Молекул биологийн зарим аргуудын *Staphylococcus aureus*-ыг илрүүлэх чадамжийг тодорхойлсон дүн

З.Урангоо[1,2], Д.Амгаланзаяа[3], Н.Нямтуяа[4], Ц.Гэрэлсүх[2], Ц.Хишигбуян[2], Э.Отгонцэцэг[1], Б.Баярлах[1], Ж.Сарантуяа[1], Я.Мөнхдэлгэр[1]

[1]АШУҮИС, Био-АС, Молекул биологи-Удамзүйн тэнхим
[2]ХСҮТ, Эмнэлзүйн лабораторийн тасаг
[3]Этүгэн их сургууль, Био-Анагаахын тэнхим
[4]Экспресс лаборатори
Цахим шуудан: Urangoo2@gmail.com, Утас: 99647226

Түлхүүр үг:

Полимеразийн гинжин урвал (ПГУ)
loop-Mediated Isothermal amplification (LAMP)
nucA
S.aureus

Товч утга:

Үндэслэл: *Staphylococcus aureus (S.aureus)* нь хүн болон амьтанд хоол хүнсээр дамжих өвчин, хоолны хордлого, арьс, зөөлөн эдийн халдвар, хатгаа, мастит, бактереми үүсгэдэг хоруу чанар өндөртэй эмгэгтөрөгч юм. **Зорилго:** *S.aureus*-ыг полимеразийн гинжин урвал (ПГУ) болон Loop-Mediated Isothermal amplification (LAMP) аргачлалаар илрүүлэн, харьцуулан үнэлэх. **Арга, аргачлал:** Бид энэхүү судалгаагаар *S. aureus* (ATCC 6538) стандарт омгийн өсгөврөөс ДНХ ялган 0.1фг/мкл, 1фг/мкл, 10фг/мкл, 100фг/мкл, 1пг/мкл, 10пг/мкл, 100пг/мкл, 1нг/мкл, 10нг/мкл, 100нг/мкл концентрацитай 10 төрлийн ДНХ-ийн уусмал бэлтгэж ПГУ болон LAMP аргачлалаар илрүүлэн, харьцуулан үнэлэв. **Үр дүн:** ПГУ-аар *nucA* генийн 270хн урттай бүтээгдэхүүн 100нг/мкл-10фг/мкл концентрацитай ДНХ-ийн уусмалд илэрсэн бол 0.1 болон 1фг/мкл концентрацитай үед бүтээгдэхүүн олширсонгүй. LAMP аргачлалаар олшруулан хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт байршуулан, өнгөний ялгарлаар дүгнэхэд 100нг/мкл-0.1фг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ-ийн уусмалд бүгдэд эерэг тодорхойлогдсон. **Дүгнэлт:** *S.aureus*-ыг илрүүлэхэд LAMP шинжилгээний илрүүлэх чадамж ПГУ-ын шинжилгээнээс 100 дахин өндөр байгаа тул уг аргыг цаашид ашиглах боломжтой байна.

Үндэслэл: Грам эерэг бактерийн бүлэг болох стафилококкийн омгууд ялангуяа *S.aureus* нь хүн болон амьтанд арьс, зөөлөн эдийн халдвар, уушгины хатгалгаа, эндокардит, остеомиелит, мастит, ходоод гэдэсний үрэвсэл, хоолны хордлого, хорт шокын хамшинж зэрэг янз бүрийн эд эсийн халдвар, өргөн хүрээний өвчин үүсгэдэг хоруу чанар өндөртэй эмгэгтөрөгч юм.[1,2]

S.aureus-ыг өсгөвөр болон биохимийн шинж чанараар ялган дүйдэг “Алтан стандарт” арга болох өсгөвөрлөх шинжилгээний аргыг эмнэлзүйн болон эрүүл зүйн лабораторид баримталдаг бөгөөд энэхүү уламжлалт шинжилгээний арга нь үүсгэгчийг бүрэн ялган дүйхэд 2-3 өдөр шаардагддаг. Бактерийн хоруу чанарын генийг олшруулан илрүүлэх ПГУ, бодит хугацааны ПГУ-ын аргууд нь өвөрмөц, мэдрэг чанар сайтай, харьцангуй богино хугацаа зарцуулах боловч заавал тусгай термоциклер, тоног төхөөрөмж шаарддаг. Харин LAMP арга нь *Bst* ДНХ полимераз фермент, 4-6 праймер ашиглан бай генийг олшруулдаг, тогтмол температурт явагддаг, нэг шаттай, их хэмжээний бүтээгдэхүүн үүсгэдэг илүү өвөрмөц, хурдан бөгөөд энгийн арга юм.[3] Мөн олширсон бүтээгдэхүүнийг гель электрофорезийн аргаас гадна этидиум бромид, Sybr green гэх мэт флюресценц будагч бодис ашиглан хэт ягаан туяаны үүсгүүрт харах эсвэл өнгөний өөрчлөлтөөр нүдээр харж дүгнэх боломжтой.[4] LAMP аргачлал нь ашиглахад хялбар, хурдан, өвөрмөц багаж шаардлагагүй зэрэг давуу талтай хөгжиж буй орон, алслагдсан бүс нутагт нарийн мэргэжлийн тоног төхөөрөмж, чадварлаг боловсон хүчин шаардалгүйгээр эмнэлзүйн оношлогоо, халдварт өвчний хяналт шинжилгээг хийхэд тохиромжтой.

Манай орны хувьд RT-LAMP олшруулалтын аргаар 2016 онд С.Хишигмөнх нар 0-5 хүртэлх насны хүүхдийн хамар залгиурын арчдаст томуу, томуу төст вирусыг илрүүлэх, 2022 онд А.Номинзул нар SARS-CoV-2 вирусыг илрүүлэх боломжийг судалжээ.[5,6]

Эдгээр судалгааны дүнгээр LAMP олшруулалтыг вирусын халдварын шинжилгээнд,

тоног төхөөрөмж хязгаарлагдмал лабораторийн орчинд ашиглах боломжтой хэмээн дүгнэжээ. Мөн Н.Нямтуяа нарын Шигатоксин ялгаруулагч *Escherichia coli*-г илрүүлэх судалгааны дүнгээр LAMP аргачлалыг ПГУ-ын аргатай харьцуулахад 10 дахин бага ДНХ концентрацитай үед илрүүлэх боломжтой гэжээ.[7] Тиймээс *S.aureus*-ын ялган дүйлтэнд LAMP аргачлалыг ашиглах боломжийг тодорхойлох, протоколыг боловсруулах, практикт суурилуулах боломжийг эрэлхийлэх шаардлагатай байгаа нь энэхүү судалгааг хийх үндэслэл боллоо.

Зорилго: *S.aureus*-ыг ПГУ болон LAMP аргачлалаар илрүүлэн, харьцуулан үнэлэх.

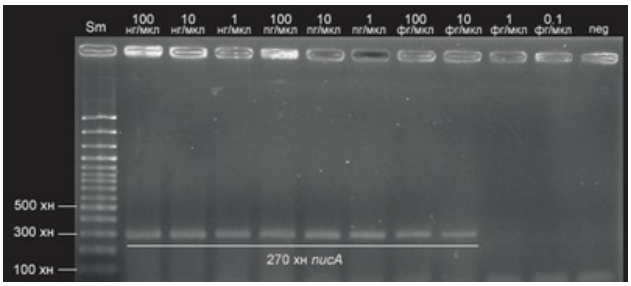
Арга, аргачлал: Судалгааг АШУҮИС-ийн Судалгааны ёс зүйн хяналтын хорооны 2020 оны 12 дугаар сарын 18-ны өдрийн хурлын судалгааны ёс зүйн зөвшөөрлийн хүрээнд хийж гүйцэтгэлээ (протокол №2020/3-09).

S.aureus (ATCC 6538) стандарт омгийг Baird-Parker-ын сонгомол тэжээлт орчинд өсгөвөрлөн, өсгөврөөс халааж буцалгах аргаар ДНХ ялгалаа.[8] Ялгасан ДНХ-ийн гарцыг нанодропоор хэмжин 0.1фг/мкл, 1фг/мкл, 10фг/мкл, 100фг/мкл, 1пг/мкл, 10пг/мкл, 100пг/мкл, 1нг/мкл, 10нг/мкл, 100нг/мкл концентрацитай ДНХ-ийн уусмал бэлтгэв. Эдгээр ялгаатай концентрацитай 10 төрлийн ДНХ-ийн уусмалд ПГУ болон LAMP аргачлалаар *S.aureus*-ыг илрүүлэх чадамжийг харьцуулан үнэлэв.

S.aureus-ыг ПГУ-аар баталгаажуулахдаа *S.aureus*-ын зүйл өвөрмөц термонуклеаза генийн (*nucA*) 270 хн урттай бүтээгдэхүүнийг өвөрмөц праймер (nuc-F 5′-3′ GCGATTGATGGTGATACGGTT, nuc-R 5′-3′ AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC) ашиглан ПГУ-аар олшруулж, илрүүллээ. ПГУ-ыг эхлэлийн денатураци 95°C хэмд 10 минут, 94 °C хэмд 1 минут, 55 °C хэмд 30 секунд, 72 °C хэмд 1.5 минутаар 37 цикл давтаж, 72 °C хэмд 10 минут байх нөхцлөөр явууллаа.[9] Олширсон бүтээгдэхүүнийг 2%-ийн агарозын гелээр 100 вольтод 35 минут гүйлгэж этидиум бромидоор 20 минут будаж илрүүлэв.

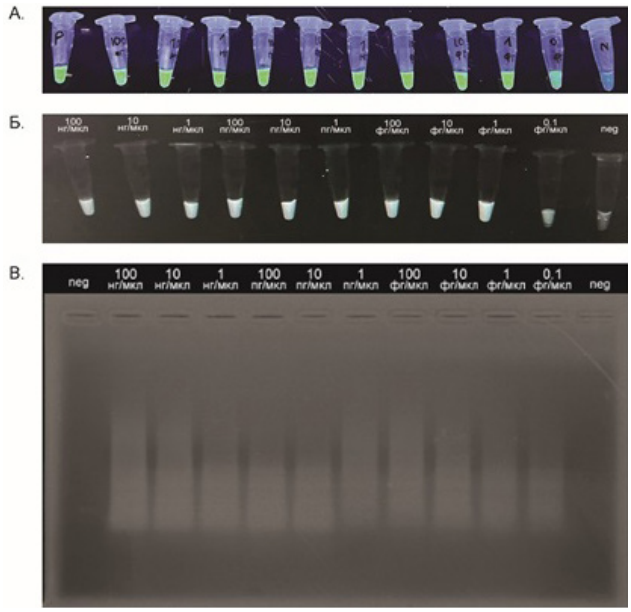
S.aureus-ыг LAMP аргачлалаар илрүүлэхдээ урвалжийн холимгийг 5мкл буфер уусмал (2X), 0.2 μM F3/B3 праймер, 1.6 μM FIP/BIP праймер, 0.4 μM FLP/BLP праймер, 3.2 U Bst 2.0 WarmStart ДНХ полимераза, 2мкл ДНХ байхаар тооцож нийт 25мкл холимог бэлтгэв. Бэлтгэсэн холимгийг 63ºC хэмд 40 минут инкубацлан олшруулсны дараа 80ºC хэмд 5 минут байлгаж урвалыг зогсоон, олширсон бүтээгдэхүүнд Sybr green будаг нэмж нүдээр болон хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт харж илрүүлэв.[10]

Үр дүн: Бид 100нг/мкл-0.1фг/мкл хүртэл 10 төрлийн ялгаатай концентраци бүхий ДНХ-ийн уусмалд *nucA* генийн бүтээгдэхүүнийг ПГУ-ын аргаар илрүүлэхэд 100нг/мкл-10фг/мкл хүртэл шингэрүүлсэн ДНХ-ийн уусмалд 270хн урттай бүтээгдэхүүн илэрсэн боловч 10фг/мкл концентрацитай уусмалд үүссэн бүтээгдэхүүний хэмжээ мэдэгдэхүйц буурсан, гелийн зураглалд бүдэг зурвас тодорхойлогдлоо. (Зураг 1) Харин 0.1фг/мкл болон 1фг/мкл концентрацитай ДНХ-ийн уусмалд бүтээгдэхүүн олширсонгүй.



Зураг 1. Ялгаатай концентрацитай ДНХ-ийн уусмалд *nucA* генийг ПГУ-аар илрүүлсэн байдал.

Ялгаатай концентрацитай ДНХ-ийн уусмалд *nucA генийг* LAMP аргачлалаар олшруулан хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт байршуулан, өнгөний ялгарлаар дүгнэхэд 100нг/мкл-0.1фг/мкл болтол шингэрүүлсэн ДНХ-ийн уусмалд бүгдэд эерэг тодорхойлогдсон. ДНХ-ийн гарц 100нг/мкл концентрацитай үед илүү тод өнгө хэт ягаан туяанд үзүүлсэн ба ДНХ шингэрүүлэлтээс хамааран гарц нь багасах тусам өнгөний ялгарал бага багаар буурч байсан боловч 0.1фг/мкл болтол шингэрсэн ДНХ-ийн уусмалд ч нүдэнд илт харагдахуйц өнгө өгч байна. Дээрх үр дүнг 1.5%-ийн агарозын гельд гүйлгэн, этидиум бромидоор будаж баталгаажуулав. (Зураг 2)



Зураг 2. Ялгаатай концентрацитай ДНХ-ийн уусмалд *nucA* генийг LAMP аргаар илрүүлсэн байдал.

А. Хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт байрлуулан харж үнэлсэн байдал Б. Хэт ягаан туяаны үүсгэвэрт байрлуулан зургийг авч баталгаажуулсан байдал В. Агарозын гель электрофорезоор илрүүлсэн байдал (р-эерэг хяналт, 100нг/мл-0.1фг/мкл хүртэл шингэрүүлсэн ДНХ-ийн уусмал, N, neg-сөрөг хяналт).

ПГУ болон LAMP аргачлалын *S.aureus*-ыг илрүүлэх хамгийн бага ДНХ-ийн концентрацийг харьцуулан үзэхэд ПГУ-ын илрүүлэх чадамж 10фг/мкл хүртэл байсан бол LAMP аргачлалын илрүүлэх чадамж 0.1фг/мкл буюу ПГУ-аас 100 дахин илүү байгаа нь тодорхойлогдлоо. ($p<0.05$)

Хэлцэмж: LAMP шинжилгээний аргыг 2000 онд Японы судлаач Tsugunori N боловсруулан нуклейн хүчилд суурилсан молекул генетикийн бүх төрлийн шинжилгээ, халдварт өвчний оношлогоо, хоол хүнсний эрүүл ахуй, орчны шинжилгээ зэрэгт өвчин үүсгэгч вирус, бактери, шимэгчийг илрүүлэх зэргээр хэрэглэх боломжтой болохыг баталгаажуулжээ.[3]

2022 онд Manal H нар хоол хүнсний бохирдол үүсгэгч *S.aureus*-ыг махнаас ПГУ болон LAMP аргаар илрүүлэн, үр дүнг харьцуулан үнэлжээ. Уламжлалт аргаар эерэг гэж тодорхойлсон 13 дээжийг шар буурцагны шөлөнд 12-18 цагийн турш баяжуулсны дараа ДНХ-ийг ялгаж, *S.aureus*-ыг илрүүлэхэд LAMP шинжилгээгээр 12 тохиолдолд эерэг илэрсэн бол ПГУ-аар 7 дээжинд илрүүлсэн байна. Мөн стандарт омгоос ялгаж бэлтгэсэн ялгаатай концентрацитай ДНХ-ийн уусмалаас үүсгэгчийн *femA, arcC* генийг илрүүлэхэд ПГУ-аар 15пг/мкл хүртэл, LAMP шинжилгээ 1.5пг/мкл хүртэл илрүүлэх чадамжтай байжээ. Уг судалгааны дүнгээр LAMP арга нь ПГУ-ын шинжилгээнээс 100 дахин мэдрэг бөгөөд цаашид хүнсний дээжээс эмгэгтөрөгчийг илрүүлэх боломжтой гэж дүгнэжээ.[11] Энэхүү судалгааны дүн нь бидний үр дүнтэй дүйж байна.

Jianyu S (2014 он) нар метициллинд тэсвэртэй *S.aureus*-ыг илрүүлэх LAMP шинжилгээний аргачлалыг илүү боловсронгуй болгож, хугацааг 60 минутанд багтаан хийх боломжтой протоколыг боловсруулсан байна.[2] Энэхүү судалгаагаар 667 стафилококкийн эмнэлзүйн омгийг илрүүлж, ПГУ-тай харьцуулан үнэлэхэд мэдрэг чанар 98.4%-100%, өвөрмөц чанар 92.7%-100% байлаа. Судалгааны дүнгээс LAMP шинжилгээг метициллинд тэсвэртэй *S.aureus*-ыг илрүүлэхэд ашиглах бүрэн боломжтой бөгөөд илрүүлэх хязгаар өндөртэй, энгийн, хурдан зэрэг олон давуу талтай байна гэж тодорхойлсон нь бидний судалгааны үр дүнтэй нийцэж байна.

Дүгнэлт: *S.aureus*-ыг илрүүлэхэд LAMP шинжилгээний илрүүлэх чадамж ПГУ-ын шинжилгээнээс 100 дахин өндөр байгаа тул уг аргыг цаашид ашиглах боломжтой байна.

Ном зүй:

1. *Haskell KJ, Schriever SR, Fonoimoana KD, Haws B. Antibiotic resistance is lower in Staphylococcus aureus isolated from antibiotic-free raw meat as compared to conventional raw meat. 2018;13(12):e0206712.*
2. *Su J, Liu X, Cui H, et al. Rapid and simple detection of methicillin-resistance Staphylococcus aureus by orfX loop-mediated isothermal amplification assay. BMC biotechnology. Jan 24 2014;14:8.*
3. *Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic acids research. Jun 15 2000;28(12):E63.*
4. *Yano A, Ishimaru R, Hujikata R. Rapid and sensitive detection of heat-labile I and heat-stable I enterotoxin genes of enterotoxigenic Escherichia coli by Loop-Mediated Isothermal Amplification. Journal of microbiological methods. Feb 2007;68(2):414-420.*
5. *Khishigmunkh C. ED, Darmaa B., Amarzhargal Y.A., Nyamkhuu D., Tsogtsaykhan S., Nakauchi M., Nymadawa P. Results of identification of infectious agents of influenzae and other acute respiratory infections with method of RT-LAMP. Acta Biomedica Scientifica. 2018;3(4):155-157.*
6. *А. Номинзул, Я. Мөнхдэлгэр. SARS-CoV-2 вирусыг тогтмол хэмт гогцоо олшруулалт (LAMP)-ын аргаар илрүүлсэн үр дүн, Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль; 2022. хуудас 25-27.*
7. *Н. Нямтуяа, Ж. Сарантуяа, Я. Мөнхдэлгэр. Шигатоксин ялгаруулагч Escherichia coli-г савлагаатай салат, салатны навчнаас (lettuce) илрүүлсэн дүн, Анагаахын шинжлэх ухааны үндэсний их сургууль; 2022.хуудас 21.*
8. *Hegde A, Ballal M, Shenoy S. Detection of diarrheagenic Escherichia coli by multiplex PCR. Indian journal of medical microbiology. Jul-Sep 2012;30(3):279-284.*
9. *Parvez MAK, Ferdous RN, Rahman MS, Islam S. Healthcare-associated (HA) and community-associated (CA) methicillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in Bangladesh - Source, diagnosis and treatment. Journal, genetic engineering & biotechnology. Dec 2018;16(2):473-478.*
10. *Tian X, Feng J, Wang Y. Direct loop-mediated isothermal amplification assay for on-site detection of Staphylococcus aureus. FEMS microbiology letters. Jun 1 2018;365(11).*
11. *Hassan M, Vittal R, Raj JM, Chakraborty G. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a sensitive molecular tool for detection of Staphylococcus aureus in meat and dairy product. Mar 2022;53(1):341-347.*

Evaluation of some molecular biological methods' detection capacity for *staphylococcus aureus*

Urangoo Z[1,2], Amgalanzaya D[3], Nyamtuya N[4], Gerelsukh Ts[2], Khishigbuyan Ts[2], Otgontsetseg E[1], Bayarlakh B[1], Sarantuya J[1], Munkhdelger Ya[1]

[1]Department of Molecular biology and Genetics, School of Biomedicine, MNUMS
[2] Clinical laboratory, National Cancer Center of Mongolia
[3]Etugen University
[4]Express laboratory
E-mail: Urangoo2@gmail.com; Tel: +976-99647226

Background: *Staphylococcus aureus (S.aureus)* is a highly virulence pathogen that responsible for various tissues infection and a wide range of diseases, including food borne infection, skin infections, pneumonia, mastitis and bacteremia in humans and animals.
Aim: To compare PCR and LAMP methods in detecting *S.aureus.*
Materials and Methods: In our study, we analyzed a comparison of PCR and LAMP results on *S.aureus* (ATCC 6538) standard strain used quality control strain solution which diluted, 0.1fg/µL, 1fg/µL, 10fg/µL, 100fg/µL, 1pg/µL, 10pg/µL, 100pg/µL, 1ng/µL, 10ng/µL, and 100ng/µL DNA concentration from BP agar cultures. A comparison was made using PCR and LAMP methods to detect diluted DNA concentrations.
Results: The *nuc A* gene sensitivity in PCR results is positive in 10fg/µL DNA solution and negative in 0.1fg/µL and 1fg/L DNA. In LAMP test results, it showed a positive response to all concentrations.
Conclusion: The LAMP method's sensitivity is 100 times more than PCR for detecting *S.aureus*. Therefore this method might be more practical in near future.

Keywords: Polymerase chain reaction (PCR), Loop-Mediated Isothermal amplification (LAMP), *nuc A, S.aureus*