

ДИАГНОСТИКА АЭРОМОНОЗА ЛОСОСЕВЫХ РЫБ МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ДВОЙНЫМ ПРАЙМИРОВАНИЕМ (DAMP)

Щекутьева Е.О.¹, Ворожцов Д. С.¹
Научный руководитель – канд. биол. наук Рубель М. С.¹,
мл. науч. сотр. Бобков Г. А.¹
¹Университет ИТМО
eoshchekuteva@itmo.ru

Работа выполнена в рамках темы НИР № 325005 «Разработка тест-системы для диагностики основных бактериальных возбудителей лососевых рыб».

Введение

В первой половине 2020-х годов объем продукции аквакультуры впервые превысил объемы промыслового вылова и составил более половины общего производства водных биоресурсов [1]. На фоне глобальной тенденции особенно интенсивно развивается сектор выращивания лососевых рыб. В Российской Федерации за последнее десятилетие объемы товарной продукции увеличились более чем в два раза. Однако развитие производства сопровождается повышением эпизоотических рисков, что проявляется в периодических вспышках инфекционных заболеваний на рыбоводных предприятиях.

Бактериальные инфекции остаются одной из ведущих причин экономических потерь в лососеводстве. Высокая плотность посадки, активное перемещение посадочного материала и формирование устойчивых микробных сообществ в элементах инфраструктуры производств способствуют циркуляции патогенов. В условиях строгого регулирования применения антибиотиков в пищевой продукции особую значимость приобретает своевременный мониторинг бактериальных возбудителей, позволяющий предотвращать развитие инфекций и минимизировать необходимость антимикробной терапии.

Существующие методы диагностики основаны на бактериологическом культивировании и полимеразной цепной реакции, однако они не подходят для быстрой диагностики на месте получения образца. В связи с этим актуальной задачей является разработка быстрых и специфичных методов выявления возбудителей, пригодных для применения вне специализированных лабораторий. Одним из перспективных решений является изотермическая амплификация с двойным праймированием (DAMP – от англ. «dual-priming amplification»), обеспечивающая высокую специфичность при снижении риска ложноположительных результатов относительно других методов амплификации, доступных в полевых условиях [2].

Основная часть

В рамках настоящего исследования была разработана тест-система для диагностики аэромоназа, вызванной патогенной бактерией *Aeromonas hydrophila*. В качестве мишени было выбрано два генетических локуса: ген, кодирующий 16S рРНК, и ген, кодирующий гемолитический токсин аэролизин (*aerA*). Ген 16S рРНК является универсальным и высококонсервативным таксономическим маркером, применяемым для обнаружения и идентификации бактерий. Гемолитический токсин аэролизин специфичен для вирулентных штаммов *A. hydrophila*. Сочетание двух регионов для детекции позволяет обнаруживать патоген при малых концентрациях клеток и точнее определять вирулентную форму патогена.

Амплификация проводилась при постоянной температуре 60°C (16S рПНК) и 63°C (*aerA*) в течение 45 минут с использованием наборов праймеров, включающего внешние, внутренние и конкурентные праймеры, характерные для DAMP. Для разработанной системы был определен лимит детекции (LOD) ДНК *A. hydrophila*. Ложноположительные сигналы в отрицательных контролях отсутствовали. Дополнительно разработанные праймеры были апробированы на производственных образцах, отобранных на рыбноводном предприятии, что подтвердило работоспособность метода в условиях реального хозяйства.

Выводы

Разработана тест-система на основе изотермической амплификации DAMP для выявления одного из возбудителей аэромоноза лососевых рыб *A. hydrophila*. Метод продемонстрировал чувствительность в диапазоне от 250 до 1000 геномных копий и отсутствие ложноположительных реакций. Апробация на производственных образцах подтвердила применимость тест-системы для анализа реального биоматериала. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности внедрения разработанной тест-системы в практику мониторинга инфекционных бактериальных заболеваний на рыбноводных хозяйствах в качестве инструмента оперативного выявления аэромоноза.

Литература

1. Sharma R. et al. Review of the state of world marine fishery resources–2025. – Food & Agriculture Org., 2025.
2. Ding X. et al. Dual-priming isothermal amplification (DAMP) for highly sensitive and specific molecular detection with ultralow nonspecific signals //Analytical chemistry. – 2019. – Т. 91. – №. 20. – С. 12852-12858.