

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ

С.А. Лана, А.С. Епифанов, А.В. Чудинов

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

Ранее мы докладывали о разработке мультиплексной ПЦР [2] и рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) [3] для видового определения бактериальных возбудителей пневмонии человека. Отличие RPA от ПЦР заключается в том, что это реакция идет в изотермическом режиме, благодаря тому, что представляет собой сложную ферментативную систему, в состав которой включены: рекомбиназа, которая создает комплекс между двухцепочечной ДНК и праймером на участке их комплементарности, стабилизирующие белки, которые удерживают этот комплекс, чтобы он не распался в момент, когда начинается синтез удлинения цепи с помощью полимеразы, обладающей 5' – 3' вытесняющей активностью, и собственно полимеразы.

Для разработки дискриминирующей тест-системы был проведен выбор видоспецифичных генетических мишеней, которые представляют собой фрагменты генов с последовательностями, характерными для конкретного индивидуального возбудителя бактериальной пневмонии. На основании проведенного анализа сконструированы видоспецифичные праймеры к шести возбудителям, удовлетворяющие требованиям для RPA, в том числе, определяющие необходимость конструирования праймеров большей длины для работы ферментативного комплекса с рекомбиназой.

Таблица 1. Видоспецифичные праймеры RPA для идентификации бактериальных возбудителей пневмонии человека

Бактериальный возбудитель	Нуклеотидные последовательности праймеров, 5'→3'	Длина продукта, п.н.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	f – TTCTGAGCCCAGGACTGCTCGTCGTGGCCGGTAGC r – GTACAACATGGCTCTGGGCGAGCGTCGTGCCAAGG	150
<i>Haemophilus influenzae</i>	f – CC(A/T) GCACCAGACCCAAACACAGCAAATTGGGTATC r – TGCTAACGGTAATTGGGATCCATCGATTTTAGCCT	195
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	r – ATGTAGATGACGGTCCCAAGTCAAGAGAGGAAAGC f – ATCTCTGCGCCATAAGCAATGACTAAATCATCTGC	210
<i>Legionella pneumophila</i>	f – CATGTTGGAGTTCTATGGCACGAATTTT(C/G/T) AATAAG r – GCAGCGATCA(C/T) CCTCGGTGGATTGGCTGCCGCAAT	232
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	f – GTTGTGGCGTAGATGTTCCAGATGAACTGGAAGGAGTTCG r – GGTGTGCTGTGAGTTTTTCAGGCACCGTGAAATATAACG	261
<i>Staphylococcus aureus</i>	f – ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCT r – CCAAATATCGCTAATGCACCGATAATTAGTACAGC	280

Проведена модификация и оптимизация системы [3], которая теперь не использует идентификации суммарной ДНК с помощью интеркалирующего красителя. Разработанная диагностическая система, основанная на RPA, включает шесть пар видоспецифичных праймеров и способна одновременно выявлять шесть бактериальных возбудителей пневмонии человека в одном реакционном объеме. В работе использовали ДНК штаммов из коллекции ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск), идентификацию возбудителя проводили путем визуального анализа электрофореграммы в двухволновой системе детекции сигнала (зеленый и красный каналы возбуждения флуорофора) (Рис. 1).

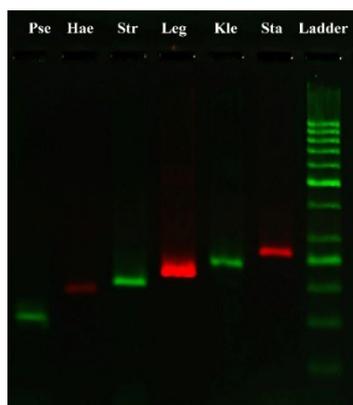


Рисунок 1: Электрофореграмма, полученная в результате определения в образце возбудителя пневмонии с помощью мультипраймерной RPA. Красный цвет означает наличие продукта амплификации праймера, несущего по 5' – концу метку Cy-5, зеленый – Cy-3. **Ladder** – молекулярный маркер длин ДНК GeneRuler 50bp (Thermo, Латвия). **Pse** – *Pseudomonas aeruginosa*, **Hae** – *Haemophilus influenzae*, **Str** – *Streptococcus pneumoniae*, **Leg** – *Legionella pneumophila*, **Kle** – *Klebsiella pneumoniae*, **Sta** – *Staphylococcus aureus*.

Из электрофореграммы, представленной на Рис. 1, видно, что праймеры сконструированы таким образом, чтобы облегчить визуальную идентификацию продуктов амплификации благодаря их различной длине. Для повышения надежности идентификации праймеры, дающие продукты близкой длины, окрашены различными флуоресцентными метками. Это позволяет визуально, по продуктам RPA, дифференцировать наличие различных возбудителей пневмонии в исследуемом образце. На том же рисунке представлен список социально-значимых возбудителей пневмонии, идентифицируемых предлагаемым методом.

Для практической проверки надежности работы системы (видоспецифичности праймеров) составлены «гипотетические» составные образцы, содержащие одновременно несколько возбудителей пневмонии. Проведены реакции одновременно с двумя возбудителями бактериальной пневмонии человека в одном образце. Из Рис. 2. видно, что во всех случаях праймеры проявляют строгую видоспецифичность, а продукты реакции хорошо дискриминируются.

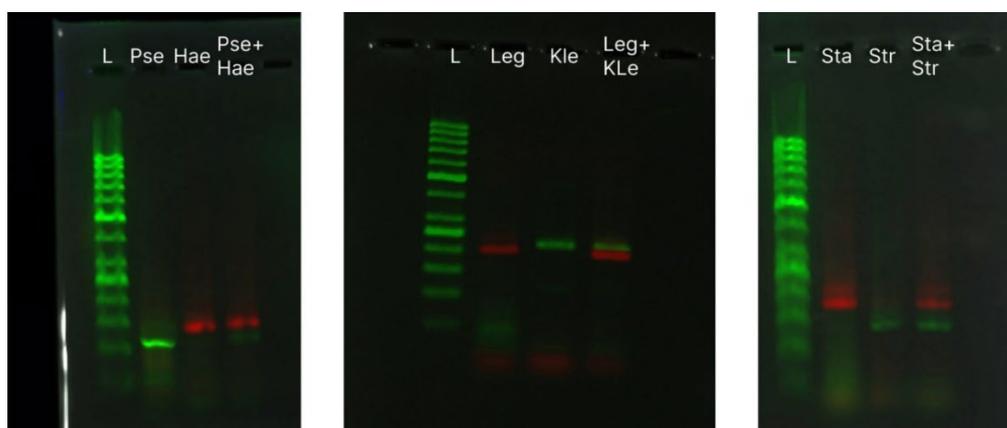


Рисунок 2: Визуальная идентификация возбудителей бактериальной пневмонии в составных образцах: L – маркер длин ДНК Ladder GeneRuler 50 bp, Sta – *S. aureus*, Kle – *K. Pneumoniae*, Leg – *L. Pneumophila*, Str – *S. Pneumoniae*, Hae – *H. Influenzae*, Pse – *P. Aeruginosa*.

Система не нуждается в использовании термоциклера. Для надежной дискриминации близких по размеру продуктов амплификации использованы флуоресцентно-меченные праймеры (Cy3 и Cy5). Аналитическая чувствительность разработанной мультиплексной RPA составила 10^2 – 10^3 копий ДНК. Тест-система может найти применение в профильных клинических лабораториях для экспресс-анализа образцов от пациентов с подозрением на пневмонию. Система запатентована (Патент РФ 2813995).

Исследование поддержано грантом РФФ № 22-14-00257.

Литература

1. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. // Thorax. 2011. 66 Suppl 2:ii1–23.
2. Лапа С.А., и др. // Молекуляр. биология. 2021, Т. 55. С. 944–955.
3. Лапа С.А., и др. Молекуляр. биология. 2023, Т. 57. С. 539–545.