

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ОТ-ПЦР В ИММОБИЛИЗОВАННОЙ ФАЗЕ ДЛЯ УСКОРЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ

С.А. Лапа, Е.С. Ключихина, А.А. Топилина, Р.А. Мифтахов, А.В. Чудинов

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами, вирусами гриппа А и В, а также бактериальными возбудителями, являются серьезной социальной угрозой. От своевременной постановки точного диагноза зависит успешность назначенной терапии и стратегия лечения пациента в целом [1]. Создание методов экспресс-диагностики для точного выявления этиологии пневмонии имеет важное значение как для назначения индивидуальной терапии, так и для решения эпидемиологических задач.

Биочипы являются универсальной платформой для одновременного определения нескольких биологических объектов и находят применение в научных исследованиях и клинической диагностике.

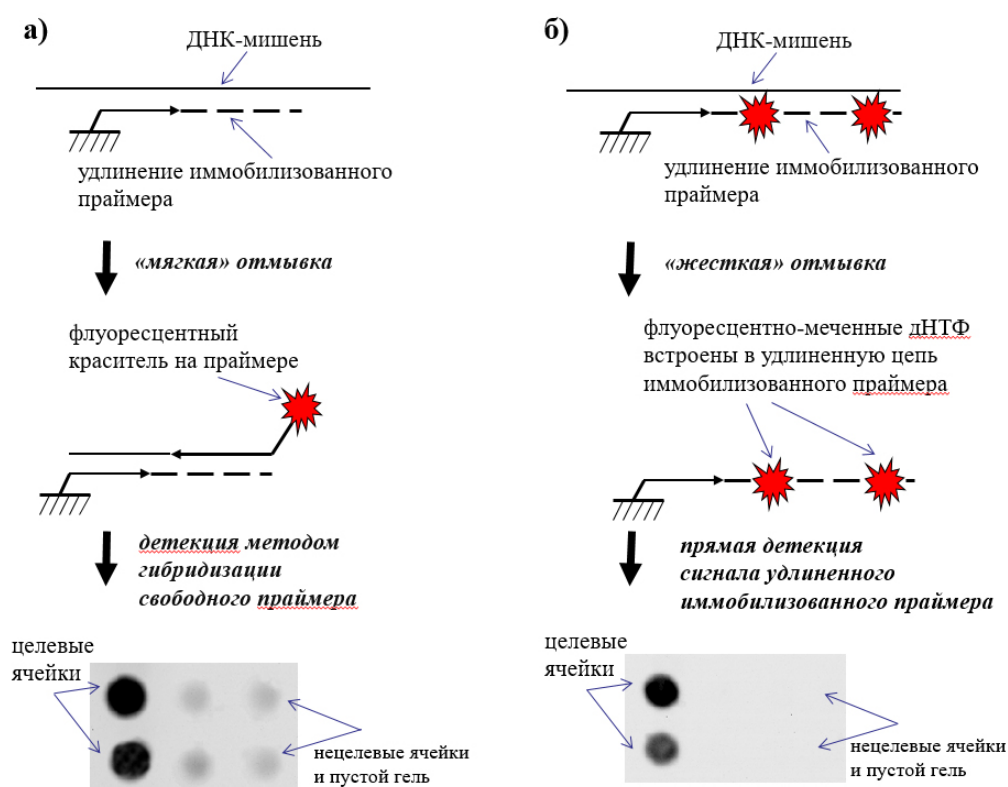


Рисунок 1. Варианты ПЦР на чипе (схема): а) стандартный вариант ПЦР с использованием свободного (не иммобилизованного) флуоресцентно-меченного праймера в смеси, б) предлагаемый нами вариант ПЦР с использованием флуоресцентно-меченного трифосфата дезоксиуридина.

Ранее мы докладывали о разработке мультиплексной ПЦР в одном общем объеме для видового определения бактериальных возбудителей пневмонии человека [2]. Это позволило нам сформулировать требования к видоспецифичным праймерам и оптимизировать ПЦР в мультиплексном варианте. Развитием тест-системы [2] стала разработка мультиплексной ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) в иммобилизованной фазе для выявления шести бактериальных и двух вирусных возбудителей инфекционной пневмонии человека [3]. Накопление сигнала удлиняющихся иммобилизованных праймеров происходит за счет включения в растущую цепь флуоресцентно-меченных нуклеотидов. Детекция сигнала осуществляется после удаления всех компонентов смеси, что существенно снижает фон и увеличивает чувствительность анализа (Рис. 1).

В качестве носителя для иммобилизованных праймеров использовали акриламидные гелевые ячейки. В качестве подложки применяли как специальным образом обработанные предметные стекла, так и различные виды полимеров, включая ПЭТ.

На Рис. 2 показаны примеры применения прототипа разработанной системы.

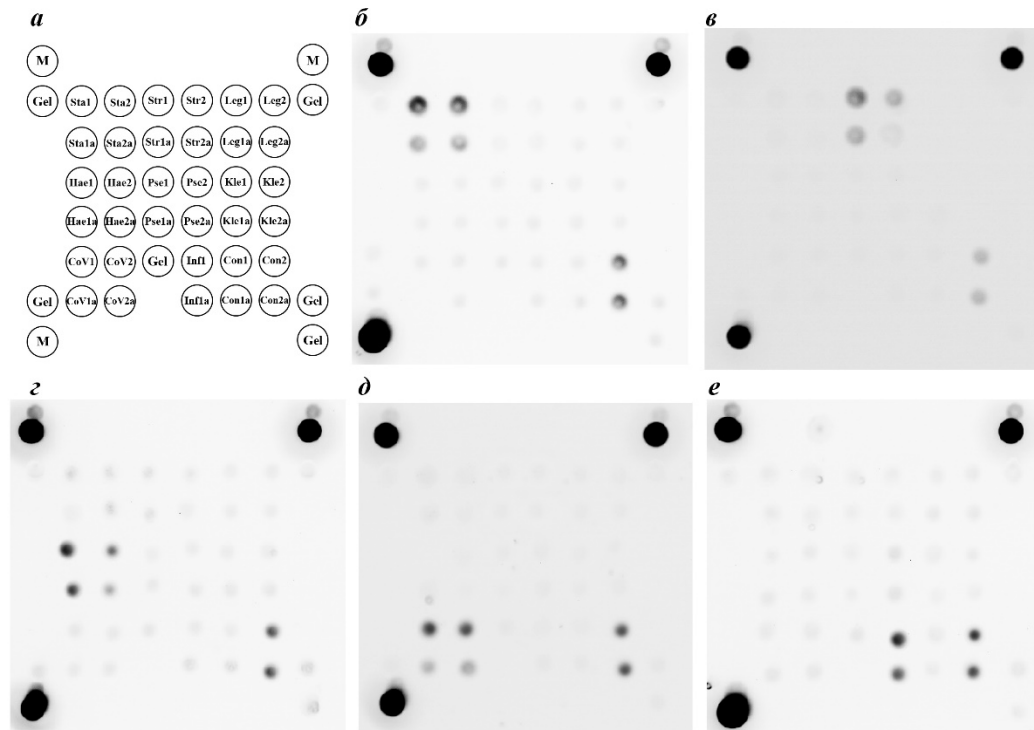


Рисунок 2. Результаты мультиплексной ОТ-ПЦР на чипе. а – Схема: М – флуоресцентный маркер для автоматического наложения сетки для расчета интенсивности сигнала; Gel – ячейка пустого геля; Sta – *Staphylococcus aureus*, Str – *Streptococcus pneumoniae*, Leg – *Legionella pneumophila*, Hae – *Haemophilus influenzae*, Pse – *Pseudomonas aeruginosa*, Kle – *Klebsiella pneumoniae*, Cov – SARS-CoV-2, Inf – вирус гриппа А; Con1 – внутренний контроль обратной транскрипции (резервный; в настоящее время не используется), Con2 – внутренний контроль ПЦР. б–е – результаты определения вида (примеры) соответственно: *St. aureus*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, SARS-CoV-2, вирус гриппа А. Для удобства приведены фото с инвертированными сигналами (негативы).

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20-14-00287.

Литература

1. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011 // *Thorax*. – 2011. – 66 Suppl 2:ii1–23.
2. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии // *Биоорг. Химия*. – 2020. – Т. 46. – Стр. 550–552.
3. Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Аммури Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека // *Молекуляр. биология*. – Т. 55. – № 5. – В печати.