

Разработка ПЦР тест-системы для детекции лейкоцидин-продуцирующих золотистых стафилококков

Белоусов А.В.¹, Бикбаева Ю.Н.², Рубальский М.О.³, Рубальский Е.О.⁴

¹ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, г. Астрахань, Россия

²Управление Роспотребнадзора по Республике Татарстан, г. Казань, Россия

³ООО «Городская диагностическая лаборатория», г. Астрахань, Россия

⁴ФБУН Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

E-mail: rubalsky@phage.pro, alexandr123456111@mail.ru

Актуальность

- Золотистый стафилококк является частым возбудителем пиодермий и инфекций мягких тканей, а также абсцессов внутренних органов или угрожающей жизни септицемии.
- *S. aureus* имеет возможность значительно повысить свою вирулентность за счет продукции ферментов и токсинов. Одним из наиболее важных токсинов является лейкоцидин Пантона-Валентайна (PVL), который вызывает образование пор в макрофагах.
- Инфекции, вызванные PVL+ золотистым стафилококком, трудно поддаются антибиотикотерапии за счет повышенной способности микроорганизма к пенетрации в ткани, а также редуцированного макрофагального звена иммунитета.
- В настоящее время отсутствуют тест-системы, позволяющие выявлять PVL-положительные *S. aureus*.

Цель работы

- Разработка тест-системы в форматах классической ПЦР и ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) для выявления золотистых стафилококков, продуцирующих лейкоцидин Пантона-Валентайна.

Результаты конструирования тест-системы

- Разработаны специфические олигонуклеотиды, которые готовятся к патентованию.
- На основе расчетной температуры отжига праймеров по методу Аллави проведена оптимизация условий ПЦР. Время денатурации, и отжига составило по 15 секунд, время элонгации составило 30 секунд, количество циклов – 40.
- Наиболее ранний сигнал (наименьший критический цикл Cq) при использовании длины волны поглощения 497 нм и длины волны флуоресценции 520 нм наблюдался при температуре отжига 60°C.
- Чувствительность реакции составила 10³ копий/мл.

Результаты апробации тест-системы

Тест-культуры, n – число протестированных изолятов или штаммов	PVL+	PVL–
Изоляты <i>S. aureus</i> (коагулазопозитивные), n=15	2	13
Изоляты коагулазонегативных стафилококков, n=20	0	20
Штамм <i>S. aureus</i> ATCC 29213 (PVL-отрицательный), n=1	0	1
Штамм <i>S. aureus</i> ATCC 25923 (PVL-положительный), n=1	1	0

Выводы

- Разработана тест-система для выявления золотистых стафилококков, продуцирующих токсин PVL.
- Показана высокая чувствительность и специфичность разработанной тест-системы в форматах классической ПЦР и ПЦР-РВ.
- Проведена успешная апробация тест-системы на коагулазопозитивных и коагулазонегативных клинических изолятах стафилококков.

