

РАЗРАБОТКА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ DAMP ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ НИЖНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ

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

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

Введение. Инфекции нижних дыхательных путей (ИНДП) являются одними из самых распространенных заболеваний в мире. Основной сложностью при их лечении является отсутствие быстрой диагностики возбудителя заболевания, который может быть бактериальным, вирусным или грибковым. При выявлении ИНДП бактериальной природы по лабораторным показателям пациенту в первую очередь назначают антибиотики широкого спектра действия, что сопряжено с риском развития антибиотикорезистентности (Cilloniz, 2016). Определение конкретного патогена проводится только при госпитализации и осуществляется с помощью культурального исследования (посев образца на питательную среду) или полимеразной цепной реакции (ПЦР). Однако оба метода имеют недостатки: культуральный анализ требует 3–5 дней для роста микроорганизмов, а для ПЦР необходимо дорогостоящее оборудование — термоциклер и квалифицированный персонал.

В последнее время разрабатываются новые подходы, основанные на различных видах изотермической амплификации, которые позволяют быстро (в течение часа) увеличить количество генетического материала патогенов без необходимости использования дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала, при этом обеспечивая точность и чувствительность, сопоставимые с ПЦР — «золотым стандартом» диагностики (Soroka, 2021). Использование мультиплексных систем для одновременного обнаружения нескольких мишеней также экономит время и ресурсы и повышает точность диагностики, обеспечивая более полное понимание состояния пациента (Tan, 2021). Последнее особенно ценно в контексте ИНДП, где несколько патогенов могут коинфицировать пациента.

Основная часть. Целью данной работы является разработка мультиплексной тест-системы на основе изотермической амплификации с двойным праймированием (dual-priming isothermal amplification, DAMP) для диагностики бактериальных возбудителей ИНДП. В качестве объекта исследования были выбраны наиболее распространенные возбудители ИНДП: *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*.

Реакция DAMP проводилась с использованием трех пар праймеров, специфичных для каждого патогена: прямой и обратный внешние праймеры (FO/RO-праймеры), прямой и обратный внутренние праймеры (FI/RI-праймеры), прямой и обратный конкурирующие праймеры (FC/RC-праймеры). Амплификация проводилась в течение 60 минут при температуре 65°C, в коммерческом буфере для изотермической амплификации с Bst-полимеразой с вытесняющей активностью. Результат амплификации оценивали по конечной точке при помощи электрофореза в 2% агарозном геле. Перекрестная реактивность между патогенами проверялась путем смешивания набора праймеров для одного патогена с ДНК другого патогена в присутствии буфера, далее смесь выдерживали 60 минут при температуре 65°C. Предел детекции для каждого патогена определялся путем проведения реакции с разным количеством ДНК: 10^5 геномных эквивалентов (ГЭ), 10^4 ГЭ, 10^3 ГЭ, 10^2 ГЭ, 10 ГЭ, 1 ГЭ.

Выводы. Для каждого патогена были проведены реакции DAMP, при которых отсутствовали ложноположительные результаты, и определен предел детекции. Также было показано отсутствие кросс-реактивности между исследуемыми патогенами. Планируется разработать флуоресцентные пробы для мультиплексной реакции.

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. Soroka, M., Wasowicz, B. and Rymaszewska, A., 2021. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR?. *Cells*, 10(8), p.1931.
3. Tan, Y.L., Huang, A.Q., Tang, L.J. and Jiang, J.H., 2021. Multiplexed droplet loop-mediated isothermal amplification with scorpion-shaped probes and fluorescence microscopic counting for digital quantification of virus RNAs. *Chemical Science*, 12(24), pp.8445-8451.