

УДК 619:616.98-076:
579.852.11:577.2.08:602.643
© 2026

РОЗРОБЛЕННЯ ТЕСТ-СИСТЕМИ НА ОСНОВІ КІЛЬКІСНОЇ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ГЕНЕТИЧНОГО МАТЕРІАЛУ ЗБУДНИКА СИБІРКИ

*О.В. Білоїван¹, Т.Б. Дідик²,
А.І. Завгородній³, А.П. Палій⁴, Ю.К. Дунаєв⁵*

^{1, 2, 5}кандидати ветеринарних наук

³доктор ветеринарних наук, професор, член-кореспондент НААН

⁴доктор ветеринарних наук, професор

Національний науковий центр

«Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»

Національної академії аграрних наук України

вул. Г. Сковороди, 83, м. Харків, 61023, Україна

³Національна академія аграрних наук України

вул. Михайла Омеляновича-Павленка, 9, м. Київ, 01010, Україна

e-mail: ¹Silverscreen91@gmail.com, ²didykmicr@ukr.net,

³Andrii.I.Zavgorodnii@gmail.com, ⁴paliy.dok@gmail.com, ⁵dunaev1975@gmail.com

ORCID: ¹0000-0002-9973-4551, ²0000-0002-1976-7426,

³0000-0003-3563-0478, ⁴0000-0002-9193-3548, ⁵0000-0001-7378-430X

Надійшла 28.01.2026. Рецензована 18.02.2026. Прийнята до друку 17.04.2026

Мета. Розробити вітчизняну тест-систему для детекції ДНК збудника сибірки *Bacillus anthracis* у біологічному матеріалі та пробах із довкілля на основі кількісної полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) із використанням рекомбінантних контрольних зразків. **Методи.** Дослідження проводили у 2024 – 2025 рр. на базі Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» НААН із застосуванням молекулярного тимін-аденінового клонування (для виготовлення рекомбінантних контрольних зразків) і полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу (для визначенням чутливості та специфічності тест-системи). **Результати.** Сконструйовано рекомбінантний позитивний контрольний зразок, що містить специфічний хромосомний маркер *dhpb1*, а також внутрішній контрольний зразок, який дає змогу виявити інгібітори реакції та запобігає отриманню хибнонегативних результатів. Обидва компоненти інтегровано до складу експериментальної тест-системи *Anthrax DNA-test*, здатної детектувати хромосомний і плазмідні маркери збудника. Тест-система стабільно виявляє ДНК *Bacillus anthracis* у широкому діапазоні концентрацій, не реагує на гетерологічні зразки та демонструє повну відтворюваність результатів у разі повторних досліджень. За основними аналітичними характеристиками вона відповідає міжнародним вимогам до діагностичних засобів. **Висновки.** Створено й апробовано експериментальний набір компонентів для проведення надійної детекції

збудника сибірки методом кількісної ПЛР із використанням рекомбінантних контрольних зразків. Запропонована тест-система є перспективною для впровадження у практику лабораторної діагностики, забезпечує можливість підвищення ефективності епізоотичного нагляду в Україні.

Ключові слова: полімеразна ланцюгова реакція, рекомбінантний контроль, сибірка, тест-система, хромосомний маркер, *Bacillus anthracis*.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202604-08>

Сибірка — дуже небезпечне зооантропонозне захворювання, збудником якого є бактерія *Bacillus anthracis*. Ця бактерія являє собою грампозитивну спороутворюючу паличку та водночас факультативний анаероб [1–3]. Залежно від механізму передачі інфекції вона може викликати шкірну, шлунково-кишкову або легеневу форми сибірки [4]. Спори *B. anthracis* можуть залишатися життєздатними у ґрунті протягом десятиліть [5]. У разі попадання до організму спори переходять у вегетативну форму і розмножуються, призводячи тим самим до розвитку захворювання. Ключовими факторами, які зумовлюють вірулентність *B. anthracis*, є здатність цього збудника до токсинування і формування в організмі господаря капсули, що захищає мікробну клітину від фагоцитозу. Гени, які відповідають за утворення капсули, розташовані на плазміді *pXO2*, тоді як синтез токсинів контролюють гени плазміді *pXO1*. Обидві плазміді разом із хромосомою формують геном збудника сибірки [6].

Поряд із традиційними бактеріологічними та серологічними методами для експрес-діагностики сибірки повсюдно застосовують класичну полімеразну ланцюгову реакцію та ПЛР у реальному часі (кількісну). На сьогодні фахівці Національного наукового центру «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини» (ННЦ «ІЕКВМ») активно розробляють та застосовують у лабораторній діагностиці рекомбінантні позитивні контрольні зразки для дослідження методом ПЛР. Зокрема, отримано рекомбінантні позитивні контрольні зразки

p-pagA-TZ57R/T та *p-capC-TZ57R/T*, специфічність яких була підтверджена за допомогою ПЛР у режимі реального часу та секвенування. Вони цілком придатні до використання в діагностичних лабораторіях ветеринарної медицини [7, 8]. Крім того, за результатами напрацювань попередніх років фахівці ННЦ «ІЕКВМ» уже проводили випробування прототипу діагностичного засобу для виявлення генетичного матеріалу збудника сибірки [9]. Окрім згаданих позитивних контрольних зразків для виявлення генетичного матеріалу плазмід *B. anthracis*, у попередніх дослідженнях використовували позитивний контрольний зразок *p-dhp61-CR2.1-TOPO* для виявлення хромосомного маркера збудника сибірки, розроблений авторами праці [10] і люб'язно наданий колегами з Інституту мікробіології Бундесверу. Однак позитивного контрольного зразка вітчизняної розробки для виявлення ДНК хромосоми цього патогену не було.

Застосування тест-систем для проведення ПЛР дає змогу значно спростити та прискорити процедуру проведення аналізу в умовах діагностичної лабораторії. Проте складність створення високоспецифічного діагностичного засобу полягає у високому ступені гомології збудника сибірки з іншими представниками роду *Bacillus*. Крім того, в Україні поки що немає ефективного вітчизняного ПЛР-діагностикуму для виявлення генетичного матеріалу *Bacillus anthracis*. Донедавна українські діагностичні лабораторії мали у своєму розпорядженні тест-системи російських виробників, однак нині

використовують іноземні аналоги від виробників із США та ЄС, застосування яких є досить дорогим з огляду на високу собівартість реактивів, що входять до складу цих наборів, а також на витрати, пов'язані з їх транспортуванням.

Мета досліджень — створити вітчизняну тест-систему на основі кількісної ПЛР, призначену для виявлення генетичного маркера збудника сибірки *B. anthracis*.

Матеріали та методи досліджень. Дослідження виконували на базі лабораторії молекулярної епізоотології, діагностики та генетики мікроорганізмів ННЦ «ІЕКВМ». Секвенування отриманих ділянок фрагментів проводили в Інституті мікробіології Бундесверу (Мюнхен, Німеччина).

Рекомбінантний позитивний контрольний зразок для виявлення хромосомного маркера *dhp61* збудника сибірки було отримано з використанням методу молекулярного тимін-аденового (ТА) клонування за допомогою компетентних клітин *E. coli* зі штаму DH5α [11]. Для отримання цих клітин використовували методику, описану в праці [12].

Як матрицю використовували геномну ДНК *B. anthracis* штаму Ames 3013, що була надана німецькими партнерами з Інституту мікробіології Бундесверу та зберігається в колекції лабораторії молекулярної діагностики ННЦ «ІЕКВМ». Процедура молекулярного ТА-клонування виконували із застосуванням комерційного набору InsTAclone™ PCR Cloning Kit (#K1214) виробництва фірми Thermo Scientific, США. Перед початком процедури проводили ПЛР зі зразком ДНК збудника сибірки, використовуючи праймерну систему *dhp61* [10] (*dhp61* forward: 5'CGTAAGGA CAATAAAAGCCGTTGT; *dhp61* reverse: 5'CGATACAGACATTTATTGGGAAC TACAC; *dhp61* probe: 5'-6FAM-TGCAAT CGATGAGCTAATGAACAATGA CCCT-TMR), з такими температурно-часовими параметрами:

95°C — 5 хв	} 40 циклів.
95°C — 15 с	
55°C — 20 с	
72°C — 40 с	
72°C — 1 хв	

Далі проводили горизонтальний гелелектрофорез із застосуванням камери Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System та транслюмінатора Gel Doc Imaging System Universal Hood III (BioRad, США). Очищення амплікона після електрофорезу здійснювали за допомогою комерційного набору Thermo Scientific GeneJET Gel Extraction Kit (#K0691, #K0692). Концентрацію ДНК в очищених ампліконах визначали із застосуванням спектрофотометра Nanodrop DS-11 фірми DeNovix.

Для вбудовування ДНК з амплікона в плазмідну використовували реанти з комерційних наборів Thermo Scientific InsTAclone PCR Cloning Kit (#K1213, #K1214) згідно з інструкцією виробника. Отриманими плазмідними конструкціями трансформували компетентні клітини *E. coli* штаму DH5α за температури 42 °C протягом 40 с. Трансформовані клітини інкубували впродовж 1 год у С-середовищі й пересівали в чашки Петрі на LB-середовище з ампіциліном в концентрації 50 мкг/мл. На поверхню середовища попередньо наносили IPTG (ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид) та X-gal (5-бромо-4-хлоро-3-індоліл-β-D-галактопіранозид) — по 0,8 мг/мл кожної речовини. Після нічної інкубації чашок за температури 37 °C було відібрано 10 білих колоній, які перевіряли на наявність плазмідної ДНК за допомогою ПЛР, яку проводили відповідно до зазначених вище температурно-часових параметрів. Після того як було встановлено, що колонії містять плазмідну, бактерії з цих колоній підрощували в LB-середовищі з ампіциліном (50 мкг/мл). З підрощеної культури було виконано екстракцію плазмід за допомогою комерційного набору Thermo

Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit (#K0502). Проведення ПЛР із виділеними плазмідними ДНК здійснювали з використанням праймерів *M13* для очищення необхідного фрагмента ДНК від плазміди [13]. Безпосередньо перед проведенням реакції готували зразок, загальна кількість якого становила 50 мкл. Після проведення ПЛР частину отриманого амплікона (5–10 мкл) вносили в лунки агарозного гелю в трис-ацетатному буфері для виконання горизонтального гелелектрофорезу. Решту амплікона очищали від інгібіторів за допомогою комерційного набору Monarch® PCR & DNA Cleanup Kit.

Концентрацію ДНК в очищеному продукті визначали спектрофотометром Nanodrop DS-11 фірми DeNovix за довжини хвилі 340 нм. Кількість копій досліджуваної послідовності нуклеотидів *N* в 1 мкл зразка розраховували за формулою

$$N = \frac{A \cdot 6,022 \times 10^{23}}{B \cdot 1 \times 10^9 \cdot 660},$$

де *A* — вихідна концентрація ДНК у продукті (нг/мкл); *B* — довжина досліджуваного фрагмента ДНК, пар нуклеотидів (п.н.).

Щоб отримати внутрішній контрольний зразок *qPCR IC*, який використовують під час проведення ПЛР для уникнення хибнонегативних результатів, було виконано молекулярне клонування плазміди з фрагментом гена *GFP* [14]. Для синтезу фрагмента довжиною 176 п.н. використовували систему праймерів *EGFP-1-F/10-R* та зонд *EGFP-HEX* [15]. Матрицею для синтезу слугувала плазміда з комерційного набору Qiagen Intype IC-DNA.

ПЛР проводили за таким протоколом (з розрахунку на одну пробу): Amplitaq Gold полімераза (Applied biosystems) 1,25 U/50 мкл — 0,13 мкл, PE-буфер 1X — 2,5 мкл, суміш dNTP 0,2 мМ — 0,5 мкл, MgCl₂ 1,5 мМ — 1,5 мкл, праймер *EGFP-1-F-1* — 10 пМ, H₂O довести до кінцевого об'єму 20 мкл. Ампліфікацію проводили за визначеним температурним профілем:

$$\left. \begin{array}{l} 95^\circ\text{C} \text{ — } 5 \text{ хв} \\ 95^\circ\text{C} \text{ — } 15 \text{ с} \\ 58^\circ\text{C} \text{ — } 30 \text{ с} \\ 60^\circ\text{C} \text{ — } 30 \text{ с} \end{array} \right\} 40 \text{ циклів.}$$

Процедуру молекулярного клонування здійснювали за тим самим принципом, що і за отримання рекомбінантного позитивного контрольного зразка. З метою визначення чутливості та специфічності, повторюваності та відтворюваності методу дослідні зразки випробовували за допомогою ПЛР у режимі реального часу, що давало змогу виявити ДНК сибірки із застосуванням експериментального набору тест-системи *Anthrax DNA test*. Використовували: отримані раніше плазмідні зразки ДНК *p-dhp61-TZ57R/T*, рекомбінантні позитивні зразки *p-pagA-TZ57R/T* та *p-capC-TZ57R/T* (для виявлення ДНК плазмід збудника сибірки *pXO1* та *pXO2* відповідно) у різних розведеннях (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000) [7, 8], а також негативні зразки (деіонізовану воду).

Реакційну суміш для проведення ПЛР у реальному часі готували із розрахунку: кількість випробуваних зразків плюс один зразок за схемою, поданою в табл. 1.

1. Реакційна суміш для виконання ПЛР у реальному часі

Компонент	Остаточна концентрація	Кількість компонентів на реакцію, мкл
RT-PCR MasterMix	1 × 200 нмоль	18,5
Суміш розчинів праймерів і зонда для детекції маркерів <i>dhp61</i> , <i>pagA</i> та <i>capC</i>	1 × 200 нмоль	1,5
ДНК (досліджуваний або контрольний зразок)	1 × 200 нмоль	5

З метою визначення видової специфічності тест-системи було використано гетерологічні зразки ДНК патогенних бактерій і вірусів, що спричиняють захворювання з клінічною картиною,

подібною до тієї, що спостерігається під час захворювання на сибірку (табл. 2).

Для визначення відтворюваності результатів, отримуваних під час застосування тест-системи на основі ПЛР,

2. Гетерологічна панель, використана для визначення видової специфічності тест-системи для виявлення ДНК збудника сибірки

Номер тест-системи	Патоген	Номер штаму
1	<i>Acinetobacter baumannii</i>	B431
2	<i>Brucella spp</i>	03-0391
3	<i>Burkholderia cepacia</i>	P112
4	<i>Burkholderia mallei</i>	05-0580
5	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	Jun 88
6	<i>Burkholderia thailandensis</i>	P412
7	<i>Campylobacter jejuni</i>	B1229
8	<i>Candida albicans</i>	B885
9	<i>Chlamydomyxa pneumoniae</i>	Б/н*
10	<i>Citrobacter freundii</i>	B22
11	<i>Clostridium perfringens</i>	B888
12	<i>Coxiella burnetii</i>	Nine Mile
13	<i>Enterobacter aerogenes</i>	B16
14	<i>Enterococcus faecalis</i>	B871
15	<i>Escherichia coli</i>	B893
16	<i>Francisella tularensis holarctica</i>	F49
17	<i>Haemophilus influenzae</i>	B895
18	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B896
19	<i>Legionella pneumophila</i>	IMB 072813
20	<i>Listeria monocytogenes</i>	B435
21	<i>Moraxella catarrhalis</i>	B433
22	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Б/н
23	<i>Neisseria meningitidis</i>	B1232
24	<i>Propionibacterium acnes</i>	B438
25	<i>Proteus mirabilis</i>	B23
26	<i>Salmonella typhi</i>	20-3267
27	<i>Serratia marcescens</i>	B14
28	<i>Shigella dysenteriae</i>	B476
29	<i>Staphylococcus aureus/SEB</i>	B946
30	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	B26
31	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	B918
32	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	B847
33	<i>Streptococcus pyogenes</i>	B846
34	<i>Vibrio cholerae</i>	B962
35	<i>Yersinia enterocolitica</i>	Y105
36	<i>Yersinia pestis</i>	02. Apr
37	<i>Clostridium sporogenes</i>	DSMZ795
38	Вірус мавпячої віспи	MSF-6
39	Вірус коров'ячої віспи	VACV-0273/2004
40	Вірус вітряної віспи	Б/н

* Без номера.

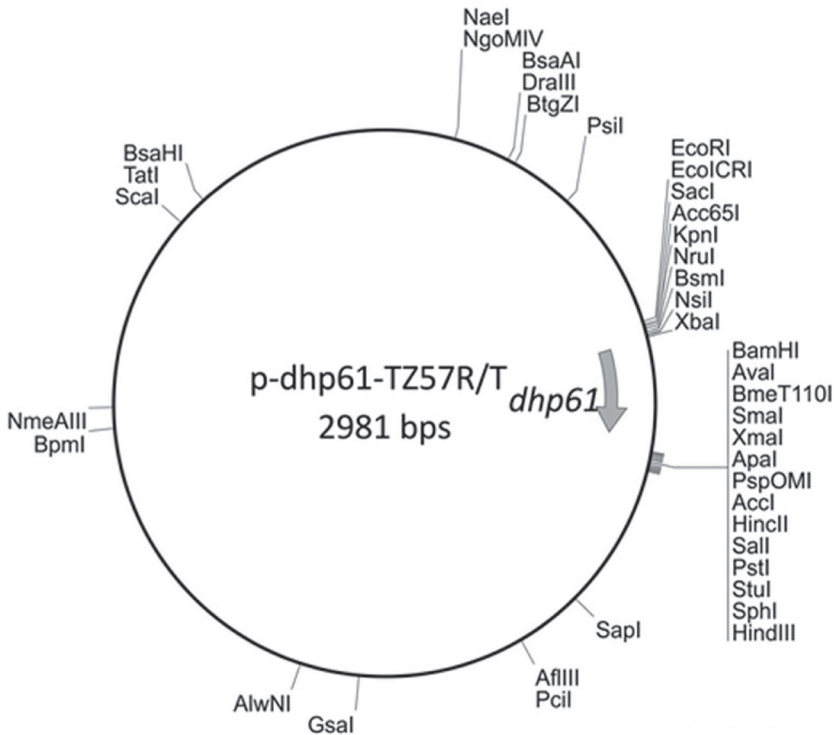


Рис. 1. Схема рекомбінантного позитивного контрольного зразка *p-dhp61-TZ57R/T*

проби досліджували двічі. Проведення реакції ампліфікації в режимі реально-го часу виконували згідно з наведеним вище протоколом. З метою визначення рівня здатності тест-системи виявляти ДНК збудника сибірки використовували системи праймерів *PA5/8* та *1234/1301*, рекомендовані ВООЗТ для детекції ДНК плазмід *rXO1* і *rXO2* збудника сибірки під час проведення класичної ПЛР [4, 16–18].

Система праймерів *PA5/8* фланкує ділянку гена *rag* плазміди *rXO1* довжиною 596 п.н.:

- *PA5*, 5'-TCCTAACACTAACGAAGT CG-3';
- *PA8*, 5'-GAGGTAGAAGGATATACG GT-3'.

Система праймерів *1234/1301* фланкує ділянку гена *sar* плазміди *rXO2* довжиною 846 п.н.:

- *1234*, 5'-CTGAGCCATTAATCGATA TG-3';

- *1301*, 5'-TCCCACTTACGTAATCTG AG-3'.

Облік результатів класичної ПЛР із використанням праймерів *PA5/8* та *1234/1301* проводили методом візуалізації отриманих ампліконів в ультрафіолетовому світлі після проведення горизонтального гел-електрофорезу. Зразок вважали позитивним щодо ДНК плазмід *rXO1* та *rXO2* збудника сибірки за відображення на фореграмі жовтогарячих смужок довжиною 596 п.н. (для гена *rag* плазміди *rXO1*), 846 п.н. (для гена *sar* плазміди *rXO2*) та негативним у разі їх відсутності.

Результати досліджень. На першому етапі розроблення рекомбінантного позитивного контрольного зразка за допомогою програми Clone Manager було сконструйовано модель векторної молекули на основі плазміди *pTZ57R/T* для ТА-клонування та ДНК-фрагмента *dhp61*. Отримана модель плазмідної

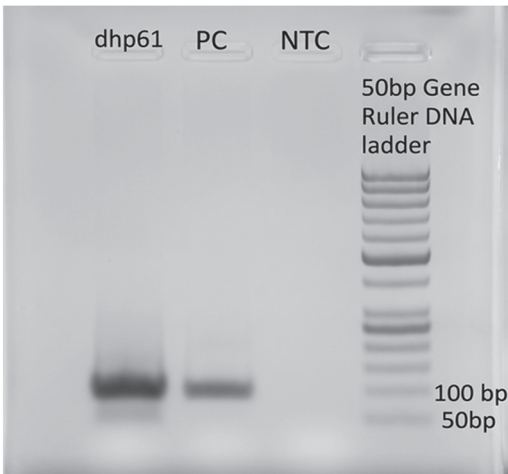


Рис. 2. Результати гел-електрофорезу з використанням позитивного контрольного зразка для виявлення хромосомного маркера *dhp61*: 50 bp Gene Ruler DNA ladder — маркер молекулярної маси, PC — позитивний контрольний зразок, NTC — негативний контрольний зразок

конструкції *p-dhp61-TZ57R/T* має довжину 2981 п.н. (рис. 1). У складі зазначеного вектора міститься ген стійкості до ампіциліну, що в разі подальшого клонування в культурі *E. coli* штаму DH5 α є маркером селективних ознак.

Фрагмент гена *dhp61* був отриманий із ДНК *B. anthracis* штаму Ames 3013 й успішно вбудований у ДНК вектора *pTZ57R/T*, після чого клітини *E. coli* штаму DH5 α були трансформовані отриманою біомасою плазмід.

За результатами молекулярного ТА-клонування було отримано рекомбінантний позитивний контрольний зразок для виявлення фрагмента хромосомного маркера *dhp61* роду *Bacillus*. Горизонтальний гел-електрофорез після ПЛР підтвердив, що отримана ділянка *dhp61* мала характерну довжину 95 п.н. (рис. 2).

Пізніше цей контрольний зразок було секвеновано в Інституті мікробіології Бундесверу. Результати секвенування свідчать про успішність лігації фрагмента *dhp61* із ДНК плазмідного вектора.

За аналогічною схемою було отримано внутрішній контрольний зразок *qPCR IC* і проведено валідацію методики ПЛР у режимі реального часу (ПЛР-РЧ) з його використанням. Встановлено, що оптимальна для використання концентрація внутрішнього контрольного зразка становить 10^8 копій/мкл. Залежно від зразка, з якого здійснювали екстракцію ДНК, та методу виділення отримані під час проведення ПЛР-РЧ значення порогового циклу перебувають у межах $15 \leq C_t \leq 35$.

Наступні етапи роботи полягали в формуванні експериментального набору тест-системи ПЛР Anthrax-DNA-test і його випробування. До складу тест-системи увійшли такі компоненти:

- RT-PCR MasterMix — 1–2 пробірки по 1 мл;
- розчини праймерів і зондів для детекції маркерів *dhp61*, *pagA* та *capC* (10 пмоль/мкл) — по 1 пробірці, 0,03 (0,06) мл (кожного);
- вода деіонізована — 1–2 пробірки по 0,5 мл;
- позитивні контрольні зразки для детекції хромосомного маркера *dhp61* та плазмідних маркерів *pagA* і *capC* (на 5 або 10 реакцій) — по 1 пробірці по 0,1–0,2 мл (кожного).
- внутрішній контрольний зразок *qPCR IC*.

До складу розчинника RT-PCR MasterMix для проведення ПЛР увійшли $MgCl_2$, нуклеотидтрифосфати (dNTP) і *Taq*-полімераза. Готуючи розчинник, враховували оптимізовані концентрації $MgCl_2$ та *Taq*-полімерази, що були отримані на попередньому етапі досліджень [19]. Для забезпечення зручності використання в умовах діагностичної лабораторії суміші праймерів та зонда готували рівними об'ємами, загалом 3 суміші праймерів та зондів для детекції кожного з генетичних маркерів збудника сибірки (*dhp61*, *pagA* та *capC*). Крім рекомбінантного позитивного контрольного зразка *p-dhp61-TZ57R/T* та внутрішнього контрольного *qPCR IC*,

3. Результати випробувань експериментального набору тест-системи Anthrax-DNA-test для діагностики сибірки

Матеріал	Результати проведення ПЛР		
	з праймерами PA5/8 та 1234/1301	C _t , 1-й повтор	C _t , 2-й повтор
Плазмідна ДНК <i>p-dhp61-Z57R/T</i> у розведенні 1 : 100	Негативний	29,13	28,88
Плазмідна ДНК <i>p-dhp61-Z57R/T</i> у розведенні 1 : 1000	Негативний	31,35	31,32
Плазмідна ДНК <i>p-dhp61-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 10 000	Негативний	34,65	34,56
Плазмідна ДНК <i>p-pagA-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 100	Позитивний	27,29	27,37
Плазмідна ДНК <i>p-pagA-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 1000	Позитивний	31,40	30,75
Плазмідна ДНК <i>p-pagA-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 10 000	Позитивний	33,65	33,75
Плазмідна ДНК <i>p-capC-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 100	Позитивний	26,02	25,35
Плазмідна ДНК <i>p-capC-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 1000	Позитивний	29,18	29,00
Плазмідна ДНК <i>p-capC-TZ57R/T</i> у розведенні 1 : 10 000	Позитивний	32,90	32,45

до складу набору ввійшли позитивні контрольні зразки для детекції плазмідних маркерів *B. anthracis* (*pagA* і *capC*), виготовлені на попередньому етапі. Кожний із компонентів розливали по пробірках у кількості, необхідній для проведення 50 аналізів.

Встановлено, що тест-система виявляє ДНК збудника сибірки у позитивних зразках *B. anthracis p-dhp61-TZ57R/T* (хромосомний маркер), *p-pagA-TZ57R/T* (маркер токсигенної плазмиди *pXO1*) і *p-capC-TZ57R/T* (маркер капсулоутворюючої плазмиди *pXO2*) у розведеннях від 1 : 100 до 1 : 10 000 зі значеннями C_t в діапазоні від 25,35 до 34,65 (табл. 3). Водночас утворення продукту ампліфікації в гетерологічних зразках не спостерігали (флюоресценція не виникала), що доводить специфічність

розробленої тест-системи. Крім того, зроблено висновок про повторюваність та відтворюваність результатів випробувань, що доводить їх повний збіг у двох повторах експерименту з кожним випробуваним зразком.

Отже, розроблена нами тест-система Anthrax-DNA-test за показниками специфічності, чутливості, відтворюваності відповідає вимогам ВООЗТ [18, 20]. Перевагою цієї тест-системи є можливість виявляти в досліджуваному матеріалі не тільки плазмиди *pXO1* та *pXO2*, які можуть втрачатися мікроорганізмами або бути наявними у близькоспорідних до збудника сибірки бактерій групи *B. cereus* [21, 22], а й хромосомний маркер *dhp61*, який, по-перше, є високоспецифічним, а по-друге — наявний тільки в хромосомі *B. anthracis* [10].

Висновки

Виготовлено рекомбінантний позитивний контрольний зразок ДНК — *p-dhp61-TZ57R/T*, придатність якого

для використання в діагностичних лабораторіях ветеринарної медицини було підтверджено проведенням

ПЛР-РЧ, а успішність лігування фрагментів — секвенуванням. Також отримано внутрішній контрольний зразок qPCR IC і з його використанням здійснено валідацію ПЛР-РЧ. Встановлено, що оптимальна для використання концентрація внутрішнього контрольного зразка становить 10^8 копій/мкл. Залежно від зразка, в якому виконується екстракція ДНК, та методу виділення ДНК отримані під час проведення ПЛР значення порогового циклу

змінюються в діапазоні $15 \leq C_t \leq 35$. Обидва компоненти, p-dhp61–TZ57R/T та qPCR IC, входять до складу експериментального набору для проведення ПЛР у режимі реального часу. За показниками специфічності, чутливості, відтворюваності ця система не поступається зарубіжним аналогам та відповідає вимогам ВООЗТ. Після реєстрації її можна буде використовувати для експрес-діагностики сибірки на території України.

Biloivan O.¹, Didyk T.², Zavorodnii A.³, Paliy A.⁴, Dunaev Yu.⁵

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», 83 Hryhorii Skovoroda Str., Kharkiv, 61023, Ukraine, ³National academy of Agricultural Sciences of Ukraine, 9 M. Omelianovych-Pavlenko Str., Kyiv, 01010, Ukraine; e-mail: ¹Silverscreen91@gmail.com, ²didykmicr@ukr.net, ³Andrii.I.Zavorodnii@gmail.com, ⁴paliy.dok@gmail.com, ⁵dunaev1975@gmail.com; ORCID: ¹0000-0002-9973-4551, ²0000-0002-1976-7426, ³0000-0003-3563-0478, ⁴0000-0002-9193-3548, ⁵0000-0001-7378-430X

Development of a test system based on the quantitative polymer chain reaction for the detection of genetic material of the anthrax pathogen

Goal. To develop a domestic test system for the detection of anthrax pathogen *Bacillus anthracis* DNA in biological material and environmental samples based on quantitative polymerase chain reaction (PCR) using recombinant control samples. **Methods.** The study was conducted in 2024–2025 on the basis of NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine» of NAAS using molecular thymine-adenine cloning (for the manufacture of recombinant control samples), and real-time polymerase chain reaction

(to determine the sensitivity and specificity of the test system). **Results.** A recombinant positive control sample containing a specific chromosomal marker dhp61 was designed, as well as an internal control sample, which made it possible to detect reaction inhibitors and prevent false negative results. Both components were integrated into the Anthrax DNA-test experimental test system, capable of detecting chromosomal and plasmid markers of the pathogen. The test system stably detected *Bacillus anthracis* DNA in a wide range of concentrations, did not respond to heterologous samples, and demonstrated complete reproducibility of the results in the case of repeated studies. According to the main analytical characteristics, it met international requirements for diagnostic tools. **Conclusions.** An experimental set of components for reliable detection of the anthrax pathogen by quantitative PCR using recombinant control samples was created and tested. The proposed test system is promising for implementation in the practice of laboratory diagnostics and provides an opportunity to increase the efficiency of epizootic surveillance in Ukraine.

Key words: anthrax, *Bacillus anthracis*, chromosomal marker, polymerase chain reaction, recombinant control, test system.

DOI: <https://doi.org/10.31073/agrovisnyk202604-08>

Бібліографія

1. Purcell B.K., Worsham P.L., Freidlander A.M. Anthrax. *Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare*: ed. Z.F. Dembek. Falls Church: Office of the Surgeon General, 2007. P. 69–90. <http://purl.access.gpo.gov/GPO/LPS101470>

2. Hoffmaster A.R., Fitzgerald C.C., Ribot E. et al. Molecular subtyping of *Bacillus anthracis*

and the 2001 bioterrorism-associated anthrax outbreak. *Emerging Infectious Diseases*. 2002. 8(10). P. 1111–1116. doi: 10.3201/eid0810.020394

3. Keim P., Van Ert M. N., Pearson T. et al. Anthrax molecular epidemiology and forensics: Using the appropriate marker for different evolutionary scales *Infection*. *Genetics*

and Evolution. 2004. 4(3). P. 205–213. doi: 10.1016/j.meegid.2004.02.005

4. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Organisation for Animal Health. *Anthrax in humans and animals*. Geneva: WHO, 2008. 219 p. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/97503/9789241547_536_eng.pdf

5. Eitzen E.M. Use of biological weapons. *Medical aspects of chemical and biological warfare*: ed. F.R. Sidell, E.T. Takafuji, D.R. Franz. Washington: Office of the Surgeon General, 1997. P. 437–450.

6. Mock M., Fouet A. Anthrax. *Annual Review of Microbiology*. 2001. 55(1). P. 647–671. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.647

7. Пат. № 133292 Україна, МПК (2019.03) C12N7/00. Позитивний контрольний зразок для виявлення ДНК генетичного маркера pagA плазмиди рХО1 збудника сибірки *Bacillus anthracis* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. О.В. Білойван, Б.Т. Стегній, О.С. Солодянкін, А.П. Герілович; заявник і патентовласник ННЦ «ІЕКВМ». № u201811373; заявл. 19.11.2018; опубл. 25.03.2019. 2 с.

8. Пат. № 135807 Україна, МПК (2018.11) C12N7/00. Позитивний контрольний зразок для виявлення ДНК генетичного маркера sarC плазмиди рХО2 збудника сибірки *Bacillus anthracis* за допомогою полімеразної ланцюгової реакції. О.В. Білойван, Б.Т. Стегній, О.С. Солодянкін; заявник і патентовласник ННЦ «ІЕКВМ». № u201811376; заявл. 27.11.2018; опубл. 25.07.2019. 2 с.

9. Biloivan O.V., Popp C., Schwarz J. Development of in-house diagnostic tool for the detection of Anthrax genetic material in real-time PCR. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2023. 9(3). P. 18–22. doi: 10.36016/JVMBBS-2023-9-3-4

10. Antwerpen M.H., Zimmermann P., Bewley K. et al. Real-time PCR system targeting a chromosomal marker specific for *Bacillus anthracis*. *Molecular and Cellular Probes*. 2008. 22(56). P. 313–315. doi: 10.1016/j.mcp.2008.06.001

11. Kostylev M., Otwell A.E., Richardson R.E., Suzuki Y. Cloning Should Be Simple: *Escherichia coli* DH5 α -Mediated Assembly of Multiple DNA Fragments with Short End Homologies. *PLoS ONE*. 2015. 10(9):e0137466. doi: 10.1371/journal.pone.0137466

12. Chang A.Y., Chau V.W., Landas J.A., Pang Y. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. *JEMI Methods*. 2017. 1. P. 22–25.

13. Chandra P.K., Wikel S.K. Analyzing ligation mixtures using a PCR based method. *Biological procedures online*. 2005. 7. P. 93–100.

14. Tsien R.Y. The green fluorescent protein. *Annual Reviews of Biochemistry*. 1998. 67. P. 509–544.

15. Hoffmann B., Depner K., Schirmmeier H., Beer M. A universal heterologous internal control system for duplex real-time RT-PCR assays used in a detection system for pestivirus. *Journal of Virological Methods*. 2006. 136. P. 200–209.

16. Hutson R.A., Duggleby C.J., Lowe J.R. et al. The development and assessment of DNA and oligonucleotide probes for the specific detection of *Bacillus anthracis*. *Journal of Applied Bacteriology*. 1993. 75. P. 463–472.

17. Beyer W., Glockner P., Otto J., Bohm R. A nested PCR and DNA-amplification-fingerprinting method for detection and identification of *Bacillus anthracis* in soil samples from former tanneries. *Salisbury Medical Bulletin*. 1996. 87. P. 47–49.

18. World Organisation for Animal Health. *Anthrax. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.01_ANTHRAX.pdf

19. Biloivan O.V., Stegny B.T., Gerilovych A.P., Solodiankin O.S. Validation of Anthrax specific pagA quantitative PCR for detection of *Bacillus anthracis* PXO1 plasmid. *Journal for Veterinary Medicine, Biotechnology and Biosafety*. 2019. 2. P. 15–21.

20. World Organisation for Animal Health. Chapter 1.1.2. Principles and methods of validation of diagnostic assays for infectious diseases. *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. 2018. https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_validation_diagnostics_assays.pdf

21. Hurtle W., Bode E., Kulesh D.A. et al. Detection of the *Bacillus anthracis* gyrA Gene by Using a Minor Groove Binder Probe. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004. 42. P. 179–185.

22. Pannucci J., Okinaka R.T., Sabin R., Kuske C.R. *Bacillus anthracis* pXO1 plasmid sequence conservation among closely related bacterial species. *Journal of Bacteriology*. 2002. 184. P. 134–141.