



## МІКРОБІОЛОГІЯ, ЕПІЗООТОЛОГІЯ ТА ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

УДК 636.09:616.981.25:619

Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.*Шевченко М.В.<sup>1</sup> , Тишківська Н.В.<sup>1,2</sup> , Андрійчук А.В.<sup>1</sup> ,Мартиненко О.А.<sup>2</sup>, Царенко Т.М.<sup>1</sup> <sup>1</sup> Білоцерківський національний аграрний університет<sup>2</sup> ТОВ Експертний центр діагностики та лабораторного супроводу «Біолайтс» Царенко Т.М. E-mail: taras.m.tsarenko@gmail.com

Шевченко М.В., Тишківська Н.В., Андрійчук А.В., Мартиненко О.А., Царенко Т.М. Внутрішньолабораторна апробація протоколу ПЛР для молекулярно-генетичної ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.* Науковий вісник ветеринарної медицини, 2022. № 1. С. 81–91.

Shevchenko M., Tyshkivska N., Andriy-chuk A., Martynenko O., Tsarenko T. Intra-laboratory testing of the PCR protocol for molecular genetic identification of bacteria of the genus *Staphylococcus spp.* *Nauk. visn. vet. med.*, 2022. № 1. PP. 81–91.

Рукопис отримано: 08.04.2022 р.

Прийнято: 27.04.2022 р.

Затверджено до друку: 24.06.2022 р.

Doi: 10.33245/2310-4902-2022-173-1-81-91

Наведені результати оптимізації протоколу ідентифікації бактерій *Staphylococcus spp.* методом полімеразної ланцюгової реакції з детекцією в агарозному гелі та апробації протоколу з польовими штамами відібраними від собак. Визначення параметрів специфічності та чутливості методу проводили на музейних штаммах коків *S. epidermidis ATCC 14990*, *S. aureus ATCC 25923*, *S. aureus subsp. aureus UKM B-918*, *S. pneumoniae ATCC 49619* та *E. faecalis ATCC 194433*.

Екстракцію ДНК проводили за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit. Для виготовлення реакційної суміші використали готовий ПЛР мікс NEB OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer. Для дослідження використовували праймери націлені на ділянку гена *tuf*, що дають продукт ампліфікації 370 bp. Облік результатів реакції проводили в 2 % агаровому гелі з додаванням етидіум бромід у концентрації 0,5 %.

Оптимальну температуру відпалу визначали методом градієнта температур.

За дослідження специфічності методики три музейні штами стафілококів були ідентифіковані як позитивні, тимчасом штами інших коків не дали продуктів реакції.

Дослідження чутливості методу полягало у виявленні продукту ампліфікації в семи розведеннях бактеріальної суспензії, що відповідають стандартам каламутності McFarland, найменша концентрації була додатково розведена у 10, 100 та 1000 разів. Останнє розведення, що показало наявність продукту ампліфікації відповідає  $2 \times 10^6$  КУО в 200 мкл фізіологічного розчину, що використовували для виділення ДНК.

Апробацію протоколу ПЛР проведено на польових штаммах стафілококів. Для дослідження були відібрані вушні і назальні мазки у собак, а також змиви з клітки-переноски. Первинний посів матеріалу був проведений на маніт-сольовий агар, на цьому середовищі можливий ріст лише галофільних мікроорганізмів. Було виявлено ріст на 17 чашках Петрі. Дослідження змивів з цих чашок методом ПЛР вказало на наявність стафілококів у досліджуваних матеріалах.

Результати внутрішньолабораторної апробації ПЛР вказують на те, що використаний нами праймер дає високі показники параметрів специфічності та чутливості. Апробована нами методика може бути використана для підтвердження наявності бактерій *Staphylococcus spp.* в первинному посіві мазків відібраних від собак.

**Ключові слова:** ПЛР, *tuf* ген, апробація праймерів, оптимізація праймерів, мікрофлора собак, *Staphylococcus spp.*

**Постановка проблеми та аналіз останніх досліджень.** *Staphylococcus spp.* поширений в природі рід мікроорганізмів, що в нормі колонізує організм тварин та людей. Різні родини стафілококів відрізняються за ступенем своєї патогенності і природними носіями [1]. Значною проблемою пов'язаною зі стафілококами є набуття ними стійкості до антибактеріальних засобів [2]. На сьогодні багато зусиль спрямовано на виявлення стійкості окремих штамів до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, так званих метицилінрезистентних стафілококів [3, 4]. Такі штамми можуть набувати стійкості до інших груп антибіотиків, ставати мультирезистентними та колонізувати простір лікарень, пацієнтів та персонал. Для ефективного лікування інфекцій спричинених такими штамми потрібно проводити додаткові лабораторні дослідження [5, 6].

Мікробіологічні методи дослідження стафілококів потребують 2–3 доби для виділення чистої культури та постановки біохімічних тестів. Цей процес може спростити використання тест-систем, наприклад API-Staph [7]. Проте різні родини стафілококів можуть мати мінливі або однакові біохімічні ознаки, що унеможливує повну їх ідентифікацію мікробіологічними методами [8]. MALDI-ToF MS сучасний метод, який пропонують використовувати як новий золотий стандарт, однак його застосування також потребує виділення чистої культури [9, 10]. Водночас прилад дороговартісний і його обслуговування можуть собі дозволити лише великі лабораторії.

Молекулярно-генетичні методи поєднують високу специфічність і чутливість, проте не дають інформації про фенотипові особливості штамів. Розроблені праймери направлені на ділянку *tuf*, *nuc* та *16S rRNA* генів для родової і родинної ідентифікації стафілококів методом класичної ПЛР [11–13]. Праймери направлені на ділянку *gap* та *groEl* генів для видової і родинної ідентифікації стафілококів методом ПЛР з поліморфізмом довжини рестрикційних фрагментів [14, 15]. Праймери направлені на

ділянку гена *nuc* та *tuf* для постановки кількісної ПЛР в реальному часі [16, 17]. Впровадження методів повногеномного секвенування відкриває можливість детального генотипування штамів, дослідження їх розповсюдженості і пов'язати генетичні особливості з їх фенотиповими проявами [18].

Дослідження, спрямовані на вивчення стафілококів, потребують комбінування різних методів для збільшення їх ефективності і специфічності.

**Мета дослідження** – оптимізувати та апробувати протокол ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.* методом ПЛР.

**Матеріал і методи дослідження.** Для контролю використали музейні штамми: позитивний контроль – *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus subsp. aureus* UKM B-918, негативний контроль – *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Enterococcus faecalis* ATCC 194433.

Музейні штами зберігаються в напіврідкому середовищі за температури 4 °С. Для дослідження їх пересівали з напіврідкого агару на чашку Петрі з Plate Count Agar далі PCA (HiMedia Laboratories, Індія) та культивували протягом доби за температури 37 °С.

**Виділення ДНК.** 4–5 типових колоній з поверхні агару бактеріологічною петлею перенесли в 1 мл стерильного фосфатного буферу та розводили до 0,5 по стандарту McFarland, потім 200 мкл бактеріальної суспензії перенесли в окрему пробірку. Виділення ДНК проводили за допомогою набору IndiSpin Pathogen Kit (Indical Bioscience, Німеччина), дотримуючись стандартної інструкції.

**Полімеразна ланцюгова реакція.** Для дослідження в літературних джерелах була підібрана пара праймерів, націлених на ділянку гена *tuf*, що кодує фактор елонгації *Tu*, який бере участь у формуванні пептидного ланцюга і є важливою частиною бактеріального геному. Олігонуклеотиди були синтезовані Metabion (Німеччина). Інформація про використані олігонуклеотиди подана в таблиці 1.

Таблиця 1 – Олігонуклеотиди використані в дослідженні

Назва олігонуклеотиду	Послідовність нуклеотидів	Температура плавлення ( $T_m$ )	Віднайдена оптимальна температура відпалу ( $T_a$ )	Розмір продукту ампліфікації	Літературне джерело
TStaG422	5'-GGC CGT GTT GAA CGT GGT CAA ATC A-3'	67	55	370 bp	[7]
TStag765	5'-TI(Inosine)A CCA TTT CAG TAC CTT CTG GTA A-3'	60			

Дослідження проводили за допомогою ПЛР з детекцією в агаровому гелі. Реакцію ампліфікації проводили в реакційній суміші об'ємом 25 мкл, яка включала: 12,5 мкл готового ПЛР міксу OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer (New England Biolabs, США), 7,5 мкл деіонізованої води, по 1 мкл F та R праймерів і 3 мкл ДНК. Ампліфікацію проводили в термоциклері GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems, США), за температурних режимів вказаних в таблиці 2.

Детекцію результатів проводили в 2 % агаровому гелі з додаванням 0,5 % етидіум броміду. Аналіз реакції проводили за наявністю специфічної смуги відповідного розміру напроти лунки з позитивним контролем та відсутністю відповідної смуги напроти лунки з негативними контролями.

*Оптимізація протоколу.* Для визначення оптимальної температури відпалу була проведена оптимізація протоколу, методом градієнта температур з кроком в 2 °С в діапазоні від 47 до 65 °С. Температура, за якої реакція була найбільш специфічною, використана в наступних етапах дослідження.

*Дослідження специфічності.* Дослідження специфічності реакції проводили на трьох посівах кожного музейного штаму. Виділення ДНК та постановку ПЛР проводили за вказаним вище протоколом.

*Дослідження чутливості.* Дослідження чутливості проводили на трьох музейних штаммах стафілококів. Бактеріологічною петлею 4–5 типові колонії вносили в 1 мл фосфатного буфера. Отриману суспензію додатково розводили фосфатним буфером та порівнювали зі стандартом каламутності. Було виготовлено 4 суспензії (4; 2; 1; 0,5 по McFarland standart). Суспензію 0,5 по McFarland було додатково розведено методом серійних розведень в 10, 100 та 1000 разів.

*Апробація протоколу реакції на польових штаммах.* Дослідження проходило в два етапи: первинний посів відібраного матеріалу на селективне середовище і родової ідентифікації збудника методом полімеразної ланцюгової реакції. Мікробіологічну частину дослідження виконували на базі кафедри епізоотології та інфекційних хвороб та в лабораторії «Біолайтс». Молекулярно-генетичну частину досліджень виконували на базі Міжфакультетської лабора-

торії новітніх методів (ІФА та ПЛР) Білоцерківського НАУ.

*Відбір польових штамів.* Польові штами мікроорганізмів відбирали від клінічно здорових собак, що знаходяться на карантині в Управлінні ветеринарної медицини м. Біла Церква. Матеріал відбирали за допомогою аплікатора з пробіркою без транспортного середовища, змоченим декількома краплями фосфатного буфера. Тварину фіксували, тампон аплікатора вводили в ніздрю на 2–3 см і декілька разів прокатували його по слизовій оболонці. Після цього тампон вводили в іншу ніздрю, повторювали відбір, і поміщали назад в пробірку. Мазок з вуха відбирали іншим аплікатором: піднімали вушну раковину і тампон вводили в слуховий прохід на глибину 2–3 см. Тампон аплікатора декілька разів прокатували по слизовій оболонці, відбір повторювали в іншій вушній раковині тим самим аплікатором. Було відібрано 20 парних мазків з носа та вуха собаки, та мазок з клітки-переноски.

*Посів матеріалу.* Первинний посів робили на диференційне середовище маніт-сольовий агар (CONDA, Іспанія). Тампон аплікатора діставали з пробірки і зигзагоподібними рухами проводили ним на поверхню агару, чашку ставили до термостату на 24 години за 37 °С. Через добу чашки Петрі діставали з термостату, визначали прояв росту колоній та робили мазок з декількох типових колоній і фарбували за Грамом. За посіву на селективне середовище було виявлено ріст на 17 чашках Петрі (дані не надані).

ПЛР проводили за згаданим вище протоколом.

**Результати дослідження.** Оптимізацію та апробацію протоколу ПЛР з використанням обраного праймера провели на музейних штаммах. Три музейні культури стафілококів, культура стрептококу і ентерококу були посіяні з середовища зберігання на чашку Петрі з РСА та витримані в термостаті протягом доби за 37 °С. Було засіяно 3 чашки для кожної музейної культури. Через добу 4–5 типових колоній відбирали бакпетлею з поверхні агару, вносили в пробірку з 1 мл фосфатного буфера та розводили до 4 по стандарту каламутності McFarland. Після цього з 200 мкл бактеріальної суспензії було виділено ДНК та поставлена полімеразна ланцюгова реакція.

Таблиця 2 – Температурні режими ампліфікації

Активация полімерази	Ампліфікація – 30 циклів			Фінальна елонгація
	денатурація	відпал	елонгація	
94 °С – 1 хв	94 °С – 30 с	55 °С – 30 с	68 °С – 60 с	68 °С – 5 хв

Температура відпалу підібрана методом градієнта температур. Температурний режим всіх етапів реакції окрім відпалу відповідає паспорту полімерази (мастер-міксу). Реакційну суміш готували безпосередньо перед ампліфікацією. Для оптимізації протоколу був використаний метод градієнта температур з кроком в 2 °С в ді-

апазоні від 47 до 65 °С. Критеріями оцінки були наявність відповідного продукту реакції напроти лунок зі стафілококами та відсутність напроти лунок з іншими коками, відсутність неспецифічних фрагментів, чіткість смужки (бенда) відповідного розміру. Результати дослідження наведені в таблиці 3, рисунок 1.

Таблиця 3 – Умови оптимізації протоколу ПЛР-ідентифікації бактерій роду *Staphylococcus spp.*

Температура	Позитивний контроль	Негативний контроль	Результат оптимізації
47 °С	3/3	0/2 наявні неспецифічні фрагменти	Низька температура
49 °С	3/3 наявні неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Низька температура
51 °С	3/3 наявні неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Низька температура
53 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
55 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
57 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
59 °С	3/3 чіткі бенди	0/2	Оптимальна температура
61 °С	3/3 наявні неспецифічні фрагменти >100	0/2 наявні неспецифічні фрагменти >100	Висока температура
63 °С	3/3 нечіткі бенди, наявні неспецифічні фрагменти	0/2	Висока температура
65 °С	1/3	0/2	Висока температура

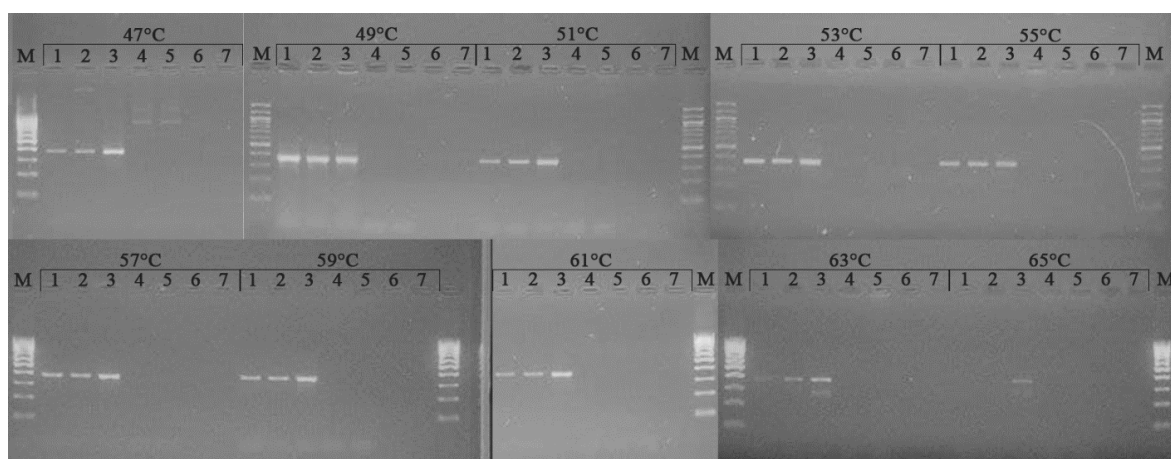


Рис. 1. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки гена *tuf* за різних температур відпалу:

1. *Staphylococcus epidermidis* ATCC (14990).
2. *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
3. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (УКМ В-918).
4. *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 49619).
5. *Enterococcus faecalis* (ATCC 194433).
6. Негативний контроль виділення ДНК.
7. Негативний контроль виготовлення реакційної суміші.

Після оптимізації протоколу була обрана температура відпалу 55 °С та проведена апробація протоколу. Зроблені свіжі посіви кожного з музейних штамів із середовища зберігання на 3 чашки Петрі з РСА. Через добу з кожної чашки проводили відбір типових колоній і виділення з них ДНК за згаданою вище схемою та поставлена полімеразна ланцюгова реакція. Результати дослідження вказані в таблиці 4.

Для визначення чутливості ПЛР використали різний ступінь розведення трьох музейних штамів у фосфатному буфері. Для контролю ступеня розведення використали стандарт каламутності. Бактеріальну суспензію, що відповідає 0,5 по стандарту каламутності, також було додатково розведено методом серійних розведень. Для виділення ДНК відбирали по 200 мкл кожного розведення бактеріальної су-

спензії, що відповідає концентрації бактеріальних клітин (табл. 5).

Продукт ампліфікації у всіх досліджуваних штамів перестав утворюватися на розведенні 0,5:100, що відповідає  $2 \times 10^5$  КУО в 200 мкл суспензії (рис. 2).

Для апробації оптимізованого протоколу були відібрані мазки від собак, що знаходяться на карантині в Управлінні ветеринарної медицини м. Біла Церква. Від кожної собаки було отримано по мазку з вуха та носа. Додатково проведено змиви з кліток-переносок відразу після прибуття собак. Отримані мазки були засіяні на агарову пластину. Відсутність росту на агаровій пластині трактували як відсутність стафілококів у досліджуваному мазку. Позитивними на негативними контролюми слугували музейні штами.

Таблиця 4 – Результат апробації протоколу ПЛР з використанням праймера направлено на ділянку гена *tuf*

№	Назва штаму	Номер посіву	Продукт реакції
1	<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 14990	1	Наявний 370 bp
		2	Наявний 370 bp
		3	Наявний 370 bp
2	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	1	Наявний 370 bp
		2	Наявний 370 bp
		3	Наявний 370 bp
3	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> UKM B-918	1	Наявний 370 bp
		2	Наявний 370 bp
		3	Наявний 370 bp
4	<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	1	Відсутній
		2	Відсутній
		3	Відсутній
5	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 194433	1	Відсутній
		2	Відсутній
		3	Відсутній

Таблиця 5 – Ступінь розведення бактеріальної суспензії

№	Ступінь розведення по McFarland стандарту	Кількість КУО в 1 мл	Кількість КУО в 200 мкл	Наявність продукту реакції
1	4	$1,2 \times 10^9$	$2,4 \times 10^8$	Наявний 370 bp
2	2	$6,0 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	Наявний 370 bp
3	1	$3,0 \times 10^8$	$6 \times 10^7$	Наявний 370 bp
4	0,5	$1,0 \times 10^8$	$2 \times 10^7$	Наявний 370 bp
5	0,5:10	$1,0 \times 10^7$	$2 \times 10^6$	Наявний 370 bp
6	0,5:100	$1,0 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	Відсутній
7	0,5:1000	$1,0 \times 10^5$	$2 \times 10^4$	Відсутній

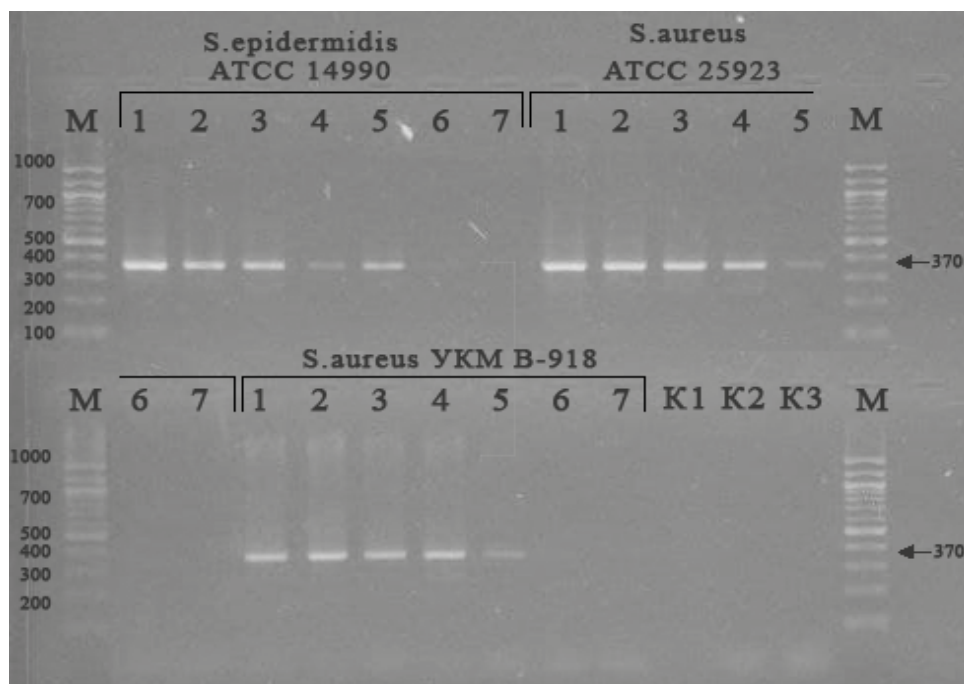


Рис. 2. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки гена *tuf* різних ступенів розведення музейних культур:

- A. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990 1–7 ступінь розведення згідно з таблицею;  
 B. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 1–7 ступінь розведення згідно з таблицею;  
 C. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* UKM B-918 1–7 ступінь розведення згідно з таблицею;  
 K1. *Enterococcus faecalis* ATCC 194433 (4 по McFarland); K2. Негативний контроль виділення ДНК;  
 K3. Негативний контроль приготування реакційної суміші.

Отримали ріст на 17 агарових пластинах. В усіх чашках Петрі колір середовища, частково чи повністю, був змінений на жовтий (всі отримані культури ферментували маніт), рисунок 3.

Із поверхні агару були проведені змиви маніт-ферментуючих колоній за допомогою фосфатного буфера, та розведені до 0,5 за стандартом каламутності. З отриманих суспензій виділили ДНК та поставили ПЛР за раніше оптимізованим протоколом (рис. 4).

Отримали відповідний ПЛР-продукт розміром 370 бп напроти лунок з усіма штамми, що дали ріст на диференційному середовищі. Наявність відповідних продуктів реакції трьох музейних штамів стафілококів і відсутність в інших родин коків вказує на специфічність реакції. Відсутність продуктів реакції негативних контролів свідчить про те, що в процесі постановки реакції контамінації не відбулось.

**Обговорення.** У літературі описані різні цільові гени для видової ідентифікації стафілококів молекулярно-генетичними методами [14–16]. Проте в цих дослідженнях не було розроблено праймерів для постановки

класичної ПЛР з ідентифікацією в агаровому гелі. Для розробки видоспецифічного праймера *Staphylococcus spp.* Martineau et al. (2001) секвенували ділянку *tuf* гена для 11 клінічно значимих видів стафілококів, та визначили специфічну ділянку, що зустрічається у стафілококів проте відсутня у інших видів мікроорганізмів. На основі цієї послідовності автори розробили пару праймерів, що дає продукт реакції розміром 370 бп [12]. Цей праймер обрали для оптимізації і апробації внутрішньолaborаторного протоколу дослідження.

Впровадження в лабораторну практику нових аналітичних методів потребує попередньої апробації протоколів постановки реакції. Показниками ефективності ПЛР є специфічність і чутливість методу. Навіть за правильного підбору праймерів наявна значна кількість чинників, які впливають на проведення реакції і відрізняються в різних лабораторіях. Апробація та оптимізація протоколу ПЛР спрямована на підбір температурних режимів і концентрації реагентів, що забезпечує високі показники специфічності і чутливості методу в подальших лабораторних дослідженнях [19].

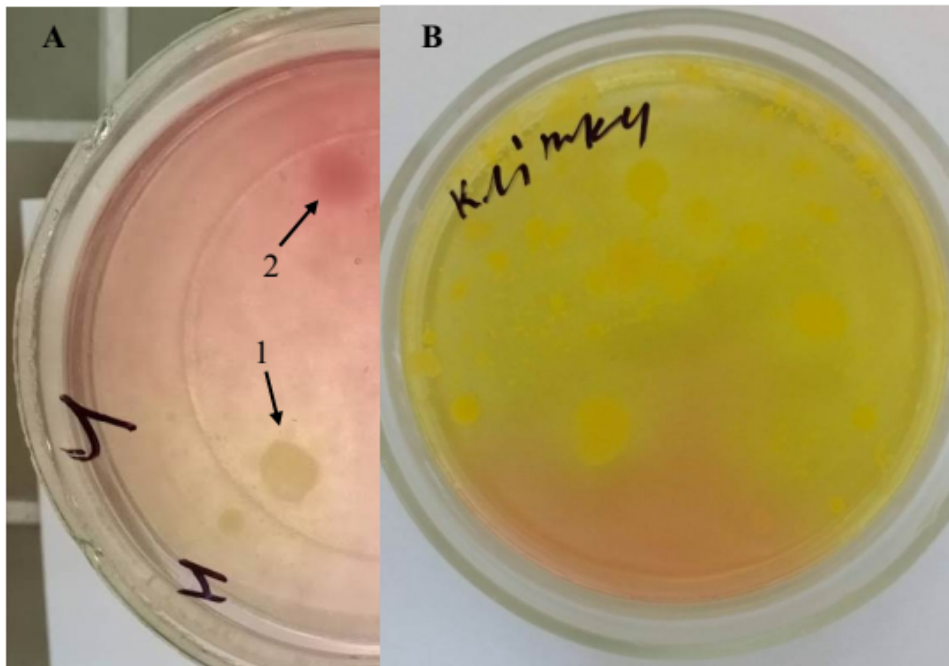


Рис. 3. Ріст мікроорганізмів на середовищі маніт-сольовий агар:

- A. Ріст бактерій на МСА 1. Колонія мікроорганізмів, що ферментують маніт (жовтий колір).  
 2. Колонія мікроорганізмів що не ферментують манніт (червоний колір).  
 B. Результати посіву мазка відібраного з клітки-переноски.

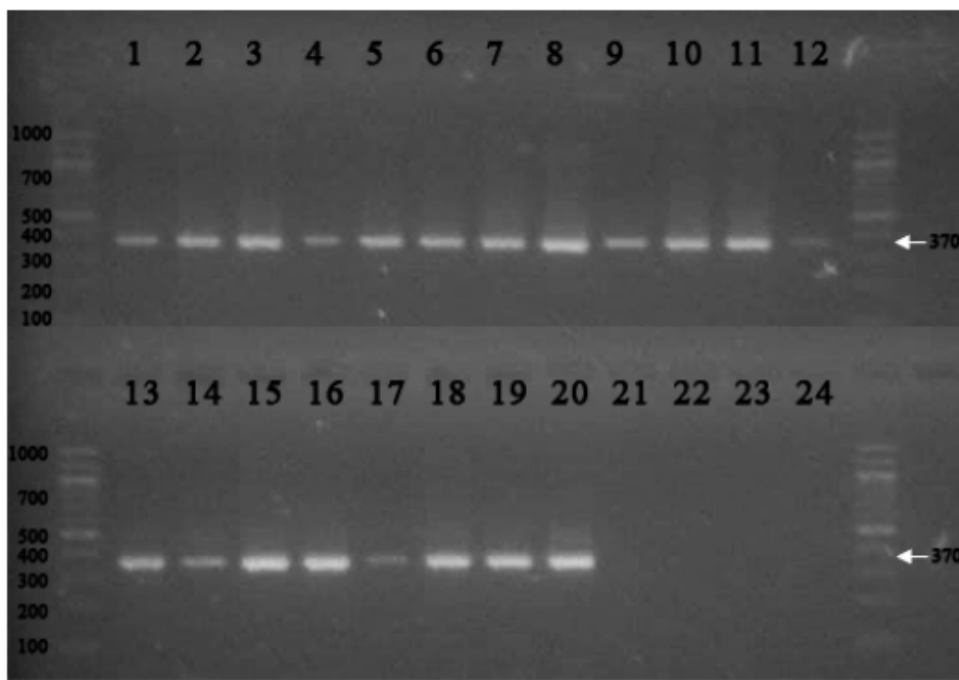


Рис. 4. Електрофореграма продуктів ампліфікації ділянки гена *tuf* польових штамів та музейних культур:

- 1–17. Польові штами відібрані у собак. 18. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990.  
 19. *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. 20. *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* YKM B-918.  
 21. *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619. 22. *Enterococcus faecalis* ATCC 194433. 23. Негатив-  
 ний контроль виділення ДНК. 24. Негативний контроль приготування реакційної суміші.

На першому етапі дослідження провели оптимізацію протоколу. Згідно з паспортними даними полімерази температура відпалу в досліді має бути в межах від 45 до 65 °С. Поставили 10 послідовних реакцій, з різною температурою відпалу від 47 до 65 °С з кроком в 2 °С. Оптимальна температура становить в діапазоні від 51 до 59 °С.

Потім була проведена апробація на трьох посівах музейних штамів, щоб переконатись в правильності обраної температури та протоколу реакції.

Результати дослідження свідчать про специфічність обраної пари праймерів, ми отримали відповідний продукт ампліфікації для музейних штамів стафілококів, для штамів інших коків цей продукт був відсутній. Це узгоджується з результатами досліджень інших авторів. ПЛР реакція була позитивною для всіх музейних штамів стафілококів різних родин і негативною для всіх інших мікроорганізмів [12, 20].

За дослідження на чутливість продукт ампліфікації припинив утворюватися на розведенні 0,5:100 за McFarland, що відповідає  $1,0 \times 10^6$  КУО. Стандарт каламутності зручний і простий у використанні інструмент, розведення бактеріальної суспензії 0,5 McFarland готують для посіву чистої культури на антибіотикорезистентність. Каламутність визначають візуально, порівнюючи приготовану суспензію зі стандартом, це може призвести до відхилень. Однак як показує наше дослідження, діапазон концентрацій бактеріальних суспензій, які утворюють продукт ампліфікації, досить широкий. Автори оригінальної методики користувались розведенням однієї колонії до 0,5 по стандарту каламутності McFarland [20].

Первинний посів відібраних мазків на диференційне середовище маніт-сольовий агар, через наявність в своєму складі солі, пригнічував ріст більшості інших родів коменсальних мікроорганізмів. Також використання цього середовища вказує на ферментацію мікроорганізмами маніту, що більш притаманне коагулазопозитивним стафілококам. Це дало змогу поєднати швидкий ріст потрібних нам мікроорганізмів із можливістю попередити ріст інших родів бактерій, що не відповідали меті нашого дослідження.

**Висновки і перспективи.** Праймери підібрані в результаті аналізу літературних даних мають високу специфічність до представників роду *Staphylococcus spp.* та високу чутливість і можуть використовуватись для ідентифікації окремих колоній.

Використання диференційного середовища для первинного посіву спрощує процес підго-

товки проб для визначення *Staphylococcus spp.* методом ПЛР.

Потребує додаткових досліджень методика ідентифікації бактерій *Staphylococcus spp.* методом ПЛР у первинному мазку від тварини без попереднього посіву на живильні середовища з метою накопичення.

Потрібні додаткові дослідження щодо апробації протоколів родинної ідентифікації *Staphylococcus spp.* методом ПЛР.

**Подяки.** Дослідження проведене завдяки гранту на закупівлю матеріалів і реактивів від BioUkraine (Small research grant of the US-Ukraine foundation biotech initiative, № 21, 2021 рік).

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

- Bertelloni F., Cagnoli G., Ebani V. V. Virulence and Antimicrobial Resistance in Canine *Staphylococcus spp.* Isolates. *Microorganisms*. 2021. Vol. 9. no. 3. 515 p. DOI:10.3390/microorganisms9030515
- Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens / D.M.P. De Oliveira et al. *Clinical Microbiology Reviews*. 2020. Vol. 33. no. 3. e00181-19. Doi:10.1128/CMR.00181-19
- Гаркавенко Т. О., Козицька Т. Г. Механізм резистентності та методи виявлення метицилінрезистентного стафілокока (mrsa) (оглядова стаття). *Ветеринарна біотехнологія*. 2016. Т. 28. С. 42–54.
- Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis/E. Tacconelli et al. *The Lancet Infectious Diseases*. 2018. Vol. 18. no. 3. P. 318–327. DOI:10.1016/S1473-3099(17)30753-3
- Systematic review and meta-analysis of the occurrence of eskape bacteria group in dogs, and the related zoonotic risk in animal-assisted therapy, and in animal-assisted activity in the health context / A. Santaniello et al. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2020. Vol. 17. no. 9. DOI:10.3390/ijerph17093278
- Direct detection of methicillin-resistant in *Staphylococcus spp.* in positive blood culture by isothermal recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assay / A. Srisrattakarn et al. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2020. Vol. 36. no. 11. 162 p. DOI:10.1007/s11274-020-02938-8
- Molecular Detection and Characterization of the *mecA* and *nuc* Genes From *Staphylococcus* Species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*) Isolated From Dogs Suffering Superficial Pyoderma and Their Antimicrobial Resistance Profiles / M. S. González-Domínguez et al. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020. Vol. 7. no. July. P. 1–11. DOI:10.3389/fvets.2020.00376
- Velizarova Rusenova N., Georgiev Rusenov A. Detection of *staphylococcus aureus* among coagulase positive staphylococci from animal origin based on conventional and molecular methods. *Macedonian Veterinary Review*. 2017. Vol. 40. no. 1. P. 29–36. DOI:10.1515/macvetrev-2016-0095



9. Балбутская А. А., Дмитренко О. А., Скворцов В. Н. Современные особенности видовой идентификации коагулазоположительных бактерий рода *Staphylococcus*. Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62. № 8. С. 497–502. DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502

10. Efficacy of MALDI-TOF mass spectrometry as well as genotypic and phenotypic methods in identification of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* isolated from intramammary infections in dairy cows in Poland/A. Wanecka et al. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 2019. Vol. 31. no. 4. P. 523–530. DOI:10.1177/1040638719845423

11. Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci/T. Sasaki et al. Journal of Clinical Microbiology. 2010. Vol. 48. no. 3. P. 765–769. DOI:10.1128/JCM.01232-09

12. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels / F. Martineau et al. Journal of Clinical Microbiology. 2001. Vol. 39. no. 7. P. 2541–2547. DOI:10.1128/JCM.39.7.2541-2547.2001

13. PCR Detection of Bacillus and Staphylococcus in Various Foods/S. Nakano et al. Journal of Food Protection. 2004. Vol. 67. no. 6. P. 1271–1277. DOI:10.4315/0362-028X-67.6.1271

14. Identification of Staphylococcus spp. by PCR-Restriction fragment length polymorphism of gap gene/J. Yugueros et al. Journal of Clinical Microbiology. 2001. Vol. 39. no. 10. P. 3693–3695. DOI:10.1128/JCM.39.10.3693-3695.2001

15. Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial groEL gene sequence / E. M. Barros et al. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 2007. Vol. 59. no. 3. P. 251–257. DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2007.05.004

16. Alarcón B., Vicedo B., Aznar R. PCR-based procedures for detection and quantification of *Staphylococcus aureus* and their application in food. Journal of Applied Microbiology. 2006. Vol. 100. no. 2. P. 352–364. DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02768.x

17. Kilic A., Basustaoglu A. C. Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Research in Microbiology. 2011. Vol. 162. no. 10. P. 1060–1066. DOI:10.1016/j.resmic. 2011.07.009

18. Tagini F., Greub G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2017. Vol. 36. no. 11. P. 2007–2020. DOI:10.1007/s10096-017-3024-6

19. Внутрішньолабораторна апробація праймерів для молекулярно-генетичної ідентифікації грибів роду *Fusarium link*/В. Д. Іщенко та ін. Наукові доповіді Національного університету біоресурсів і природокористування України 2019. № 6(82). DOI:10.31548/dopovidy 2019.06.017

20. Morot-Bizot S. C., Talon R., Leroy S. Development of a multiplex PCR for the identification of *Staphylococcus* genus and four staphylococcal species isolated from food. Journal of Applied Microbiology. 2004. Vol. 97. no. 5. P. 1087–1094. DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02399.x

## REFERENCES

1. Bertelloni, F., Cagnoli, G., Ebani, V. V. (2021). Virulence and Antimicrobial Resistance in Canine *Staphylococcus* spp. Isolates. *Microorganisms*. Vol. 9, no. 3, 515 p. (in England) DOI:10.3390/microorganisms9030515

2. De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*. Vol. 33, no. 3, e00181-19. (in England) DOI:10.1128/CMR.00181-19

3. Garkavenko, T., Kozystska, T. (2016) Mechanizm rezystentnosti ta metody vyavlennia metytsylin-rezistentnoho stafilokoka (MRSA) (ohliadova stattia) [Mechanism of resistance and methods of detection of methicillin-resistant staphylococcus (MRSA) (review article)]. *Veterynarna biotekhnolohiia* [Veterinary biotechnology]. Vol. 28, pp. 42–54. (in Ukraine). Available at: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb\\_2016\\_28\\_6](http://nbuv.gov.ua/UJRN/vbtb_2016_28_6).

4. Tacconelli, E., Carrara, E., Savoldi, A. (2018). Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *The Lancet Infectious Diseases*. Vol. 18, no. 3, pp. 318–327. (in England) DOI:10.1016/S1473-3099(17)30753-3

5. Santaniello, A., Sansone, M., Fioretti, A. (2020). Systematic review and meta-analysis of the occurrence of escape bacteria group in dogs, and the related zoonotic risk in animal-assisted therapy, and in animal-assisted activity in the health context. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. Vol. 17, no. 9. (in England) DOI:10.3390/ijerph17093278

6. Srisrattakarn, A., Tippayawat, P., Chanawong, A. (2020). Direct detection of methicillin-resistant in *Staphylococcus* spp. in positive blood culture by isothermal recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick assay. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. Vol. 36, no. 11, 162 p. (in England) DOI:10.1007/s11274-020-02938-8

7. González-Domínguez, M. S., Carvajal, H. D., Calle-Echeverri, D. A. (2020). Molecular Detection and Characterization of the *mecA* and *nuc* Genes From *Staphylococcus* Species (*S. aureus*, *S. pseudintermedius*, and *S. schleiferi*). Isolated From Dogs Suffering Superficial Pyoderma and Their Antimicrobial Resistance Profiles. *Frontiers in Veterinary Science*. Vol. 7, no. July. pp. 1–11. (in England) DOI:10.3389/fvets.2020.00376

8. Velizarova Rusenova, N., Georgiev Rusenov, A. (2017). Detection of *Staphylococcus aureus* among coagulase positive staphylococci from animal origin based on conventional and molecular methods. *Mace-*

donian Veterinary Review. Vol. 40, no. 1, pp. 29–36. (in England) DOI:10.1515/macvetrev-2016-0095

9. Balbutskaya, A. A., Dmilrenko, O. A., Skvortsov, V. N. (2017) Sovremennye osobennosti vidovoj identifikatsii koagulazopolozhitel'nyh bakterij roda *Staphylococcus* [Modern features of species identification of coagulase-positive bacteria of the genus *Staphylococcus*]. Klinicheskaya laboratornaya diagnostika [Clinical laboratory diagnostics]. Vol. 62, no. 8, pp. 497–502. (in Russian) DOI:10.18821/0869-2084-2017-62-8-497-502

10. Wanecka, A., Król, J., Twardoń, J. (2019). Efficacy of MALDI-TOF mass spectrometry as well as genotypic and phenotypic methods in identification of staphylococci other than *Staphylococcus aureus* isolated from intramammary infections in dairy cows in Poland. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. Vol. 31, no. 4, pp. 523–530. (in England) DOI:10.1177/1040638719845423

11. Sasaki, T., Tsubakishita, S., Tanaka, Y., et al. (2010). Multiplex-PCR method for species identification of coagulase-positive staphylococci. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 48, no. 3, pp. 765–769. (in England) DOI:10.1128/JCM.01232-09

12. Martineau, F., Picard, F. J., Ke, D. (2001). Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, no. 7, pp. 2541–2547. (in England) DOI:10.1128/JCM.39.7.2541-2547.2001

13. Nakano, S., Kobayashi, T., Funabiki, K. (2004). PCR Detection of Bacillus and Staphylococcus in Various Foods. Journal of Food Protection. Vol. 67, no. 6, pp. 1271–1277. (in England) DOI:10.4315/0362-028X-67.6.1271

14. Yugueros, J., Temprano, A., Sánchez, M. (2001). Identification of Staphylococcus spp. by PCR-Restriction fragment length polymorphism of gap gene. Journal of Clinical Microbiology. Vol. 39, no. 10, pp. 3693–3695. (in England) DOI:10.1128/JCM.39.10.3693-3695.2001

15. Barros, E. M., Iório, N. L. P., Bastos, M. do P. de F. (2007). Species-level identification of clinical staphylococcal isolates based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of a partial groEL gene sequence. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. Vol. 59, no. 3, pp. 251–257. (in England) DOI:10.1016/j.diagmicrobio.2007.05.004

16. Alarcón, B., Vicedo, B., Aznar, R. (2006). PCR-based procedures for detection and quantification of Staphylococcus aureus and their application in food. Journal of Applied Microbiology. Vol. 100, no. 2, pp. 352–364. (in England) DOI:10.1111/j.1365-2672.2005.02768.x

17. Kilic, A., Basustaoglu, A. P. (2011). Double triplex real-time PCR assay for simultaneous detection of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis*, and *Staphylococcus haemolyticus* and determination of their methicillin resistance directly from positive blood culture bottles. Research

in Microbiology. Vol. 162, no. 10, pp. 1060–1066. (in England) DOI:10.1016/j.resmic.2011.07.009

18. Tagini, F., Greub, G. (2017). Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Vol. 36, no. 11, pp. 2007–2020. (in England) DOI:10.1007/s10096-017-3024-6

19. Ishchenko, V. D., Voloshchuk, N. M. (2019). Vnutrishnolaboratorna aprobatsiia praimeriv dlia molekuliarno-henetychnoi identyfikatsii hrybiv rodu Fusarium Link [Interlaboratory approbation of primers for molecular genetic identification of Fusarium link fungus]. Naukovi dopovidi Natsionalnoho universytetu bioresursiv i pryrodokorystuvannia Ukrainy [Scientific Bulletin of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine]. no. 6(82). (in Ukraine) DOI:10.31548/dopovidi2019.06.017

20. Morot-Bizot, S. C., Talon, R., Leroy, S. (2004). Development of a multiplex PCR for the identification of Staphylococcus genus and four staphylococcal species isolated from food. Journal of Applied Microbiology. Vol. 97, no. 5, pp. 1087–1094. (in England) DOI:10.1111/j.1365-2672.2004.02399.x

#### **Intralaboratory testing of the PCR protocol for molecular genetic identification of bacteria of the genus *Staphylococcus* spp.**

**Shevchenko M., Tyshkivska N., Andriychuk A., Martynenko O., Tsarenko T.**

The results of optimization of the *Staphylococcus* spp. identification protocol by polymerase chain reaction with agarose gel detection and approbation of the protocol with wild strains selected from dogs are presented. Determination of the parameters of specificity and sensitivity of the method was performed on museum strains of cocci *S. epidermidis* ATCC 14990, *S. aureus* ATCC 25923, *S. aureus* subsp. *aureus* UKM B-918, *S. pneumoniae* ATCC 49619 and *E. faecalis* ATCC 194433.

DNA extraction was performed using the IndiSpin Pathogen Kit. The ready PCR mix NEB OneTaq® 2X Master Mix with Standard Buffer was used to prepare the reaction mixture. Primers targeted to the *tuf* gene region using an amplification product of 370 bp were used for the study. The reaction results were recorded in a 2% agarose gel with the addition of ethidium bromide at a concentration of 0.5%.

The optimal annealing temperature was determined by the temperature gradient method.

In a study of the specificity of the method, three museum strains of staphylococci were identified as positive, while strains of other cocci did not give reaction products.

The sensitivity study of the method was to detect the amplification product in seven dilutions of bacterial suspension that meet McFarland turbidity standards, the lowest concentration was further diluted 10, 100 and 1,000 times. The last dilution, which showed the presence of the amplification product corresponds to 2×106 CFU in 200 µl of saline used for DNA isolation.

PCR protocol was tested on wild staphylococcal strains. Ear and nasal swabs of dogs, as well as washes from the transfer cage were selected for the study. The primary inoculation of the material was carried out on mannitol salt agar, on this medium only the growth of halophilic microorganisms is possible. Growth was found on 17 Petri dishes. The PCR washings of these cups indicated the presence of staphylococci in the test materials.

The results of in-laboratory PCR testing indicate that the primer we used gives high indicators of specificity and sensitivity. Our tested technique can be used to confirm the presence of *Staphylococcus spp.* bacteria in the primary culture of smears taken from dogs.

**Key words:** PCR, tuf gene, approbation of primers, optimization of primers, dog microflora, *Staphylococcus spp.*



Copyright: Шевченко М.В. та ін. © This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.



ORCID iD:

Шевченко М.В.

<https://orcid.org/0000-0002-7002-1494>

Тишківська Н.В.

<https://orcid.org/0000-0001-9249-0921>

Андрійчук А.В.

<https://orcid.org/0000-0001-9144-5272>

Царенко Т.М.

[https:// orcid.org/0000-0003-4373-5958](https://orcid.org/0000-0003-4373-5958)