

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ РЕКОМБИНАЗНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА

С.А. Лапа, С.А. Суржиков, В.Е. Шершов, 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 вирусными и бактериальными возбудителями, являются серьезной социальной угрозой. От своевременной постановки точного диагноза зависит успешность назначенной терапии и стратегия лечения пациента в целом [1]. 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].

В качестве весьма привлекательной альтернативы ПЦР в настоящее время рассматриваются активно развивающиеся методы изотермической амплификации; одним из наиболее перспективных является метод рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA).

Нами разработана диагностическая система, основанная на RPA, для выявления шести бактериальных возбудителей пневмонии человека. Сконструированы и оптимизированы видоспецифичные праймеры для проведения мультиплексной реакции в одном общем объеме. Использованы меченые праймеры для надежной дискриминации близких по размеру продуктов амплификации.

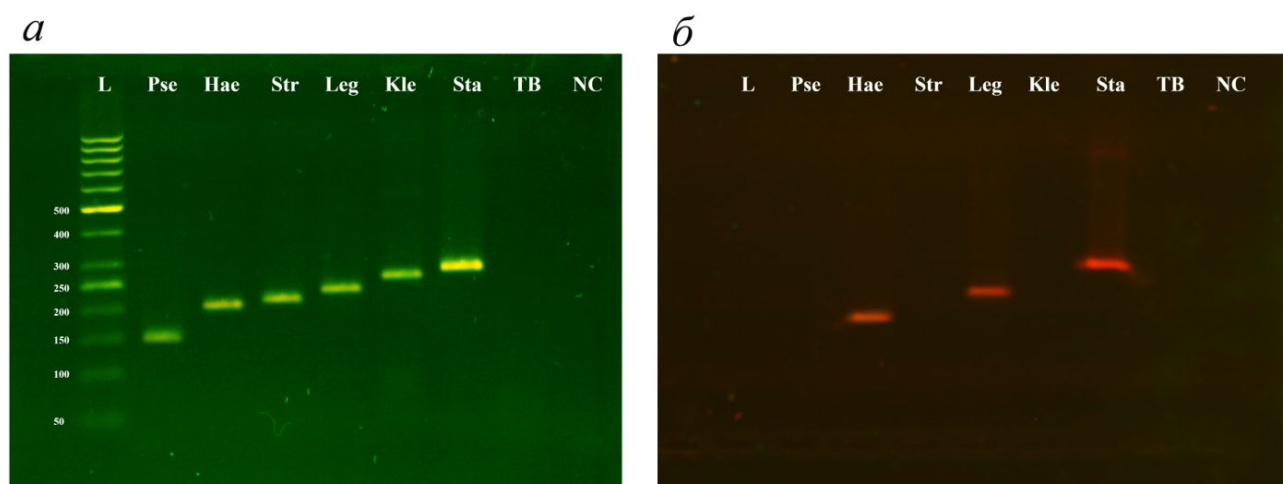


Рисунок 1. Визуальная идентификация возбудителя пневмонии на электрофореграмме. а – Неизбирательная детекция ДНК с помощью красителя SYBR Green I; б – избирательная идентификация продуктов удлинения праймеров, содержащих цианиновый краситель Cy5. Окрашивание праймеров, специфичных к *H. influenzae*, *L. pneumophila* и *Staphylococcus aureus*, позволяет надежно дискриминировать соответствующие продукты амплификации от не несущих флуоресцентную метку: *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*. Обозначения: L – маркер длин ДНК Ladder GeneRuler 50bp (“Thermo Fisher Scientific”), Pse – *P. aeruginosa*, Hae – *H. influenzae*, Str – *S. pneumoniae*, Leg – *L. pneumophila*, Kle – *K. pneumoniae*, Sta – *Staphylococcus aureus*, TB – *M. tuberculosis* (контроль специфичности праймеров), NC – отрицательный контроль. Цифрами слева обозначена длина двухцепочечных ДНК (от 50 до 500 п.н.)

В работе использовали ДНК штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск), в том числе клинические и природные изоляты. Перед выделением ДНК изоляты из природных источников, а также клинические образцы культивировали на селективных средах. ДНК из культур выделяли и деконтаминировали с использованием СТАВ-метода. Работы с изолятами и живыми коллекционными культурами проводили на базе указанного учреждения.

Таблица 1. Штаммы возбудителей бактериальной пневмонии человека, использованные в работе.

Возбудитель	№	Штамм	Источник
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-4807	NCTC / ATCC 25668	
	B-7565	ATCC 17650	
	B-8361	DE 177	клинический штамм
<i>Haemophilus influenzae</i>	B-7400	ATCC 49247	
	B-7399	ATCC 9006 тип а	
	B-9029	Хак-1	клинический штамм
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	B-7756	ATCC 49619	
	B-7397	ATCC 6303	
	B-7398	ATCC 6305	
<i>Legionella pneumophila</i>	B-5978	ATCC 33152	
	B-7783	7	природный штамм
	B-8538	ОО42	природный штамм
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B-4811	NCTC / ATCC 13883	
	B-7877	KPB-594	клинический штамм
	B-7878	KPB-1802	клинический штамм
<i>Staphylococcus aureus</i>	B-5931	ATCC 25923	
	B-7471	ATCC 43300	
	B-8377	Оренбург_2014 № 67	клинический штамм

Идентификацию возбудителя проводили путем визуального анализа электрофореграммы (Рис. 1). Аналитическая чувствительность разработанной мультиплексной RPA составила 10^2 – 10^3 копий ДНК. Специфичность метода определяли по отсутствию перекрестной амплификации исследованных образцов ДНК возбудителей пневмонии для каждой пары праймеров, а также для ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37rv. Для исследованных образцов этот показатель составил 100 %. Время выполнения анализа – менее часа, включая электрофоретический контроль реакции.

Тест-система может найти применение в профильных клинических лабораториях для экспресс-анализа образцов от пациентов с подозрением на пневмонию.

Исследование поддержано грантом РФФИ № 22–14–00257.

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*. – 2021 – Т. 55. – № 5. – Стр. 944–955.