



ОПИСАНИЕ ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ К ПАТЕНТУ

(21) 2019/0699.2

(22) 05.08.2019

(45) 03.04.2020, бюл. №13

(72) Байменов Бахыт Муратович (KZ); Алиева Гульнур Козыевна (KZ); Мендыбаева Анара Муратовна (KZ); Рыщанова Раушан Миранбаевна (KZ); Чужебаева Гульжаган Джамбуловна (KZ); Шюкждинене Рита (LT); Шевченко Павел Викторович (KZ); Бермухаметов Жанайдар Жагпарович (KZ); Алешина Юлия Евгеньевна (KZ)

(73) Республиканское государственное предприятие на праве хозяйственного ведения "Костанайский государственный университет имени А. Байтурсынова" Министерства образования и науки Республики Казахстан (KZ)

(56) CN 103421906 B, 23.08.2013

(54) **ВИДОСПЕЦИФИЧЕСКАЯ
НУКЛЕОТИДНАЯ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ
ПРАЙМЕРОВ И ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ
ЗОНДОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
STAPHYLOCOCCUS AUREUS МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В
РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

(57) Полезная модель относится к молекулярной биологии, а именно к применению видоспецифичных праймеров и флуоресцентных зондов для обнаружения генов устойчивости *Staphylococcus aureus* к антибиотикам групп: бета-лактамов, макролидов, тетрациклинов, сульфаметоксазол/триметопримов методом полимеразной цепной реакции в формате Real-time. Структура последовательностей подобрана таким

образом, что разница температур их плавления минимальна.

Задачей полезной модели, является использование олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены устойчивости к бета-лактамым антибиотикам - ген *MecA*; макролидам - гены *ErmC*, *MsrA*; тетрациклинам - гены *tetM*, *tetK* и сульфаметоксазол/триметопримам - ген *dfpG*.

Полезная модель, позволяет при помощи предложенных праймеров выявить наличие генов антибиотикорезистентности микроорганизмов вида *Staphylococcus aureus* к антибиотикам, при этом, детекция амплифицированных участков осуществляется при помощи флуоресцентно меченых зондов в реальном времени.

Технический результат достигается использованием синтетических олигонуклеотидов-праймеров и флуоресцентных зондов, используемых для выявления методом полимеразной цепной реакции в реальном времени участков генов резистентности к антимикробным препаратам микроорганизмов вида *Staphylococcus aureus*.

Способ осуществляется с использованием амплификатора для проведения ПЦР марки QuantStudio5, производитель «Applied Biosystems», США или аналогичного.

Детекция продуктов амплификации осуществляется методом регистрации флуоресценции, генерируемой в результате разрушения гибридизационного зонда, содержащего на 5'-конце флуорофор FAM, а на 3'-конце - гаситель BHQ1.

Полезная модель относится к молекулярной биологии, а именно к применению видоспецифичных праймеров и флуоресцентных зондов для обнаружения генов устойчивости *Staphylococcus aureus* к антибиотикам групп: бета-лактамам, макролидов, тетрациклинов, сульфаметоксазол/триметопримов методом полимеразной цепной реакции в формате Real-time. Структура последовательностей подобрана таким образом, что разница температур их плавления минимальна.

Известны способы определения антибиотикочувствительности:

1. Современные стандартизованные методы определения чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (АБП), подразделяют на методы серийных разведений и диффузионные [1. МУК 4.2.1890-04 - Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Утверждены и введены в действие Главным государственным санитарным врачом Российской Федерации - Первым заместителем Министра здравоохранения Российской Федерации Г.Г.Онищенко 4 марта 2004 г.// Методические указания.—М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004,—91 с.].

Методы серийных разведений основаны на прямом определении основного количественного показателя, характеризующего микробиологическую активность АБП - величины его минимальной подавляющей концентрации (МПК). МПК - минимальная концентрация, подавляющая видимый рост исследуемого микроорганизма в бульонной культуре или на плотной среде. Для определения МПК заданные концентрации АБП вносят в питательную среду, которую затем засевают культурой исследуемого микроорганизма и после инкубации оценивают наличие или отсутствие видимого роста. В зависимости от характера используемой питательной среды различают методы серийных разведений в агаре или в бульоне. В зависимости от объема используемой жидкой питательной среды выделяют методы серийных макро- и микро-разведений.

Диффузионные методы определения чувствительности основаны на диффузии АБП из носителя в плотную питательную среду и подавлении роста исследуемой культуры в той зоне, где концентрация АБП превосходит МПК.

В настоящее время существуют две основные модификации диффузионного метода: диско-диффузионный и Е-тест.

В диско-диффузионном методе в качестве носителя АБП используют бумажный диск. Образование зоны подавления роста происходит в результате диффузии АБП из носителя в питательную среду. В определенных пределах величина диаметра зоны подавления роста обратно пропорциональна МПК.

Е-тест представляет собой узкую полоску полимера (0,5x6,0 см), на которую нанесен градиент

концентраций АБП (от минимальных до максимальных). Подавление роста микроорганизма вокруг полоски Е-теста происходит только в той зоне, где концентрация АБП, диффундирующего из носителя, выше МПК, при этом образуется каплевидная зона ингибиции. Значения концентрации АБП в каждом участке носителя типографским способом нанесены на наружной (обращенной к исследователю) поверхности Е-теста. Величину МПК учитывают в том месте, где граница зоны подавления роста вплотную подходит к носителю.

Недостатком данных методов является длительность обнаружения устойчивости к лекарственным средствам до нескольких дней. Бактерии необходимо инкубировать на нескольких питательных средах, при этом проводить идентификацию выделенных штаммов микроскопическими и биохимическими методами. Диско-диффузионный метод позволяет лишь косвенно судить о величине МПК, а результатом исследования является отнесение микроорганизма к одной из категорий чувствительности (чувствительный, промежуточный или резистентный).

2. Так же известен патент Китайской Народной Республики CN106480219A «Набор для обнаружения мультиплексной ПЦР (полимеразной цепной реакцией) генов лекарственной устойчивости к макролидам стафилококковой инфекции у животных и способ применения» [2. Патент CN106480219A - дата начала отсчета срока действия патента 2017-03-08. Авторы: Чэн Жентао, Ма Гуанцян, Чжоу Бижунь, Ван Кайгун, Юэ Юэ, Ли Йи]. Изобретение относится к набору для обнаружения тройной ПЦР (полимеразной цепной реакции) генов устойчивости к макролидным лекарственным препаратам у стафилококка, инфицирующим домашний скот. Комплект, включает в себя три пары праймеров для ПЦР для усиления генов устойчивости к лекарственным средствам у обнаруживаемых бактерий, реагент для приготовления матрицы. И реактив множественной амплификации гена устойчивости к лекарственным препаратам.

Недостатком этого набора является способность обнаружения генов устойчивости только к макролидным лекарственным средствам у стафилококков. Недостатки данного изобретения устраняются подбором видоспецифичных праймеров и зондов к генам антибиотикорезистентности других групп антибиотиков.

3. В качестве ближайшего аналога выбран патент Китайской Народной Республики CN103421906B «Набор и метод определения лекарственной устойчивости золотистого стафилококка» [3. Патент CN103421906B - дата начала отсчета срока действия патента 2013- 08-23. Авторы: Ван Вэй, Чен Ин, Ху Вэй, Тауки, Ян Хайронг, Чжао Юншэн, Чжао Гуймин, Лю Ян]. Настоящее изобретение относится к наборам и методам обнаружения лекарственной устойчивости

Staphylococcus aureus. В частности, настоящее изобретение также относится к способу мультиплексной ПЦР-амплификации, в котором используют ДНПЛС (Денатурирующая жидкостная хроматография высокого давления) для детекции продуктов мультиплексной ПЦР-амплификации.

Недостатком этих праймеров, является способность обнаружения генов устойчивости только к метициллину - *mecA*, аминогликозидам *aacA* - *aphD*, эритромицину - *ermA* и *ermC*, тетрациклину - *tetK* и *tetM*. Так же использование денатурирующей жидкостной хроматографии высокого давления (ДНПЛС) является относительно новым методом, недостатком которого является высокая стоимость проведения анализа, необходимость в высококвалифицированных специалистах и оборудовании для проведения жидкостной хроматографии.

Задачей полезной модели, является использование олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены устойчивости к бета-лактамам антибиотикам - ген *MecA*; макролидам - гены *ErmC*, *MsrA*; тетрациклинам - гены *tetM*, *tetK* и сульфаметоксазол/триметопримам - ген *dfgG*.

Поставленная задача решается благодаря тому, что, как и патент Китайской Народной Республики CN103421906B «Набор и методика определения лекарственной устойчивости золотистого стафилококка», содержащем праймеры, используемые для идентификации нуклеиновых кислот специфичных для генов антибиотикоустойчивости, используемые в полимеразной цепной реакции для *Staphylococcus aureus* [3], предусмотрены следующие отличия: видоспецифические нуклеотидные последовательности (праймеры и флуоресцентные зонды) используется для определения

антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* с детекцией продуктов ПЦР-амплификации в реальном времени; содержит праймеры для идентификации специфических участков генов резистентности для более широкого спектра антимикробных препаратов, таким как: бета-лактамы - *MecA*, макролиды - *ErmC*, *MsrA*, тетрациклины - *tetM*, *tetK* и сульфаметоксазол/триметопримы - *dfgG*.

Кроме того, предложенная полезная модель «Видоспецифические нуклеотидные последовательности (праймеры и флуоресцентные зонды) для определения антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в формате Real-time» отличается тем, что предусматривает использование флуоресцентных зондов для детекции амплифицированных участков в формате Real-time PCR, исключая проведение детекции методом денатурирующей жидкостной хроматографии высокого давления, что в свою очередь существенно уменьшает стоимость проведения анализа.

Полезная модель, позволяет при помощи предложенных праймеров выявить наличие генов антибиотикорезистентности микроорганизмов вида *Staphylococcus aureus* к антибиотикам групп: бета-лактамы, макролиды, тетрациклины - и сульфаметоксазол/триметопримы, при этом, детекция амплифицированных участков осуществляется при помощи флуоресцентно меченых зондов в реальном времени.

Технический результат достигается использованием синтетических олигонуклеотидов-праймеров и флуоресцентных зондов, используемых для выявления методом полимеразной цепной реакции в реальном времени участков генов резистентности к антимикробным препаратам микроорганизмов вида *Staphylococcus aureus*.

Таблица 1

Синтетические олигонуклеотиды-праймеры и флуоресцентные зонды, для выявления генов антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus*

Группа антибиотиков	Анализируемый ген	Размер, п.н	Праймер и зонды (5'→3')	Температура
Бета-лактамы	<i>MecA</i>	115	F-ACGGTAACATTTGATCGCAACG	63.3°C
			R-TGTATGCTTTGGTCTTTCTGCAT	63.2°C
			P-TGGGATCATAGCG(FAMdT)CATTATTCAGGA	67°C
Макролиды	<i>ErmC</i>	97	F-TCGTTATGAAATGGGTAAACAA	63.3°C
			R-TTGTTTAAATCGTCAATTCCT	63.2°C
			P-TCAATTTAACAAT(FAMdT)CCTTAAAACATGC	67°C
	<i>MsrA</i>	76	F-CTGCTAACACAAGTACGATTCCA	62.6°C
			R-TCTTACCTACACCATTTGCACCT	63.9°C
			P-ACCATATGGCAAAA(FAMdT)ATAGCGCTCGT	66.9 °C
Тетрациклины	<i>tetM</i>	166	F-GCATTGGAACCTCGAACAAAGAGG	63.4°C
			R-TCCGCAAAGTTCAGACGGA	64.1°C
			P-CTGTTCCCTCTT(FAMdT)ATCATGGAAGTGCA	66.4°C
	<i>tetK</i>	136	F-TGTTATGGGCGGATTATCTTTTACT	62.6°C
			R-TGCTATACCTGTTCCTCTGA	62.1°C
			P-AGAAGTTGCTTC(FAMdT)GGAATGAGTTTGCT	67°C

сульфаметоксазол/триметопримы	dfrG	182	F-GCTTATTCAACTAACGGGCAGG	63.3°C
			R-TCCCAGTCCTTGGGAATCCT	64.6°C
			P-TGAAAGTTTCTT(FAMdT)GATTGCTGCGATGG	66.5°C

Состав реакционной смеси включает следующие компоненты: праймеры и флуоресцентные зонды 0.2 μ M, буфер для проведения ПЦР реакции, Mg^{++} 3 mM, Na^+ 50 mM, смесь дезоксирибонуклеотидтрифосфатов dNTP 0.8 mM и Taq-полимераза.

Также на основании выбранных в процессе экспериментов оптимальных параметров времени и температур для всех стадий амплификации, был составлен следующий режим для проведения ПЦР в формате Real-time:

пре-денатурация	5 мин	98°C	} 35 циклов
денатурация	20 с	94°C	
отжиг	20 с	63°C	
синтез	20 с	72°C	
хранение	4°C		

Способ осуществляется с использованием амплификатора для проведения ПЦР марки QuantStudio5, производитель «Applied Biosystems», США или аналогичного.

Детекция продуктов амплификации осуществляется методом регистрации флуоресценции, генерируемой в результате разрушения гибрида зонда, содержащего на 5'-конце флуорофор FAM, а на 3'-конце - гаситель BHQ1.

ФОРМУЛА ПОЛЕЗНОЙ МОДЕЛИ

Видоспецифическая нуклеотидная последовательность праймеров и флуоресцентных зондов для определения антибиотикорезистентности *Staphylococcus aureus* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, включающая синтетические олигонуклеотиды-праймеры и флуоресцентные зонды, *отличающаяся* тем, что используют праймеры для идентификации специфических участков генов резистентности для группы антибиотиков: бета-лактамы - MecA, макролиды - ErmC, MsrA, тетрациклины - tetM, tetK, сульфаметоксазол/триметопримы - dfrG