

© Коллектив авторов, 2014

Е.А. ПУДОВА<sup>1,2</sup>, Т.А. ЧЕКАНОВА<sup>1,2</sup>, М.Л. МАРКЕЛОВ<sup>2</sup>, В.Г. ДЕДКОВ<sup>1,2</sup>, Н.П. КИРДЯШКИНА<sup>1,2</sup>, И.П. КАРАСЕВА<sup>1</sup>, А.И. САЖИН<sup>1</sup>, Т.С. ЗАЦЕПИН<sup>1</sup>, Д.В. УТКИН<sup>3</sup>, Н.А. ОСИНА<sup>3</sup>, С.А. ШЕРБАКОВА<sup>3</sup>, Г.А. ШИПУЛИН<sup>1</sup>

## РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ ДНК-ЧИПА ДЛЯ ИНДИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

<sup>1</sup> Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва;

<sup>2</sup> НИИ медицины труда РАН, Москва;

<sup>3</sup> Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора, Саратов

*Постоянная необходимость мониторинга за особо опасными инфекционными заболеваниями обуславливает актуальность разработки новых эффективных методов идентификации возбудителей этих заболеваний.*

*Цель исследования. Создание и апробация набора реагентов, включающего ДНК-чип, для выявления возбудителей сибирской язвы, чумы, туляремии, холеры, легионеллеза и бруцеллеза.*

*Материалы и методы. Олигонуклеотидные зонды, несущие аминокислотные группы на 5'-конце, наносились на поверхность слайдов с альдегидным покрытием с помощью плоттера для бесконтактной печати. После выделения ДНК из инактивированных культур проводили стадию мультипраймерной ПЦР, затем стадию транскрипции с включением РНК-детектирующей метки. Продукты транскрипции гибридизовали на ДНК-чипе, затем с помощью лазерного сканера проводили анализ флуоресцентных профилей.*

*Результаты. Разработан набор реагентов, включающих ДНК-чип, для выявления возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний, позволяющий провести анализ 48 образцов. Время анализа составляет 5,5 ч.*

*Заключение. Набор реагентов обладает чувствительностью и специфичностью, что дает возможность применять его в лабораториях регионального уровня и референсных центрах.*

**Ключевые слова:** ДНК-чип, набор реагентов, особо опасные инфекции, сибирская язва, туляремия, чума, холера.

E. A. PUDOVA<sup>1,2</sup>, T. A. CHEKANOVA<sup>1,2</sup>, M. L. MARKELOV<sup>2</sup>, V. G. DEDKOV<sup>1,2</sup>,  
N. P. KIRDYASHKINA<sup>1,2</sup>, I. P. KARASEVA<sup>1</sup>, A. I. SAZHIN<sup>1</sup>, T. S. ZATSEPIN<sup>1</sup>, D. V. UTKIN<sup>3</sup>,  
N. A. OSINA<sup>3</sup>, S. A. SHCHERBAKOVA<sup>3</sup>, G. A. SHIPULIN<sup>1</sup>

## DEVELOPMENT AND TESTING OF A DNA MICROARRAY FOR IDENTIFICATION OF PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIOUS PATHOGENS

<sup>1</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Russian Inspectorate for Protection of Consumer Right and Human Welfare, Moscow;

<sup>2</sup> Research Institute of Occupational Medicine, Russian Academy of Sciences, Moscow;

<sup>3</sup> Russian «Microbe» Plague Control Research Institute,

Russian Inspectorate for the Protection of Consumer Rights and Human Welfare, Saratov

*The continuous necessity for monitoring particularly dangerous infectious diseases determines the urgency of developing new effective methods to identify the pathogens of these diseases.*

*Objective. To design and test a reagent kit involving a DNA microarray to reveal the pathogens of anthrax, plague, tularemia, cholera, legionellosis, and brucellosis.*

*Subjects and methods. The oligonucleotide probes carrying the amino groups at the 5'-end were applied to the surface of aldehyde-coated slides with a noncontact printing plotter. After DNA extraction from inactivated cultures, the investigators used multi-primer PCR, then transcription, by including a RNA-detecting label. Transcription products were hybridized using the DNA microarray, then a laser scanner was applied to analyze fluorescence profiles.*

*Results. The reagent kit involving a DNA microarray has been designed to reveal the pathogens of particularly dangerous infectious diseases, which allows 48 samples to be analyzed. The analysis time is 5.5 hours.*

*Conclusion. The reagent kit has been found to be sensitive and specific, which makes possible using it at the regional laboratories and reference centers.*

**Key words:** DNA microarray, reagent kit, particularly dangerous infections, anthrax, tularemia, plague, cholera.

Для осуществления мониторинга за особо опасными инфекциями и проведения своевременных противоэпидемических мероприятий актуальной является разработка новых эффективных диагнос-

тических наборов. На сегодняшний день все большее распространение получают методы индикации и идентификации возбудителей различных инфекций с использованием ДНК-чипов. Особенностью данной технологии является возможность проведения одномоментного мультилокусного анализа за сравнительно короткое время при высоких уровнях чувствительности и специфичности. Наравне с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) ДНК-чипы могут найти применение для идентификации и генетического типирования возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний в профильных лабораториях территориального, регионального и федерального уровней.

Целью настоящей работы являлось конструирование и апробация на панели референтных штаммов микроорганизмов набора реагентов, включающего ДНК-чип, для дифференциального выявления возбудителей особо опасных инфекций: сибирской язвы — *Bacillus anthracis*, чумы — *Yersinia pestis*, туляремии — *Francisella tularensis*, холеры — *Vibrio cholerae*, легионеллеза — *Legionella pneumophila*, бруцеллеза — *Brucella abortus*. Выбор данных микроорганизмов для диагностики с помощью ДНК-чипа обусловлен, прежде всего, высокой вероятностью использования их в качестве средств биотерроризма [1, 2].

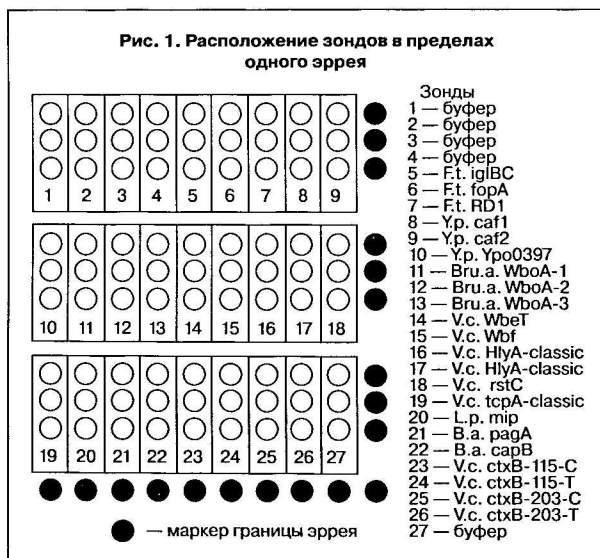
### Материалы и методы

Выбор структур олигонуклеотидных праймеров и зондов проводили с использованием программного пакета Vector NTI («Invitrogen Corporation, США»), а также ресурса, предлагаемого на сервере <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>. Все структуры зондов и праймеров сравнивались с помощью программы BLAST (информационный ресурс NCBI) с последовательностями ДНК, депонированными в базе данных GenBank. Олигонуклеотидные зонды и праймеры были синтезированы в ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва (далее — ЦНИИЭ). Зонды, предназначенные для последующей иммобилизации на слайдах, содержали аминокислотную группу на 5'-конце. В состав одного из праймеров каждой пары был включен сайт узнавания для ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7. Структуры олигонуклеотидных праймеров и зондов представлены в табл. 1.

#### Производство ДНК-чипов

Препараты олигонуклеотидных зондов наносили на микроскопные слайды с поверхностью, модифицированной альдегидными группами, VALS («CEL Associates Inc.», США) методом бесконтактной печати с помощью пьезоэлектрического робота для микропечати S3 («Scipion AG», Германия) в виде индивидуальных пятен (спотов) диаметром 350 мкм в трех повторах. Олигонуклеотидные зонды и контрольные споты были нанесены в пределах каждой из двенадцати зон (эрреев) на слайде идентичным образом (рис. 1). Далее слайды инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, обрабатывали свежеприготовленным 0,25%

раствором боргидрида натрия, промывали 0,2% раствором додецилсульфата натрия (SDS), затем дистиллированной водой и высушивали.



### Материал для исследования

Для изучения аналитической чувствительности и специфичности ДНК-чипа были использованы штаммы следующих микроорганизмов: *Bacillus anthracis* (13 штаммов), *Yersinia pestis* (8), *Francisella tularensis* (9), *Vibrio cholerae* (9), *Legionella pneumophila* (3), *Brucella abortus* (1), *Bacillus cereus* (1), *Bacillus subtilis* (1), *Yersinia pseudotuberculosis* (1), *Yersinia enterocolitica* (1), *Escherichia coli* (2), *Vibrio parahaemolyticus* (1), *Vibrio vulnificus* (1), *Vibrio mimicus* (1). Данные штаммы были предоставлены ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (Оболенский) и ФКУЗ Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» (Саратов; далее — РосНИПЧИ «Микроб»). Межлабораторные испытания ДНК-чипа проводили в РосНИПЧИ «Микроб» на панелях штаммов, включавших 8 штаммов *B. anthracis*, по одному штамму *B. cereus*, *B. subtilis* и *megatherium*, 7 штаммов *Y. pestis*, 1 штамм *Y. enterocolitica*, 1 штамм *Y. pseudotuberculosis*, 8 штаммов *F. tularensis*, по одному штамму *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis*, *B. ovis*, *B. canis* и *B. neotomae*, 10 штаммов *V. cholerae*, по одному штамму *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* и *V. vulnificus*, 3 штамма *L. pneumophila* и 1 штамм *E. coli*. Взвеси бактериальных клеток были приготовлены с использованием отраслевого стандартного образца мутности ОСО 42-28-59-86П ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России. Работы проводили в соответствии с МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности» и СП 1.3.2855-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)».

**Таблица 1. Структуры олигонуклеотидных зондов для иммобилизации на слайдах и праймеров для амплификации**

Название	5'-3'-последовательность
<i>Vibrio cholerae</i>	
Vc-2-EL F	aat gtt ctg ggt att atg ggt gtg g
T7-Vc2-EL R	aat tct aat acg act cac tat agg gag cca agg ctg acc aaa cca tta ctg
Vc-2-cl F	atc atc gtt cta ggc att atg ggg
T7-Vc2-cl R	aat tct aat acg act cac tat agg gag ttt tac cta aac taa cca agc ctg aag
Prb-Vc2	NH2-C12-ttt ttt ttt agc gtg cga ttg att cgc ag
Vc 3F	ata atc gaa act tca ttt aca atg gag ag
T7-Vc 3R	aat tct aat acg act cac tat agg gag a cac aga aag ttc caa cgt ttg cac gca
Prb Vc3	NH2-C12-ttt ttt ttt ccc aga gtg cag ttg aac
Vc 5R	aac caa agg ctc atc tag atc cca gt
T7-Vc5F	aat tct aat acg act cac tat agg gag a cct acg ttt ctg gtt tgc aag ctg gct
Prb Vc5	NH2-C12-ttt ttt ttt ca tca cca gac aag cat aca
Vc 6F	agt cgt ccg ttc ttc tgt aaa gat gcc
T7-Vc 6R	aatt cta ata cga ctc act ata ggg aga tgc tat aac tgg ctc caa act gac g
Prb Vc 6 EL	NH2-C12-ttt ttt ttt gcc ggc att cat ctg aat g
Prb Vc 6 cl	NH2-C12-ttt ttt ttt agc cgg ctg atc aac tgc g
Vc 7F	tta cag ttt tac tat ctt cag cat atg c
T7-Vc 7R	a att cta ata cga ctc act ata ggg aga ata cta att gcg gca atc gca tga g
Prb-VC7115-C	NH2-C12-ttt ttt ttt aca aca cac aaa tac ata cgc
Prb-VC7115-T	NH2-C12-ttt ttt ttt acc aca aca cac aaa tat ata cg
Prb-VC7 203-C	NH2-C12-ttt ttt ttt tgg tgc aac ttt tci agt ag
Prb-VC7 203-T	NH2-C12-ttt ttt ttt tgg tgc aat ttt tci agt ag
Vc 8F	aca ctt taa tgg atg ttt acg ata gcc
T7-Vc 8R	a att cta ata cga ctc act ata ggg aga tta cag tga tgg ctc agt caa tgc
Prb-VC8	NH2-C12-ttt ttt ttt ata tct gcg ttc agg cg
<i>Legionella pneumophila</i>	
Lp-mip F	cat gca aga cgc tat gag tgg c
T7-Lp-mip R	a at tct aat acg act cac tat agg gag cat cca ggg ata act tgt gaa acc
Prb-Lp-mip	NH2-C12-ttt ttt ttt agg cgt tgt tgt tgt att gcc aag tg
<i>Bacillus anthracis</i>	
Ba 11	aaa agc gaa gta caa gtg ctg gac cta
T7-Ba 1	aat tct aat acg act cac tat agg gag aca ctc cca cca ata tca aag aac gac
Prb Ba 1	NH2-C12-ttt ttt ttt tcc gat tgt aca tgt aga tat g
Ba 31	cgt ttt gct gac caa tct aag cct gc
T7-Ba 3	aat tct aat acg act cac tat agg gag atg gca aaa cat ccc tag caa act g
Prb Ba 3	NH2-C12-ttt ttt ttt cat tac gta ttt ggg aac gtg
<i>Yersinia pestis</i>	
Yp 21	ctc tta cat ata agg aag gcg ctc caa
T7-Yp 2	aat tct aat acg act cac tat agg gag att gag cga aca aag aaa tcc tgg c
Prb Yp 2	NH2-C12-ttt ttt ttt ctt ctc agg atg gaa ata acc
Yp 41	cga ttg gat gct aag caa caa aat tc
T7-Yp 4	aat tct aat acg act cac tat agg gag a cga att gca cga aca ctc cca cat ct
Prb Yp 4	NH2-C12-ttt ttt ttt gat gaa gat ata tgg gtt gat ga
Yp 61	gag gtg att acc gcg gct aat ct
T7-Yp 6	aat tct aat acg act cac tat agg gag a cag act cgg aca gca ggc gt
Prb Yp 6	NH2-C12-ttt ttt ttt ccg gct gtg ctc agg

## Продолжение Таблицы 1

<i>Francisella tularensis</i>	
Ft 11	ttt gta gac tcg ttt act ata gga gg
T7-Ft 1	aat tct aat acg act cac tat agg gag a ctc ctt caa gca agg tcc taa cac
Prb Ft 1	NH2-C12-ttt ttt ttt gca gcc agt gtt ata cgt c
Ft 21	ggt act tag gtg tag atg cta acg g
T7-Ft 2	aat tct aat acg act cac tat agg gag a gtt tac aac acc ttc acc taa acc agc
Prb Ft 2	NH2-C12-ttt ttt ttt ctt cgc tgt aca gta caa c
Ft 31	cat taa aac atc tat ttg ctt ctt act gg
T7-Ft 3	aat tct aat acg act cac tat agg gag a gta tca aga aga ttg tgt aaa taa tat cg
Prb Ft 3	NH2-C12-ttt ttt tta cat tat taa aga cat cgc act c
<i>Brucella abortus</i>	
Bru 1-F	gcc aac caa ccc aaa tgc tca caa
T7-Bru1-R	a att cta ata cga ctc act ata ggg aga tta agc gct gat gcc att tcc ttc ac
Prb_Bru1.1	NH2-C12-ttt ttt ttt tag tgt gcg gat gga ccc
Prb_Bru1.2	NH2-C12-ttt ttt ttt ctt atg tga aat ctg tac gg
Prb_Bru1.3	NH2-C12-ttt ttt ttt tgc aaa ttc cca tgc agt a

**Процедура проведения анализа**

Выделение ДНК из исследуемых материалов проводили с помощью комплекта реагентов «РИБО-преп» производства ЦНИИЭ согласно рекомендациям производителя. Дальнейшие этапы проводили с использованием разработанного набора.

ПЦР-амплификацию проводили в формате «мульти-прайм». Праймеры группировали в 2 пробирки по 10 пар праймеров в каждой. Таким образом, для каждого из исследуемых образцов проводилось по 2 реакции амплификации. В состав реакционной смеси входили 10 мкл ПЦР-смеси-2-blue (ЦНИИЭ), 2,5 мкл 10x dNTP-mix (ЦНИИЭ), по 0,08 мкМ прямого и обратного праймеров и бетаин до конечной концентрации 1 М. Объем реакции составлял 25 мкл. Амплификацию проводили в термоциклере Терцик («ДНК-Технология», Россия) по протоколу, представленному в табл. 2.

Транскрипцию ПЦР-продукта проводили с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага T7. В состав реакционного буфера входили 40 мМ Трис-НСI-буфера (pH = 8,0), 6 мМ хлорида магния, 10 мМ хлорида натрия, 10 мМ DTT, по 0,25 мМ АТР, СТР и ГТР (ЗАО «Биосан», Россия), 0,2 мМ УТР (ЗАО «Биосан», Россия), 0,05 мМ biotin-УТР («ДНК-Синтез», Россия), 50 ед. ДНК-зависимой РНК-полимеразы фага T7 (ЦНИИЭ). Для проведения транскрипции в реакцию брали по 10 мкл неочищенного ПЦР-продукта из каж-

дой амплификационной пробирки при общем объеме реакции 50 мкл. Реакцию проводили в течение 40 мин при 37 °С.

При постановке гибридизации для разделения ДНК-чипа на эрреи использовали рамки-трафареты «16 well incubation chamber» («Whatman», Германия), слайды с трафаретами помещали в рамки-держатели «FAST-Frame» («Whatman», Германия). В ячейку вносили 80 мкл предварительно прогретой гибридационной смеси, состоящей из 10 мкл продукта транскрипции, 30 мкл дистиллированной воды и 40 мкл двукратного гибридационного буфера. Состав буфера: 600 мМ хлорида натрия, 60 мМ цитрата натрия (4x SSC; pH = 7,0), 20% формамид 40 мМ ЭДТА, 1% SDS. Гибридизацию проводили в течение 40 мин при температуре 37 °С и 300 об/мин с использованием термостатируемого шейкера («Biosan», Латвия), затем содержимое из эрреев убирали с помощью вакуумного медицинского отсасывателя и отмывали слайды сначала 5x SSC (pH = 7,0) с добавлением 0,1% твина-20, а затем 2x SSC (pH = 7,0) с добавлением 0,1% твина-20. После отмывки слайды инкубировали со стрептавидином, меченым флуоресцирующим красителем Cyapine-5 («Имтек», Россия) в конечной концентрации 2,5 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С и 300 об/мин с использованием термостатируемого шейкера, затем промывали ДНК-чипы раствором PBS-T, далее ополаскивали дистиллированной водой и высушивали.

**Учет и интерпретация результатов анализа**

После проведения гибридизации слайды сканировали на флуоресцентном лазерном анализаторе для биочипов MArS («Ditabis», Германия) на канале Red (возбуждение при 635 нм, поглощение при 670 нм). Уровни флуоресцентных сигналов от каждого спота оценивали с помощью программы ScanArray Express («Perkin Elmer», США). С помощью специализированного программного обеспечения для интерпретации сигналов флуоресценции «SCAN ARRAY PARSER», разработанного в ЦНИИЭ, вычисляли

Таблица 2. Программа амплификации

Цикл	Температура	Время	Число циклов
1	94 °С	1 мин	1
2	94 °С	15 с	35
	60 °С	25 с	
	72 °С	20 с	
3	72 °С	1 мин	1
4	4 °С	Хранение	

средние значения флуоресценции, критический уровень флуоресценции (cut off) и коэффициенты позитивности (КП) для каждого исследуемого био-маркера. Если для определенного олигонуклеотидного зонда КП превышал 1,2, результат гибридизации на чипе считали положительным для соответствующего этому зонду фрагмента генома возбудителя.

#### Подтверждение результатов гибридизации

Специфичность результатов гибридизационного анализа подтверждали с помощью электрофоретической детекции продуктов ПЦР в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия и последующего капиллярного секвенирования фрагмента на приборе Genetic Analyzer ABI Prism 3500xl («Life Technologies», США).

### Результаты и обсуждение

В ходе работы в ЦНИИЭ был разработан диагностический набор, включающий ДНК-чип, для одновременного выявления маркеров возбудителей особо опасных инфекций. С целью повышения эффективности гибридизации на ДНК-чипе нами была дополнительно введена стадия транскрипции. На этой стадии с помощью фермента ДНК-зависимой РНК-полимеразы бактериофага Т7 происходит синтез одноцепочечной РНК на матрице двухцепочечных фрагментов ДНК, полученных на этапе ПЦР-амплификации, с одновременным встраиванием рибонуклеозидтрифосфатов, меченых биотином. Такой подход позволяет сократить длительность гибридизации материала на ДНК-чипе и увеличить чувствительность анализа.

Комбинации праймеров для проведения реакций ПЦР-амплификации и зондов для иммобилизации на слайдах были подобраны с учетом особенностей строения геномов выявляемых патогенов.

Известно, что вирулентные штаммы *Bacillus anthracis* содержат одновременно 2 плазмиды: рХО1 и рХО2 [3, 4], в то время как штаммы, лишенные какой-либо из плазмид, являются авирулентными. Поэтому в качестве основных мишеней для ПЦР нами были выбраны ген *capB*, находящийся на плазмиде рХО2, и ген *pagA* (рХО1). Таким образом, при исследовании образцов, подозрительных на инфицированность сибиреязвенным микробом, могут быть получены следующие результаты гибридизации:

- *pagA+* *capB+* – вирулентные штаммы *B. anthracis* (рХО1+, рХО2+);
- *pagA– capB+* – авирулентные штаммы *B. anthracis* (рХО1–, рХО2+);
- *pagA+ capB–* – авирулентные штаммы *B. anthracis* (рХО1+, рХО2–).

Для определения патогенности и таксономической принадлежности штаммов холерного вибриона, полученных из инактивированных культур, а также из клинического и биологического материала, были выбраны следующие локусы в геноме возбудителя:

- гены *ctxA*, *ctxB*, кодирующие синтез соответственно А- и В-субъединиц холерного энтеротоксина и являющиеся маркерами патогенности [5, 6]. Кроме

того, анализ структуры гена *ctxB* позволяет выявить измененные и атипичные варианты штаммов эльтор;

- ген *tcpA*, кодирующий синтез большой субъединицы токсин-корегулируемых пилей адгезии, считается маркером эпидемической значимости;

- гены *wbeT* и *wbfR*, входящие в состав кластера генов, отвечающих за синтез О-антигена групп О1 и О139 соответственно [7, 8];

- ген *hlyA*, кодирующий термостабильный гемолизин, присутствующий в геноме как вирулентных, так и авирулентных штаммов *V. cholerae* серогрупп О1 и не-О1, позволяет провести различие между холерными и нехолерными вибрионами, а также между классическими биварами и биоварами эльтор *V. cholerae* за счет делеции размером 11 п.н. у классических штаммов;

- гены *rstC* и *rstR*, регулирующие транскрипцию профага СТХф. Структура локуса *rstR* существенно отличается у биоваров классического и эльтор. Фрагмент *rstC* присутствует в составе профага только у штаммов эльтор. Таким образом, оба эти гена позволяют дифференцировать штаммы эльтор и классические между собой.

Для индикации штаммов возбудителей чумы был выбран фрагмент локуса Ypo0397, расположенного на хромосоме и являющегося высокоспецифичным для *Yersinia pestis*. Существуют капсульные и бескапсульные штаммы *Yersinia pestis*; бескапсульные характеризуются, как правило, пониженной вирулентностью. Синтез капсулы у возбудителя чумы кодируется плазмидой рFга, поэтому для дифференциации капсульных и бескапсульных штаммов были выбраны фрагменты *cafI* и *cafIM*, расположенные на плазмиде рFга [9].

Для возбудителя туляремии были использованы зонды, гомологичные специфическим участкам гена *iglBC* (отвечает за синтез белков, необходимых для persistence возбудителя в макрофагах), гена *fopA* (кодирует белок наружной мембраны), участка гена *RD1* (общий для всех подвидов) [10].

Для индикации *Legionella pneumophila* были синтезированы зонды и праймеры, позволяющие определить наличие фрагмента гена *mip*, который кодирует синтез белка размером 24 кДа, являющегося фактором вирулентности возбудителей [11, 12].

С целью определения наличия в исследуемом материале возбудителей бруцеллеза были выбраны и синтезированы зонды и праймеры на фрагмент гена *wboA*, кодирующего выработку О-антигена и идентичного для штаммов *B. meliensis*, *B. abortus* и *B. suis* [13], наиболее часто вызывающих развитие заболевания у человека.

Разработанный в ЦНИИЭ набор реагентов для индикации возбудителей особо опасных инфекций в формате ДНК-чипа включает все необходимые реагенты для проведения стадий ПЦР-амплификации, транскрипции и гибридизации. Набор предназначен для анализа 48 образцов (включая контрольные). В состав набора входят: ПЦР-смесь 1а, ПЦР-смесь 1б, 5М бетанин и ПЦР-смесь-2-blue для проведения ПЦР-амплификации; 5-кратный транскрипционный буфер, гНТР (5-кратный раствор рибонуклеозидтрифосфатов) и Т7-полимераза для проведения

транскрипции; ДНК-чипы, гибридизационный буфер 2х, концентрированный раствор стрептавидина, конъюгированного с Суапне-5, раствор для разведения стрептавидина и концентрированные отмывочные растворы для проведения стадии гибридизации, а также инструкция к набору. Общее время анализа, без учета стадии выделения ДНК из исследуемого материала, составляет 5,5 ч.

С целью апробации диагностического набора в ЦНИИЭ были изготовлены 3 экспериментально-производственные серии. Межлабораторные испытания ДНК-чипа для выявления возбудителей особо опасных инфекций проводились на базе РосНИПЧИ «Микроб». В ходе межлабораторных испытаний, проводимых на очищенных инактивированных культурах возбудителей, неспецифической амплификации и гибридизации не наблюдалось. Аналитическая чувствительность набора реагентов в отношении выявления *Bacillus anthracis* по результатам проведенных испытаний составляла от  $1 \times 10^3$  м.к./мл в образце, при этом ДНК-чип позволял дифференцировать моноплазмидные и биплазмидные штаммы *B. anthracis* (рис. 2 А, см. на вклейке). В отношении возбудителей холеры набор позволял выявлять присутствие *Vibrio cholerae* в концентрации от  $1 \times 10^3$  м.к./мл, а также характеризовать обнаруженные штаммы с точки зрения их патогенности, принадлежности к серогруппам O1, O139 или не-O1 не-O139, принадлежности к классическому, эльтор или атипичному биовару эльтор (рис. 2 Д, см. на вклейке). Аналитическая чувствительность в отношении возбудителей чумы и туляремии составляла от  $1 \times 10^3$  м.к./мл в образце, при этом набор позволял дифференцировать капсульные и бескапсульные штаммы *Yersinia pestis* (рис. 2 Б, см. на вклейке). Аналитическая чувствительность в отношении выявления возбудителей легионеллеза и бруцеллеза по результатам испытаний составила от  $1 \times 10^4$  м.к./мл в образце.

Таким образом, разработанный набор реагентов, основанный на проведении мультипраймерной ПЦР с последующей транскрипцией и гибридизацией материала на ДНК-чипе, позволяет не только выявить в исследуемом клиническом или биологическом материале за одну процедуру сразу несколько возбудителей, но и проводить их генетическую характеристику. Показатели чувствительности и специфичности набора реагентов, продемонстрированные в результате межлабораторных испытаний на панели гомологичных и гетерологичных штаммов микроорганизмов, свидетельствуют о возможности использования данного способа диагностики в отношении возбудителей особо опасных инфекционных заболеваний в профильных лабораториях разных уровней. В дальнейшем спектр выявляемых патогенов или их генетических маркеров предполагается расширить за счет размещения в пределах одного зреля большего количества зондов.

\*\*\*

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2009–2014 годы)».

## ЛИТЕРАТУРА

1. Воробьев А.А. Критериально-рейтинговая система оценки степени опасности биоагентов и концепция создания международной коалиционной программы по биобезопасности. *Журн. микробиол.* 2007; 1: 105–108.
2. Онищенко Г.Г., Сандахчиев Л.С., Нетесов С.В., Мартынюк Р.А. Биотерроризм: национальная и глобальная угроза. *Вестник РАН* 2003; 73(3): 195–204.
3. X. Hu G., Van der Auwera S., Timmerly L., Zhu J., Mahillon. Distribution, Diversity, and Potential Mobility of Extrachromosomal Elements Related to the *Bacillus anthracis* pXO1 and pXO2 Virulence plasmids. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75: 3016–3028.
4. Mukhopadhyay S., Akmal A., Stewart A.C., Hsia R., Read T.D. Identification of *Bacillus anthracis* spore component antigens conserved across diverse *Bacillus cereus* sensu lato strains. *Mol. Cell. Proteomics* 2009; 8: 1174–1191.
5. Смирнова Н.И., Челдышова Н.Б., Горяев А.А., Лозовский Ю.В., Кутырев В.В. Эволюция генома *Vibrio cholerae*: пути формирования атипичных штаммов. *Проблемы особо опасных инфекций* 2008; 97: 5–11.
6. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y.C. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Cell* 2009; 18(1): 46–54.
7. Huang J., Zhu Y., Wen H., Zhang J., Huang Sh., Niu J. et al. Quadruplex Real-Time PCR Assay for Detection and Identification of *Vibrio cholerae* O1 and O139 Strains and Determination of Their Toxigenic Potential. *Applied and Environmental Microbiology* 2009; 75(22): 6981–6985.
8. Faruque Sh. M., Balakrish G. Nair., eds. *Vibrio cholerae: genomics and molecular biology*. Poole: Horizon Scientific Press, 2008; 101–123.
9. Sebbane F., Jarrett C., Gardner D., Long D., Hinnebusch B.J. The *Yersinia pestis* caf1M1A1 fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infect. Immun.* 2009; 77: 1222–1229.
10. Fey P.D., Dempsey M. M.P., Olson M.E., Chrustowski M.S., Engle J.L., Jay J.J. et al. Molecular Analysis of *Francisella tularensis* Subspecies *tularensis* and *holarctica*. *Am. J. Clin. Pathol.* 2007; 128: 926–935.
11. Тартаковский И.С., Теменникова Н.Д., Карпова Т.И. Легионеллез: проблемы и перспективы лабораторной диагностики. *Проблемы особо опасных инфекций* 2005; 90: 276–280.
12. Edwards M.T., Fry N.K., Harrison T.G. Clonal population structure of *Legionella pneumophila* inferred from allelic profiling. *Microbiology* 2008; 154: 852–864.
13. Wang Zh., Niu J., Wang Sh., Lv Y., Wu Q. In vivo differences in the virulence, pathogenicity, and induced protective immunity of wboA mutants from genetically different parent *Brucella* spp. *Clin. Vaccine Immunol.* 2013; 20: 174–180.

Поступила 03.02.14

## Для корреспонденции:

Пудова Елена Александровна – мл. науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора  
 Адрес: 111123, Москва, ул. Новогириевская, д. 3а  
 Телефон: +7-926-296-97-35  
 E-mail: el\_pudov@mail.ru  
 For correspondence: Elena A. Pudova, el\_pudov@mail.ru

**Сведения об авторах:**

**Чеканова Татьяна Александровна** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; tchekanova74@mail.ru

**Маркелов Михаил Леонидович** – канд. биол. наук, ст. науч. сотр. группы постгеномных технологий НИИ медицины труда РАМН; mikhailmarkelov@gmail.com

**Дедков Владимир Георгиевич** – мл. науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; vgdedkov@yandex.ru

**Кирдяшкина Нина Петровна** – лаборант-технолог группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; nkirdyashkina@mail.ru

**Карасева Ирина Петровна** – лаборант-технолог группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; irkasha@list.ru

**Зацепин Тимофей Сергеевич** – канд. хим. наук, науч. сотр. группы постгеномных технологий НИИ медицины труда РАМН; tsz@yandex.ru

**Уткин Денис Валерьевич** – канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаб. диагностических технологий Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора; gusrapi@mikrobe.ru

**Осина Наталья Александровна** – канд. биол. наук, зав. лаб. молекулярной диагностики Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора; gusrapi@mikrobe.ru

**Щербакова Светлана Анатольевна** – д-р биол. наук, зав. лаб. оперативной диагностики, зав. отд. диагностики инфекционных болезней Российского научно-исследовательского противочумного института «Микроб» Роспотребнадзора; gusrapi@mikrobe.ru

**Сажин Алексей Игоревич** – мл. науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; alexey.sazhin@gmail.com

**Шипулин Герман Александрович** – канд. мед. наук, зав. отд. молекулярной диагностики и эпидемиологии Центрального НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора; german@pcr.ru