

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-153

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ИЗОТЕРМИЧЕСКИХ АМПЛИФИКАЦИЙ С ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИЕЙ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ ЛОСОСЕВЫХ РЫБ***COMPARATIVE ANALYSIS OF ISOTHERMAL AMPLIFICATION AND POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DETECTION OF PATHOGENIC BACTERIA IN SALMONID FISH**Е. О. Щекутьева¹, Г. А. Бобков^{1,2}¹ Университет ИТМО, Санкт-Петербург² Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, МоскваE. O. Shchekuteva¹, G. A. Bobkov^{1,2}¹ ITMO University, Saint Petersburg² N. I. Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow

✉ eoshchekuteva@gmail.com

Аннотация

Рост аквакультуры сопровождается увеличением эпизоотических рисков, особенно бактериальных инфекций, вызываемых *Aeromonas spp.* и *Pseudomonas spp.* В работе проведен сравнительный анализ ПЦР, LAMP и DAMP. DAMP показал высокую чувствительность (1–10 копий) без ложноположительных результатов. Метод перспективен для портативных тестов и дальнейшей адаптации к новым мишеням.

Abstract

The growth of aquaculture is accompanied by increasing epizootic risks, particularly bacterial infections caused by *Aeromonas spp.* and *Pseudomonas spp.* This study presents a comparative analysis of PCR, LAMP, and DAMP. DAMP demonstrated high sensitivity (1–10 copies) with no false-positive results. The method is promising for portable tests and further adaptation to new targets.

По данным отчета FAO (2024), в 2022 г. мировое производство продукции аквакультуры достигло 223,2 млн т, что отражает устойчивый рост сектора на 4,4 % по сравнению с 2020 г. [1]. Однако быстрый рост сопряжен с эпизоотическими рисками: высокая плотность посадки рыбы в садках и недостаточный ветеринарный контроль способствуют распространению инфекций [2]. Бактериальные инфекции, вызываемые *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Flavobacterium spp.*, представляют одну из ключевых угроз для рыбных производств, занимающихся разведением лососевых рыб.

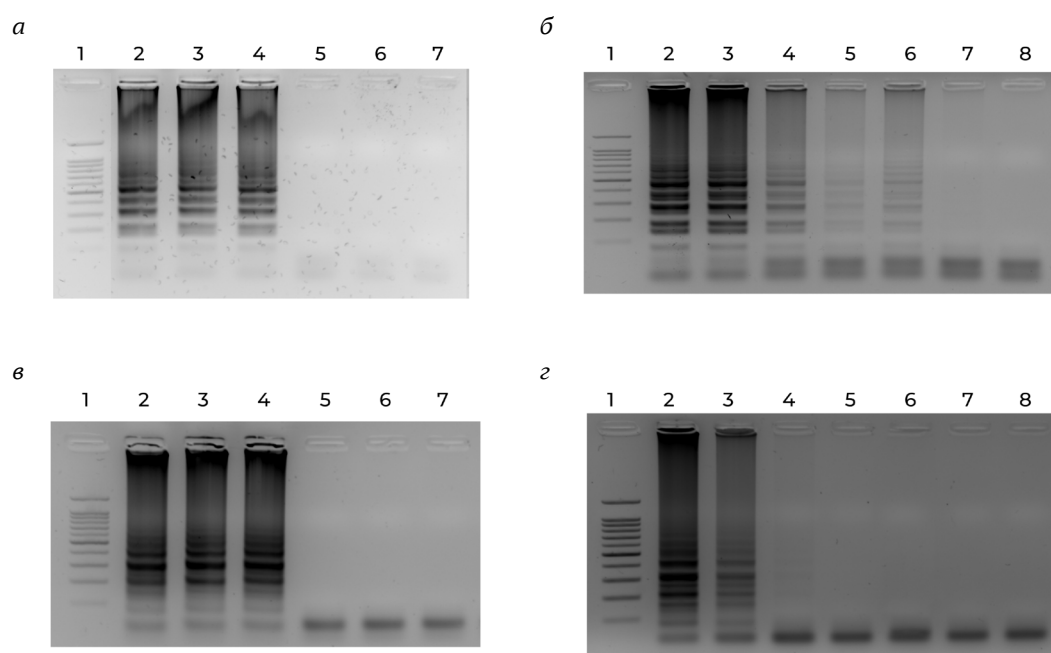
Эффективная диагностика патогенов — необходимый элемент профилактики и контроля вспышек заболеваний. Несмотря на то что полимеразная цепная реакция (ПЦР) остается золотым стандартом молекулярной диагностики, ее практическое применение ограничено высокой стоимостью оборудования, необходимостью температурных циклов и уровнем подготовки персонала. В связи с этим возрастающий интерес вызывают изотермические методы амплификации, способные функционировать при постоянной температуре и в упрощенных условиях.

Целью данного исследования стало сравнение характеристик методов ПЦР, петлевой изотермической амплификации (LAMP) [3] и ее модификации — изотермической амплификацией с двойным праймированием (DAMP) [4], по следующим параметрам: предел обнаружения (LOD), специфичность, вероятность ложноположительных результатов, длительность реакции и применимость в условиях ограниченной лабораторной инфраструктуры. В качестве мишени был выбран ген 16S рРНК бактерий *Aeromonas hydrophila* и *Pseudomonas fluorescens*.

Результаты исследования показали, что изотермические методы амплификации могут использоваться для диагностики патогенов лососевых рыб, предлагая более простую и доступную альтернативу ПЦР. Метод LAMP обеспечивал быстрое выявление и высокую чувствительность наравне с DAMP, но часто сопровождался неспецифической амплификацией даже после оптимизации реакции. Метод DAMP продемонстрировал улучшенный результат за счет модификации праймеров и отсутствия ложноположительных сигналов. Предел обнаружения при использовании метода DAMP для гена 16S рРНК бактерии *Pseudomonas fluorescens* составил 1–10 копий, для *Aeromonas hydrophila* — 100–1000 копий на 25 мкл реакции при 60 °С и временем до 45 мин (см. рисунок).

* Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 25-26-00247).

© Е. О. Щекутьева, Г. А. Бобков, 2025



Изотермическая амплификация с двойным праймированием (DAMP) гена 16S рРНК *P. fluorescens* (а, б) и *A. hydrophila* (в, г); а, в — изотермическая амплификация: 1 — ДНК-лестница, 2–4 — результат амплификации, 5–7 — отрицательный контроль; б, г — лимит детекции (LOD): 1 — ДНК-лестница, 2–7 — ДНК-матрица в количестве 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10 и 1 геномная копия соответственно, 8 — отрицательный контроль

Направление дальнейших исследований включает в себя оптимизацию существующих протоколов для новых мишеней, сравнительный анализ эффективности DAMP с другими изотермическими подходами (NASBA, SDA), а также разработку компактных детекционных систем, пригодных для применения вне лабораторной среды и обеспечивающих визуальное считывание результатов.

Литература

1. Ahmed I., Ishtiyag S., Sayed S. F. An overview on understanding the major bacterial fish diseases in freshwater salmonids // *Frontiers in Aquaculture*. 2025. Vol. 4. P. 1515831.
2. Singh G. G., Sajid Z., Mather C. Quantitative analysis of mass mortality events in salmon aquaculture shows increasing scale of fish loss events around the world // *Scientific Reports*. 2024. Vol. 14, No. 1. P. 3763.
3. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic acids research*. 2000. Vol. 28, No. 12. P. e63.
4. Ding X. et al. Dual-priming isothermal amplification (DAMP) for highly sensitive and specific molecular detection with ultralow nonspecific signals // *Analytical chemistry*. 2019. Vol. 91, No. 20. P. 12852–12858.