

ТИПИРОВАНИЕ ШТАММОВ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* МЕТОДОМ ПЦР

В.С. Грудина, А.А. Белянкин, Н.С. Савельев, С.О. Рабдано

ФГУП СПбНИИВС ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Введение. *Streptococcus pneumoniae* является одним из наиболее значимых патогенов, вызывающих широкий спектр заболеваний у человека, включая пневмонию, менингит, отит и сепсис. Эпидемиологический контроль и эффективное лечение инфекций, вызванных этим микроорганизмом, во многом зависят от точного определения его серотипов. Традиционные методы серотипирования, такие как агглютинация и серологические тесты, обладают рядом ограничений, включая низкую чувствительность и трудоемкость. В последние годы все большее значение приобретает молекулярный подход — полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющая быстро и точно идентифицировать серотипы *S. pneumoniae* на основе специфических генетических маркеров. Например, для серотипов 1, 4, 5, 7F, 15A, 19A, 19F, 23F целевым геном является ген *wzy* (кодирует полимеразу O-антигена (Wzy)), которая играет важную роль в синтезе липополисахарида (LPS) бактерий [1], для серотипа 3 - *galU* (кодирует UDP-глюкозопирофосфорилазу, необходимую для биосинтеза капсул [2]).

Целью данного исследования является разработка и применение методики на основе ПЦР для типирования серотипов *S. pneumoniae* из главного банка клеток *S. pneumoniae*, используемого для производства вакцинных полисахаридов, с целью верификации содержащейся в банке культуре и исключения контаминации.

Поставленные задачи:

1. Выделить ДНК из 15 штаммов *Streptococcus pneumoniae* из инактивированных образцов главного банка клеток;
2. Провести амплификацию специфичных участков генома целевыми праймерами, предложенными центром по контролю и профилактике заболеваний США [3];
3. Определить оптимальные температуры отжига праймеров для дальнейшей разработки протокола;
4. Оценить результат амплификации (наличие и длина продуктов) с помощью электрофореза в агарозном геле.

Материалы и методы. Анализировались штаммы *S. pneumoniae*, имеющиеся в ФГУП СПбНИИВС ФМБА России: Pneuma 1, PCV-3, PCV-4, PCV-5, PCV-14R, PCV-12F, PCV-6A, PCV-6B, PCV-9V, PCV-7F, Pneuma 15A, Pneuma 18C, PCV-19F, PCV-22F. Культуру клеток выращивали при 37°C, 5% CO₂ на Hemin free media (HFM), инактивировали 20 мин при 56°C. Выделение ДНК из культуры производили с помощью набора ExtractDNA Blood&Cells («Евроген», Россия). Концентрацию полученных препаратов измеряли на спектрофотометре Nanodrop («Implen», Германия). Для амплификации участков была использована окрашенная реакционная смесь для ПЦР 5X Screen Mix («Евроген», Россия). В состав реакционной смеси входило от 20 до 60 нг ДНК; 0,4 мкМ соответствующих праймеров; 5 мкл 5X Screen Mix («Евроген», Россия).

Полимеразно-цепная реакция проводилась в амплификаторе Bio-Rad T100 («Bio-Rad», США)

Программа амплификации, представленная в таблице 1 была подобрана согласно с рекомендациями производителя реакционной смеси и температурой отжига праймеров.

Таблица 1 – Программа амплификации для серотипирования *S. pneumoniae*

Этап	Температура, °С	Время	Количество циклов
Предварительная денатурация	95	5 мин	1
Денатурация	95	30 сек	30
Отжиг праймеров	Зависит от штамма	30 сек	
Элонгация	72	1 мин	
Финальная элонгация	72	3 мин	1
Удержание температуры	4	∞	1

Для определения оптимальной температуры отжига пар праймеров был задан градиент температур, подобранный на основе теоретического расчета праймеров в инструменте для определения T_m праймеров, разработанный Thermo Scientific [4]. Для амплификации геномной ДНК штаммов PCV-6A, PCV-6B, PCV-9V, PCV-7 градиент – 55-65 °С и 26 циклов; для амплификации геномной ДНК остальных штаммов – 60-70 °С и 30 циклов.

Анализ размеров ампликонов проводился методом электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия в течение 1 часа при 110 В. В лунки вносились маркер 100+ bp («Евроген», Россия) объемом 4 мкл; ПЦР- смеси – объемом 10 мкл.

Обработка агарозного геля осуществлялась в программе Image Lab («Bio-Rad», США).

Результаты и обсуждение. Реакция ПЦР для подобранных пар праймеров прошла положительно с геномной ДНК всех штаммов в эксперименте по типированию штаммов *S. pneumoniae*. Оптимальные температуры отжига праймеров были подобраны по принципу отсутствия побочных продуктов ПЦР, а также по наибольшему содержанию целевого продукта. Значения температур приведены в таблице 2.

Таблица 2 – Оптимальные температуры отжига праймеров

Пара праймеров	Температура отжига, °С
1 fwd, 1 rev	60,0
3 fwd, 3 rev	60,0
4 fwd, 4 rev	60,0
5 fwd, 5 rev	62,0
6A/B fwd, 6A/B rev	58,8
7F fwd, 7F rev	58,8
9V fwd, 9V rev	58,8
14 fwd, 14 rev	62,0
12F fwd, 12F rev	66,1
15A fwd, 15A rev	66,1
18C fwd, 18C rev	62,0
19A fwd, 19A rev	60,0
19F fwd, 19F rev	69,3
22F fwd, 22F rev	60,0

Продукты ПЦР анализировались с помощью гель-электрофореза по завершению реакции. Пример результатов после анализа представлен на рисунке 1.

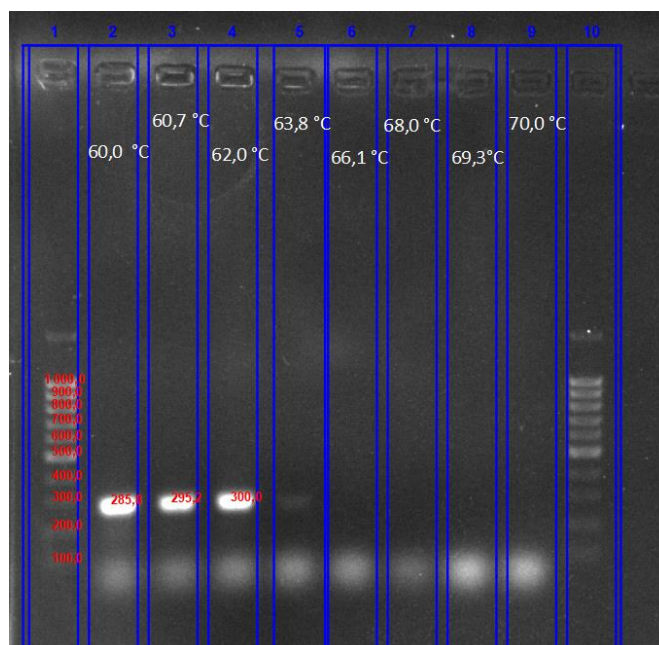


Рисунок 1 – Электрофореграмма с анализом образцов из эксперимента по подбору температуры отжига с геномной ДНК штамма Pneum 1 (серотип 1)

При анализе основных результатов, была составлена сводная таблица сравнения размеров ампликонов с теоретическими значениями, указанными центром по контролю и профилактике заболеваний США [3].

Таблица 3 – Сравнение теоретических длин фрагментов с оцененными на гель-электрофорезе

Номер	Штамм	Теоретическая длина фрагмента, п.о.	Длина фрагмента на геле, п.о.
1	Pneuma 1	280	285
2	PCV-3	371	380
3	PCV-4	430	430
4	PCV-5	362	370
5	PCV-14R	189	176
6	PCV-12F	376	344
7	Pneuma 15A	434	374
8	Pneuma 18C	573	478
9	Pneuma 19A	566	537
10	PCV-19F	304	261
11	PCV-22F	643	584
12	PCV-6A	250	254
13	PCV-6B	250	251
14	PCV-9V	816	821
15	PCV-7F	590	547

Штаммы *Streptococcus pneumoniae* Pneuma 1, PCV-3, PCV-4, PCV-5, PCV-14R, PCV-12F, PCV-6A, PCV-6B, PCV-9V, PCV-7F соответствуют своим серотипам, фрагменты на электрофорезе совпадают с теоретическими по длине с отклонением не более 40 п.о. (см. таблицу 3). Для штаммов Pneuma 15A, Pneuma 18C, PCV-19F, PCV-22F отклонение достигает 100 п.о., однако наличие положительно прошедшей ПЦР говорит о специфическом отжиге праймеров. Это позволяет заключить, что и для этих штаммов серотип подтвержден. Для более точной идентификации длин фрагментов необходимо продлить время электрофореза или увеличить концентрацию агарозы: необходимо повышение разрешение на геле.

Выводы В результате типирования штаммов *S. pneumoniae* было установлено, что все штаммы соответствуют по заявленному серотипу. Для штаммов Pneuma 15A, Pneuma 18C, PCV-19F, PCV-22F теоретическая и практическая длины ампликонов имеют отличия до 100 п.о., для других штаммов отличие менее 40 п.о. Предложенные праймеры и условия ПЦР возможно использовать для рутинного контроля качества производственных банков клеток. Возможными улучшениями методики может быть переход на ПЦР в режиме реального времени, а также подбор оптимальных условий для постановки ПЦР напрямую с использованием инактивированных клеток бактерий для исключения стадии выделения ДНК из культуры.

Литература

1. Zuo J., Tu C., Wang Y. et al. The role of the wzy gene in lipopolysaccharide biosynthesis and pathogenesis of avian pathogenic *Escherichia coli* // *Microbial Pathogenesis*. 2019. Vol. 127. P. 296–303. doi: 10.1016/j.micpath.2018.12.021
2. Bonofiglio L., García E., Mollerach M. The galU gene expression in *Streptococcus pneumoniae* // *FEMS Microbiology Letters*. 2012. Vol. 332. № 1. P. 47–53. doi: 10.1111/j.1574-6968.2012.02572.x
3. List of oligonucleotide primers used in conventional multiplex PCR assays for pneumococcal serotype deduction // Centers for Disease Control and Prevention. URL: <http://www.cdc.gov/streplab/downloads/pcr-oligonucleotide-primers.pdf> (дата обращения: 25.07.2025).
4. Tm Calculator for Primers // Thermo Fisher Scientific. URL: <https://www.thermofisher.com/nl/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html> (дата обращения: 25.05.2025).