

РОЗРОБКА СИСТЕМИ ПРАЙМЕРІВ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ БАКТЕРІЙ РОДУ *STAPHYLOCOCCUS* МЕТОДОМ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Прохоренко Д.К.

КПІ ім. Ігоря Сікорського, pdmytro378@gmail.com

ТОВ «ХЕМА»

Abstract

In this work, a primer system were selected and optimized for the specific detection of a conserved DNA fragment of Staphylococcus spp. using real-time PCR. The results obtained demonstrate the high efficiency and strong potential of the developed system for application in molecular diagnostics.

Keywords: sepsis, bacterial infections, diagnostics, polymerase chain reaction.

Вступ. Сепсис залишається однією з провідних причин госпітальної смертності у всьому світі, особливо в умовах інтенсивної терапії. Його клінічна картина часто неспецифічна, а стрімкий перебіг вимагає максимально швидкої і точної ідентифікації збудника. У цьому контексті методи молекулярної діагностики, зокрема полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) у реальному часі, набувають особливого значення. На відміну від класичних культуральних методів, які потребують щонайменше доби для вирощування мікроорганізмів, ПЛР дає змогу виявити ДНК або РНК патогенів безпосередньо з біологічного зразка вже за кілька годин. Це не лише суттєво скорочує час до початку терапії, але й підвищує діагностичну чутливість та дозволяє виявляти збудників, що складно культивуються або пригнічені попереднім прийомом антибіотиків.

У більшості випадків сепсис зумовлений бактеріальними інфекціями, зокрема патогенами родини *Streptococcaceae*, серед яких виділяють потенційно небезпечні види, такі як *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* та *Staphylococcus saprophyticus* [1]. Родина даних мікроорганізмів ускладнює моделювання імунної відповіді за рахунок формуванню біоплівки, а за рахунок продукування токсинів та частої резистентності до антибіотикотерапії проблема швидкої та точної діагностики бактеріальних інфекцій, що спричиняють сепсис стає надзвичайно актуальною [2].

У зв'язку з цим актуальним є застосування методів молекулярної діагностики, зокрема ПЛР. Використання специфічних маркерів *Streptococcaceae* у ПЛР дозволить здійснювати високочутливу та специфічну ідентифікацію збудників сепсису, що дасть можливість підібрати оптимальне лікування для пацієнта.

Метою роботи було встановлення оптимального генетичного маркера та підбір праймерів для ідентифікації мікроорганізмів родини *Streptococcaceae*.

Матеріали та методи. В роботі проведено біоінформатичний аналіз баз NCBI в результаті якого, отримано висококонсервативний фрагмент гену 16S ген рибосомної РНК, що характерний для родини *Streptococcaceae*, особливо для представників, *Staphylococcus aureus* та *Staphylococcus epidermidis*, котрі мають найбільший діагностичний інтерес.

Для оцінки ампліфікації цільових генів було застосовано ПЛР у реальному часі. Ампліфікацію нуклеїнових кислот проводили за допомогою системи Bio-Rad CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System у двофазовому режимі термоцикування. Протокол ампліфікації включав початкову денатурацію при 94 °C протягом 3 хвилин, за якою слідували 9 циклів, що склалися з денатурації при 94 °C протягом 20 секунд, відпалу при 58 °C протягом 30 секунд і елонгації при 72 °C протягом 30 секунд. Після цього виконували ще 38 циклів із скороченою тривалістю етапів: 94 °C протягом 15 секунд, 58 °C протягом 15 секунд і 72 °C протягом 15 секунд, причому вимірювання флуоресценції здійснювали під час етапу елонгації. Загальна кількість циклів становила 47. Аналіз флуоресценції проводили під час фази елонгації другого блоку циклування.

Результати та обговорення. Для загальної ідентифікації роду *Staphylococcus* найчастіше використовують 16S ген рибосомної РНК. Для ампліфікації цільової ділянки гену 16S рРНК методом ПЛР у реальному часі були використані такі специфічні праймери:

Forward: 5'- GTTGTCGTCAGCTCGTGTGCG -3'

Reverse: 5'- CCACCTTCCTCCGGTTTGT -3'

Probe: 5'-[FAM]-TAGTTGCCATCATTAAGTTG-[BHQ1]-3'

Такий дизайн праймерів дозволив досягнути відсутності димерів і вторинних структур та утворення амплікону довжиною 131 п.н.

Отримані в ході ПЛР в реальному часі результати перевірки праймерів до фрагменту гену 16S рРНК показали специфічність до ряду мікроорганізмів родини *Streptococcaceae*. Для визначення меж аналітичної чутливості отриманих пар праймерів, проводили ампліфікацію плазмідного вектору на основі рUC19 з фрагментом цільового фрагменту ДНК. Застосування специфічного TaqMan-зонда дало змогу підвищити специфічність ампліфікації та чутливість розробленої системи праймерів. Отримані результати показали, що межа чутливості розробленої системи праймерів становить 10^2 копій ДНК в мл, що відповідає високій аналітичній чутливості. Для порівняння, реальна ефективність бактеріального посіву часто обмежується межами $10^3/10^4$ копій на мл, зважаючи на необхідність життєздатності патогенів та вплив терапії. Отримані результати свідчать про високу аналітичну чутливість та потенціал використання даної системи для ранньої молекулярної діагностики.

Висновки. Проведено оптимізацію праймерів за параметрами температури плавлення, GC-вмісту та мінімізації утворення димерів та враховано ризики при дизайні зонда для уникнення внутрішнього гасіння флуорофора. Описана система праймерів може використовуватись для методу ПЛР у медичній діагностиці з метою виявлення бактеріальних патогенів для терапії сепсису та зменшення ризику летальних наслідків.

Список використаної літератури:

1. *Staphylococcus aureus* infections and human intestinal microbiota / A. Liu et al. *Pathogens*. 2024. Vol. 13, no. 4. P. 276. URL: <https://doi.org/10.3390/pathogens13040276>.
2. A review of biofilm formation of *Staphylococcus aureus* and its regulation mechanism / Q. Peng et al. *Antibiotics*. 2022. Vol. 12, no. 1. P. 12. URL: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010012>.