

УДК 57.083.18

ИДЕНТИФИКАЦИЯ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ИНФЕКЦИОННОЙ ПНЕВМОНИИ С ПОМОЩЬЮ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР

Е.С. Ключихина, С.А. Лана, В.Е. Кузнецова, А.В. Чудинов

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

Инфекционная пневмония – острый воспалительный процесс легочной ткани, вызываемый широким рядом возбудителей бактериальной, вирусной и грибковой природы. Вспышки инфекционных пневмоний, вызванных коронавирусами SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2, вирусами гриппа А и В, а также бактериальных пневмоний становятся реальной социальной угрозой. Важной проблемой является установление этиологии заболевания и быстрая идентификация возбудителя, поскольку часто вирусные и бактериальные пневмонии характеризуются сходной клинической картиной [1].

Нами разработана мультиплексная ПЦР для видового определения пяти основных возбудителей бактериальной пневмонии человека [2], а именно *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*. Для перечисленных видов были выбраны генетические мишени и сконструированы праймеры, для каждого из которых была проведена процедура BLAST-анализа, определены физико-химические характеристики, включая тестирование на наличие как внутри – так и межмолекулярных вторичных структур. Праймеры, использованные в ПЦР, были подобраны таким образом, чтобы они амплифицировали фрагменты ДНК различной длины из разных матриц, но работали в одинаковых условиях амплификации. Используются следующие генетические мишени: ген *ebpS* (*S. aureus*), длина ПЦР-продукта – 283 п.о.; ген *sidA* (*L. pneumophila*), длина ПЦР-продукта – 369 п.о.; ген *fucK* (*H. influenzae*), длина ПЦР-продукта – 193 п.о.; ген *oprL* (*P. aeruginosa*), длина ПЦР-продукта – 321 п.о., и ген *rmpA* (*K. pneumoniae*), длина ПЦР-продукта – 177 п.о.

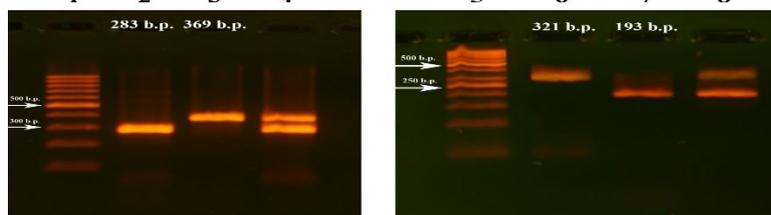


Рис. 1. Определение ДНК возбудителя электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. 1 – маркер длин ДНК GeneRuler 100bp (Thermo Scientific, США), 2 – *S. aureus*, 3 – *L. pneumophila*, 4 – *S. aureus* + *L. pneumophila*, 5 – маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo Scientific, США), 6 – *P. aeruginosa*, 7 – *H. influenzae*, 8 – *P. aeruginosa* + *H. influenzae*. 4 % агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Проводили оптимизацию температурно-временного профиля ПЦР с применением градиентной ПЦР, а также состава компонентов буфера и концентрации каждого из праймеров в смеси; как в режиме применения индивидуальных ДНК-матриц, так и в режиме смесей ДНК нескольких возбудителей в одной пробирке. Установили, что праймеры обладают высокой специфичностью в смеси, содержащей ДНК различных

микроорганизмов, и способны выявлять исключительно свои специфичные мишени, не давая ложноположительный результат при наличии в смеси неспецифичной ДНК. Результат дифференциального обнаружения ДНК возбудителя в образце методом мультиплексной ПЦР показан на рисунке 1. Разработанная система может быть расширена для выявления возбудителей пневмонии вирусной и грибковой природы. В настоящее время планируется проведение испытаний на клинических образцах, применение меченых производных dNTP для последующего анализа на биочипах, а также разработка математического алгоритма расчетов сигналов амплификации.

Система подходит для диагностических лабораторий, специализирующихся на клинических анализах с использованием ПЦР, и ориентирована на применение в клинической диагностике для определения этиологии заболевания благодаря возможности дифференцировать бактериальную пневмонию от вирусной и грибковой пневмоний.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 20–14–00287.

ЛИТЕРАТУРА

1. Steele RW, Thomas MP, Kolls JK. Current management of community-acquired pneumonia in children: an algorithmic guideline recommendation. *Infect Med* 1999; 16:46–54.
2. Han Y.C., Woo J.H. Diagnosis and treatment of bacterial pneumonia in Korea. *Respirology*. 1996. V. 1, P. 115–122.