

УДК 577.2

РАЗРАБОТКА И ОПТИМИЗАЦИЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ПАТОГЕНОВ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Кузнецова В.С. (ИТМО), Шкоденко Л.А. (ИТМО)

Научный руководитель – младший научный сотрудник лаборатории ДНК-наносенсорной диагностики Рубель М.С. (ИТМО)

Введение. Основная проблема при лечении бактериальной пневмонии заключается в отсутствии быстрой диагностики патогена, вызывающего заболевание. При постановке диагноза «бактериальная пневмония» пациенту прежде всего назначается лечение в виде антибиотиков широкого спектра действия. Существенным риском в этом случае является возможность развития антибиотикорезистентности у возбудителей. Определение конкретного бактериального патогена производится только в случае госпитализации пациента и происходит посредством культурального исследования (высеивания образца на чашку Петри) или полимеразной цепной реакции (ПЦР). У этих видов диагностики есть несколько недостатков: для культурального исследования возбудители должны расти в лаборатории в течение трех-пяти дней, прежде чем их можно будет идентифицировать; постановка ПЦР требует наличия дорогостоящего прибора – термоциклера; также оба вида исследования предполагают наличие специально обученного персонала, который будет осуществлять анализы.

В последние годы для диагностики бактериальных патогенов все чаще используется изотермическая амплификация. Она позволяет быстро (в течение часа), без использования дорогостоящих приборов и персонала преамплифицировать генетический материал патогенов для его последующей детекции с сохранением специфичности и чувствительности сравнимой с ПЦР – «золотым стандартом» диагностики.

Основная часть. Целью данной работы является подбор оптимальных условий изотермической амплификации с праймерами со стволowymi петлями (SPA) для детекции бактериальных возбудителей пневмонии. В качестве объекта исследования были выбраны наиболее распространенные возбудители инфекций нижних дыхательных путей: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*.

Буфер для реакции SPA состоит из следующих компонентов: буфер для Bst-полимеразы (2.5 мкл), dNTP (1.25 мкл), ионы Mg^{2+} в составе $MgSO_4$ (4 – 10 мМ), Bst-полимераза (0.5 мкл), вода (до 25 мкл). Также в реакционную смесь входили две пары праймеров, специфичных для конкретного патогена: прямой и обратный праймеры (F/R-праймеры) в количестве 0.4 – 0.8 мМ и прямой и обратный праймеры со стволовой петлей (FSL/RSL-праймеры) в количестве 0.1 мМ. FSL/RSL-праймеры были получены путем добавления петлевой структуры к последовательностям F/R-праймеров. Количество детектируемой ДНК – 1 нг. Оптимизация условий состояла в изменении количества F/R-праймеров и ионов Mg^{2+} в составе реакционной смеси. Амплификация проводилась в течение 30 минут при температуре 60°C. Результат амплификации оценивали по конечной точке при помощи электрофореза в 2% агарозном геле.

Выводы. Были получены варианты оптимального сочетания параметров реакции для шести патогенов. Планируется провести проверку повторяемости полученных результатов.

Работа выполняется в рамках проектов: РНФ "Разработка point-of-care диагностической системы на основе ДНК-наносенсоров для выявления инфекций респираторного тракта и их лекарственной устойчивости", государственного задания "Point-of-care диагностика на основе ДНК-наносенсорной технологии", приоритета 2030 "Разработка платформы полного цикла для Point-of-care диагностики на основе технологии ДНК-наносенсоров".

Список использованных источников:

1. Cilloniz, C., Martin-Loeches, I., Garcia-Vidal, C., San Jose, A. and Torres, A., 2016. Microbial etiology of pneumonia: epidemiology, diagnosis and resistance patterns. *International journal of molecular sciences*, 17(12), p.2120.
2. Ranzani, O.T., Senussi, T., Idone, F., Ceccato, A., Li Bassi, G., Ferrer, M. and Torres, A., 2019. Invasive and non-invasive diagnostic approaches for microbiological diagnosis of hospital-acquired pneumonia. *Critical Care*, 23, pp.1-11.
3. Luo, G., Yi, T., Wang, Q., Guo, B., Fang, L., Zhang, G. and Guo, X., 2021. Stem-loop-primer assisted isothermal amplification enabling high-specific and ultrasensitive nucleic acid detection. *Biosensors and Bioelectronics*, 184, p.113239.