



УДК 57.083.18

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ПЦР ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ

© 2020 г. С. А. Лапа*., Е. С. Ключихина*, Р. А. Мифтахов*,
А. М. Золотов*, А. С. Заседателев*, А. В. Чудинов*

*ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова 32

Поступила в редакцию 04.04.2020 г.

После доработки 16.04.2020 г.

Принята к публикации 20.04.2020 г.

Разработана и оптимизирована система мультиплексной ПЦР для быстрого выявления пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии. Система может быть расширена для анализа возбудителей пневмонии вирусной (ДНК- и РНК-содержащие вирусы), а также грибковой природы.

Ключевые слова: инфекционная пневмония, мультиплексная ПЦР, диагностика

DOI: 10.31857/S0132342320050139

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная пневмония — острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей бактериальной, вирусной и грибковой природы. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами SARS-CoV (2002–2003 г.), MERS-CoV (2012–2013 г.), SARS-CoV-2 (2019–?), вирусами гриппа А и В, а также бактериальных пневмоний, становятся реальной социальной угрозой. Бактериальные пневмонии характеризуются летальностью около 15%, при этом летальность в случаях тяжелого течения внебольничной пневмонии (ТВП) может достигать 21–58% [1], что сравнимо с таковыми показателями SARS (т.н. атипичная пневмония, ТОРС), MERS [2] и превышает этот показатель для CoViD-19 и гриппа.

Специализированные лечебные учреждения, в которые поступают пациенты с клиническим диагнозом “пневмония”, сталкиваются с проблемой установления этиологии заболевания и быстрой идентификации возбудителя, поскольку часто вирусные и бактериальные пневмонии характеризуются сходной клинической картиной. Ситуация резко обострилась с возникновением пандемии CoViD-19, для которого необходима своевременная дифференциальная диагностика вторичной бактериальной инфекции, часто возникающей как одно из осложнений при течении болезни.

От своевременной постановки точного диагноза зависит правильный подбор препаратов и стратегия лечения пациента [3]. Сложившаяся ситуация сигнализирует об острой необходимости создания экспресс-методов дифференциальной диагностики.

Разработана мультиплексная ПЦР для видовой определения пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии человека. Система ориентирована на применение в клинической диагностике для определения этиологии заболевания благодаря возможности дифференцировать бактериальную от вирусной и грибковой пневмонии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Одними из наиболее распространенных возбудителей бактериальной пневмонии являются представители нескольких родов: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae* и некоторые другие [4]. Для перечисленных пяти бактериальных видов были выбраны генетические мишени и сконструированы праймеры для осуществления мультиплексной ПЦР. При конструировании праймеров руководствовались требованием видовой специфичности и внутривидовой консервативности выбранных участков генетических мишеней, необходимым для надежной дифференциальной диагностики, например, ген *ebpS* для идентификации *S. aureus* [5] и ген *sidA* для *L. pneumophila* [6]. Учитывали необходимость получения различных длин ПЦР-продуктов для удобства идентификации возбудителя при электрофоретическом разделении.

Сокращения: ТОРС — тяжелый острый респираторный синдром; ТВП — тяжелая внебольничная пневмония; СТАВ — цетил-триметил аммоний бромид.

Автор для связи: (тел.: +7 (495) 135-98-00; факс: +7 (495) 135-14-05; эл. почта: lapa@biochip.ru).

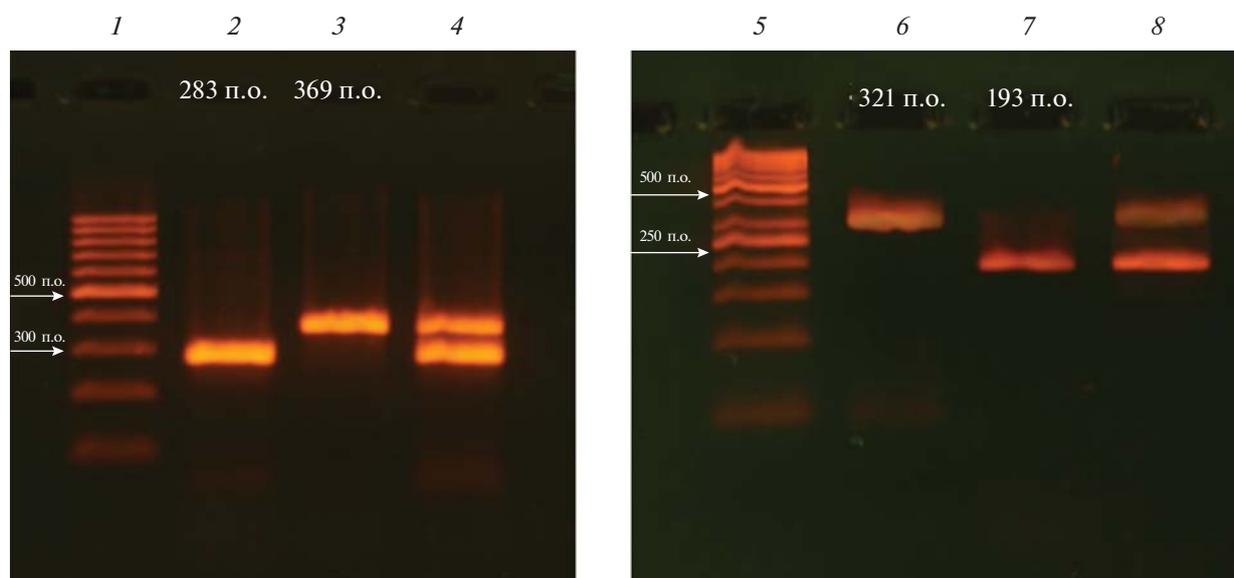


Рис. 1. Определение ДНК возбудителя электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. 1 – маркер длин ДНК GeneRuler 100bp (Thermo Scientific, США), 2 – *S. aureus*, 3 – *L. pneumophila*, 4 – *S. aureus* + *L. pneumophila*, 5 – маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США), 6 – *P. aeruginosa*, 7 – *H. influenza*, 8 – *P. aeruginosa* + *H. influenza*. 4% агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Для каждого праймера проводили процедуру BLAST-анализа, определяли его физико-химические характеристики, включая тестирование на наличие как внутри- так и межмолекулярных вторичных структур.

Проводили оптимизацию температурно-временного профиля ПЦР с применением градиентной ПЦР, а также состава компонентов буфера и концентрации каждого из праймеров в смеси. Экспериментально определяли специфичность праймеров к целевым и нецелевым мишеням (используя тотальную геномную ДНК каждого из тестируемых бактериальных штаммов), как в режиме применения индивидуальных ДНК-матриц, так и в режиме смесей ДНК нескольких возбудителей в одной пробирке. Установили, что праймеры обладают высокой специфичностью в смеси, содержащей ДНК различных микроорганизмов и способны выявлять исключительно свои специфичные мишени, не давая ложноположительный результат при наличии в смеси неспецифичной ДНК.

Определяли чувствительность сконструированной тест-системы раститровкой ДНК каждого из анализируемых возбудителей, которая составила от 10^2 до 10^3 копий геномной ДНК на реакционную пробирку, в том числе при одновременном введении в смесь нескольких матриц.

Результат дифференциального обнаружения ДНК возбудителя в образце методом мультиплексной ПЦР показан на рис. 1.

Разработанная система может быть расширена для выявления возбудителей пневмонии вирус-

ной и грибковой природы. В настоящее время планируется проведение испытаний на клинических образцах, применение меченых производных dNTP для последующего анализа на биочипах, а также разработка математического алгоритма расчетов сигналов амплификации. Система подходит для диагностических лабораторий, специализирующихся на клинических анализах с использованием ПЦР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы

В работе использована деконтаминированная полногеномная ДНК бактериальных штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск). Выделение ДНК из клеточных культур осуществляли СТАВ-методом [7].

Праймеры

Множественное выравнивание последовательностей геномных мишеней проводили с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Конструирование праймеров осуществляли с помощью сетевого ресурса www.idtdna.com, анализ специфичности проводили с помощью алгоритма BLAST (NIH, США). Последовательности, видоспецифичность, генетические мишени и длина ПЦР-продуктов для всех использованных пар праймеров приведены ниже: *S. aureus*, ген *ebpS*, прямой *ebpS*-f (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGC-

GTCT-3'), обратный ebpS-г (5'-ССТССАААТАТС-ГСТААТGCACC-3'), длина продукта – 283 п.о.; *L. pneumophila*, ген *sidA*, прямой *sidA*-f (5'-ТТС-САСТGGTGGGTGGGGTТТТG-3'), обратный *sidA*-г (5'-ТСАТGTTGGAGTTСТАТGGCACC-3'), длина ПЦР-продукта – 369 п.о.; *H. influenza*, ген *fucK*, прямой *fucK*-f (5'-TGCTCACTCAAC-GCTTAACTGGT-3'), обратный *fucK*-г (5'-ТТСТG-GGСТААТGGTGTACGТАА-3'), длина ПЦР-продукта – 193 п.о.; *P. aeruginosa*, ген *oprL*, прямой *oprL*-f (5'-GCGTGCATCACCACCTTСТАCT-3'), обратный *oprL*-г (5'-ТТСТTCACTCGACGCGAC-GGTT-3'), длина ПЦР-продукта – 321 п.о.; *K. pneumonia*, ген *rmpA*, прямой *rmpA*-f (5'-АТ-СААТАGСААТТАAGCACAААА-3'), обратный *rmpA*-г (5'-ТСАТААТCACAACCCTTТАGGАТА-3'), длина ПЦР-продукта – 177 п.о.

Мультиплексная ПЦР

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 1.5 единицы Таq-полимеразы (Thermo Scientific, США) в буфере той же фирмы, dNTP в концентрации 200 мкМ каждого, пять пар специфичных праймеров и полногеномную бактериальную матрицу (либо смесь бактериальных ДНК). Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (MJResearch, США) при следующих условиях: 95°C в течение 5 мин (начальная денатурация); 36 циклов по 20 с при 95°C, 30 с при 66°C и 40 с при 72°C; завершающая инкубация в течение 5 мин при 72°C. Градиентную ПЦР и определение чувствительности системы с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ5 (BioRad, США). Продукты ПЦР разделяли в 4% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием. Тип анализируемой ДНК определяли по длинам продуктов амплификации (рис. 1).

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-14-00287.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов исследований.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Sligt W.I., Marrie T.J.* // Crit. Care. Clin. 2013. V. 29. P. 563–601. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2013.03.009>
2. *Song Z., Xu Y., Bao L., Zhang L., Yu P., Qu Y., Zhu H., Zhao W., Han Y., Qin C.* // Viruses. 2019. V. 11. E59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>
3. *Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A.* // Thorax. 2011. 66:ii1ei23. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200598>
4. *Han Y.C., Woo J.H.* // Respirology. 1996. V. 1. P. 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.1996.tb00019.x>
5. *Liu Y., Cao Y., Wang T., Dong Q., Li J., Niu C.* // Front. Microbiol. 2019. V. 10. A222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>
6. *Tabatabaei M., Hemati Z., Moezzi M.O., Azimzadeh N.* // Mol. Biol. Res. Commun. 2016. V. 5. P. 215–223.
7. *Doyle J.J., Doyle J.L.* // Phytochemical Bulletin. 1987. V. 19. P. 11–15.

Multiplex PCR for Detection of Bacterial Pathogens of Infectious Pneumonia

S. A. Lapa*, #, E. S. Klochikhina*, R. A. Miftakhov*,
A. A. Zolotov*, A. S. Zasedatelev*, and A. V. Chudinov*

*Phone: +7 (495) 135-98-00; fax: +7 (495) 135-14-05; e-mail: lapa@biochip.ru

*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 32, Moscow, 119991 Russia

A multiplex PCR system has been developed and optimized for rapid detection of the five main pathogens of bacterial pneumonia. The system can be expanded to analyze viral pathogens of pneumonia (DNA- and RNA-containing viruses), as well as fungal nature.

Keywords: infectious pneumonia, multiplex PCR, diagnosis