которые обеспечивают подавляющую долю кросс-реактивности при определении тест-системами, основанными на детекции плазмид pXO1 и pXO2 [4, 6].

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Благодарность. Авторы выражают благодарность Александру Шевцову («Национальный центр

биотехнологии», Астана, Казахстан) за предоставленные образцы ДНК *B. anthracis*.

Финансирование. Проведенное исследование осуществлялось в рамках программы BR10764975 Министерства сельского хозяйства Республики Казахстан.

References / Список литературы

1. Koehler T.M., Dai Z., Kaufman-Yarbray M. Regulation of the *Bacillus anthracis* protective antigen gene: CO2 and a trans-acting element activate transcription from one of two promoters. *J. Bacteriol.* 1994; 3:586–95. DOI: 10.1128/jb.176.3.586-595.1994.
2. Goel A.K. Anthrax: A disease of biowarfare and public health importance. *World J. Clin. Cases.* 2015; 1:20–33. DOI: 10.12998/wjcc.v3.i1.20.
3. Ezzell J.W., Welkos S.L. The capsule of *Bacillus anthracis*, a review. *J. Appl. Microbiol.* 1999; 2:250–67. DOI: 10.1046/j.1365-2672.1999.00881.x.
4. Helgason E., Okstad O.A., Caugant D.A., Johansen H.A., Fouet A., Mock M., Hegna I., Kolstø A.B. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 6:2627–30. DOI: 10.1128/AEM.66.6.2627-2630.2000.
5. Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *J. Bacteriol.* 2002; 1:134–41. DOI: 10.1128/JB.184.1.134-141.2002.
6. Van der Auwera G.A., Andrup L., Mahillon J. Conjugative plasmid pAW63 brings new insights into the genesis of the *Bacillus anthracis* virulence plasmid pXO2 and of the *Bacillus thuringiensis* plasmid pBT9727. *BMC Genomics.* 2005; 6:103. DOI: 10.1186/1471-2164-6-103.
7. Agren J., Hamidjaja R.A., Hansen T., Ruuls R., Thierry S., Vigre H., Janse I., Sundström A., Segerman B., Koene M., Löfström C., Van Rotterdam B., Derzelle S. *In silico* and *in vitro* evaluation of PCR based assays for the detection of *Bacillus anthracis* chromosomal signature sequences. *Virulence.* 2013; 8:671–85. DOI: 10.4161/viru.26288.
8. Shevtsov A., Lukhnova L., Izbanova U., Vernadet J.-P., Kuibagarov M., Amirgazin A., Ramankulov Y., Vergnaud G. *Bacillus anthracis* phylogeography: new clues from Kazakhstan, Central Asia. *Front. Microbiol.* 2021; 12:778225. DOI: 10.3389/fmicb.2021.778225.
9. Nossa C.W., Oberdorf W.E., Yang L., Aas J.A., Paster B.J., Desantis T.Z., Brodie E.L., Malamud D., Poles M.A., Pei Z. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J. Gastroenterol.* 2010; 16(33):4135–44. DOI: 10.3748/wjg.v16.i33.4135.
10. McKiernan H.E., Danielson P.B. Molecular Diagnostic Applications in Forensic Science. In: Patrinos G.P., editor. *Molecular Diagnostics* (3d edition). Academic Press; 2017. P. 371–94. DOI: 10.1016/B978-0-12-802971-8.00021-3.

Authors:

Nizkorodova A.S., S.A., Zhigailov A.V., Abdolla N. Institute of Molecular Biology and Biochemistry named after M.A. Aitkhozhin; Almaty, 050012, Republic of Kazakhstan. Almaty Branch of the National Center for Biotechnology; Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan.

Mal'seva E.R., Berdygulova Zh.A., Naizabaeva D.A., Kuatbekova Mashzhan A.S., Akhmetollaev I.A., Skiba Yu.A., Mamadaliev S.M. Almaty Branch of the National Center for Biotechnology. Almaty, 050054, Republic of Kazakhstan.

Об авторах:

Низкородова А.С., Жигайлов А.В., Абдолла Н. РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина»; Республика Казахстан, 050012, Алма-Ата. Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии»; Республика Казахстан, 050054, Алма-Ата.

Мальцева Э.Р., Бердыгулова Ж.А., Наизабаева Д.А., Куатбекова С.А., Маишжан А.С., Ахметоллаев И.А., Скиба Ю.А., Мамадалиев С.М. Филиал РГП на ПХВ «Национальный центр биотехнологии». Республика Казахстан, 050054, Алма-Ата.