

РАЗРАБОТКА СПОСОБА ОДНОВРЕМЕННОГО ОБНАРУЖЕНИЯ ВИРУСНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА

А.А. Шингарёва, С.А. Лапа, А.В. Чудинов

ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия

ПЦР является широко применяемым методом идентификации бактериальных и вирусных возбудителей пневмонии [1]. Для обнаружения РНК-содержащих вирусных возбудителей пневмонии используется ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [2].

В работе показано детектирование двух социально значимых возбудителей пневмонии, таких как SARS-CoV-2 и грипп типа А. Актуальность разработки способа одновременной идентификации возбудителей, характеризующихся сходными клиническими симптомами, заключается в возможности дискриминации возбудителя в эпидемические периоды для своевременного назначения соответствующей терапии.

Для создания мультиплексной ОТ-ПЦР сконструированы видоспецифичные пары праймеров к целевым генам-мишеням для двух возбудителей, определена специфичность, оптимальная температура плавления дуплексов и другие важные физико-химические характеристики для полученных праймеров с применением метода градиентной ПЦР и ПЦР в режиме реального времени. Наличие полноразмерного продукта и выход реакции в процессе оптимизации системы определяли по электрофореграмме (программа «Image J», США).

Для проверки основных эксплуатационных характеристик предлагаемой системы с применением иммобилизованных праймеров были использованы биочипы, разработанные в ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН (рисунок 1) [3]. Видно, что в обоих случаях получены сигналы с ячеек, содержащих видоспецифичные праймеры. Более подробно схема биочипа описана в [3].

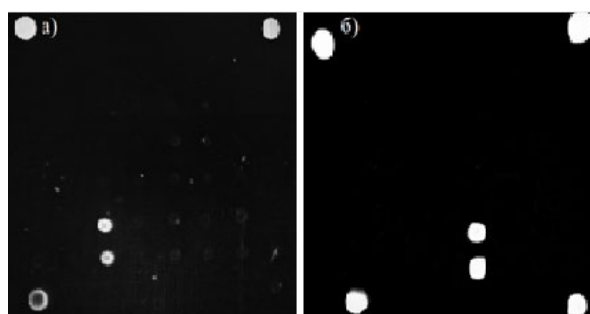


Рисунок 1. Результаты определения а) SARS-CoV-2 и б) гриппа А на биочипе.

Проверку осуществляли как с использованием РНК коллекционных штаммов, так и на шести клинических изолятах, полученных из НИИВС им. Мечникова. Была показана видоспецифичность и воспроизводимость дифференциального определения вирусных возбудителей пневмонии. Полученные результаты могут быть полезны в ускоренной клинической диагностике возбудителей пневмонии.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ 20-14-00287

Литература

- Lorenz TC. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. J Vis Exp. 2012 May 22; (63):e3998. doi: 10.3791/3998. PMID: 22664923; PMCID: PMC4846334.
- Elfman J, Li H. Detection and Measurement of Chimeric RNAs by RT-PCR. Methods Mol Biol. 2020; 2079:83–94. doi: 10.1007/978-1-4939-9904-0_6. PMID: 31728963.
- Lapa SA, Miftakhov RA, Klochikhina ES, Ammur VI, Blagodatskikh SA, Shershov VE, Zasedatelev AS, Chudinov AV. Development of Multiplex RT-PCR with Immobilized Primers for Identification of Infectious Human Pneumonia Pathogens. Mol Biol. 2021; 55(6):828–838. doi: 10.1134/S0026893321040063. Epub 2021 Dec 17. PMID: 34955557; PMCID: PMC8682033.