

Streptococcus agalactiae оказался единственным микроорганизмом, восприимчивым ко всем исследованным производным бензофеназина.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: Bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance от 17.05.2024 г. – URL: <https://www.who.int/publications/i/item/978924009346> / (дата обращения: 04.02.2025). Текст: электронный.
2. Design, synthesis, antimicrobial, antibiofilm evaluation and Z/E- isomerization of novel 6- ((arylamino)methylene)benzo[a]phenazin- 5(6H)- ones induced by organic solvent / A. Olyaei, N. Ghaleghovandi, F. Moghadami [et al.] // RSC Adv. – 2023. – Vol. 13. – № 42. – P. 29393– 29400.
2. Identification and characterisation of colistin- resistant *Acinetobacter colistiniresistens* co- producing IMP- 1 and OXA- 58 carbapenemases / S. Nishida, Y. Ono // New Microbes New Infect. – 2024. – Vol. 62. – Article №101484.
3. A multiplex real- time PCR for the direct, fast, economic and simultaneous detection of the carbapenemase genes blaKPC, blaNDM, blaVIM and blaOXA- 48 / D. Weiß, I. Engelmann, S. D. Braun [et al.] // J Microbiol Methods. – 2017. – № 142. – P. 20 – 26.
4. Antibacterial effect and mechanisms of action of forsythoside B, alone and in combination with antibiotics, against *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* / Z. Shi, J. Zhang, Y. Wang [et al.] // Phytomedicine. – 2024. – Vol. 135. – Article № 156038.
5. Sulfonamide tethered 1,4- disubstituted 1,2,3- triazoles: Synthesis and antibacterial evaluation / J. Yadav, J., & C. P. Kaushik // Synthetic Communications. – 2024. – Vol. 54, № 7. – P. 536 – 552.
66. Synthesis of a di- O- acylated deoxynojirimycin (DNJ) derivative and evaluation of its antibacterial and antibiofilm activity against *Staphylococcus aureus* and *Stenotrophomonas maltophilia* / A. Esposito, D. D'Alonzo, M. Stabile [et al.] // Carbohydrate Research. – 2025. – Vol. 550. – Article №109379.
7. ГОСТ Р ИСО 20776– 2022. Исследование чувствительности инфекционных агентов и оценка функциональных характеристик изделий для исследования чувствительности к антимикробным средствам : национальный стандарт Российской Федерации : утвержден и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 10 ноября 2022 г. N 1266– ст : взамен ГОСТ Р ИСО 20776– 1– 2010 : дата введения 2023– 10– 01. – Москва, 2023. – 24 с.

Сведения об авторах

В.В. Надточий* – аспирант

А.М.К. Алтоби – аспирант

П.Г. Аминева – врач– медицинский микробиолог

И.Л. Никонов – кандидат химических наук, старший научный сотрудник

Г.В. Зырянов – доктор химических наук, профессор РАН, профессор

Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор

Information about the authors

V.V. Nadtochiy – Postgraduate Student

A.M.K. Altobee – Postgraduate Student

P.G. Amineva – Medical Microbiologist

I.L. Nikonov – Candidate of Sciences (Chemistry), Leading Researcher

G.V. Zyryanov – Doctor of Sciences (Chemistry), Professor of Russian Academy of Sciences, Professor

E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):

nadtochiy– 99@mail.ru

УДК: 616– 093

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕМПЕРАТУРНЫХ УСЛОВИЙ ХРАНЕНИЯ ОБРАЗЦОВ НА СОХРАННОСТЬ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ДНК

Нечаева Диана Мирзозоновна¹, Карякина Анастасия Евгеньевна¹, Симарзина Вероника Михайловна¹, Корнилов Даниил Олегович¹, Кейних Андрей Евгеньевич¹, Аминева Полина Геннаьевна^{1,2}, Ворошилина Екатерина Сергеевна^{1,3}, Зорников Данила Леонидович¹

¹Кафедра медицинской микробиологии и клинической лабораторной диагностики
ФГБОУ ВО «Уральский государственный медицинский университет» Минздрава России

²Лаборатория ООО «Кволити Мед»

³Медицинский центр «Гармония»

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является высокочувствительным и специфичным методом лабораторной диагностики. Ключевым фактором для получения корректных результатов анализа является сохранность ДНК. Согласно инструкции от производителя наборов для выделения ДНК, хранение биоматериала при низких температурах может приводить к повреждению структуры нуклеиновой кислоты и, как следствие, искажению результатов. Однако, современные авторы ставят под вопрос необходимость соблюдения жестких температурных и временных ограничений. **Цель исследования** – оценить влияние температуры хранения и

количества циклов размораживания–замораживания на сохранность бактериальной ДНК в образцах. **Материал и методы.** Исследовано влияние низких температур (+4 °C, –20 °C) и 4 циклов разморозки–заморозки на ДНК смеси бактериальных культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* в течение 14 суток. **Результаты.** Все изменения результатов ПЦР для образцов, хранившихся в холодильнике (+4 °C) и для 12 образцов, хранившихся в морозильной камере (–20 °C), составляли не более одного индикаторного цикла (Cp). Хранение смеси бактериальных культур в холодильнике и морозильной камере, а также четырехкратное размораживание не приводило к разрушению ДНК ни одной из серий через 1, 2, 7 и 14 дней. **Выводы.** Полученные результаты позволяют считать биоматериал, хранившийся в холодильнике или морозильной камере дальше, чем допускает инструкция, а также подвергшийся нескольким циклам замораживания–размораживания, пригодным для выполнения повторного исследования. **Ключевые слова:** полимеразная цепная реакция, нуклеиновые кислоты, биоматериал, хранение

STUDY OF THE INFLUENCE OF SAMPLE STORAGE CONDITIONS ON THE PRESERVATION OF BACTERIAL DNA

Nechaeva Diana Mirzonovna¹, Kariakina Anastasia Evgenievna¹, Simarzina Veronika Mikhailovna¹, Kornilov Daniil Olegovich¹, Keinikh Andrei Evgenievich¹, Amineva Polina Gennayevna^{1,2}, Voroshilina Ekaterina Sergeevna^{1,3}, Zornikov Danila Leonidovich¹

¹Department of Medical Microbiology and Clinical Laboratory Diagnostics,

Ural State Medical University

²Laboratory of “QuolityMed”

³Medical Center “Harmony”

Yekaterinburg, Russia

Abstract

Introduction. Polymerase chain reaction (PCR) is a highly sensitive and specific method of laboratory diagnostics. The key factor for obtaining correct results of the analysis is the preservation of DNA. According to the instructions from the manufacturer of DNA extraction kits, storage of biomaterial at low temperatures can damage the structure of nucleic acid and, consequently, distort the results. However, current authors question the necessity of adhering to strict temperature and time limits. **The aim of the study** was to evaluate the effect of storage temperature and the number of freeze–thaw cycles on the preservation of bacterial DNA in samples. **Material and methods.** The effect of low temperatures (+4 °C, –20 °C) and 4 unfreezing–freezing cycles on DNA of a mixture of bacterial cultures of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Acinetobacter baumannii* for 14 days was investigated. **Results.** All changes in PCR results for samples stored in the refrigerator (+4 °C) and for 12 samples stored in the freezer (–20 °C) were no more than one indicator cycle (Cp). Storage of the bacterial culture mixture in the refrigerator and freezer and four times thawing did not result in DNA degradation in any of the series after 1, 2, 7 and 14 days. **Conclusions.** The obtained results allow to consider the biomaterial stored in the refrigerator or freezer further than the instruction allows, as well as subjected to several freezing–thawing cycles, as suitable for repeated research.

Keywords: polymerase chain reaction, nucleic acids, biomaterial, storage.

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) является высокочувствительным и специфичным методом лабораторной диагностики, позволяющим быстро и точно амплифицировать и детектировать целевые фрагменты ДНК. Ключевым фактором для получения корректных результатов анализа является сохранность ДНК. Несоблюдение температурных условий, воздействие химических веществ и ультрафиолетового излучения могут приводить к повреждению структуры ДНК в образце и, как следствие, искажению результатов [1]. Для предотвращения ошибок на преаналитическом этапе диагностики, разработаны методические документы, инструкции к наборам реагентов и гигиенические нормативы, регламентирующие выполнение исследований.

Некоторыми исследователями отмечалось, что хранение образцов в морозильной камере и повторяющиеся циклы размораживания–замораживания приводят к увеличению фрагментации бактериальной ДНК [2]. Согласно инструкциям к наборам для выделения Проба–НК–ПЛИУС (ООО ДНК–Технология, Россия), хранение биоматериала должно осуществляться при температуре от 2 до 8 °C не более 24 часов с момента взятия образца, а замораживание допускается только однократно. Соблюдение описанных условий выдвигает определенные требования к оснащению лаборатории и ограничивает возможность длительной транспортировки, хранения и повторного исследования образцов. Современные авторы ставят под вопрос необходимость соблюдения жестких температурных и временных ограничений

хранения биоматериалов для ПЦР, однако большинство представленных исследований проведены на образцах человеческой ДНК [3].

Цель исследования – оценить влияние температурных условий хранения и количества циклов размораживания– замораживания на сохранность бактериальной ДНК в образцах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для оценки влияния температурных условий на бактериальную ДНК была приготовлена смесь бактериальных культур *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Acinetobacter baumannii* (оптическая плотность каждой культуры 0,5 по Макфарленду). Данную смесь распределили на 36 пробирок типа Эппендорф по 100 мкл. Во все пробирки также вносили по 900 мкл физиологического раствора. Далее разделили пробирки на 3 группы: 1 группа была помещена в холодильник (+4 °С), эти образцы извлекались только в день проведения исследования; 2 группа была помещена в морозильную камеру (– 20°С) и далее подвергалась 1– 4 циклам размораживания– замораживания; 3 группа была помещена в морозильную камеру (– 20 °С) образцы данной группы подвергались однократному размораживанию.

Выделение бактериальной ДНК производилось в самый первый день – 9 проб и на 1,2,7 и 14 день проведения эксперимента. В обозначенный день хранения изымали по одной серии пробирок из 1 группы, все пробирки 2 группы до полного размораживания при комнатной температуре, но выделение проводили для одной серии, а оставшиеся вновь помещали в морозильную камеру. В 3 группе выделение проводилось только на 0 и 14 сутки эксперимента.

Выделение ДНК осуществляли набором Проба– НК– ПЛЮС (ООО ДНК– Технология, Россия). Выделенную ДНК исследовали набором для ПЦР– диагностики “БакСкрин” (ООО ДНК– Технология, Россия). Полученные результаты по общей бактериальной массе, *Staphylococcus spp.*, *S. aureus*, *Enterobacteriales*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp.* сравнивали по индикаторному циклу (Ср) в образцах, хранившихся в разных температурных условиях, и в первой серии пробирок, выделение ДНК из которых проводилось после приготовления бактериальной смеси.

Статистическую обработку и визуализацию данных проводили с помощью R версии 4.4.3. В качестве меры центральной тенденции при описании переменных указывали медиану со значениями 1– го и 3– го квартилей.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Все изменения результатов ПЦР для образцов, хранившихся в холодильнике (+4 °С), составляли не более одного индикаторного цикла (Ср) (Рис. 1). Индикаторный цикл (Ср) для общей бактериальной массы (ОБМ) в исходном образце составил 16,1, через 1 сутки – 16,1, через 2 суток – 16,2, на 7 сутки – 16,2, к 14 суткам – 15,9. Индикаторный цикл для *Staphylococcus spp.* в исходном образце был 19,5, через сутки – 19,4, через двое и трое суток – 19,5, а к 14 суткам – 19,1. Индикаторный цикл *S. aureus* также не изменялся по отношению к исходному и составлял 23,3– 23,5 при значении в 23,3 для исходного образца. Индикаторный цикл для бактерий порядка *Enterobacteriales* в исходном образце составил 18,3, через сутки оставался равным 18,3, на 2 сутки – 18,1, на 7 сутки – 18,3, через 14 суток – 17,7. Индикаторный показатель для *E. coli* в исходном образце – 21,3, через сутки – 21,2, на вторые сутки – 21, через 7 суток стал равен 21,3, а на 14 сутки – 20,7. Индикаторный цикл для бактерий рода *Acinetobacter* в исходном образце – 16,8, через сутки – 16,6, через 2 суток – 16,7, через 7 суток – 17,1, через 14 суток – 16,7.

В 12 из 15 хранившихся в морозильной камере (– 20 °С) образцах изменения результатов ПЦР для анализируемых групп бактерий также укладывались в один Ср (Рис. 2). Для оставшихся 3 образцов изменения находились в пределах – 0,7– 3,4 Ср. Ср для ОБМ в исходном образце составил 16,1, через сутки хранения (однократное размораживание) – 16,5, после 2 дней хранения (2 размораживания) – 16,7, после 7 дней хранения (3 размораживания) – 16,8, после 14 дней хранения (4 размораживания) – 16,6, 14 дней (1 размораживания) – 16,8. Ср для *Staphylococcus spp.* в исходном образце составил 19,5, после хранения и циклов размораживания– замораживания находился в пределах 19,7– 19,8. Индикаторный цикл для *S.*

aureus в исходном образце составил – 23,3, через сутки хранения (однократное размораживание) – 23,5, после 2 дней хранения и соответственно 2 размораживания – 23,6, после 7 дней хранения (3 размораживания) – 23,6 после 14 дней хранения (4 размораживания) – 22,9, в не подвергавшихся размораживанию образцах – 23,6. Индикаторный цикл для бактерий порядка *Enterobacteriales* в исходном образце составил 18,3, через сутки хранения (однократное размораживание) – 18,4, после 2 дней хранения (2 размораживания) – 18,6, после 7 дней хранения (3 размораживания) – 18,7 и после 14 дней хранения и четырехкратного размораживания – 18,3 и однократного размораживания – 19. Индикаторный цикл для *E. coli* в исходном образце составил 21,3, через сутки хранения (1 размораживание) – 21,4, после 2 дней хранения (2 размораживания) – 21,7, после 7 дней хранения (3 размораживания) – 21,7, после 14 дней хранения (4 размораживания) – 21,4, в не подвергавшихся размораживанию образцах – 21,7. Индикаторный цикл для бактерий рода *Acinetobacter* в исходном образце составил 16,8, после первого размораживания – 17,2, после второго – 17,3, после третьего – 17,4, после четвертого – 17,3, в не подвергавшихся размораживанию образцах – 17,8.

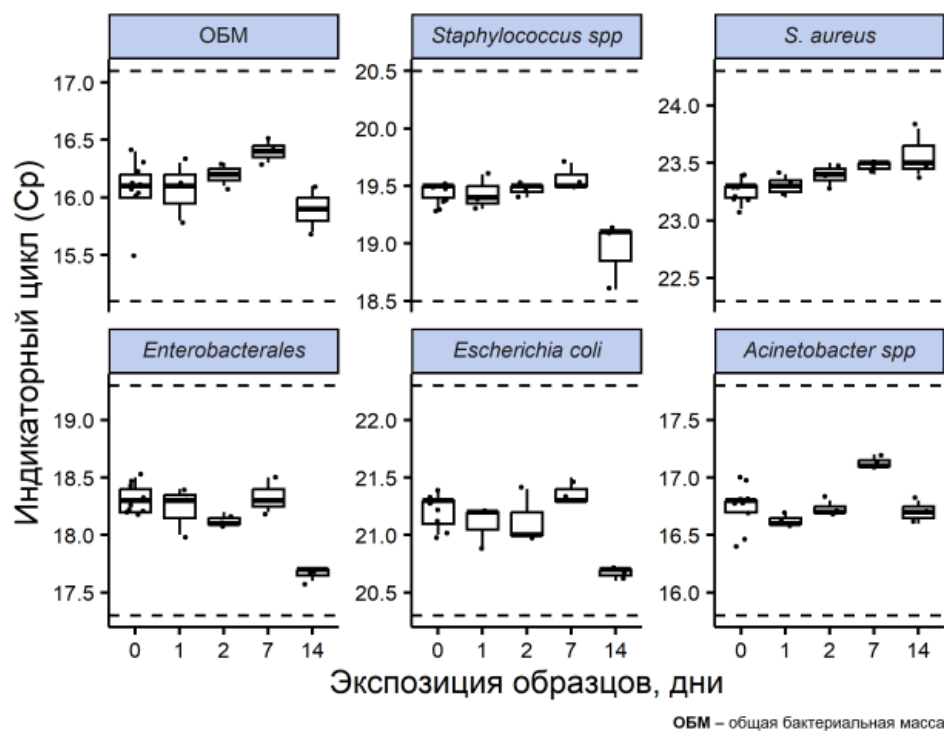


Рис.1 «Сохранность бактериальной ДНК при хранении образцов в холодильнике»

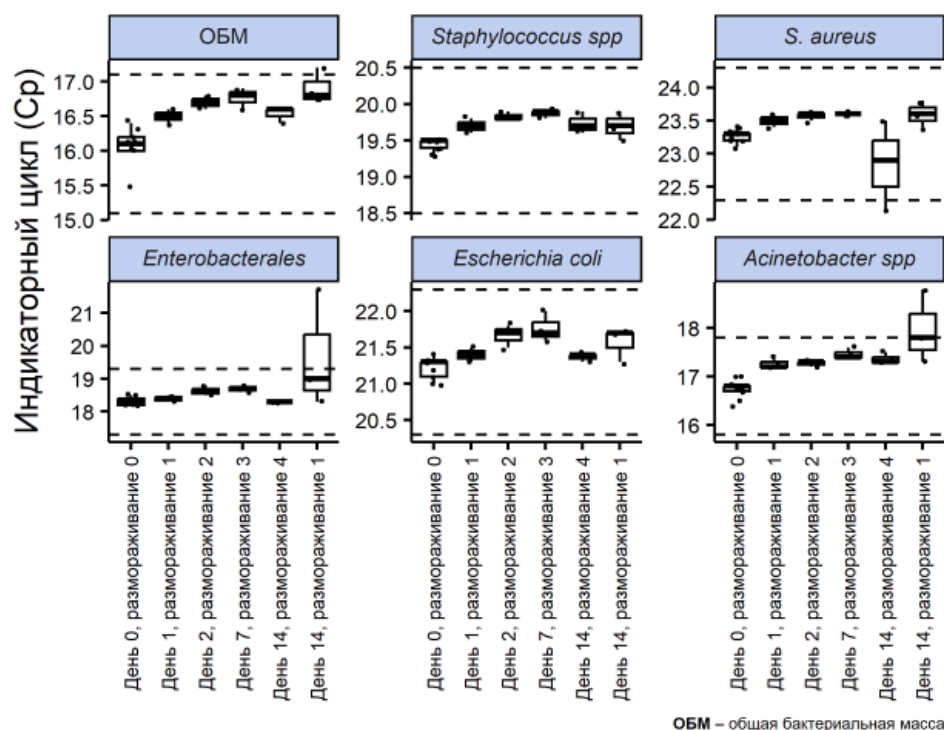


Рис.2 «Сохранность бактериальной ДНК при хранении образцов в морозильной камере»

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на исследования прошлого века, по результатам которых были сделаны выводы о деструктивном воздействии низкой температуры и длительности хранения на бактериальную ДНК [2], настоящий эксперимент подтверждает обратное. Полученные результаты, позволяют считать, что длительность хранения образцов в холодильнике и в морозильной камере, а также многократные циклы замораживания– размораживания, в данном случае — 4 раза, не приводят к разрушению бактериальной ДНК. Ранее этот факт был продемонстрирован для человеческой ДНК на образцах крови, подвергавшимся 100 циклам замораживания– размораживания [4].

По всей видимости, строгие ограничения по времени хранения образцов в инструкциях к наборам для выделения нуклеиновых кислот и проведения ПЦР [5], разработаны с целью максимальной минимизации ошибок на преаналитическом этапе. По меньшей мере 14–дневное хранение биоматериала как при температуре +4 °C, так и – 20 °C (в том числе с 4 циклами замораживания– размораживания) не приводило к снижению выхода бактериальной ДНК, что заставляет задуматься о целесообразности таких строгих требований хранения образцов на преаналитическом этапе, по крайней мере для научных исследований. Кроме того, полученные результаты показывают что образцы выдерживают, по меньшей мере, 4 перемораживания, что позволяет с уверенностью интерпретировать полученные результаты при повторных выделениях из хранимых образцов.

Стоит заметить, что исследование проводилось с чистыми бактериальными культурами и может не в полной мере отражать реальные результаты с клиническими образцами. Данный вопрос требует дальнейшего изучения.

ВЫВОДЫ

1. Хранение образцов при температуре +4 °C в течение 14 дней не приводило к снижению выхода бактериальной ДНК.
2. Хранение образцов при температуре – 20 °C в течение 14 дней, в том числе с 4 циклами замораживания– размораживания не приводило к снижению выхода бактериальной ДНК.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Pfeifer, G. P. Mechanisms of UV– induced mutations and skin cancer / G. P. Pfeifer // Genome Instability & Disease. – 2020. –Т.1. –Р.99–113.

2. Freeze– thaw injury: evidence for double strand breaks in Escherichia coli DNA / N. Grecz , T. L. Hammer, C. J. Robnett, M. D. Long // Biochemical and biophysical research communications. – 1980. – Т.93. №4. – P. 1110–1113.
3. Wood, A. B– 184 Purifying High– Quality Genomic DNA From Frozen Blood Samples Stored up to 1.5 Years at – 20°C / A. Wood, Y. Wang, // *Clinical Chemistry*. (2024).
4. The effects of different storage conditions and repeated freeze/thaw cycles on the concentration, purity and integrity of genomic DNA / M.Safarikova , A. Kubena, V. Frankova [et.al]// *Folia Biologica*. – 2021. – Т.67. №1. – P.10–15.
5. ДНК– Технология. (2024). *Инструкция по применению комплекта реагентов для выделения нуклеиновых кислот ПРОБА– НК/ПРОБА– НК– ПЛЮС*, 270– 6.

Сведения об авторах

Д.М. Нечаева* – студент
 А.Е. Карякина – студент
 А.Е. Кейних – студент
 В.М. Симарзина – аспирант
 Д.О. Корнилов – аспирант, ординатор
 П.Г. Аминева – врач– медицинский микробиолог
 Е.С. Ворошилина – доктор медицинских наук, профессор
 Д.Л. Зорников – кандидат медицинских наук, доцент

Information about the authors

D.M. Nechaeva* – Student
 A.E. Kariakina – Student
 A.E. Keinikh – Student
 V.M. Simarzina – Postgraduate student
 D.O. Kornilov – Postgraduate student
 P.G. Amineva – Medical Microbiologist
 E.S. Voroshilina – Doctor of Sciences (Medicine), Professor
 D.L. Zornikov – Candidate of Sciences (Medicine), Associate Professor

***Автор, ответственный за переписку (Corresponding author):**

dinechaeva13@yandex.ru

УДК 614.4

РАЗРАБОТКА МЕТОДА ОБНАРУЖЕНИЯ НОРОВИРУСА GI И GII В ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Патрушева Анастасия Константиновна, Чалапа Владислав Игоревич, Итани Тарек Мохамедович

Федеральное бюджетное учреждение науки Федеральный научно– исследовательский институт вирусных инфекций «Виром» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Екатеринбург, Россия

Аннотация

Введение. Норовирусы являются распространённой причиной небактериального гастроэнтерита, преобладающими геногруппами являются GII и GI. Из существующих методов детекции возбудителя приемлемые операционные характеристики демонстрирует лишь полимеразная цепная реакция в реальном времени (ПЦР– РВ). В то же время разработка подобных тест– систем затруднена ввиду генетической изменчивости возбудителя, при этом ранее были описаны сложности в подборе олигонуклеотидов для детекции норовируса GI. **Цель исследования** – усовершенствовать мультиплексную тест– систему на основе ПЦР в режиме реального времени для детекции норовирусов GI и GII. **Материал и методы.** Для экспериментальной части исследования использовались образцы фекалий больных гастроэнтеритом (n=150), включая образцы с положительными результатами ПЦР– теста на норовирус GI (n=16) и GII (n=59). В качестве эталона сравнения использовалась тест– система АмплиСенс® Norovirus GI/GII– FL (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора). **Результаты.** При тестировании экспериментального метода было получено по одному ложноположительному и ложноотрицательному результату, таким образом, чувствительность и специфичность экспериментального метода составила 99,74%. **Выводы.** Было осуществлено усовершенствование метода обнаружения норовирусов GI и GII с помощью ПЦР в реальном времени с учетом известных технических сложностей разработки тест– системы для детекции норовируса GI. Результаты исследований на ограниченной выборке с экспериментальной тест– системой показали хорошие операционные характеристики.

Ключевые слова: норовирус GI, норовирус GII, мультиплексна ПЦР– РВ.

DEVELOPMENT OF A NOROVIRUS GENOGROUP I AND II QUANTITATIVE POLYMERASE CHAIN REACTION ASSAY