ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* В БАКТЕРИАЛЬНЫХ КУЛЬТУРАХ ПАЦИЕНТОВ С СЕПСИСОМ

Руденкова Т.В., Горбич Ю.Л., Костюк С.А.
ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»
Минск, Беларусь
t.rudenkova@mail.ru, y.gorbich@gmail.com, s.kostiuk@mail.ru

Актуальным направлением является разработка быстрых и достоверных методов идентификации инфекционных агентов. Оптимизирован метод молекулярно-генетической идентификации Klebsiella pneumoniae, основанный на использовании специфических пар праймеров, усовершенствованных состава амплификационной смеси и программ амплификации, который позволяет проводить выявление ДНК возбудителя в бактериальных культурах.

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae; сепсис; ДНК; ПЦР.*

OPTIMIZATION OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* MOLECULAR-GENETIC IDENTIFICATION METHOD IN BACTERIAL CULTURES OF PATIENTS WITH SEPSIS

Rudenkova T.V., Gorbich Y.L., Kostiuk S.A.
Belarusian medical academy of postgraduate education
Minsk, Belarus

The development of fast and significant methods for the identification of infectious agents is an actual trend. The method of Klebsiella pneumoniae molecular genetic identification has been optimized. It based on the use of specific primer pairs, improved composition of the amplification mixture and amplification programs. This method usage makes possible to detect the pathogen DNA in bacterial cultures.

Key words: *Klebsiella pneumoniae; sepsis; DNA; PCR .*

Введение. Одной из наиболее значимых проблем современного здравоохранения продолжает оставаться летальность от инфекционной патологии, основную долю в которой составляют смертельные исходы, связанные с развитием у пациентов тяжелых пневмоний и сепсиса. В Республике Беларусь заболеваемость сепсисом составляет 2,55 случая на 100 000 населения, частота летальных исходов составляет 0,99 случая на 100 000 населения. В целом количество случаев сепсиса в мире оценивается в 18–31,5 миллионов ежегодно, из которых 6-8 миллионов пациентов погибают [1, 2].

В этиологии нозокомиального сепсиса ключевую роль играет грамотрицательная флора, в которой доминируют микроорганизмы семейства *Enreobacteriaceae.* Среди них значительный интерес представляет *Klebsiella pneumoniae (K. pneumoniae)*, являющаяся одним из наиболее опасных микроорганизмов для пациентов отделений реанимации и интенсивной терапии, т.к. она способна вызывать быстрое, иногда молниеносное, течение сепсиса с развитием септического шока и выраженной полиорганной недостаточностью, что значительно ограничивает время на установление этиологии заболевания и подбор эффективной антибактериальной терапии [3, 4, 5].

«Золотым стандартом» микробиологической диагностики сепсиса в настоящее время считается бактериологическое исследование посева крови – гемокультура. Однако этот метод имеет достаточно серьезные ограничения: продолжительность исследования (от 12 до 72 часов), возможность получения ложноотрицательного результата ввиду проводимой на момент забора крови антимикробной терапии, или забора малого количества крови, недостаточного для достоверного исследования, или низкого количества циркулирующих в крови микроорганизмов (1-10 КОЕ/мл). С целью ускорения получения результатов исследования для установления этиологии сепсиса актуальна разработка более быстрых основанных на применении молекулярно-генетического метода способов идентификации инфекционных агентов.

Материалы и методы. В качестве биологического материала для проведения молекулярно-биологических исследований использовали бактериальные культуры *K. pneumoniae*, полученные в ходе бактериологического исследования гемокультур пациентов с сепсисом (n=16). Взятие биологического материала проводили с поверхности плотной питательной среды для культивирования *K. pneumoniae*, для чего использовали одноразовые зонды. Полученный материал помещали в пробирку типа эппендорф объемом 1,5 мл, содержащую 200 мкл транспортной среды («АртБиоТех», РБ). При необходимости, пробирки замораживали и оставляли для хранения при температуре -18ºС.

В качестве отрицательного контроля использовали бактериальные культуры, в которых с применением бактериологического метода на была выявлена *K. pneumoniae* (n=5).

Выделение ДНК проводили с использованием коммерческих наборов реагентов «Проба-НК» («ДНК-технология», РФ), «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ), «АртДНК легкий» («АртБиоТех», РБ) и методом классической фенол-хлороформной экстракции. Для определения концентрации и степени чистоты выделенной ДНК проводили спектрофотометрические исследования (NanoDrop 1000, Thermo scientific, США), при этом определяли отношение поглощения на длинах волн 260 и 280 нм ($A_{260/280}$).

Последовательности праймеров для выявления ДНК *K. pneumoniae* были взяты из литературных источников (таблица 1) [6, 7]:

Таблица 1 – Последовательности праймеров и зонда для идентификации ДНК K. pneumoniae

Название	**Последовательность**	Источник
Kl.pn.-1-f	ATTTGAAGAGGTTGCAAACGAT	Y. Liu [et al.], 2008
Kl.pn.-1-r	TTCACTCTGAAGTTTTCTTGTGTTC	
Kl.pn.-2-f	TTCTTCTGCGTCGTTGCC	Suzhou Baiyuan Gene Technology Co Ltd., 2015
Kl.pn.-2-r	GCGATCACCTGGCTGAAAG	
Kl.pn.-2-p	FAM-TCTGGCTTCGCATCCTGATTGTTGA- BHQ1	

Амплификацию ДНК проводили с применением Quick-Load Taq 2X Master Mix («Праймтех», РБ) на приборе «Rotor-Gene-6000» («Corbett research», Австралия). Для идентификации уровней амплификации специфических и

неспецифических фрагментов проводили анализ кривых плавления и электрофоретический анализ ампликонов.

Результаты и их обсуждение. На первом этапе исследования проводили сравнительный анализ эффективности выделения микробной ДНК из культуры бактериальных клеток с использованием коммерческих наборов для выделения нуклеиновых кислот «Проба-НК» («ДНК-технология», РФ), «Экстракция-100» («ВекторБест», РФ), «АртДНК легкий» («АртБиоТех», РБ) и метода классической фенол-хлороформной экстракции.

После выделения ДНК из образцов биологического материала с использованием различных наборов реагентов было проведено сравнение значений концентрации ДНК и показателя $A_{260/280}$. Достоверно более высокие значения, сопоставимые со значениями данных показателей у референтного метода (метод фенол-хлороформной экстракции), были установлены при использовании набора реагентов «АртДНК легкий» (критерий Манна-Уитни, $p<0,05$). Полученные результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Значения концентрации ДНК и соотношения А260/280, полученные при использовании различных наборов реагентов (Me (Q25/Q75))

Название набора	**Концентрация ДНК (нг/мкл)**	**$A_{260/280}$**
«Проба-НК»	**101 (89/125)**	**1,47 (1,31/1,56)**
«Экстракция-100»	**97 (85/118)**	**1,44 (1,33/1,51)**
«АртДНК легкий»	**121 (92/131)**	**1,61 (1,58/1,68)**
Метод классической фенол-хлороформной экстракции	**142 (125/157)**	**1,74 (1,71/1,79)**

После анализа полученных данных был сделан вывод, что для проведения дальнейших исследований по усовершенствованию молекулярно-генетического метода идентификации *K. pneumoniae* оптимальным является использование набора реагентов «АртДНК легкий» («АртБиоТех», РБ).

На следующем этапе проводили оптимизацию состава амплификационной смеси и программ амплификации для каждой пары праймеров. В ходе оптимизации состава амилификационной смеси были протестированы различные объемы внесения праймеров (от 1 до 2 мкл), ДНК (от 3 до 10 мкл) и воды, а также дополнительное внесение ионов Mg^{2+}.

По результатам исследований для праймеров Kl.pn.-1 в состав смеси были включены: 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix, 1,2 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного), 1,0 мкл интеркалирующего красителя ZUBR Green-1, 0,3 мкл $MgCl_2$, 7,5 мкл воды и 5 мкл ДНК. Для праймеров Kl.pn.-2 в состав смеси были включены: 15,0 мкл 2X Quick-Load Taq Master Mix, 1,5 мкл смеси эквивалентных концентраций праймеров (прямого и обратного) и зонда, 3,5 мкл воды и 10 мкл ДНК.

При оптимизации программы амплификации варьировали длительность горячего старта (от 5 до 15 мин); длительность этапа денатурации (от 10 до 20 с); длительность (от 30 до 60 с) и температуру (от 58°С до 63°С) этапа отжига; количество циклов амплификации (от 35 до 50). По результатам проведенных исследований для праймеров Kl.pn.-1 был выбран вариант программы

амплификации: 1 цикл: 95°С – 5 мин; 45 циклов: 95°С – 10 с, 60°С – 30 с. Для праймеров Kl.pn.-2 был выбран вариант программы амплификации: 1 цикл: 95°С – 15 мин; 40 циклов: 95°С – 15 с, 60°С – 20 с, 72°С – 15 с.

При амплификации праймеров Kl.pn.-1 был дополнительно проведен этап анализа кривых плавления. Во всех положительных образцах (n=16) пик плавления ампликонов находился на уровне 87,5°С, дополнительных пиков зафиксировано не было. При электрофоретическом анализе ампликонов, полученных с использованием обоих пар праймеров (n=32), были зафиксированы четкие полоски свечения на уровне соответствующем массе специфического фрагмента, дополнительных полос неспецифических фрагментов выявлено не было.

В пробах отрицательного контроля (n=5) специфического фрагмента не было зафиксировано ни при постановке ПЦР-РВ, ни при электрофоретическом анализе.

Заключение. Оптимизированный метод молекулярно-генетической идентификации *K. pneumoniae*, основанный на использовании специфических пар праймеров, усовершенствованных состава амплификационной смеси и программ амплификации, позволяет проводить выявление ДНК возбудителя в бактериальных культурах пациентов с сепсисом. Использование оптимизированного метода позволяет проводить быструю и точную молекулярно-генетическую идентификацию *K. pneumoniae* для проведения дальнейшего изучения свойств инфекционного агента.

Список литературы

1. Daniels, R. What next for sepsis? / R. Daniels // Lancet Infect Dis. – 2015. – Т. 15, № 5. – P. 499-501.

2. Interventions for rapid recognition and treatment of sepsis in the emergency department: a narrative review / J. W. Uffen [et al.] // Clin Microbiol Infect. – 2021. – Т. 27, № 2. – P. 192-203.

3. Якубцевич, Р.Э. Сепсис в интенсивной терапии: современные аспекты диагностики / Р. Э. Якубцевич // Журнал ГрГМУ. – 2016, № 1. – С. 11-16.

4. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis / A. Cassini [et al.] // Lancet Infect Dis. – 2019. – Т. 19, № 1. – С. 56-66.

5. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control / M. Bassetti [et al.] // Expert Rev Anti Infect Ther. – 2018. – Т. 16, № 10. – С. 749-761.

6. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer / Y. Liu [et al.] // Int J Food Microbiol. – 2008. – Vol. 125, № 3. – P. 230-5. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.005.

7. Primer and probe for quantitative determination of *Klebsiella pneumonia*, and application of primer and probe : Worldwide patent CN103642910B / Application filed by Suzhou Baiyuan Gene Technology Co Ltd. / Application date 26.11.2013; Application granted and publication 09.09.2015.