

## Оптимизация изотермической амплификации SPA для детекции возбудителей инфекций нижних дыхательных путей

Научный руководитель – Рубель Мария Сергеевна

Кузнецова В.С.<sup>1</sup>, Шкоденко Л.А.<sup>2</sup>

1 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Saint Petersburg, Россия, E-mail: nikkuznets14@gmail.com; 2 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Saint Petersburg, Россия, E-mail: shkodenko@scamt-itmo.ru

Инфекции нижних дыхательных путей являются ведущей причиной смертности от инфекционных заболеваний в мире [1]. Эти заболевания вызываются бактериальными или вирусными патогенами, но в подавляющем большинстве случаев конкретный возбудитель не выявляется, а лечение производится посредством антибиотиков широко спектра действия. Необоснованное использование антибиотиков влечет за собой развитие антибиотикорезистентности у патогенных бактерий. В настоящее время диагностика возбудителей инфекций нижних дыхательных путей осуществляется с помощью культурального исследования либо полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для проведения этих анализов требуется длительное время (3-5 дней в случае культурального посева), дорогостоящее оборудование (термоциклер для ПЦР) и специально обученный персонал. Таким образом, актуальной задачей является создание высокочувствительного диагностического подхода, позволяющего за короткий срок и с наименьшими затратами установить этиологию заболевания.

Одним из возможных решений этой задачи является использование изотермической амплификации, которая позволяет быстро (в течение одного часа) и без использования дорогостоящего оборудования наработать количество ДНК патогена, достаточное для детекции. При этом чувствительность и специфичность такого метода сохраняется на уровне микробиологического анализа и ПЦР или даже превосходит их.

Целью данной работы являлась оптимизация изотермической реакции с праймерами со столовыми петлями (SPA) [2] для выявления наиболее часто встречающихся возбудителей инфекций нижних дыхательных путей.

В качестве объекта детекции были выбраны шесть патогенов: *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Haemophilus influenzae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria meningitidis*, *Klebsiella pneumoniae*. Изотермическая амплификация SPA проводилась с использованием двух пар праймеров, специфичных для каждого патогена: прямой и обратный праймеры (F и R), прямой и обратный праймеры со стволовой петлей (FSL и RSL). Оптимизация SPA заключалась в изменении количества праймеров F и R (0.4 – 0.8 мМ), а также ионов  $Mg^{2+}$  (4 – 10 мМ) в реакционной смеси. В состав реакционной смеси также входил буфер для Bst-полимеразы (2.5 мкл), dNTP (1.25 мкл), Bst-полимераза (0.5 мкл), праймеры FSL и RSL (0.1 мМ), вода (до 25 мкл). Амплификация проводилась в течение 30 минут при температуре 60°C. Результат амплификации оценивали по конечной точке посредством электрофореза в 2% агарозном геле.

Были подобраны оптимальные сочетания параметров реакции для каждого патогена, при которых отсутствовали ложноположительные результаты. Планируется проверить отсутствие перекрестной активности при детекции данных шести возбудителей, использовать методы визуальной детекции для определения продуктов SPA. Также дальнейшие планы включают определение антибиотикорезистентности возбудителей с помощью SPA. 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".

#### **Источники и литература**

- 1) Feldman C. and Shaddock E. Epidemiology of lower respiratory tract infections in adult // Expert Review of Respiratory Medicine. 2019. № 13. P.63-77.
- 2) Luo G., Yi T., Wang Q., Guo B., Fang L., Zhang G. and Guo X. Stem-loop-primer assisted isothermal amplification enabling high-specific and ultrasensitive nucleic acid detection // Biosensors and Bioelectronics. 2021. №184. P.113239.