

УДК 57.083.18;57.087.23;57.088.3

РЕКОМБИНАЗНАЯ ПОЛИМЕРАЗНАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДЛЯ БЫСТРОГО ВЫЯВЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ БАКТЕРИАЛЬНОЙ ПНЕВМОНИИ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. С. А. Лапа^а, *, С. А. Суржигов^а, С. А. Благодатских^б, В. Е. Шершов^а, А. В. Чудинов^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

^бГосударственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии,
Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

*e-mail: lapa@biochip.ru

Поступила в редакцию 02.11.2022 г.

После доработки 19.11.2022 г.

Принята к публикации 20.11.2022 г.

Разработана диагностическая система, основанная на рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA), для выявления шести бактериальных возбудителей пневмонии человека. Сконструированы и оптимизированы видоспецифичные праймеры для проведения мультиплексной реакции в одном общем объеме. Используются меченые праймеры для надежной дискриминации близких по размеру продуктов амплификации. Идентификацию возбудителя проводят путем визуального анализа электрофореграммы. Аналитическая чувствительность разработанной мультиплексной RPA составила 10^2 – 10^3 копий ДНК. Специфичность метода определяли по отсутствию перекрестной амплификации исследованных образцов ДНК возбудителей пневмонии для каждой пары праймеров, а также для ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37_{rv}. Для исследованных образцов этот показатель составил 100%. Время выполнения анализа — менее часа, включая электрофоретический контроль реакции. Тест-система может найти применение в профильных клинических лабораториях для экспресс-анализа образцов от пациентов с подозрением на пневмонию.

Ключевые слова: рекомбиназная полимеразная амплификация, RPA, бактериальная пневмония

DOI: 10.31857/S0026898423030072, **EDN:** CHGYQF

Инфекционная пневмония относится к социально значимым заболеваниям и представляет собой воспаление респираторных отделов легких. Внебольничная пневмония бактериальной природы встречается гораздо чаще грибковой, паразитарной, аллергической, ожоговой и лучевой, однако часто сочетается с вирусной инфекцией [1, 2]. Ежегодно бактериальной пневмонией болеет около 1000 человек на 100 тыс. населения (данные сильно варьируют для различных возрастных категорий [3, 4]). Бактериальная пневмония характеризуется этиологической неоднородностью и вызывается широким спектром грамположительных и грамотрицательных бактерий. В этой связи крайне важно своевременное выявление возбудителя, поскольку стратегия лечения для различных патогенных бактерий может отличаться [5].

Современная клиническая диагностика базируется на классических методах: зачастую просто на определении клинической картины заболевания [6], на данных радиологического исследова-

ния [7, 8] или культуральных методов [9], — что с учетом быстрой динамики развития патологии далеко не оптимально. В лучшем случае используют серологические тесты или ПЦР, которые в основном ориентированы на определение лишь одного вида возбудителя [10, 11].

Ранее нами разработан метод мультиплексной ПЦР в едином общем объеме для выявления наиболее значимых возбудителей пневмонии человека [12, 13]. В представленной статье описана разработка диагностической экспресс-системы, основанной на применении рекомбиназной полимеразной амплификации (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) в мультиплексном формате. Для этой реакции, проходящей в изотермическом режиме, характерна более высокая, по сравнению с ПЦР, скорость накопления продукта и повышенная чувствительность, а также для ее проведения не нужен термоциклер [14, 15]. Преимущества RPA в условиях все большего распространения и доступности реагентов, необходимых для выполнения анализа в профильных клинических

лабораториях, позволяют рассматривать этот метод как перспективную альтернативу широко используемым способам выявления возбудителей пневмонии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы. В работе использовали ДНК штаммов из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (“ГНЦ ПМБ”, п. Оболенск, Россия), в том числе клинические и природные изоляты. Перед выделением ДНК изоляты из природных источников, а также клинические образцы культивировали на селективных средах. ДНК из культур выделяли и деконтаминировали с использованием СТАВ-метода, как описано ранее [16, 17]. Работы с изолятами и живыми коллекционными культурами проводили на базе указанного учреждения.

Для контроля стерильности образцов ДНК, выделенных из микроорганизмов, делали высеив из полученных растворов ДНК на плотные питательные среды. В случае штаммов *Pseudomonas aeruginosa* и *Klebsiella pneumoniae* использовали среду № 1 ГРМ (“ГНЦ ПМБ”, Россия), культивирование проводили при 37°C в течение трех суток. В случае штаммов *Haemophilus influenzae* использовали среду ГБМ-АГАР с ростовой добавкой (“ГНЦ ПМБ”), в случае штаммов *Legionella pneumophila* — среду ЛЕГИОНЕЛБАКАГАР (“ГНЦ ПМБ”), в случае штаммов *Streptococcus pneumoniae* и *Staphylococcus aureus* — Blood Agar Base (“ГНЦ ПМБ”) с добавлением 5% крови барана. Инкубацию проводили при 37°C в CO₂-инкубаторе в присутствии 5% CO₂ в течение 3 суток. Через трое суток на питательных средах ни в одном случае роста не наблюдали.

Качество ДНК оценивали по электрофоретической подвижности в 1%-ном агарозном геле, концентрацию измеряли спектрофотометрически с использованием GeneQuant Pro RNA/DNA Calculator (“Amersham Pharmacia Biotech”, Великобритания).

Для контроля специфичности праймеров использовали деконтаминированную очищенную геномную ДНК *Mycobacterium tuberculosis* H37_{rv}.

Праймеры. Нуклеотидные последовательности геномных мишеней выравнивали с помощью алгоритма ClustalW (www.clustal.org). Праймеры для RPA (длиной от 35 до 40 н.) конструировали с использованием сетевого ресурса www.idtdna.com. Проводили тестирование на внутри- и межмолекулярные вторичные структуры. Специфичность анализировали с помощью алгоритма BLAST (NIN, США, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Праймеры конструировали для образования продуктов амплификации различной длины с учетом удобства их визуального контроля по электрофореграмме. Кроме того, с целью повышения надежности дискриминации на 5'-конец праймеров, специфичных к *H. influenzae*, *L. pneumophila* и *S. aureus*, вводили Cy5-метку [17].

Твердофазный синтез олигонуклеотидов проводили на автоматическом синтезаторе ABI 394 DNA/RNA (“Applied Biosystems”, США) по стандартному регламенту. Для очистки целевых продуктов использовали колонку BDS Hypersil C18 (“Thermo Fisher Scientific”, США).

Мультиплексная RPA. Реакционная смесь (50 мкл) содержала компоненты набора TwistAmp (“Twist-DX”, Великобритания) в рекомендуемых производителем концентрациях; раствор 6 пар праймеров, специфичных к бактериальным возбудителям пневмонии (из расчета 10 пмоль на реакцию каждого), а также 1 мкл очищенных полногеномных бактериальных ДНК в концентрации от 10¹ до 10⁶ копий/мкл. Раствор, содержащий 6 пар праймеров, перед внесением в общий реакционный объем прогревали в течение 5 мин при 95°C и сразу же помещали на лед. Реагенты набора, за исключением матрицы (образец ДНК) и ацетата магния, входили в общую смесь, которую после аккуратного перемешивания разливали по реакционным пробиркам объемом 200 мкл. На внутреннюю сторону каждой реакционной пробирки вносили ацетат магния и пробирку закрывали лишь перед окончательным перемешиванием и началом проведения реакции, образец ДНК вводили на верхнюю часть внутренней поверхности пробирки для предотвращения преждевременного контакта с компонентами смеси. Растворы “сбрасывали” коротким центрифугированием, аккуратно перемешивали шестикратным переворачиванием и еще раз “сбрасывали”, после чего немедленно помещали в термостат. Реакцию проводили в течение 20 мин при 40°C на лабораторном термостате для микропробирок TDB-120 (“Biosan”, Латвия). Реакцию останавливали либо внесением в реакционную смесь концентрированного буфера для электрофоретических образцов, либо прогреванием в течение 5 мин при 95°C.

Чувствительность RPA определяли с использованием панели разведений ДНК в интервале 10¹–10³ копий в реакционной смеси (50 мкл). Скорость накопления продукта оценивали при температурном режиме, описанном выше, с добавлением красителя EvaGreen (“Lumiprobe”, Россия) на амплификаторе iCycler iQ5 (“Bio-Rad”, США). Эксперименты выполняли в трех повторениях для каждого исследуемого образца и рассчитывали среднее значение. Качественный анализ

Таблица 1. RPA-праймеры

Бактерия	Праймер			Длина продукта ^b , п.н.
	название	нуклеотидная последовательность ^a , 5'→3'	длина, н.	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	oprL-f1	GTACAACATGGCTCTGGGCGAGCGTCGTGCCAAGG	35	150
	oprL-r1	TTCTGAGCCCAGGACTGCTCGTCGTGGCCGGTAGC	35	
<i>Haemophilus influenzae</i>	fucK-f1	TGCTAACGGTAATTGGGATCCATCGATTTTAGCCT	35	195
	fucK-r1	CC(A/T)GCACCAGACCCAAACACAGCAAATTGGGTATC	35	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	cpsB-f1	ATGTAGATGACGGTCCCAAGTCAAGAGAGGAAAGC	35	210
	cpsB-r1	ATCTCTGCGCCATAAGCAATGACTAAATCATCTGC	35	
<i>Legionella pneumophila</i>	sidA-f1	GCAGCGATCA(C/T)CCTCGGTGGATTGGCTGCCGCAAT	35	232
	sidA-r1	CATGTTGGAGTTCTATGGCACGAATTC(G/T)AATAAG	35	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	fimH-f1	GGTGTGCTGTCGAGTTTTTCAGGCACCGTGAAATATAACG	40	261
	fimH-r1	GTTGTTGGCGTAGATGTTCCAGATGAAGTGAAGGAGTCG	40	
<i>Staphylococcus aureus</i>	ebpS-f1	CCAAATATCGCTAATGCACCGATAATTAGTACAGC	35	280
	ebpS-r1	ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCTCAAGATAAGTCT	35	

^aВ скобках указаны вырожденные позиции, связанные с вариативностью данного участка генетической мишени у различных штаммов.

^bПолужирным шрифтом выделены значения длин продуктов, несущих флуоресцентную метку Cy5, — с целью лучшей дифференциации от продуктов близкой длины для других возбудителей (на фореграмме показано чередование продуктов “меченый—немеченый” — через один по увеличению длины).

наличия/отсутствия продукта амплификации проводили визуально по электрофореграмме.

Горизонтальный электрофорез для контроля продуктов RPA. Продукты RPA разделяли в 4%-ном агарозном геле Agarose LE (“Helicon”, Россия) в течение 20 мин при 10 В/см, для окрашивания использовали SYBR Green I (“Molecular Probes”, США). Визуализацию проводили с помощью трансиллюминатора TCP-20.MC 254/312 нм (“Vilber Lourmat”, Франция) при длине волны 260 нм, снабженного цифровым фотоаппаратом EOS 60D (“Canon”, Япония), — для получения цветного изображения; на системе гель-документирования ChemiScope 6200 Touch (“Clinx Science Instruments”, Китай) с помощью входящего в комплект УФ-трансиллюминатора — для общей детекции ДНК по окрашиванию SYBR Green I; а также с использованием встроенных LED-светодиодов и светофильтров “Red light excitation/emission”, соответствующих характеристикам флуоресцентного красителя Cy5, — для избирательной детекции продуктов удлинения меченых праймеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для создания системы мультиплексной RPA сконструировали набор из 6 пар видоспецифичных праймеров для социально значимых бактериальных возбудителей пневмонии: *Staphylococcus aureus*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*, *K. pneumoniae*, *H. influenzae* и *P. aeruginosa*. Для каждого бактериального возбудителя выбирали функционально значимые видоспецифичные участки генов. Ген

cpsB S. pneumoniae кодирует тирозинспецифичную протеинфосфатазу B; ген *ebpS Staphylococcus aureus* — эластинсвязывающий белок S; ген *fucK*, применяемый для видовой идентификации *H. influenzae*, относится к генам углеводного обмена; ген *oprL* кодирует пептидогликанассоциированный белок *P. aeruginosa*; для видовой идентификации *L. pneumophila* и *K. pneumoniae* использовали детерминанты вирулентности этих бактерий: *sidA* и *fimH* соответственно. Алгоритмы выбора генов и исследования по функциональной роли кодируемых ими белков подробно изложены в работе, посвященной разработке мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами [17].

Основные подходы к конструированию праймеров, специфичных к участкам геномов бактериальных возбудителей пневмонии, описаны ранее [18] с учетом того факта, что для RPA в большинстве случаев требуются праймеры большей длины (30–35 н.), чем для ПЦР (Инструкция TwistAmp, официальные рекомендации по дизайну праймеров: <https://www.twistdx.co.uk/wp-content/uploads/2021/04/twistamp-assay-design-manual-v2-5.pdf>). Однако в процессе оптимизации этой системы длину праймеров корректировали в сторону увеличения по сравнению с рекомендованной, а именно 35–40 н., что резко повысило воспроизводимость результатов в мультиплексном режиме работы системы.

Последовательности праймеров указаны в табл. 1 в порядке увеличения длин образующихся продуктов.

Таблица 2. Штаммы возбудителей бактериальной пневмонии человека, использованные в работе

Возбудитель	№	Штамм	Источник
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	B-4807	10662 NCTC/ATCC 25668	Клинический штамм
	B-7565	ATCC 17650	
	B-8361	DE 177	
<i>Haemophilus influenzae</i>	B-7400	ATCC 49247	Клинический штамм
	B-7399	ATCC 9006 тип А	
	B-9029	Хак-1	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	B-7756	ATCC 49619	
	B-7397	ATCC 6303	
	B-7398	ATCC 6305	
<i>Legionella pneumophila</i>	B-5978	ATCC 33152	Природный штамм Природный штамм
	B-7783	7	
	B-8538	ОО42	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	B-4811	9633 NCTC/ATCC 13883	Клинический штамм Клинический штамм
	B-7877	KPB-594	
	B-7878	KPB-1802	
<i>Staphylococcus aureus</i>	B-5931	ATCC 25923	Клинический штамм
	B-7471	ATCC 43300	
	B-8377	Оренбург_2014 №67	

В исследовании использовали образцы деконтаминированной геномной ДНК, указанные в табл. 2.

При разработке системы использовали как коллекционные штаммы, так и клинические и природные изоляты. Основные параметры системы (аналитическая чувствительность, специфичность, воспроизводимость) оценивали с помощью амплификации в реальном времени (в изотермическом режиме) для разных концентраций образцов, с последующим электрофоретическим контролем. Для представленной в табл. 2 выборки специфичность составила 100%; причем перекрестной амплификации не наблюдали. Кроме того, геномную ДНК штамма *M. tuberculosis* H37_{rv} использовали в качестве контроля на специфичность, так как клинические проявления туберкулеза легких сходны с таковыми при пневмонии. Чувствительность метода составила от 10^2 до 10^3 копий ДНК в реакционной смеси, что несколько превышает чувствительность методов, основанных на мультиплексной ПЦР (10^3 – 10^4); при этом время выполнения RPA-анализа составляет менее часа, что гораздо меньше, чем для ПЦР (1.5–3 ч).

На рис. 1 представлен результат выполнения мультиплексной RPA в одном общем объеме с результирующим набором праймеров и при оптимизированных условиях амплификации.

Из данных, представленных на рис. 1, видно, что визуальная дискриминация вида возбудителя в ряде случаев затруднительна, так как выбранный интервал длин продуктов амплификации при конструировании системы RPA был ограничен официальными рекомендациями производителя – “TwistDX”. Кроме того, теоретически при наличии в образце двух и более генетических мишеней возможна конкурентная амплификация в пользу продуктов меньшей длины.

Учитывая эти факторы, для надежной дискриминации видовой принадлежности патогенов мы предложили двухволновую детекцию флуоресценции. Комплекс двухцепочечной ДНК с SYBR Green I имеет максимум поглощения при длине волны 497 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 497$ нм) и максимумом излучения при 520 нм ($\lambda_{\text{em}} = 520$ нм). Окрашивание SYBR Green I применяли по завершении электрофореза для визуализации всех продуктов амплификации. Цианиновый краситель Cy5, ковалентно связанный с 5'-концом трех прямых праймеров (с возрастанием длин продуктов по схеме “через один”), применяли для избирательной визуализации продуктов меченых праймеров. Для этого красителя максимум поглощения соответствует длине волны 650 нм ($\lambda_{\text{ex}} = 650$ нм), а максимум излучения – 670 нм ($\lambda_{\text{em}} = 670$ нм). Такая двухволновая схема детекции не приводит к перекрестному

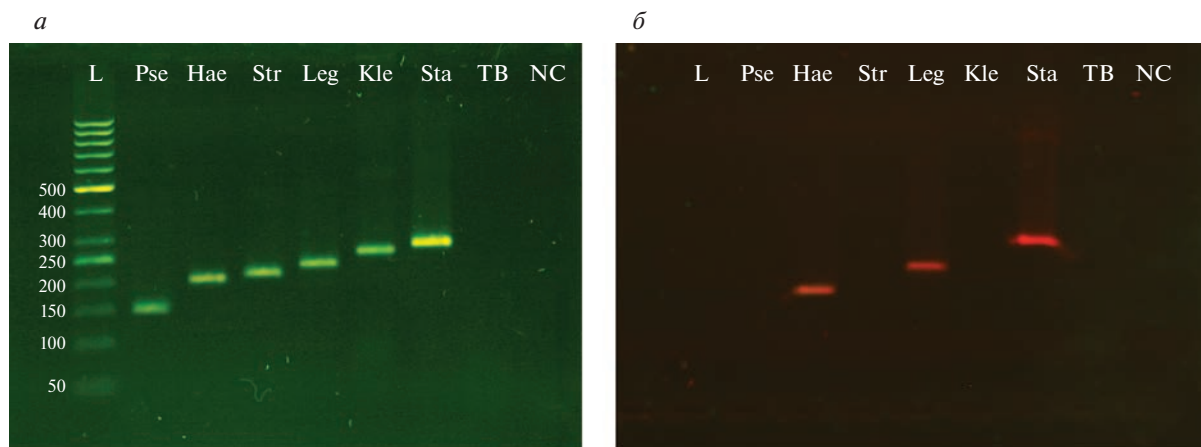


Рис. 1. Визуальная идентификация возбудителя пневмонии на электрофореграмме. *а* — Неизбирательная детекция ДНК с помощью красителя SYBR Green I; *б* — избирательная идентификация продуктов удлинения праймеров, содержащих цианиновый краситель Cy5. Окрашивание праймеров, специфичных к *H. influenzae*, *L. pneumophila* и *Staphylococcus aureus*, позволяет надежно дискриминировать соответствующие продукты амплификации от не несущих флуоресцентную метку: *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*, *K. pneumoniae*. Обозначения: L — маркер длин ДНК Ladder GeneRuler 50 bp (“Thermo Fisher Scientific”), Pse — *P. aeruginosa*, Hae — *H. influenzae*, Str — *S. pneumoniae*, Leg — *L. pneumophila*, Kle — *K. pneumoniae*, Sta — *Staphylococcus aureus*, TB — *M. tuberculosis* (контроль специфичности праймеров), NC — отрицательный контроль. Цифрами слева обозначена длина двухцепочечных ДНК (от 50 до 500 п.н.).

возбуждению флуорофоров и удобна для раздельной визуализации. Продукты амплификации, полученные с Cy5-мечеными праймерами, отличаются по цвету даже при использовании УФ-трансиллюминатора с применением оптического фильтра SYBR photographic filter S7569 (“Molecular Probes”, США), но для надежности интерпретации результатов мы использовали систему геледокументирования со специализированными источниками возбуждения и светофильтрами для каждого из красителей.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Рекомбиназная полимеразная амплификация обладает рядом преимуществ по сравнению с ПЦР: отсутствие необходимости в применении амплификатора (изотермические условия реакции), высокая скорость накопления продуктов и, в большинстве случаев, более высокая, по сравнению с ПЦР, чувствительность метода [15].

Потенциально технология RPA способна занять нишу ПЦР и других молекулярно-биологических методов, применяемых в профильных клинических лабораториях. Этот метод особенно востребован для экспресс-анализа инфекционных заболеваний с быстрой динамикой развития, когда требуется как можно быстрее получить результат и сформировать стратегию лечения пациента.

Разработка предлагаемой системы мультиплексного анализа, основанной на RPA, позволила сократить время анализа в два–три раза по сравнению с классической ПЦР. Как и в случае

мультиплексной ПЦР, предлагаемая система может быть расширена для анализа более широкого спектра патогенов. Как и в случае большинства диагностических систем, при использовании RPA возникают проблемы, которые обусловлены различиями в природе тестируемых образцов, присутствием ингибиторов, загрязнений и микроорганизмов-спутников. Присутствие в исследуемом образце нецелевых нуклеиновых кислот затрудняет анализ и интерпретацию результатов. Для преодоления этой проблемы необходим более внимательный подход к дизайну видоспецифичных праймеров.

Для разработанной системы мультиплексного анализа, основанной на методе RPA, показана высокая специфичность и чувствительность, для проведения анализа не требуется специализированное оборудование (используется изотермическая амплификация). Однако для корректной интерпретации результатов необходимо использовать двухволновую систему геле-документирования. Упрощению аппаратной части системы анализа может способствовать увеличение флуоресценции с избирательно окрашенных праймеров. Тогда сигнал красителя будет хорошо регистрироваться визуально. Это позволило бы использовать стандартный трансиллюминатор вместо двухволновой системы анализа. Достичь этого путем встраивания меченых дезоксиуридинтрифосфатов при настоящем дизайне системы невозможно, так как это приведет к неизбирательному окрашиванию продуктов амплификации. Возможна ковалентная пришивка нескольких молекул флуорофора в

один праймер, но при таком подходе возрастает размер и стерический эффект таких структур. Это может негативно влиять на ферментативную доступность комплексов праймер–целевая ДНК. Кроме того, возможны эффекты электронного переноса (EET, RET) и тушение флуорофора, что необходимо проверить экспериментально. Следует отметить, что дальнейшая оптимизация системы возможна при подборе подходящего индивидуального красителя для введения метки в праймеры. Это позволит проводить интерпретацию результатов с применением стандартного трансиллюминатора и упростить систему детекции сигнала флуоресцентных меток.

В результате проведенного исследования сконструированы высокоспецифичные RPA-праймеры для одновременной идентификации шести видов бактерий — возбудителей пневмонии человека. Разработан метод ускоренного дифференциального анализа бактериальных патогенов (время анализа, включая электрофоретическое разделение продуктов, — менее 1 ч). Мы стремились к упрощению как дизайна, так и эксплуатации разработанного подхода. Система ориентирована на применение в клинических лабораториях для ускоренного массового тестирования образцов с целью своевременного выбора или коррекции стратегии лечения пациентов.

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда (№ 22-14-00257).

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Campigotto A., Mubareka S. (2015) Influenza-associated bacterial pneumonia; managing and controlling infection on two fronts. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **13**, 55–68.
2. Noskin G.A., Glassroth J. (1996) Bacterial pneumonia associated with HIV-1 infection. *Clin. Chest. Med.* **17**, 713–723.
3. Henig O., Kaye K.S. (2017) Bacterial pneumonia in older adults. *Infect. Dis. Clin. North. Am.* **31**, 689–713.
4. Eshwara V.K., Mukhopadhyay C., Rello J. (2020) Community-acquired bacterial pneumonia in adults: an update. *Indian. J. Med. Res.* **151**, 287–302.
5. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. (2011) British thoracic society standards of care committee. British thoracic society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax*. **66** (Suppl. 2), ii1–ii23.
6. Cunha B.A. (2006) The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clin. Microbiol. Infect.* **12**(Suppl. 3), 12–24.
7. Azoulay E., Russell L., Van de Louw A., Metaxa V., Bauer P., Pova P., Montero J.G., Loeches I.M., Meh-ta S., Puxty K., Schellongowski P., Rello J., Mokart D., Lemiale V., Mirouse A. (2020) Diagnosis of severe respiratory infections in immunocompromised patients. *Intensive Care Med.* **46**, 298–314.
8. Mabie M., Wunderink R.G. (2003) Use and limitations of clinical and radiologic diagnosis of pneumonia. *Semin. Respir. Infect.* **18**, 72–79.
9. Budayanti N.S., Suryawan K., Iswari I.S., Sukrama D.M. (2019) The quality of sputum specimens as a predictor of isolated bacteria from patients with lower respiratory tract infections at a tertiary referral hospital, Denpasar, Bali-Indonesia. *Front. Med. (Lausanne)*. **6**, 64.
10. Lee N., Rainer T.H., Ip M., Zee B., Ng M.H., Antonio G.E., Chan E., Lui G., Cockram C.S., Sung J.J., Hui D.S. (2006) Role of laboratory variables in differentiating SARS-coronavirus from other causes of community-acquired pneumonia within the first 72 h of hospitalization. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**, 765–772.
11. Dorigo-Zetsma J.W., Zaaij S.A., Wertheim-van Dillen P.M., Spanjaard L., Rijntjes J., van Waveren G., Jensen J.S., Angulo A.F., Dankert J. (1999) Comparison of PCR, culture, and serological tests for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infection in children. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 14–17.
12. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Золотов А.М., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2020) Мультиплексная ПЦР для выявления бактериальных возбудителей инфекционной пневмонии. *Биоорг. химия*. **46**, 550–552.
13. Лапа С.А., Клочихина Е.С., Мифтахов Р.А., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Development of multi-primer PCR system with an open architecture for rapid detection of infectious pneumonia causative agents. *AIP Conf. Proc.* **2388**, 030018.
14. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. (2006) DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* **4**, e204.
15. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. (2018) Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. *Trends Analyt. Chem.* **98**, 19–35.
16. Wilson K. (2001) Preparation of genomic DNA from bacteria. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **56**, 2.4.1–2.4.5.
17. Лапа С.А., Мифтахов Р.А., Клочихина Е.С., Ам-мур Ю.И., Благодатских С.А., Шершов В.Е., Заседателев А.С., Чудинов А.В. (2021) Разработка мультиплексной ОТ-ПЦР с иммобилизованными праймерами для идентификации возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Молекуляр. биология*. **55**, 944–955.
18. Клочихина Е.С., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Лапа С.А., Чудинов А.В. (2021) Особенности оптимизации мультипраймерной ПЦР для выявления возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Тонкие хим. технологии*. **16**, 225–231.

Recombinase Polymerase Amplification for Rapid Detection of Human Bacterial Pneumonia Pathogens

S. A. Lapa^{1, *}, S. A. Surzhikov¹, S. A. Blagodatskikh², V. E. Shershov¹, and A. V. Chudinov¹

¹*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia*

²*Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Moscow Region, 142279 Russia*

**e-mail: lapa@biochip.ru*

A diagnostic system based on recombinase polymerase amplification (RPA) has been developed to identify six bacterial pathogens of human pneumonia. Species-specific primers have been designed and optimized to conduct a multiplex reaction in one common volume. Labeled primers were used for reliable discrimination of amplification products close in size. Identification of the pathogen was carried out by visual analysis of the electrophoregram. The analytical sensitivity of the developed multiplex RPA was 10^2 – 10^3 copies of DNA. The specificity of the system was determined by the absence of cross-amplification of the studied DNA samples of pneumonia pathogens for each pair of primers, as well as for the DNA of *Mycobacterium tuberculosis* H37_{rv}, and amounted to 100%. The analysis execution time is less than an 1 h, including electrophoretic reaction control. The test system can be used in specialized clinical laboratories for rapid analysis of samples from patients with suspected pneumonia.

Keywords: recombinase polymerase amplification, RPA, bacterial pneumonia