

# РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОБНАРУЖЕНИЯ И ИДЕНТИФИКАЦИИ ДНК ТОКСИГЕННЫХ ШТАММОВ *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* ТИПОВ А, В, Е МЕТОДОМ ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Д.С. Янов, А.В. Кузнецовский, М.Ю. Дубровин, А.В. Миронин,  
Н.В. Онучина, А.В. Филиппов

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 17.07.2018 г. Принята к публикации 15.10.2018 г.

Бактерия *Clostridium botulinum* вызывает у человека опасную токсикоинфекцию – ботулизм. Летальность при ботулизме в случаях несвоевременного обращения за медицинской помощью достигает 70% от количества заболевших. В основе патогенеза ботулизма лежит поражение центральной нервной системы токсином, продуцируемым *C. botulinum*. В настоящее время известно 7 антигенных типов такого токсина. Ботулотоксин входит в группу биологических агентов, наиболее вероятных в качестве средств биотерроризма. Так как ботулинический нейротоксин представляет собой сложный нуклеопротеиновый комплекс и следы ДНК могут быть обнаружены даже в очищенных препаратах токсина, мы разработали способ обнаружения и идентификации токсигенных штаммов *Clostridium botulinum* типов А, В, Е, наиболее часто вызывающих ботулизм у человека, основанный на выявлении остаточных количеств этой ДНК в ботулиническом токсине с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. Основным препятствием для разработки способа обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов стала высокая вариабельность генов, ответственных за синтез ботулотоксина. Нами установлен участок гена, обладающий наименьшей гомологией у всех штаммов. Этому требованию отвечал фрагмент гена *bont*, кодирующий легкую цепь нейротоксина и обладающий высокой консервативностью в пределах штаммов *C. botulinum*, продуцирующих один тип токсина. Представлены результаты по определению аналитической чувствительности и специфической активности разработанного способа. Специфичность определения составила 100%, аналитическая чувствительность метода –  $1 \times 10^2$  м.к./мл. Способ может быть использован для анализа продуктов питания, образцов клинических материалов и проб из окружающей среды, подозрительных на контаминацию токсигенными штаммами *C. botulinum*.

**Ключевые слова:** *Clostridium botulinum*; биотерроризм; ботулизм; ботулинический токсин; ген *bont*; гибридационно-флуоресцентная детекция; нуклеопротеиновый комплекс; пороговый цикл; ПЦР в реальном времени.

**Библиографическое описание:** Янов Д.С., Кузнецовский А.В., Дубровин М.Ю., Миронин А.В., Онучина Н.В., Филиппов А.В. Разработка способа обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов *Clostridium botulinum* типов А, В, Е методом ПЦР в реальном времени // Вестник войск РХБ защиты. 2018. Т. 2, № 4. С. 36–43.

Возбудитель ботулизма *Clostridium botulinum* – анаэробная подвижная грамотрицательная палочка, относящаяся к семейству *Vacillaceae*. По антигенным свойствам продуци-

руемых токсинов штаммы *C. botulinum* подразделяют на 7 типов – А, В, С, D, Е, F и G. Ботулизм у человека вызывают четыре из них – типы А, В, Е и в редких случаях F.

Ботулизм – остро протекающее тяжелое токсико-инфекционное заболевание, характеризующееся поражением центральной нервной системы, которое проявляется парезами и параличами поперечнополосатой и гладкой мускулатуры, иногда в сочетании с синдромами гастроэнтерита. Летальность при ботулизме в случаях несвоевременного обращения за медицинской помощью достигает 70% [1].

Российские санитарно-эпидемические правила СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности (опасности)» относят ботулинические токсины ко II группе патогенности. Поскольку ботулотоксины вызывают специфическое поражение не только при попадании в желудочно-кишечный тракт, но и через слизистые оболочки глаз, дыхательные пути и поврежденные кожные покровы, они рассматриваются в качестве агентов для осуществления биологических террористических актов, вероятность их использования оценивается специалистами как весьма высокая [2]. Согласно методическим рекомендациями МР 0100/3556-04-34 «Взаимодействие органов управления, учреждений и специализированных формирований при ликвидации последствий террористических актов с применением патогенных биологических агентов и опасных химических веществ», ботулотоксин входит в группу биологических агентов, наиболее вероятных в качестве средств биотерроризма. При этом в качестве первоочередных медико-биологических мер противодействия его террористическому применению отмечается необходимость «разработки недорогого метода экспресс-диагностики ботулиновых токсинов и кодирующих их генов» [3].

«Золотым стандартом» обнаружения ботулотоксинов является биологическая проба, в том числе с типоспецифическими антитоксическими сыворотками, на белых мышах, имеющая чувствительность около 1 нг. Постановка окончательного диагноза может занять несколько суток [1]. Однако из-за относительно короткого инкубационного периода (от нескольких часов до нескольких суток) и высокой летальности для эффективного лечения огромное значение имеет ранняя лабораторная диагностика. В связи с этим разработка экспресс-методов лабораторной диагностики ботулизма является весьма актуальной задачей.

ПЦР для детекции ДНК токсигенных штаммов *C. botulinum* используют достаточно давно, при этом показана высокая эффективность данного подхода [4–8]. Кроме того, поскольку ботулинические нейротоксины пред-

ставляют собой сложные нуклеопротеиновые комплексы, следы ДНК могут быть обнаружены даже в очищенных препаратах токсина и являются надежным маркером присутствия ботулотоксина в подозрительном образце [9, 10].

Ввиду этого представляется целесообразным разработать способ обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов *Clostridium botulinum* типов А, В, Е методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ).

### Материалы и методы

В работе использованы следующие штаммы микроорганизмов: *Clostridium botulinum* 234 А, *Clostridium botulinum* 506 В, *Clostridium botulinum* 516 Е, *Clostridium botulinum* 498 (атоксигенный), *Clostridium botulinum* 113 С, *Clostridium botulinum* 283 D, *Clostridium botulinum* 341 F, *Clostridium botulinum* 123 G; *Legionella pneumophila* Philadelphia 1; *Yersinia pestis* EB линии НИИЭГ; *Vibrio cholerae cholerae* 493; *Bacillus anthracis* СТИ-1; *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ; *Burkholderia mallei* Ц-5; *Burkholderia pseudomallei* С-141; *Brucella melitensis* 21; *Listeria monocytogenes* 1Сг; *Escherichia coli* 803; *Shigella sonnei* 941; *Streptococcus aureus*; *Pseudomonas fluorescens* 78Г, полученные из коллекции микроорганизмов филиала ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Минобороны России (г. Киров).

Микробные культуры штаммов возбудителей ботулизма, близкородственных и гетерологичных видов бактерий выращивали в жидких питательных средах в условиях, оптимальных для роста соответствующего вида микроорганизма. Полученные бульонные культуры переносили в центрифужные пробирки и центрифугировали при частоте вращения ротора 6000 об./мин в течение 10 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в физиологическом растворе NaCl до концентрации 10 единиц по отраслевому стандартному образцу мутности ГИСК им. Л. А. Тарасевича (ОСО 42-28-59-86П), что соответствует  $1 \times 10^9$  микробных клеток (м.к.)/мл. Затем делали 10-кратные серийные разведения подготовленных суспензий в физиологическом растворе до концентраций  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^2$  и 10 м.к./мл.

Подготовку бактериальных штаммов для выделения ДНК проводили согласно МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–II групп патогенности». Для выделения бактериальной ДНК из подготовленных суспензий бактериальных клеток и препаратов ботулинических токсинов использовали набор реагентов для выделения ДНК и РНК из клинических образцов и объектов окружающей среды (на магнитных частицах)

**Таблица 1 – Консенсусные последовательности участков генома, использованные в качестве ДНК-мишеней при разработке способа обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов *Clostridium botulinum* типов А, В, Е методом ПЦР-РВ**

Область генома	5'-3' последовательность	Размер участка, п.н.
<i>bontA</i>	TGGTTTTGAGGAGTCACTTGAAGTTGATACAAATCCTCTTTTAGGTGCAGGCCAAA TTTGCTACAGATCCAGCAGTAACATTAGCACATGAACCTATACATGCTGGACATAG ATTATATGGAATAGCAATTAATCCAAATAGGGTTTTTAAAGTAAATACTAATGCCTA TTATGAAATGAGTGGGTTAGAAGTAAGCTTTGAGGAACCTAGAACATTTGGGGG ACATGA	228
<i>bontB</i>	CAAGAAAACAAAGGCGCAAGTATATTTAATAGACGTGGATATTTTCAGATCCAGC CTTGATATTAATGCATGAACCTATACATGTTTTACATGGATTATATGGCATTAAGTA GATGATTTACCAATTGTACCAATGAAAAAATTTTTATGCAATCTACAGATGCT ATACAGGCAGAAGAACTATATACATTTGGAGGACAAGATCCCAG	215
<i>bontE</i>	ATAATGGGAGCAGAGCCTGATTTATTTGAAACTAACAGTTCCAATATTTCTCTAAG AAATAATTATATGCCAAGCAATCACCGTTTTGGATCAATAGCTATAGTAACATTCT CACSTGAATATCTTTTAGATTTAATGATAATTGTATGAATGAATTTATTCAAGATC CTGCTCTTACATTAATGCATGAATTAATACATTCATTACATGGACTATATGGGGCTA AAGGG	231

(«СИНТОЛ», Россия) в соответствии с инструкцией по применению.

Реакцию амплификации с детекцией продуктов в режиме реального времени проводили на приборе «АНК-32» («СИНТОЛ», Россия). Результаты ПЦР регистрировали по оптическим каналам R6G/Yellow (530 нм / 555 нм), Rox/Orange (585 нм/610 нм), и Fam/Green (470 нм/510 нм). Для детекции продуктов амплификации использовали зонды в формате TaqMan Assay.

Дизайн праймеров и зондов к подобранным ДНК-мишеням осуществляли с использованием программного обеспечения «Primer Express» («Applied Biosystems», США). Предварительную оценку специфичности праймеров, ампликонов и зондов проводили с помощью on-line программы «BLAST».

Оптимизацию условий проведения ПЦР-РВ проводили по температуре отжига праймеров, концентрации в реакционной смеси праймеров, зондов и ионов Mg<sup>2+</sup>.

### Результаты и обсуждение

Анализ баз данных секвенированных генетических последовательностей штаммов *C. botulinum* показал высокую вариабельность генов, ответственных за синтез ботулотоксина. В связи с этим существующие методы, основанные на ПЦР, не всегда позволяют надежно идентифицировать все штаммы в пределах каждого типа ботулотоксина.

При разработке ПЦР-методов для индикации и идентификации возбудителей опасных инфекций в качестве маркерных чаще всего используют генетические детерминанты, являющиеся высокоспецифичными и консервативными для данного вида бактерий и отсутствующие у близкородственных микроорганизмов. Очевидно, что в случае с токсигенными штаммами *C. botulinum* при выборе генетических маркеров

был рассмотрен кластер генов, ответственный за синтез белкового комплекса ботулотоксина (*bont*, *ntnt*, *botR*, *ha70*, *ha17* и др.) [11]. При этом особое внимание было уделено гену *bont*, определяющему тип продуцируемого токсина и являющегося естественным генетическим маркером при выборе праймеров. Нуклеотидные последовательности генов *bontA*, *bontB*, *bontC*, *bontD*, *bontE*, *bontF* и *bontG* были проанализированы с применением приложения «MegAlign» программы «Lasergene» («DNASTAR», США). Основной задачей было установить участок гена, обладающий наименьшей гомологией у всех штаммов. Этому требованию отвечал фрагмент гена *bont*, кодирующий легкую цепь нейротоксина и обладающий высокой консервативностью в пределах штаммов *C. botulinum*, продуцирующих один тип токсина [8]. Консенсусные последовательности участков генов *bontA*, *bontB* и *bontE* *C. botulinum*, использованные в качестве ДНК-мишеней, представлены в таблице 1.

Выбранные олигонуклеотидные праймеры и зонды представлены в таблице 2.

На первом этапе были проведены моноплексные ПЦР для каждого канала детекции отдельно с целью определения оптимального диапазона флуоресцентного сигнала, достаточного для детекции специфической флуоресценции и не перекрывающегося с сигналами других детектируемых каналов, а также выбора программы амплификации и соотношения концентрации праймеров и зонда в каждой реакционной смеси, не дающих повышенной фоновой флуоресценции.

При подборе оптимальных условий проведения ПЦР-РВ как в моно-, так и в мультиплексном формате определяли следующие параметры реакции: состав реакционной смеси – концентрация праймеров, зондов, Taq-полимеразы, ионов Mg<sup>2+</sup>; программу амплификации – температура отжига праймеров, продолжительность

**Таблица 2 – Структура праймеров и зондов для индикации и типирования штаммов *C. botulinum* с помощью ПЦР-РВ**

Название	Последовательность	Размер, нуклеотидов
BotA-F	TGG-TTT-TGA-GGA-GTC-ACT-TGA-A	22
BotA-R	TCA-TGT-CCC-CCA-AAT-GTT-CT	20
BotB-F	CAA-GAA-AAC-AAA-GGC-GCA-AG	20
BotB-R	CTG-GGA-TCT-TGY-CCT-CCA-AA	20
BotE-F	ATA-ATG-GGA-GCA-GAG-CCT-GA	20
BotE-R	CCC-TTT-AGC-CCC-ATA-TAG-TCC	21
BotA-Z	(R6G)TG-CAG-GCA-AAT-TTG-CTA-CAG-ATC-CA(BHQ2)	25
BotB-Z	(ROX)CG-TGG-ATA-TTT-TTC-AGA-TCC-AGC-CTT-G(BHQ2)	27
BotE-Z	(FAM)TG-CCA-AGC-AAT-CAC-GGT-TTT-GG(RTQ1)	22

**Таблица 3 – Аналитическая чувствительность мультиплексной ПЦР-РВ**

Концентрация, м.к./мл	Значения Ct (пороговый цикл) по детектируемым каналам (зонд):		
	R6G (BotA-Z)	ROX (BotB-Z)	FAM (BotE-Z)
1×10 <sup>5</sup>	16,1	14,3	19,8
1×10 <sup>4</sup>	22,2	20,4	22,7
1×10 <sup>3</sup>	25,5	24,3	27,4
1×10 <sup>2</sup>	32,0	31,0	32,0
10	-	-	-

*Примечание*  
«-» – сигнал отсутствует.

каждого шага цикла амплификации, количество циклов, длительность предварительной денатурации. Далее, используя данные, полученные при проведении моноплексных реакций, был подобран состав реакционной смеси для мультиплексной ПЦР-РВ, обеспечивающий стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналу детекции (Orange, Green или Yellow), не приводящее к искажению сигнала по другим каналам.

Оптимизированный состав реакционной смеси включал следующие компоненты: 10× Taq буфер без ионов Mg<sup>2+</sup> («СибЭнзим», Россия) – конечная концентрация 1×; 50 мМ раствор MgCl<sub>2</sub> – конечная концентрация 3,5 мМ; 5 мМ раствор dNTP – конечная концентрация каждого 0,2 мМ; смесь праймеров – конечная концентрация каждого 0,5 мкМ; смесь зондов – конечная концентрация каждого 200 нМ; Taq ДНК-полимераза – конечная концентрация 0,25 ед. активности/мкл; вода для ПЦР.

Оптимальную температуру отжига праймеров определяли постановкой ПЦР-РВ с десятикратными разведениями положительных контрольных образцов с градиентом температур отжига: 50, 53, 55, 59, 62 и 65 °С. Как моноварианты постановки ПЦР-РВ, так и постановка ПЦР-РВ в мультиплексном формате показали наибольшую чувствительность определения ДНК-мишени в реакционной смеси при температуре отжига праймеров 60 °С. В дальнейшей работе приме-

няли оптимизированный температурно-временной протокол проведения реакции амплификации, состоящий из денатурации при температуре 95 °С в течение 5 мин и 45 циклов, каждый из которых включает денатурацию ДНК при температуре 94 °С в течение 10 с, отжиг праймеров при температуре 60 °С в течение 25 с, синтез комплементарной цепи при температуре 72 °С в течение 25 с.

Учет флуоресцентного сигнала проводят при температуре 60 °С. Были установлены следующие значения пороговой линии: по каналу Orange – 0,015; по каналу Green – 0,02, по каналу Yellow – 0,07. На основании проведенных исследований определена максимальная величина порогового цикла (Ct), при котором результат реакции считается положительным: для Green – <32, для Yellow – <31 и для Orange – <32. Учет результатов осуществляли по каждому каналу отдельно.

Все качественные и количественные характеристики экспериментальной тест-системы адаптированы для прибора «АНК-32» («СИНТОЛ», Россия).

Результаты оценки аналитической чувствительности ПЦР-РВ для идентификации ДНК токсигенных штаммов *C. botulinum* типов А, В, Е, которую определяли с использованием препаратов ДНК, выделенных из десятикратных разведений подготовленных бактериальных суспензий, представлены в таблице 3.

Таблица 4 – Специфичность мультиплексной ПЦР-РВ

Штамм микроорганизма	Наличие сигнала по детектируемым каналам (зонд):		
	R6G (BotA-Z)	ROX (BotB-Z)	FAM (BotE-Z)
<i>Clostridium botulinum</i> 234 A	+	-	-
<i>Clostridium botulinum</i> 506 B	-	+	-
<i>Clostridium botulinum</i> 516 E	-	-	+
<i>Clostridium botulinum</i> 498 (атоксигенный)	-	-	-
<i>Clostridium botulinum</i> 113 C	-	-	-
<i>Clostridium botulinum</i> 283 D	-	-	-
<i>Clostridium botulinum</i> 341 F	-	-	-
<i>Clostridium botulinum</i> 123 G	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1	-	-	-
<i>Yersinia pestis</i> EB линии НИИЭГ	-	-	-
<i>Vibrio cholerae cholerae</i> 493	-	-	-
<i>Bacillus anthracis</i> СТИ-1	-	-	-
<i>Francisella tularensis</i> 15 НИИЭГ	-	-	-
<i>Burkholderia mallei</i> Ц-5	-	-	-
<i>Burkholderia pseudomallei</i> C-141	-	-	-
<i>Brucella melitensis</i> 21	-	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> 1Ст	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> 803	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> 941	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i> 78Г	-	-	-

Экспериментальную оценку специфичности обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов *C. botulinum* производили относительно близкородственных и гетерологичных видов микроорганизмов. Специфичность определяли по отсутствию ложноположительных и ложноотрицательных результатов реакции амплификации исследуемой ДНК в концентрации  $1 \times 10^7$  КОЕ/мл в ПЦР. Результаты оценки специфичности представлены в таблице 4.

При проведении ПЦР-РВ наблюдалось стабильное нарастание уровня флуоресценции по каналам R6G/Yellow, Rox/Orange, и Fam/Green с ДНК всех исследованных токсигенных штаммов *C. botulinum* типов А, В, Е соответственно (рисунок 1). Перекрестных неспецифических реакций с близкородственными и гетерологичными видами бактерий не выявлено. Флуоресценция в этих образцах не превышала уровень фона на трех каналах детекции. Характеристики разработанного способа соответствуют предъявляемым требованиям: специфичность составила 100%, аналитическая чувствительность –  $1 \times 10^2$  м.к./мл.

Таким образом, разработан способ обнаружения и идентификации ДНК токсигенных штаммов *C. botulinum* типов А, В, Е методом мультиплексной ПЦР-РВ. Показана возможность

использования разработанного способа для анализа проб, подозрительных на присутствие в них возбудителя ботулизма. На основе разработанного способа целесообразно создание тест-системы, позволяющей проводить экспрессные дифференциально-диагностические исследования образцов клинического материала или проб из объектов окружающей среды.

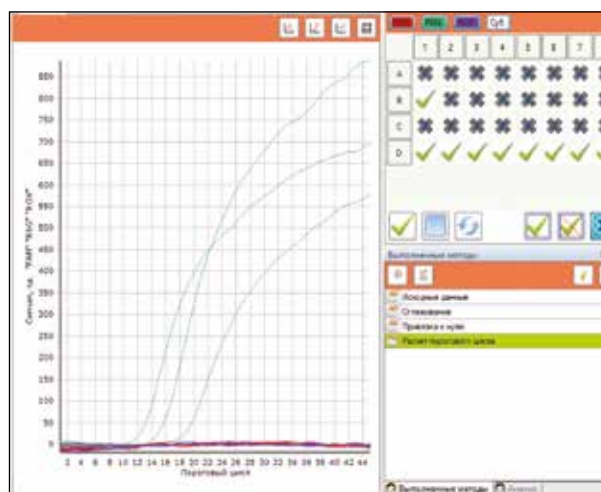


Рисунок 1 – График накопления продуктов амплификации в ПЦР-РВ по каналам R6G/Yellow, Rox/Orange и Fam/Green

**Информация о конфликте интересов**

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

**Сведения о рецензировании**

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

**Список источников**

1. Инфекционные болезни: национальное руководство / Под ред. Ющука Н.Д., Венгерова Ю.Я. М.: 2009.
2. Супотницкий М.В. Биологическая война. Введение в эпидемиологию искусственных эпидемических процессов и биологических поражений: монография. М.: 2013.
3. Взаимодействие органов управления, учреждений и специализированных формирований при ликвидации последствий террористических актов с применением патогенных биологических агентов и опасных химических веществ МР 0100/3556-04-34 М., 2004. 42 с.
4. Campbell K.D., Collins M.D., East A.K. Gene probes for identification of the botulinum neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E, and F // J. Clin. Microbiol. 1993. V. 31. № 9. P. 2255–2262.
5. Dahlenborg M., Borch E., Radstrom P. Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 10. P. 4781–4788.
6. Fach P., Gibert M., Griffais R., Guillou J.P., Popoff M.R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 1. P. 389–392.
7. Akbulut D., Grant K.A., McLauchlin J. Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism // Foodborne Pathog Dis. 2004. V. 1. № 4. P. 247–257.
8. Hill B.J., Skerry J.C., Smith T.J., Arnon S.S., Douek D.C. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes // BMC Microbiology. 2010. № 10. P. 267–304. DOI:10.1186/1471-2180-10-267.
9. Kitamura M., Sakaguchi S., Sakaguchi G. Purification and some properties of *Clostridium botulinum* type-E toxin // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 168. № 2. P. 207–217.
10. Kozaki S., Sakaguchi S., Sakaguchi G. Purification and some properties of progenitor toxins of *Clostridium botulinum* type B // Infect. Immun. 1974. V. 10. № 4. P. 750–756.
11. Hill K.K., Xie G., Foley B.T., Smith T.J. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins // Toxicon. 2015. V. 107. P. 2–8. DOI: 10.1016.

**Об авторах**

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г.Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

*Янов Дмитрий Сергеевич.* Младший научный сотрудник, канд. биол. наук.

*Кузнецовский Андрей Владимирович.* Заместитель начальника центра, канд. биол. наук.

*Дубровин Михаил Юрьевич.* Старший научный сотрудник, канд. мед. наук.

*Миронин Александр Викторович.* Ведущий научный сотрудник, д-р мед. наук., проф.

*Онучина Наталья Викторовна.* Младший научный сотрудник, канд. биол. наук.

*Филиппов Алексей Владимирович.* Заместитель начальника научно-исследовательского отдела – начальник группы, канд. мед. наук.

**Контактная информация для всех авторов:** 23527@mil.ru

**Контактное лицо:** Янов Дмитрий Сергеевич; 23527@mil.ru

## DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR DNA DETECTION AND IDENTIFICATION OF TOXIGENIC STRAINS OF *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYPES A, B, E BY THE REAL-TIME PCR METHOD

D.S. Yanov, A.V. Kuznetsovskiy, M.I. Dubrovin,

A.V. Mironin, N.V. Onuchina, A.V. Filippov

*Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation*

Botulism is dangerous toxic infection caused by a toxin produced by the bacterium *Clostridium botulinum*. The mortality rate from botulism can reach 70% of all cases of illness in case of untimely initiation of treatment. The pathogenesis of botulism involves the damage to the central nervous system by a toxin produced by *C. botulinum*. Currently there are seven recognized antigenic types of this toxin. Botulinum toxin is included into the group of biological agents and it is one of the most likely agents to be used in a biological attack. Since botulinum neurotoxin is a complex nucleoprotein complex and the traces of DNA can be detected even in purified toxin preparations, we have elaborated a technique for detecting and identifying DNA of toxigenic strains of *Clostridium botulinum* types A, B, E, that cause human botulism in most cases. This technique is based on the detection of residual amounts of this DNA in botulinum toxin using multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) assay with fluorescent hybridization detection. The main obstacle to development of a technique for the detection and identification of DNA of toxigenic strains is the high variability of the genes responsible for the synthesis of botulinum toxin. We have established a region of the gene with the lowest homology in all strains. This requirement is met by a fragment of the bont gene that encodes a light chain of a neurotoxin and is highly conserved in the strains of *C. botulinum* producing one type of toxin. The paper represents the results of the definition of analytical sensitivity and specific activity of the developed method. The specificity of the determination is 100%, the analytical sensitivity –  $1 \times 10^2$  mc./ml. The method can be used to analyze food, samples of clinical materials and environmental samples suspected of being contaminated with toxigenic strains of *C. botulinum*.

**Keywords:** *Clostridium botulinum*; bioterrorism; botulism; botulinum toxin; bont gene; fluorescent hybridization detection; nucleoprotein complex; threshold cycle; Real Time PCR.

**For citation:** Yanov D.S., Kuznetsovskiy A.V., Dubrovin M.I., Mironin A.V., Onuchina N.V., Filippov A.V. Development of a technique for DNA detection and identification of toxigenic strains of *Clostridium botulinum* types A, B, E by the Real-Time PCR method // *Journal of NBC Protection Corps*. 2018. V. 2 № 4. P. 36–43.

### **Conflict of interest statement**

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

### **Peer review information**

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

### References

1. Infectious diseases: national leadership / Ed. Yuschuk N.D., Vengerov Yu.Ya. M.: GEOTAR-Media, 2009. 1056 c. (in Russian).
2. Supotnitsky M.V. Biological warfare. Introduction to the epidemiology of artificial epidemic processes and biological lesions: monograph. M.: 2013. (in Russian).
3. Interaction of management bodies, institutions and specialized formations in the elimination of consequences of terrorist acts with the use of pathogenic biological agents and hazardous chemical substances MP 0100/3556-04-34 M., 2004. 42 c. (in Russian).
4. Campbell K.D., Collins M.D., East A.K. Gene probes for identification of the botulinum neurotoxin gene and specific identification of neurotoxin types B, E, and F // J. Clin. Microbiol. 1993. V. 31. № 9. P. 2255–2262.
5. Dahlenborg M., Borch E., Radstrom P. Development of a combined selection and enrichment PCR procedure for *Clostridium botulinum* types B, E, and F and its use to determine prevalence in fecal samples from slaughtered pigs // Appl. Environ. Microbiol. 2001. V. 67. № 10. P. 4781–4788.
6. Fach P., Gibert M., Griffais R., Guillou J.P., Popoff M.R. PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples // Appl. Environ. Microbiol. 1995. V. 61. № 1. P. 389–392.
7. Akbulut D., Grant K.A., McLauchlin J. Development and application of Real-Time PCR assays to detect fragments of the *Clostridium botulinum* types A, B, and E neurotoxin genes for investigation of human foodborne and infant botulism // Foodborne Pathog. Dis. 2004. V. 1. № 4. P. 247–257.
8. Hill B.J., Skerry J.C., Smith T.J., Arnon S.S., Douek D.C. Universal and specific quantitative detection of botulinum neurotoxin genes // BMC Microbiology. 2010. № 10. P. 267–304. DOI:10.1186/1471-2180-10-267.
9. Kitamura M., Sakaguchi S., Sakaguchi G. Purification and some properties of *Clostridium botulinum* type-E toxin // Biochim. Biophys. Acta. 1968. V. 168. № 2. P. 207–217.
10. Kozaki S., Sakaguchi S., Sakaguchi G. Purification and some properties of progenitor toxins of *Clostridium botulinum* type B // Infect. Immun. 1974. V. 10. № 4. P. 750–756.
11. Hill K.K., Xie G., Foley B.T., Smith T.J. Genetic diversity within the botulinum neurotoxin-producing bacteria and their neurotoxins // Toxicon. 2015.V. 107. P. 2–8. DOI: 10.1016.

### Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation.

*Yanov Dmitry Sergeevich.* Junior Researcher. Candidate of Biological Sciences.

*Kuznetsovskiy Andrey Vladimirovich.* Deputy Head of the Centre. Candidate of Biological Sciences.

*Dubrovin Mikhail Yuryevich.* Senior Researcher. Candidate of Medical Sciences.

*Mironin Aleksandr Viktorovich.* Leading Researcher. Doctor of Medical Sciences, Professor.

*Onuchina Natalya Viktorovna.* Junior Researcher. Candidate of Biological Sciences.

*Filippov Aleksey Vladimirovich.* Deputy Head of the Scientific Research Department – Head of the Group of the Scientific Research Department. Candidate of Medical Sciences.

**Contact information for all authors:** 23527@mil.ru

**Contact person:** Yanov Dmitriy; 23527@mil.ru