

Определение бактерий туляремии в образцах окружающей среды с помощью сочетания иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации

А.Г.Шевяков, И.В.Щит, С.С.Ветчинин, Р.И.Миронова, С.Г.Игнатов, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

В работе исследуется возможность сочетания методов иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации при детекции возбудителя туляремии, *Francisella tularensis*, в образцах из окружающей среды. Подобраны оптимальные условия сепарации клеток с помощью иммуномагнитных частиц, обеспечивающие экспрессность диагностики. Для детекции туляремийных клеток применяли изотермическую амплификацию с визуализацией результата с помощью флуоресцентного интеркалирующего красителя. Предложенное сочетание методов позволяет проводить ускоренную диагностику *F. tularensis* в условиях ограниченных ресурсов.

Ключевые слова: иммуномагнитные частицы, иммуномагнитная сепарация, изотермическая амплификация

Для цитирования: Шевяков А.Г., Щит И.В., Ветчинин С.С., Миронова Р.И., Игнатов С.Г., Бикетов С.Ф. Определение бактерий туляремии в образцах окружающей среды с помощью сочетания иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации. Бактериология. 2022; 7(4): 57–60. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-57-60

Detection of tularemia bacteria in environmental samples using a combination of immunomagnetic separation and isothermal amplification

A.G.Shevyakov, I.Yu.Shchit, S.S.Vetchinin, R.I.Mironova, S.G.Ignatov, S.F.Biketov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

The possibility of combining the methods of immunomagnetic separation and isothermal amplification when detecting the causative agent of tularemia *Francisella tularensis* in environmental samples was studied in this work. Optimal conditions for cell separation with the help of immunomagnetic particles were selected to rapid diagnostics. Isothermal amplification was used for the detection of tularemia cells with visualization of the result using a fluorescent intercalating dye. The proposed combination of methods allows rapid diagnosis of *F. tularensis* under resource-limited conditions.

Key words: immunomagnetic particles, immunomagnetic separation, isothermal amplification

For citation: Shevyakov A.G., Shchit I.Yu., Vetchinin S.S., Mironova R.I., Ignatov S.G., Biketov S.F. Detection of tularemia bacteria in environmental samples using a combination of immunomagnetic separation and isothermal amplification. Bacteriology. 2022; 7(4): 57–60. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-57-60

Для корреспонденции:

Шевяков Антон Георгиевич, научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов, ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 26
Телефон: (4967) 36-0003
E-mail: shevyakov@obolensk.org

Статья поступила 17.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Anton G. Shevyakov, Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 26 «Quarter A» Territory, Obolensk, Serpukhov district, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0003
E-mail: shevyakov@obolensk.org

The article was received 17.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Туляремия – зоонозная природно-очаговая особо опасная инфекция, вызываемая грамотрицательной бактерией *Francisella tularensis*. В водной среде бактерии туляремии способны выживать длительное время при температуре +4°C. Для обнаружения и идентификации *F. tularensis* применяются различные методы – биосенсоры, культивирование на селективных питательных средах, иммунохроматографический анализ, полимеразная цепная реакция (ПЦР), биочипы на жидкой или твердой основе, методы аналитической химии (газовая хроматография, масс-спектрометрия и т.д.). Наиболее часто применяемым методом обнаружения *F. tularensis* является ПЦР [1]. В настоящее время в молекулярной диагностике активно внедряются методы изотермической амплификации. Среди таких методов – loop-mediated isothermal amplification (LAMP), показавший высокую специфичность и амплификационную эффективность, которая достигается при изотермальных условиях реакции [2]. Амплификацию и детектирование гена можно осуществить за одну стадию путем инкубации смеси образцов, праймеров, ДНК-полимеразы с функцией вытеснения цепей и субстратов при постоянной температуре (около 65°C). Эффективность амплификации очень высока – в течение 15–60 мин ДНК амплифицируется 10^9 – 10^{10} раз. Из-за высокой специфичности присутствие амплифицированного продукта однозначно указывает на присутствие гена-мишени. Известно об использовании методов изотермической амплификации для выявления *F. tularensis* [3]. Основной сложностью при их использовании являются неспецифические реакции при анализе близкородственных штаммов. Эта проблема может быть решена при использовании иммуномагнитных частиц на основе высокоспецифичных моноклональных антител (МКАт).

Целью данной работы было исследование возможности сочетания методов иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации при детекции *F. tularensis*.

Материалы и методы

Бактериальные клетки

Вакцинный штамм *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ был получен из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область).

Условия культивирования

Культуры микроорганизмов выращивали при температуре 37°C на плотной питательной среде состава: эритрит-агар – 3,8%, высушенная кровь крупного рогатого скота – 1%, глюкоза – 1%, цистеин – 0,05%, тиамин хлорид – 0,0025%, pH 7,2 (ФБУН ГНЦ ПМБ, Оболенск, Московская обл.). Стандартные суспензии клеток 5×10^9 КОЕ/мл штамма *F. tularensis* 15/10 НИИЭГ готовили в забуференном физиологическом растворе (0,15 М натрия хлористого и 0,015 М калий-натриевого фосфатного буфера, pH 7,4) с использованием стандарта мутности (ОСО 42-28-85-2012, НЦЭСМП). Обеззараживание микробных клеток проводили прогреванием бактериальных суспензий на кипящей водяной бане в течение 30 мин.

Наработка моноклональных антител к возбудителю туляремии

Для наработки МКАт к липополисахариду *F. tularensis* гибридому 3F5 [4] выращивали *in vitro* в культуральных флаконах T-75 (TPP, Швейцария) на среде RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (HyClone, США) при температуре 37°C и 5% CO₂. После 4–6 суток роста культуральную жидкость с клетками гибридом центрифугировали при 500 g в течение 5 мин, осевшие клетки ресуспендировали в стерильном 0,9%-м растворе хлорида натрия до концентрации 10^6 клеток/мл и вводили по 1,0 мл внутрибрюшинно мышам линии BALB/c. Мышам за 21 сутки внутрибрюшинно вводили 0,5 мл пристана (Sigma-Aldrich, США). Через 7–10 суток после инъекции суспензии гибридом у мышей собирали асцитную жидкость, содержащую МКАт. Клетки из асцитной жидкости удаляли центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Супернатант смешивали в соотношении 1:4 с 0,1 М фосфатным буферным раствором (ФБ) pH 8,6, фильтровали через полиэфирсульфоновый фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (TPP, Швейцария). Очистку МКАт проводили с помощью аффинной хроматографии на хроматографической колонке с белок-A сефарозой MabSelectA (Cytiva, США). Колонку предварительно уравнивали ФБ, затем пропускали разведение асцита со скоростью 0,5 мл/мин. Связавшиеся иммуноглобулины элюировали 0,1 М натрий-цитратным буферным раствором pH 3,0 и гель-фильтрационной хроматографией на колонке с сефадекс G-25 (Cytiva, США) переводили в фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ) pH 7,4. Концентрацию полученных иммуноглобулинов определяли на спектрофотометре DS-11 (DeNovix, США).

Получение иммуномагнитных частиц (ИМЧ)

Для получения ИМЧ с МКАт 3F5 использовали карбоксилированные магнитные частицы (MagSphere, США). Карбоксильные группы активировали карбодиимидным методом с использованием 10 мМ 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимида и 20 мМ N-гидроксисукцинимид (Sigma, США) в 0,1 М морфолиноэтансульфоновом буферном растворе pH 5,0 с 0,05% Tween-20 (MEST). Активацию магнитных частиц проводили при комнатной температуре с постоянным перемешиванием в течение 40 мин. После промывки на магнитном штативе к частицам добавляли раствор МКАт 3F5 в MEST. Конъюгирование проводили в течение 90 мин при по-

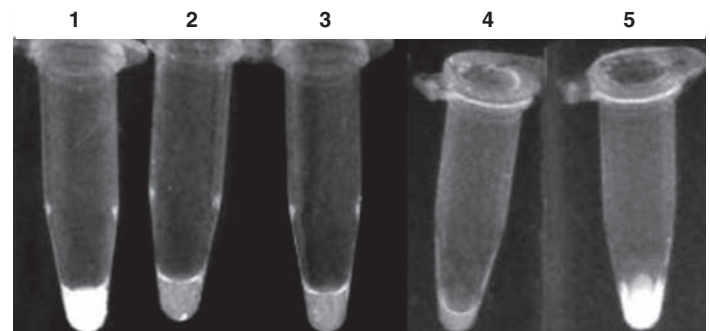


Рис. 1. Результат изотермической амплификации образцов после иммуномагнитной сепарации: 1 – 10^3 м.к. *F. tularensis*, 2 – 10^2 м.к. *F. tularensis*, 3 – 10^1 м.к. *F. tularensis*, 4 – отрицательный контроль (вода), 5 – положительный контроль (100 пг/мл ДНК *F. tularensis*).

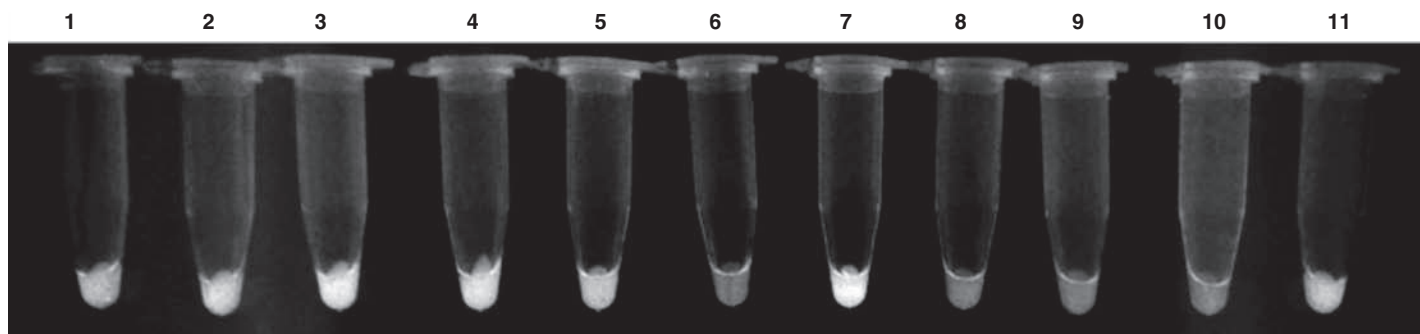


Рис. 2. Результат изотермической амплификации 10^3 м.к. *F. tularensis* в образце после иммуномагнитной сепарации: 1–3 – время иммуномагнитной сепарации 60 мин, 4–6 – 40 мин, 7–9 – 20 мин, 10 – отрицательный контроль (вода), 11 – положительный контроль (100 пг/мкл ДНК *F. tularensis*).

стоянном перемешивании. Оставшиеся реакционноспособные группы частиц инактивировали добавлением 1%-го раствора альбумина. Готовую суспензию ИМЧ промывали и переводили в ФСБ с 0,1% Triton X-100 и 0,01% азида натрия.

Иммуномагнитная сепарация

В образцы воды из природного водоема объемом 10 мл добавляли клетки *F. tularensis* в количестве от 10^6 до 10^1 микробных клеток. Приготовленные образцы фильтровали через фильтровальную бумагу и доводили pH до нейтрального добавлением 10× концентрата ФСБ. К полученным фильтратам добавляли по 50 мкл 0,25%-й суспензии ИМЧ и инкубировали с перемешиванием в течение 60 мин. Далее частицы осаждали в магнитном штативе и трижды промывали ФСБТ с осаждением на магнитном штативе. После промывки частицы ресуспендировали в 50 мкл лизирующего буферного раствора для выделения ДНК «РибоСОРБ» («Амплисенс», Россия). Для определения оптимального времени иммуномагнитной сепарации ИМЧ инкубировали с образцами в течение 60, 40 и 20 мин.

Изотермическая амплификация

Для постановки изотермической амплификации использовали набор праймеров асрFt101 [5]. Реакция LAMP проводилась в объеме 25 мкл с использованием по 0,2 μ M праймеров асрFt101-F3 и асрFt101-B3, по 1,6 μ M праймеров асрFt101-FIP и асрFt101-BIP («Синтол», Россия), 2,5 мкл 10× буферного раствора для LAMP («РусЭнзим», Россия), 1,4 мМ дНТФ («Ероген», Россия), 0,8 М бетаина (Sigma-Aldrich, США), 8 IU полимеразы Bst (NEB, США) и 5 мкл образца ДНК *F. tularensis* после иммуномагнитной сепарации. Стерильной деионизованной водой доводили объем до 25 мкл. В качестве отрицательного контроля использовали воду для инъекций, для положительного контроля – ДНК, выделенную из штамма *F. tularensis* subsp. *holarctica* 15/10 НИИЭГ. Реакция проводилась при 63°C 45 мин и останавливалась прогревом до 80°C 2 мин. Нагрев проводили в твердотельном термостате «Гном» («ДНК-технологии», Россия).

Анализ продуктов реакции LAMP

Ампликоны LAMP определяли визуально по свечению интеркалирующего красителя SYTO 82 (Invitrogen, США) при УФ-облучении в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat, Франция). О положительной реакции судили по появлению интенсивного желто-зеленого свечения.

Результаты и обсуждение

Из рис. 1 видно, что предел чувствительности метода ИМС-LAMP составил 10^3 микробных клеток *F. tularensis* при длительности иммуномагнитной сепарации 60 мин.

Уменьшение времени инкубирования образцов с ИМЧ показало, что вероятность положительного результата амплификации снижается (рис. 2). При инкубации в течение 40 мин вероятность обнаружения *F. tularensis* составила 66%, а при инкубации в течение 20 мин – 33%.

Заключение

Проведенное исследование продемонстрировало возможность сочетанного использования иммуномагнитной сепарации и изотермической амплификации для детекции *F. tularensis* в образцах воды из природного водоема. Предложенная методика позволяет провести анализ в течение 3 ч с момента отбора пробы. Полученные результаты открывают перспективы внедрения данной методики для детекции *F. tularensis* в природных образцах другого происхождения. Исследованная методика не требует высококвалифицированного персонала и сложного, дорогостоящего оборудования.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was carried out within the framework of the sectoral program of Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J Biochem Biophys Methods*. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
2. Vetchinin SS, Shevyakov AG, Khomyakov AE, Mironova RI, Mokrievich AN, Biketov SF. Development of an Immunoassay Test System Based on Monoclonal

Antybodies and Immunomagnetic Particles for the Detection of *F. tularensis* Cells. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(6):353-57. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357.

- Zasada AA, Zacharczuk K, Formińska K, Wiatrzyk A, Ziolkowski R, Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. Anal Biochem. 2018 Nov 1;560:60-66. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008
- Tatarnikov SA, Mazepa AV, Balakhonov SV. Оптимизация Nested-варианта полимеразной цепной реакции для мониторинга природных очагов туляремии. Инфекция и иммунитет. 2013;3(2):175.
- Щит ИЮ, Бикетов СФ, Дятлов ИА. Набор олигонуклеотидных праймеров Ft101 и способ определения бактерий *Francisella tularensis* (варианты). Патент RU 2703803 C1. Россия, 2019.

References

- Kaneko H, Kawana T, Fukushima E, Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. J Biochem Biophys Methods. 2007 Apr 10;70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008
- Vetchinin SS, Shevyakov AG, Khomyakov AE, Mironova RI, Mokrievich AN, Biketov SF. Development of an Immunoassay Test System Based on Monoclonal Antibodies and Immunomagnetic Particles for the Detection of *F. tularensis* Cells. Russian Clinical Laboratory Diagnostics. 2021;66(6):353-57. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-66-6-353-357.
- Zasada AA, Zacharczuk K, Formińska K, Wiatrzyk A, Ziolkowski R, Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. Anal Biochem. 2018 Nov 1;560:60-66. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008
- Tatarnikov SA, Mazepa AV, Balakhonov SV. Optimization of the Nested variant of polymerase chain Reaction for monitoring natural foci of tularemia. Russian Journal of Infection and Immunity. 2013;3(2):175. (In Russian).
- Shchit IYu, Biketov SF, Dyatlov IA. A set of Ft101 oligonucleotide primers and a method for determining *Francisella tularensis* bacteria (variants). Patent RU 2703803 C1. Russia, 2019. (In Russian).

Информация о соавторах:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Ветчинин Сергей Сергеевич, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Миронова Раиса Ивановна, научный сотрудник лаборатории микробиологии сибирской язвы ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey S. Vetchinin, PhD (Biological Sciences), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Raisa I. Mironova, Researcher, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthrax, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор
E-mail: biketov@obolensk.org

НОВЫЕ КНИГИ

Эпидемиология: учебник для мед.-проф. факультетов / под ред. Л. П. Зуевой. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2022. – 400 с.

В учебнике представлено современное изложение эпидемиологии как науки, изучающей закономерности возникновения и распространения любых патологических состояний среди людей и разрабатывающей меры борьбы с заболеваниями.

Особое внимание уделено популяционным эпидемиологическим методам, используемым для выявления причин возникновения и распространения инфекционных и неинфекционных заболеваний. Подробно рассмотрены последние методические приемы эпидемиологии (эпидемиологической диагностики), включая их практическую реализацию.

Впервые дана подробная характеристика системы эпидемиологического надзора за всеми группами заболеваний.

Учебник написан в соответствии с программой по эпидемиологии, утвержденной Минздравом России, и предназначен студентам медико-профилактических факультетов медицинских вузов.

