

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-Петербург

² Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова РАН, Москва

Е. О. Shchekuteva¹, G.A. Bobkov^{1,2}

¹ ITMO University, Saint Petersburg

² 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 мишениям.

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 соединен 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.

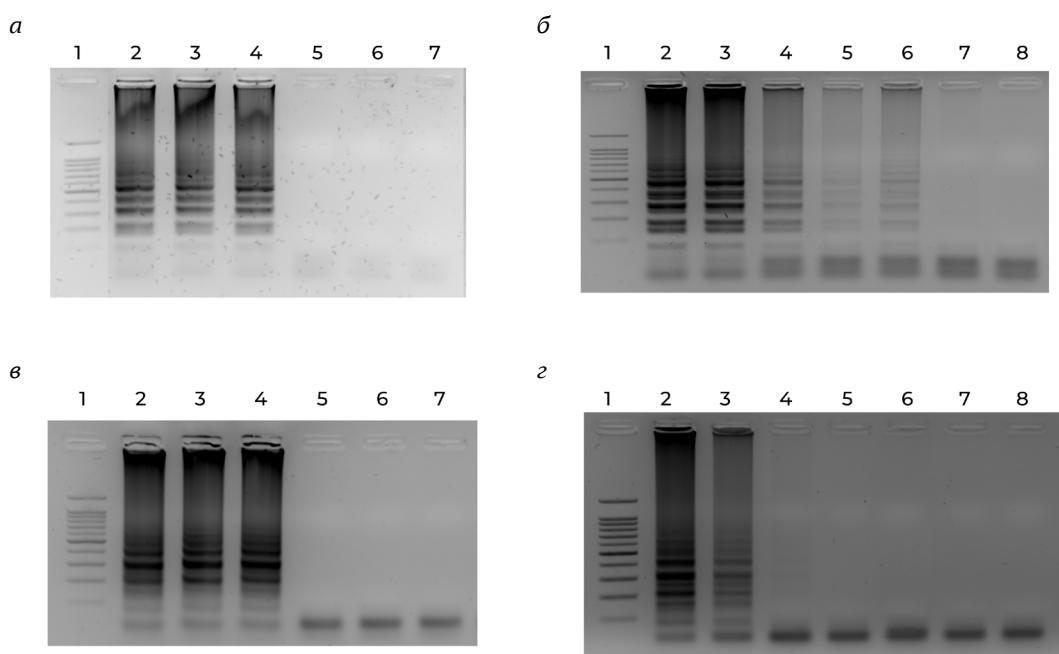
Эффективная диагностика патогенов — необходимый элемент профилактики и контроля вспышек заболеваний. Несмотря на то что полимеразная цепная реакция (ПЦР) остается золотым стандартом молекулярной диагностики, ее практическое применение ограничено высокой стоимостью оборудования, необходимостью температурных 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 °C 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 pPHK *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 мишений, 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., Ishtiyaq 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-primer isothermal amplification (DAMP) for highly sensitive and specific molecular detection with ultrasensitive nonspecific signals // Analytical chemistry. 2019. Vol. 91, No. 20. P. 12852–12858.