

УДК 638.15

МЕТОД МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ДЛЯ БЫСТРОГО ОБНАРУЖЕНИЯ *Paenibacillus larvae* В ГНИЛОСТНОЙ МАССЕ СОТ И КОЛОНИЯХ БАКТЕРИЙ

© 2013 г. Н. В. Русенова*, П. Парванов*, С. Станилова**

*Факультет ветеринарной медицины, кафедра ветеринарной микробиологии инфекционных и паразитарных заболеваний, Тракийский университет, Стара Загора, 6000, Болгария

**Отдел молекулярной биологии медицинского факультета, Тракийский университет, Стара Загора, 6000, Болгария

e-mail: n_v_n_v@abv.bg~V

Поступила в редакцию 26.01.2012 г.

Разработан быстрый и чувствительный метод мультиплексной полимеразной цепной реакции для стандартной диагностики американского гнильца. Предложен новый подход для обнаружения *Paenibacillus larvae* в гнилостной массе. Исследовано 45 образцов такой массы из пчелиных сот, в которых предполагалось присутствие американского гнильца. В экспериментальную выборку также были включены следующие родственные культуры: эталонный штамм – *Paenibacillus larvae* (NBIM-CC 8478), культуры, выделенные из клинических образцов, 4 штамма близких видов бактерий. ДНК из бактериальных колоний выделяли стандартным методом, включающим нагревание и центрифугирование с использованием коммерческого набора (pgerGem). Выделение ДНК из гнилостной массы сот проводилось в соответствии со стандартной и модифицированной процедурами. Для проведения мультиплексной ПЦР были использованы три пары праймеров, специфичных к 16S рРНК, и одна пара праймеров, специфичная для гена металлопротеазы (35 кДа) *P. larvae* в различных комбинациях. Чувствительность разработанного метода мультиплексной ПЦР для гнилостной массы составила 100%, что значительно превышало показатель чувствительности стандартного протокола (45.2%). Разработанный метод мультиплексной ПЦР может быть успешно использован для быстрого обнаружения *Paenibacillus larvae* как в гнилостной массе, так и в колониях выделенных бактерий.

DOI: 10.7868/S0555109913010182

Американский гнилец (АГ) является одним из самых вредоносных бактериальных болезней пчел, поражающий медоносных пчел в личиночной стадии развития [1]. Возбудитель, *Paenibacillus larvae*, относится к грамположительным спорообразующим бактериям [2]. Споры *P. larvae* – единственная инфекционная форма этого организма очень устойчивы [3], 10 и даже менее спор может оказаться достаточно, чтобы вызвать заболевание молодых личинок [4].

АГ распространен по всему миру, поражение им пчел приводит к значительным экономическим потерям для пчеловодства [5, 6]. Распространению АГ способствуют стандартные пчеловодческие процедуры, международная торговля продуктами пчеловодства, грабеж или роение инфицированных пчелиных семей [7, 8]. Таким образом, своевременное обнаружение *P. larvae* имеет большое значение для предотвращения распространения инфекции.

Несмотря на выраженные симптомы АГ во многих странах, в том числе и в Болгарии, диагноз этого заболевания должен быть подтвержден лабораторным исследованием. Лабораторная диагностика АГ основана на анализе клинических признаков с последующим выделением и идентификацией возбудителя. Обычные методы микробиологического исследования требуют много времени и недостаточно надежны в тех случаях, когда в клинических образцах присутствуют другие спорообразующие бактерии. Коммерческие наборы для идентификации, хотя и доступны [9, 10], но и они требуют несколько дней для получения результатов. В последнее время на европейских пасеках были выделены и описаны другие генотипы штаммов *P. larvae*, отличающиеся морфологией колоний. Это может дополнительно осложнять использование рутинной диагностики [11]. Таким образом, необходимо создание быстрого и чувствительного метода обнаружения возбудителя для предупреждения и контроля АГ.

Таблица 1. Праймеры для выявления *P. larvae*

Праймер	Последовательность	Ген, ссылка	Длина фрагмента, п.н.
1.	5'-AAGTCGAGCGGACCTTGTGTTTC-3'	16S рPHK [19]	973
2.	5'-TCTATCTCAAACCGGTCAGAGG-3'	ген металлопротеазы	273
3.	F3,5'-CGGGCAGCAAATCGTATTCAG-3'		
4.	B1,5'-CCATAAAGTGTTGGGTCCCTCTAAGG-3'		
5.	E1,5'-GCAAGTCGAGCGGACCTTGTG-3'	16S рPHK[11]	965
6.	E2,5'-AAACCGGTCAGAGGGATGTCAAG-3'	16S рPHK [11]	665
7.	F6,5'-GCACTGGAAACTGGGAGACTTG-3'		
8.	B11,5'-CGGCTTTTGAGGATTGGCTC-3'		

В последнее время опубликованы [11–14] некоторые методы ПЦР для выявления различных патогенов, в том числе *P. larvae*. Тем не менее, информация по обнаружению *P. larvae* в гнилостной массе в специальной литературе методом мультиплексной ПЦР явно недостаточно.

Цель исследования – разработка быстрого, чувствительного и специфичного метода мультиплексной ПЦР для обнаружения *P. larvae* непосредственно в гнилостной массе и в выделенных колониях бактерий для рутинной диагностики.

МЕТОДИКА

Гнилостная масса и бактериальные штаммы. В экспериментах использовались 45 образцов гнилостной массы из пчелиных сот, где подозревалось наличие АГ, эталонный штамм *Paenibacillus larvae* NBIMCC 8478 (Национальный банк промышленных микроорганизмов и клеточных культур, София, Болгария), 66 клинических изолятов и 4 штамма родственных видов бактерий – *Brevibacillus laterosporus* (NBIMCC 8036), *Bacillus licheniformis* (NBIMCC 3346), *Paenibacillus alvei*, *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. Последние 2 родственные бактерии были выделены из пчелиных сот и определены с помощью BioLog Gen III systems (США). Полевые штаммы выделяли на триптическом соевом агаре (“Fluka”, Швейцария) с добавлением 5% овечьей крови и инкубировали при 37°C в течение 72 ч в аэробных условиях.

Выделение ДНК из бактериальных штаммов. ДНК из тестированных штаммов выделяли двумя различными методами. Первый был ранее описан в работе [12] и приведен в ежегодном учебном руководстве [15], поэтому он считается стандартным. Бактериальные суспензии нагревали 20 мин при 95°C и центрифугировали 10 мин при 5000 g. Супернатант далее использовали в качестве образца ДНК в ПЦР-анализах. Вторую процедуру

проводили в соответствии с инструкциями производителя DNA Bacterial Extraction Kit PrepGem (“ZyGem”, США).

Выделение ДНК из гнилостной массы. ДНК из гнилостной массы выделяли двумя способами. Первый способ заключался в следующем: гнилостные массы из двух сотовых ячеек суспендировали в 1 мл стерильной дистиллированной воды и тщательно перемешивали. К 100 мкл этой суспензии добавляли в 900 мкл стерильной дистиллированной воды и интенсивно перемешивали, затем 100 мкл смеси использовали для извлечения ДНК стандартным методом, включающим нагревание и центрифугирование [12]. В соответствии со вторым методом разведение гнилостной массы вместо дистиллированной воды проводили в среде CASO (“Fluka”, Швейцария) и инкубировали 100 мкл каждого разведения в течение 1 ч при температуре 37°C на водяной бане и затем центрифугировали.

Все образцы ДНК хранились при температуре от –20°C до использования.

Выбор праймеров. В табл. 1 приведены выбранные праймеры, целевые гены и длина ожидаемого ампликона. Выбор праймеров основывался на ранее использовавшихся для выявления *P. larvae* [11, 19]. Праймеры были протестированы, как одна пара в стандартной ПЦР и в различных комбинациях в мультиплексной ПЦР. Были использованы следующие комбинации праймеров: 1-2/3-4, 3-4/5-6 и 3-4/7-8. Праймеры были получены от “Metabion” (Германия).

ПЦР-амплификации. В состав 20 мкл реакционной смеси для мультиплексной ПЦР входили: 1 × ПЦР-буфер (100 мМ трис-НСl, рН 8.8, 500 мМ КCl), 1.5 мМ MgCl₂, 200 мкМ каждого дНТФ, 0.25 мкМ каждого праймера, 1.0 ед. Taq-полимеразы и 1 мкл ДНК. Подходящая температура отжига для наших экспериментальных условий

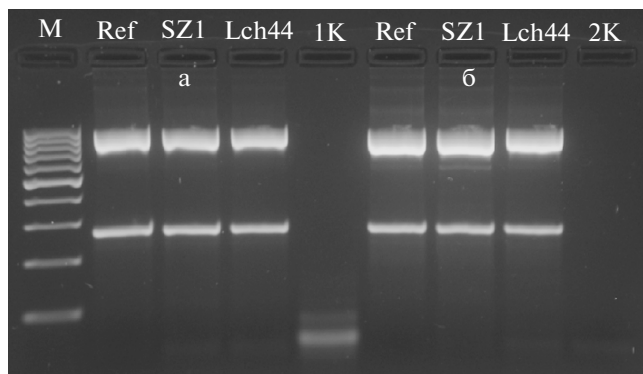


Рис. 1. Определение *P. larvae* методом мультиплексной ПЦР с помощью комбинации праймеров 1-2/3-4 (а) и 3-4/5-6 (б) в 1%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием: М – маркер (100 п.н.), Ref – контрольный штамм (NBIMCC 8478); SZ 1 и Lch 44 – “полевые” штаммы; 1К и 2К – нестандартный контроль из двух реакционных смесей.

определяется градиентом ПЦР. ПЦР-амплификацию проводили в системе Quanta Biotech QV-96 thermocycler (Англия). Процедура состояла из следующих стадий: денатурация при 94°C в течение 3 мин, затем следовали 30 циклов: денатурация при 94°C 1 мин, отжиг при 54°C 0.5 мин; наращивание ДНК при 72°C 1 мин, и завершение реакции происходит на последней стадии: наращивание 7 мин при 72°C. ПЦР-продукты (10 мкл) разделяли в 1,0%-ном геле агарозы с окрашиванием этидием бромидом (0.5 мкг/мл). Гели были визуализированы на УФ-трансиллюминаторе (ImageQuant 150, Тайвань) с помощью системы визуализации гелей. Реактивы для ПЦР – фирмы “Fermentas” (Литва).

Чувствительность и специфичность используемого протокола мультиплексной ПЦР. Чувствительность используемого протокола мультиплексной ПЦР определяли методом серийных разведений ДНК *P. larvae* (NBIMCC 8478) в пределах 120–15 нг/мкл. Специфичность реакции была протестирована также с родственными видами бактерий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для определения *P. larvae* была проведена предварительная стандартная ПЦР с одной парой праймеров на целевые гены. В качестве положительного контроля использовали ДНК из колоний эталонного штамма бактерий. Оптимизированные условия проведения ПЦР позволили получить ожидаемую длину продуктов амплификации, а затем провести эксперименты методом мультиплексной ПЦР. Одну пару праймеров всегда использовали для выявления гена 16S рРНК *P. larvae*, другую для выявления гена предшественника ме-

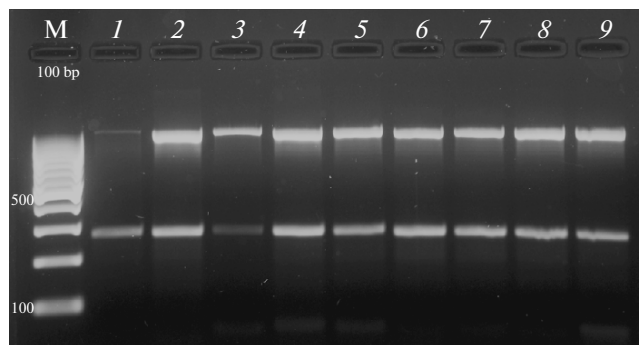


Рис. 2. Обнаружение *P. larvae* в 1%-ном агарозном геле после разделения продуктов ПЦР с комбинацией праймеров 1-2 (973 п.н.) и 3-4 (273 п.н.). М – 100 п.н. маркер; 1–9 – протестированные штаммы *P. larvae*.

таллопротеиназы (Mip). Результаты градиентной ПЦР показали, что 54°C является наиболее подходящей температурой отжига. Наилучшей комбинацией праймеров оказалась комбинация 1-2/3-4, хотя использование комбинации 3-4/5-6 также давало удовлетворительные результаты (рис. 1). Кроме того, все штаммы коллекции были протестированы с использованием праймеров 1-2 и 3-4. На рис. 2 показаны продукты ПЦР с ожидаемой длиной фрагментов, полученные с праймерами, 1-2 и 3-4. Очевидно, что фрагмент гена 16S рРНК штамма № 1 и ген Mip штамма № 3 не были амплифицированы в достаточной степени. Кроме того, необходимо принять во внимание, что концентрации ДНК в образцах варьировались от 30.8 до 143 нг/мкл.

При проведении контрольной ПЦР с родственными видами бактерий, никаких продуктов ПЦР получено не было. Предел обнаружения ДНК при использовании метода мультиплексной ПЦР был менее 15 нг/мкл.

Разработанный протокол мультиплексной ПЦР был использован для исследования гнилостной массы из сот, обработанной в соответствии со стандартной процедурой для выделения ДНК. Однако чувствительность метода оказалось низкой – только 45.2%. Именно поэтому стандартная процедура инкубации была изменена, как это описано в разделе “Методика”. Модификация привела к увеличению чувствительности используемого метода мультиплексной ПЦР до 100%. Визуализация продуктов ПЦР после электрофореза и обработки гнилостной массы была протестирована более чем на четырех системах: результаты варьировали от “едва детектируется” (1+), до “четко детектируются” ампликоны (4+). Специфичность реакции генов рРНК 16S в стандартной процедуре составила 29%, по сравнению с 100% в видоизмененной. Специфичность реак-

Таблица 2. Специфичность и чувствительность метода мультиплексной ПЦР для определения *P. larvae* в гниющей массе

ПЦР	Процедура выделения ДНК	
	стандартная	измененная
Чувствительность к амплифицированному гену	21.4%	90.5%
Чувствительность к 2 амплифицированным генам	45.2%	100%
Специфичность к 16S рРНК	29%	100%
Специфичность в гену Mlp	40.5%	90.5%

ции по отношению к гену Mlp была 40.5% и 90.5% соответственно (табл. 2). Эксперименты по выделению ДНК были проведены дважды. Результаты экспериментов с гнилой массой из сот приведены на рис. 3.

Быстрое обнаружение *P. larvae* имеет большое значение для предотвращения распространения инфекции и эффективной борьбы с ней. Кроме того, те убытки, которые терпят пчеловоды из-за распространения болезни компенсируются только на основании документа с лабораторно подтвержденным диагнозом. Наш клинический и лабораторный опыт подтверждает мнение Гиллиам [16], что во многих случаях, обнаружение *P. larvae* традиционными микробиологическими методами затруднено из-за загрязнения образца другими спорообразующими микроорганизмами, присутствующими в ульях. Именно поэтому амплификация целевых фрагментов бактериального генома все шире используется для обнаружения и диагностики [17]. К неоспоримым преимуществам ПЦР относятся также высокая специфичность, скорость выполнения анализа и хорошая воспроизводимость. Эти неоспоримые преимущества делают метод более привлекательным по сравнению со стандартным и с методами фенотипической идентификации.

При реклассификации *P. larvae* subsp. *larvae* и *P. larvae* subsp. *pulvificiens* в единый вид, анализ методом ПЦР может использоваться для более узких диагностических целей [18].

Таким образом, разработан протокол мультиплексной ПЦР для простого и быстрого обнаружения *P. larvae*, пригодный как для исследования отдельных колоний выделенных бактерий, так и гнилых масс с помощью стандартного метода ПЦР. Чтобы получить максимальную специфичность при амплификации были выбраны 2 различных гена 16S рРНК и Mlp. Комбинация праймеров 1-2/3-4 оказалась лучшей и характеризовалась отсутствием неспецифических продуктов

ПЦР, в отличие от других комбинаций, с которыми была проведена реакция мультиплексной ПЦР. Эти праймеры, специфичные для генов 16S рРНК *P. larvae*, были отобраны Гован с соавт. [19] из GenBank (accession № X60619) и ген Mlp из GenBank (№ AF111421) [11]. Амплификация фрагментов 16S рРНК и Mlp гена *P. larvae* из колоний бактерий была ранее описана в работах [11, 13], в которых использовали ступенчатую ПЦР. Результаты также показали, что одновременная амплификация двух разных генов — лучший выбор для обнаружения *P. larvae*, как это видно из рис. 2. Недостаточное количество копий одного гена может плохо визуализироваться в агарозном геле и привести к неправильной отрицательной оценке результата.

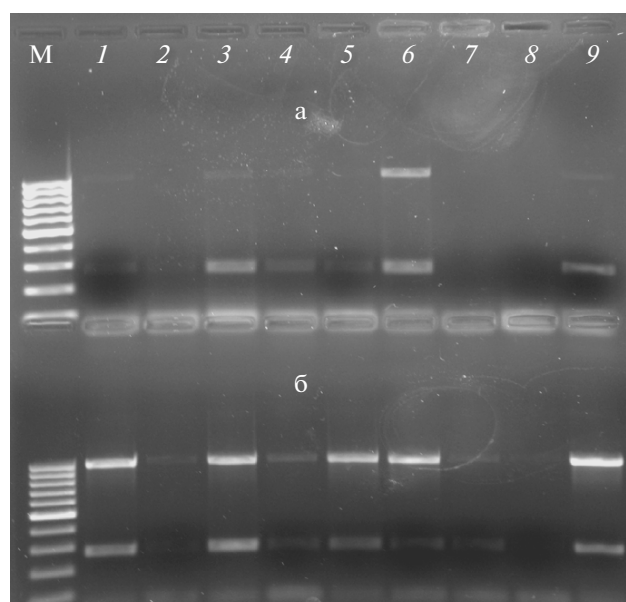


Рис. 3. Обнаружение *P. larvae* в гнилой массе с помощью стандартной (а) и модифицированной (б) процедур выделения ДНК. М — маркер (100 п.н.), 1–9 — протестированные штаммы *P. larvae*.

Разработанный протокол показал высокую чувствительность обнаружения ДНК — менее 15 нг/мкл. Комбинация праймеров 1-2/3-4 приводила к образованию продуктов амплификации ДНК исключительно из родственных видов бактерий, что подтверждено также другими исследователями [20].

Наши попытки выявления *P. larvae* в гнилостной массе сот с использованием стандартного протокола показали относительно низкую чувствительность этого метода — только 45.2%, хотя из изучаемых образцов был выделен и идентифицирован возбудитель АГ методом мультиплексной ПЦР. Этот вывод противоречит данным, приведенным в работе [12], где ампликоны предполагаемой длины были обнаружены во всех тестируемых образцах АГ. В обоих случаях образцы были собраны из ульев, где наблюдались клинические признаки АГ. Авторы протестировали 4 различные комбинации двух пар праймеров, синтезированных на основе последовательности гена 16S рНК *P. larvae*, в том числе были использованы праймеры, синтезированные Гован с соавт. [19]. Очевидно, что это требовало изменения процедуры выделения ДНК, добавления дополнительной стадии инкубации при 37°C в течение по крайней мере 1 ч перед последующим 20 мин нагреванием при 95°C, что позволит увеличить чувствительность метода PCR до 100%. Несмотря на то, что ампликоны в некоторых образцах, обработанных по измененной процедуре, были обнаружены только на уровне (1+), эти данные были подтверждены дальнейшим выделением ДНК.

Суспензия гнилостной массы содержала в основном споры, около 2.5×10^9 [21], а также остатки вегетативных клеток. Во время инкубации в богатой питательной среде, таких как CASO, проницаемость оболочки спор изменялась и активизировались метаболические процессы прорастания [22]. При таких оптимальных условиях ДНК клеток, вероятно, переживала конформационные изменения в начале цикла деления, что облегчает доступ к соответствующим генам в условиях амплификации. Хан с соавт. [23] разработали метод проведения ультрабыстрой ПЦР для обнаружения *P. larvae*, однако реакция проводилась на специальных микрочипах в системе реального времени, не всегда доступной в диагностических лабораториях. ПЦР в реальном времени как стратегия для диагностики и скрининга АГ была разработана Мартинесом с соавт. [24], однако метод дорог и не применяется во многих развивающихся странах.

Разработанные протоколы мультиплексной ПЦР могут быть успешно использованы в повседневной диагностике для быстрого обнаружения

P. larvae в гнилостной массе и выделенных бактериальных колониях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Genersch E.* // J. Verbr. Lebensm. 2008. V. 3. № 4. P. 429–434.
2. *Genersch E., Forsgren E., Pentikäinen J., Ashiralieva A., Rauch S., Kilwinski J., Fries I.* // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2006. V. 5. № 3. P. 501–511.
3. *Rauch S., Ashiralieva A., Hedtke K., Genersch E.* // Appl. Environ. Microbiol. 2009. V. 75. № 3. 10. P. 3344–3347.
4. *Bailey L., Lee D.C.* // J. Gen. Microbiol. 1962. V. 29. № 4. P. 711–717.
5. *Ellis J.D., Munn P.A.* // Bee World. 2005. V. 86. № 4. P. 88–101.
6. *Fries I., Lindström A., Korpela S.* // Vet. Microbiol. 2006. V. 114. № 3–4. P. 269–274.
7. *Hornitzky M.A.Z.* // J. Apic. Res. 1998. V. 37. № 4. P. 261–265.
8. *Lindström A., Korpela S., Fries I.* // Apidologie. 2008. V. 39. № 5. P. 1–9.
9. *Carpana E., Marocchi L., Gelmini L.* // Apidologie. 1995. V. 26. № 1. P. 11–16.
10. *Dobbelaere W., De Graaf D.C., Peeters J.E., Jacobs F.J.* // J. Apic Res. 2001. V. 40. № 1. P. 37–40.
11. *Neuendorf S., Hedtke K., Tangen G., Genersch E.* // Microbiology. 2004. V. 150. № 7. P. 2381–2390.
12. *Dobbelaere W., De Graaf D.C., Peeters J.E.* // Apidologie. 2001. V. 32. № 4. P. 363–370.
13. *Kilwinski J., Peters M., Ashiralieva A., Genersch E.* // Vet. Microbiol. 2004. V. 104. № 1–2. P. 31–42.
14. *Lauro F.M., Favaretto M., Covolo L., Rassa M., Bertoloni G.* // Int. J. Food Microbiol. 2003. V. 81. № 3. P. 195–201.
15. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. OIE Terrestrial Manual, 6th Edition, Paris. 2008. P. 395–404.
16. *Gilliam M.* // FEMS Microbiol. Lett. 1997. V. 155. № 1. P. 1–10.
17. *Vaneechoutte M., VanEldere J.* // J. Med. Microbiol. 1997. V. 46. № 3. P. 188–194.
18. *De Graaf D.C., Alippi A.M., Brown M., Evans J.D., Feldlaufer M., Gregorc A., Hornitzky M., Pernal S.F., Schuch D.M.T., Titěra D., Tomkies V., Ritter W.* // Lett. Appl. Microbiol. 2006. V. 43. № 6. P. 583–590.
19. *Govan V.A., Allsopp M.H., Davison S.* // Appl. Environ. Microbiol. 1999. V. 65. № 5. P. 2243–2245.
20. *Piccini C., D'Alessandro B., Antúnez K., Zunino P.* // World J. Microbiol. Biotechnol. 2002. V. 18. № 8. P. 761–765.
21. *Shimanuki H., Knox D.A.* Diagnosis of Honey Bee Diseases, U.S. Agriculture Handbook AH690, Beltsville, MD: US Department of Agriculture USA. 2000. 53 p.
22. *Moir A.* // J. Appl. Microbiol. 2006. V. 101. № 3. P. 526–530.
23. *Han S.H., Lee D.B., Lee D.W., Kim E.H., Yoon B.S.* // J. Invertebr. Pathol. 2008. V. 99. № 1. P. 8–13.
24. *Martnez J., Simon V., Gonzalez B., Conget P.* // Lett. Appl. Microbiol. 2010. V. 50. № 6. P. 603–610.

Development of Multiplex PCR for Fast Detection of *Paenibacillus larvae* in Putrid Masses and in Isolated Bacterial Colonies

N. V. Rusenova^a, P. Parvanov^a, and S. Stanilova^b

^a Faculty of Veterinary Medicine, Department of Veterinary Microbiology, Infectious and Parasitic diseases, Trakia University, Stara Zagora 6000, Bulgaria

^b Faculty of Medicine, Department of Molecular Biology, Trakia University, Stara Zagora 6000, Bulgaria

e-mail: n_v_n_v@abv.bg

Received January 26, 2012

Abstract—The present study was performed to develop a fast and sensitive multiplex polymerase chain reaction protocol for routine diagnostics of American foulbrood. A new approach for detection of *Paenibacillus larvae* in putrid masses was described. Forty five samples of putrid masses obtained from bee combs suspicious for American foulbrood, a reference strain *Paenibacillus larvae* (NBIMCC 8478), clinical isolates and 4 strains of closely related bacterial species were included in experiments. Bacterial colonies' DNA was isolated by heat and centrifugation method (standard procedure) and with prepGem commercial kit. DNA from putrid masses was isolated by standard and modified procedure. Three pairs of primers specific for 16S rRNA and one pair specific for 35 kDa metalloproteinase genes of *P. larvae* were tested as single pair and in different combinations as multiplex PCR. The sensitivity of the multiplex PCR protocol for putrid masses, developed in study was 100%, versus 45.2% for the standard protocol. The developed multiplex PCR protocol could be successfully used for rapid and specific detection of *Paenibacillus larvae* in both putrid masses and isolated bacterial colonies.