

Потенциал повышения чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот

С.Г.Игнатов, А.Г.Волошин, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, Оболensk, Московская область, Российская Федерация

В настоящее время микроскопия, иммуноанализ и молекулярная диагностика внесли огромный вклад в идентификацию возбудителей инфекционных заболеваний. Стандартный микробиологический подход, связанный с высевом образцов на питательные среды, является одним из лучших методов обнаружения патогенов. Однако сложная и трудоемкая процедура требует квалифицированных специалистов и длительна по времени выполнения. Как правило, для обнаружения возбудителей широко используются методы полимеразной цепной реакции (ПЦР) и иммуноферментного анализа (ИФА). Однако для ПЦР требуется дорогостоящее аналитическое оборудование и дополнительная стадия очистки, а ИФА сталкивается с серьезными проблемами из-за дорогих антител, большего времени обнаружения и низкой чувствительности. Поэтому для повышения чувствительности предлагается использовать комбинацию нескольких подходов. Данный обзор посвящен сочетанию магнитофоретической хроматографии с изотермической амплификацией нуклеиновых кислот.

Ключевые слова: определение патогенов, магнитофоретическая хроматография, изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Для цитирования: Игнатов С.Г., Волошин А.Г., Бикетов С.Ф. Потенциал повышения чувствительности определения патогенов при сочетании магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот. Бактериология. 2022; 7(4): 74–78. DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-74-78

Sensitivity potential for pathogen detection by combining magnetophoretic chromatography and isothermal nucleic acid amplification

S.G.Ignatov, A.G.Voloshin, S.F.Biketov

State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор, Obolensk, Moscow Region, Russian Federation

Immunoanalysis and molecular diagnostics have made a huge contribution to the identification of pathogens of infectious diseases at present, microscopy. The standard microbiological approach, involving inoculation of biological samples on culture media, is one of the best methods for pathogen detection. However, a complex and time-consuming procedure requires qualified specialists and a long time. As a rule, polymerase chain reaction (PCR) and enzyme immunoassay (ELISA) methods are widely used to detect pathogens. However, PCR requires expensive analytical equipment and an additional purification step, and ELISA has serious problems due to expensive antibodies, longer detection times, and low sensitivity. Therefore, to increase sensitivity, it is proposed to use a combination of several approaches. This review is devoted to the combination of magnetophoretic chromatography and isothermal amplification of nucleic acids.

Key words: detection of pathogens, magnetophoretic chromatography, isothermal amplification of nucleic acids

For citation: Ignatov S.G., Voloshin A.G., Biketov S.F. Sensitivity potential for pathogen detection by combining magnetophoretic chromatography and isothermal nucleic acid amplification. Bacteriology. 2022; 7(4): 74–78. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2022-4-74-78

Для корреспонденции:

Игнатов Сергей Георгиевич, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 360-773
E-mail: ignatov@obolensk.org

Статья поступила 09.11.2022 г., принята к печати 28.12.2022 г.

For correspondence:

Sergey G. Ignatov, PhD, DSc (Biological Sciences), Chief Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Address: 24 «Quarter A» Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow Region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 360-773
E-mail: ignatov@obolensk.org

The article was received 09.11.2022, accepted for publication 28.12.2022

Быстрое и чувствительное обнаружение патогенных бактерий в различных образцах важно для предотвращения бактериальных заболеваний. При практическом применении методов идентификации микроорганизмов нужно учитывать, что большинство целевых патогенов находятся в сложных матрицах с примесями и, следовательно, необходима предварительная обработка исследуемого материала. Среди различных методов предварительной очистки, привлекает внимание предварительная обработка на основе магнитных наночастиц (МНЧ) оксида железа благодаря их уникальным свойствам, таким как высокая магнитная восприимчивость, суперпарамагнетизм и биосовместимость. После захвата бактерий-мишеней с помощью МНЧ, функционализированных распознающими молекулами, комплексы бактерии–МНЧ могут быть легко разделены и обогащены с помощью приложения внешнего магнитного поля. Рассмотрим последние достижения в области предварительной магнитной обработки патогенных бактерий.

Магнитофоретическая хроматография

Хотя многочисленные методы, разработанные на сегодняшний день, чувствительны и требуют лишь небольшого объема пробы, они не подходят для обнаружения патогенных бактерий в больших пробах с большим количеством биологического материала и жидкостей. При наличии небольшого количества возбудителя проведенный анализ может давать ложноотрицательный сигнал, если для обнаружения используется небольшой объем образца. Кроме того, наличие различных примесей в образцах может мешать обнаружению и снижать чувствительность. Чтобы преодолеть эти ограничения, требуется процесс предварительной обработки, который отделяет и концентрирует целевые бактерии. Фильтрация и центрифугирование являются традиционными методами предварительной обработки бактериальных растворов [1]. Эти методы широко используются во многих областях, потому что они просты, быстры и недороги. Однако фильтрация и центрифугирование включают несколько этапов концентрации и промывки целевых бактерий, что приводит к повреждению бактерий и потере образца. Кроме того, эти методы трудно интегрировать с методами обнаружения, что ограничивает автоматизацию всего процесса и производство портативных устройств. Из-за этих ограничений методы предварительной обработки на основе МНЧ привлекли значительное внимание как многообещающая альтернатива.

Магнитная сепарация в основном использует МНЧ оксида железа (Fe_3O_4) для разделения и обогащения мишеней благодаря их уникальным свойствам, включая высокую магнитную восприимчивость, суперпарамагнетизм и биосовместимость [2, 3]. При суперпарамагнетизме МНЧ можно разделить с помощью внешнего магнитного поля и повторно диспергировать без агрегации частиц [1, 4]. МНЧ можно легко функционализировать с помощью обработки поверхности, такой как реакция гидрохлорида карбодиимиды/N-гидроксисукцинимиды и обработка силаном [5, 6]. Затем на обработанных поверхностях закрепляют распознающие молекулы, такие как полимеры, аптамеры и антитела [7–11]. Когда МНЧ, функционализированные молекулой распознавания, связаны с бактериями, комплексы бактерии–МНЧ можно разделить с помощью

постоянных магнитов с минимальным повреждением бактерий [11–15].

Кроме этого, для селективного захвата бактерий-мишеней поверхности МНЧ функционализируют антителами и аптамерами. С помощью методов детекции, не требующих селективного разделения, таких как полимеразная цепная реакция (ПЦР), на поверхность МНЧ могут быть нанесены полиэлектролиты, способные к электростатическому связыванию с бактериями-мишенями [16]. Для выделения комплексов бактерий и МНЧ из растворов образцов с помощью внешнего магнитного поля в традиционном методе используется многостадийный процесс. После связывания МНЧ с бактериями-мишенями комплексы бактерии–МНЧ переносят на промывку и концентрирование.

После выделения комплексов бактерий с МНЧ из раствора образца для обнаружения целевых бактерий можно использовать различные устройства, такие как оптические, электрохимические датчики [17–19]. Наиболее чувствительные методы обнаружения предусматривают использование наночастиц золота, флуоресцентных красителей и квантовых точек [20, 21]. Однако после магнитной сепарации в растворе присутствуют как комплексы бактерий с МНЧ, так и свободные МНЧ, так как концентрация используемых МНЧ значительно превышает концентрацию целевых бактерий. Поскольку наличие свободных МНЧ мешает оптическим измерениям и снижает чувствительность обнаружения, были предприняты усилия по отделению комплексов бактерии–МНЧ от свободных МНЧ. После выделения комплексов бактерий с МНЧ из свободных МНЧ концентрацию бактерий можно определить с помощью хроматографии.

Хроматография представляет собой метод разделения смесей, растворенных в жидкости, и имеет широкое применение. Традиционная хроматография основана на различии сродства компонентов смеси к твердой неподвижной фазе, тогда как магнитофоретическая хроматография основана на различии скорости осаждения МНЧ разного размера во внешнем магнитном поле [22]. После всасывания смеси бактерий с комплексами МНЧ и свободных МНЧ в наконечник пипетки добавляют вязкий раствор полиэтиленоксида, образующий неперемешанный жидкий слой. Поверхностное натяжение жидкости увеличивается с увеличением вязкости жидкости. Когда постоянный магнит помещается под наконечник пипетки, и комплексы бактерий с МНЧ, и свободные МНЧ испытывают силы магнитного поля, сопротивления и гравитации, поскольку они притягиваются к магниту. Магнитная сила пропорциональна кажущемуся объему МНЧ, что указывает на то, что скорость осаждения комплексов бактерий с МНЧ выше, чем у свободных МНЧ. В результате только комплексы бактерий с МНЧ с более высокой скоростью осаждения могут преодолевать поверхностное натяжение и достигать дна наконечника пипетки, а бактерии-мишени обнаруживаются глазами. Предел обнаружения магнитофоретической хроматографии в течение 10 мин составляет 100 КОЕ/мл.

Изотермическая амплификация нуклеиновых кислот

Методы изотермической амплификации являются альтернативой ПЦР, т.к. они относительно быстрее, проще в использовании и не требуют сложного оборудования. В частности,

петлевая изотермическая амплификация (LAMP) зарекомендовала себя как чувствительный, специфический и простой метод диагностики различных заболеваний, включая паразитарные болезни [23]. В процессе амплификации используются ДНК-полимераза с функцией смещения цепи и набор из четырех (шести) специально разработанных праймеров, которые распознают шесть (восемь) отдельных областей целевой ДНК [23, 24]. Амплификация и детекция целевого гена (из РНК или ДНК) проходит в один этап и при одной температуре в диапазоне 60–65°C. В течение менее чем 1 ч происходит синтез продукта на уровне примерно 10^9 копий целевой ДНК. Амплифицированные продукты состоят из ампликонов типа «петля-на-стебле» различной длины. Помимо электрофореза, их появление можно обнаружить визуально или нефело/фото/флуорометрически, как косвенно (по регистрации изменений концентраций пирофосфата, магния и протонов, которые происходят в ходе реакции синтеза ДНК, проявляемые металлоиндикаторами, комплексонометрическими индикаторами, pH-индикаторами), так и прямо (по регистрации нарастания количества амплификатов, что возможно при использовании интеркалирующих красителей или флуоресцентно-меченных петлевых праймеров (FLOS-LAMP)) [25].

Амплификация и обнаружение нуклеиновой кислоты с использованием LAMP имеет много преимуществ по сравнению с неизотермическими методами, основанными на ПЦР. Во-первых, скорость усиления: используя соответствующий набор праймеров и оптимальные условия амплификации, можно обнаружить небольшое количество целевой нуклеиновой кислоты менее чем за 30 мин [26–28] по сравнению со временем амплификации до 3 ч для процесса ПЦР. Кроме того, настоятельно рекомендуется интеграция и использование LAMP в устройствах для оказания медицинской помощи из-за снижения потребности в энергии и техническом обслуживании [29–32].

Заключение

В настоящее время существует множество методов индикации и идентификации возбудителей инфекционных заболеваний, однако большинство из них требуют значительных затрат времени, специального оборудования и подготовленного персонала. Создание средств экспресс-идентификации возбудителей актуальных инфекций является насущной задачей.

На основании проделанного анализа для увеличения чувствительности определения патогенов представляется перспективным сочетание магнитофоретической хроматографии и изотермической амплификации нуклеиновых кислот (LAMP).

Информация о финансировании

Работа выполнена по НИОКР 1.1.13 в рамках государственного задания.

Financial support

The work was carried out within the framework of R&D 1.1.13 within the framework of the state assignment.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Литература

1. Li Z, Ma J, Ruan J, Zhuang X. Using Positively Charged Magnetic Nanoparticles to Capture Bacteria at Ultralow Concentration. *Nanoscale Res Lett*. 2019 Jun 4;14(1):195. DOI: 10.1186/s11671-019-3005-z
2. Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2010 May-Jun;2(3):291-304. DOI: 10.1002/wnan.84
3. Shabestari Khiabani S, Farshbaf M, Akbarzadeh A, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2017 Feb;45(1):6-17. DOI: 10.3109/21691401.2016.1167704
4. Lim M-C, Park JY, Park K, Ok G, Jang H-J, Choi S-W. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control*. 2017;73:1541-7.
5. Liu S, Yu B, Wang S, Shen Y, Cong H. Preparation, surface functionalization and application of Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci*. 2020 Jul;281:102165. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102165. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32361408
6. Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: from separation to detection. *TrAC Trends Anal Chem*. 2020;128:115915.
7. Lu H, Xu S. Ultrasensitive turn on molecularly imprinted fluorescence sensor for glycoprotein detection based on nanoparticles signal amplification. *Sens Actuators B Chem*. 2020;306:127566.
8. Luo K, Park H, Adra HJ, Ryu J, Lee JH, Yu J, Choi SJ, Kim YR. Charge-switchable magnetic separation and characterization of food additive titanium dioxide nanoparticles from commercial food. *J Hazard Mater*. 2020 Jul 5;393:122483. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122483
9. Shen H, Wang J, Liu H, Li Z, Jiang F, Wang FB, Yuan Q. Rapid and Selective Detection of Pathogenic Bacteria in Bloodstream Infections with Aptamer-Based Recognition. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2016 Aug 3;8(30):19371-8. DOI: 10.1021/acsami.6b06671
10. Martynenko IV, Kusić D, Weigert F, Stafford S, Donnelly FC, Evstigneev R, et al. Magneto-Fluorescent Microbeads for Bacteria Detection Constructed from Superparamagnetic Fe_3O_4 Nanoparticles and AlS/ZnS Quantum Dots. *Anal Chem*. 2019 Oct 15;91(20):12661-12669. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01812
11. Varshney M, Yang L, Su XL, Li Y. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Food Prot*. 2005 Sep;68(9):1804-11. DOI: 10.4315/0362-028x-68.9.1804
12. Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron*. 2019 Mar 15;129:224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078
13. Xu H, Tang F, Dai J, Wang C, Zhou X. Ultrasensitive and rapid count of *Escherichia coli* using magnetic nanoparticle probe under dark-field microscope. *BMC Microbiol*. 2018 Sep 3;18(1):100. DOI: 10.1186/s12866-018-1241-5
14. Yim C, Lee H, Lee S, Jeon S. One-step immobilization of antibodies on ZIF-8/ Fe_3O_4 hybrid nanoparticles for the immunoassay of *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv*. 2017;7(3):1418-22.
15. Yang X, Zhou X, Zhu M, Xing D. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens Bioelectron*. 2017 May 15;91:238-245. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.044
16. Lee H, Han H, Jeon S. Baleen-Mimicking Virtual Filters for Rapid Detection of Pathogenic Bacteria in Water Using Magnetic Nanoparticle Chains and a Halbach Ring. *ACS Sens*. 2020 Nov 25;5(11):3432-3437. DOI: 10.1021/acssensors.0c01334

17. Wang L, Huo X, Zheng L, Cai G, Wang Y, Liu N, et al. An ultrasensitive biosensor for colorimetric detection of *Salmonella* in large-volume sample using magnetic grid separation and platinum loaded zeolitic imidazolate Framework-8 nanocatalysts. *Biosens Bioelectron.* 2020 Feb 15;150:111862. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111862
18. Nemr CR, Smith SJ, Liu W, Mephah AH, Mohamadi RM, Labib M, Kelley SO. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal Chem.* 2019 Feb 19;91(4):2847-2853. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04792
19. Sun X, Lei C, Guo L, Zhou Y. Separable detecting of *Escherichia coli* O157H:H7 by a giant magneto-resistance-based bio-sensing system. *Sens Actuat B Chem.* 2016;234:485-92.
20. Chen CX, Li YH, Zhou YL, Zhang JH, Wei QZ, Dai T, Wang L. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. *RSC Adv.* 2020 Jan 9;10(4):1966-1970. DOI: 10.1039/c9ra09894a
21. Chang Z-M, Wang Z, Shao D, et al. Fluorescent-magnetic Janus nanorods for selective capture and rapid identification of foodborne bacteria. *Sens Actuat B Chem.* 2018;260:1004-11.
22. Kwon D, Joo J, Lee J, Park KH, Jeon S. Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye. *Anal Chem.* 2013 Aug 6;85(15):7594-8. DOI: 10.1021/ac401717f
23. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
24. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a nondenatured template. *Clin Chem.* 2001 Sep;47(9):1742-3.
25. Зубик АН, Рудницкая ГЕ, Евстапов АА. Изотермическая петлевая амплификация, LAMP в формате микроустройств. *Научное приборостроение.* 2021;31(1):3-43. DOI: 10.18358/np-31-1-i343
26. Rako L, Agarwal A, Semeraro L, Broadley A, Rodoni BC, Blacket MJ. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Manag Sci.* 2021 Dec;77(12):5509-5521. DOI: 10.1002/ps.6591
27. Lee SH, Ahn G, Kim MS, Jeong OC, Lee JH, Kwon HG, et al. Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Comb Sci.* 2018 Aug 13;20(8):472-481. DOI: 10.1021/acscombsci.8b00022
28. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel).* 2021 Mar 4;11(3):438. DOI: 10.3390/diagnostics11030438
29. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Analyt Chem.* 2019 Apr;113:44-53. DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.015
30. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel).* 2020 Jul 22;9(8):182. DOI: 10.3390/biology9080182
31. Gao X, Sun B, Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Bioanal Chem.* 2019 Feb;411(6):1211-1218. DOI: 10.1007/s00216-018-1552-2
32. Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Soh HT. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun (Camb).* 2014 Apr 11;50(28):3747-9. DOI: 10.1039/c4cc00540f
2. Haun JB, Yoon TJ, Lee H, Weissleder R. Magnetic nanoparticle biosensors. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol.* 2010 May-Jun;2(3):291-304. DOI: 10.1002/wnan.84
3. Shabestari Khiabani S, Farshbaf M, Akbarzadeh A, Davaran S. Magnetic nanoparticles: preparation methods, applications in cancer diagnosis and cancer therapy. *Artif Cells Nanomed Biotechnol.* 2017 Feb;45(1):6-17. DOI: 10.3109/21691401.2016.1167704
4. Lim M-C, Park JY, Park K, Ok G, Jang H-J, Choi S-W. An automated system for separation and concentration of food-borne pathogens using immunomagnetic separation. *Food Control.* 2017;73:1541-7.
5. Liu S, Yu B, Wang S, Shen Y, Cong H. Preparation, surface functionalization and application of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020 Jul;281:102165. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102165. Epub 2020 Apr 24. PMID: 32361408
6. Wang L, Lin J. Recent advances on magnetic nanobead based biosensors: from separation to detection. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020;128:115915.
7. Lu H, Xu S. Ultrasensitive turn on molecularly imprinted fluorescence sensor for glycoprotein detection based on nanoparticles signal amplification. *Sens Actuat B Chem.* 2020;306:127566.
8. Luo K, Park H, Adra HJ, Ryu J, Lee JH, Yu J, Choi SJ, Kim YR. Charge-switchable magnetic separation and characterization of food additive titanium dioxide nanoparticles from commercial food. *J Hazard Mater.* 2020 Jul 5;393:122483. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.122483
9. Shen H, Wang J, Liu H, Li Z, Jiang F, Wang FB, Yuan Q. Rapid and Selective Detection of Pathogenic Bacteria in Bloodstream Infections with Aptamer-Based Recognition. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016 Aug 3;8(30):19371-8. DOI: 10.1021/acsami.6b06671
10. Martynenko IV, Kusić D, Weigert F, Stafford S, Donnelly FC, Evstigneev R, et al. Magneto-Fluorescent Microbeads for Bacteria Detection Constructed from Superparamagnetic Fe₃O₄ Nanoparticles and AlS/ZnS Quantum Dots. *Anal Chem.* 2019 Oct 15;91(20):12661-12669. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01812
11. Varshney M, Yang L, Su XL, Li Y. Magnetic nanoparticle-antibody conjugates for the separation of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef. *J Food Prot.* 2005 Sep;68(9):1804-11. DOI: 10.4315/0362-028x-68.9.1804
12. Vinayaka AC, Ngo TA, Kant K, Engelsmann P, Dave VP, Shahbazi MA, et al. Rapid detection of *Salmonella enterica* in food samples by a novel approach with combination of sample concentration and direct PCR. *Biosens Bioelectron.* 2019 Mar 15;129:224-230. DOI: 10.1016/j.bios.2018.09.078
13. Xu H, Tang F, Dai J, Wang C, Zhou X. Ultrasensitive and rapid count of *Escherichia coli* using magnetic nanoparticle probe under dark-field microscope. *BMC Microbiol.* 2018 Sep 3;18(1):100. DOI: 10.1186/s12866-018-1241-5
14. Yim C, Lee H, Lee S, Jeon S. One-step immobilization of antibodies on ZIF-8/Fe₃O₄ hybrid nanoparticles for the immunoassay of *Staphylococcus aureus*. *RSC Adv.* 2017;7(3):1418-22.
15. Yang X, Zhou X, Zhu M, Xing D. Sensitive detection of *Listeria monocytogenes* based on highly efficient enrichment with vancomycin-conjugated brush-like magnetic nano-platforms. *Biosens Bioelectron.* 2017 May 15;91:238-245. DOI: 10.1016/j.bios.2016.11.044
16. Lee H, Han H, Jeon S. Baleen-Mimicking Virtual Filters for Rapid Detection of Pathogenic Bacteria in Water Using Magnetic Nanoparticle Chains and a Halbach Ring. *ACS Sens.* 2020 Nov 25;5(11):3432-3437. DOI: 10.1021/acssensors.0c01334
17. Wang L, Huo X, Zheng L, Cai G, Wang Y, Liu N, et al. An ultrasensitive biosensor for colorimetric detection of *Salmonella* in large-volume sample using magnetic grid separation and platinum loaded zeolitic imidazolate Framework-8 nanocatalysts. *Biosens Bioelectron.* 2020 Feb 15;150:111862. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111862
18. Nemr CR, Smith SJ, Liu W, Mephah AH, Mohamadi RM, Labib M, Kelley SO. Nanoparticle-Mediated Capture and Electrochemical Detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Anal Chem.* 2019 Feb 19;91(4):2847-2853. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b04792

References

19. Sun X, Lei C, Guo L, Zhou Y. Separable detecting of *Escherichia coli* O157H:H7 by a giant magneto-resistance-based bio-sensing system. *Sens Actuat B Chem*. 2016;234:485-92.
20. Chen CX, Li YH, Zhou YL, Zhang JH, Wei QZ, Dai T, Wang L. Rapidly detecting antibiotics with magnetic nanoparticle coated CdTe quantum dots. *RSC Adv*. 2020 Jan 9;10(4):1966-1970. DOI: 10.1039/c9ra09894a
21. Chang Z-M, Wang Z, Shao D, et al. Fluorescent-magnetic Janus nanorods for selective capture and rapid identification of foodborne bacteria. *Sens Actuat B Chem*. 2018;260:1004-11.
22. Kwon D, Joo J, Lee J, Park KH, Jeon S. Magnetophoretic chromatography for the detection of pathogenic bacteria with the naked eye. *Anal Chem*. 2013 Aug 6;85(15):7594-8. DOI: 10.1021/ac401717f
23. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
24. Nagamine K, Watanabe K, Ohtsuka K, Hase T, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification reaction using a non-denatured template. *Clin Chem*. 2001 Sep;47(9):1742-3.
25. Zubik AN, Rudnitskaya GE, Evstratov AA. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique in microdevice format (review). *Nauchnoe Priborostroyeniye*. 2021;31(1):3-43. DOI: 10.18358/np-31-1-i343 (In Russian).
26. Rako L, Agarwal A, Semeraro L, Broadley A, Rodoni BC, Blacket MJ. A LAMP (loop-mediated isothermal amplification) test for rapid identification of Khapra beetle (*Trogoderma granarium*). *Pest Manag Sci*. 2021 Dec;77(12):5509-5521. DOI: 10.1002/ps.6591
27. Lee SH, Ahn G, Kim MS, Jeong OC, Lee JH, Kwon HG, et al. Poly-adenine-Coupled LAMP Barcoding to Detect Apple Scar Skin Viroid. *ACS Comb Sci*. 2018 Aug 13;20(8):472-481. DOI: 10.1021/acscmbosci.8b00022
28. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Mar 4;11(3):438. DOI: 10.3390/diagnostics11030438
29. Zhang H, Xu Y, Fohlerova Z, Chang H, Iliescu C, Neuzil P. LAMP-on-a-chip: Revising microfluidic platforms for loop-mediated DNA amplification. *Trends Analyt Chem*. 2019 Apr;113:44-53. DOI: 10.1016/j.trac.2019.01.015
30. Augustine R, Hasan A, Das S, Ahmed R, Mori Y, Notomi T, Kevadiya BD, Thakor AS. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel)*. 2020 Jul 22;9(8):182. DOI: 10.3390/biology9080182
31. Gao X, Sun B, Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal Bioanal Chem*. 2019 Feb;411(6):1211-1218. DOI: 10.1007/s00216-018-1552-2
32. Hsieh K, Mage PL, Csordas AT, Eisenstein M, Soh HT. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chem Commun (Camb)*. 2014 Apr 11;50(28):3747-9. DOI: 10.1039/c4cc00540f

Информация о соавторах:

Волошин Александр Григорьевич, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории нанобиотехнологии ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат биологических наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-authors:

Alexandr G. Voloshin, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Laboratory of Nanobiotechnology, State Research Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Rosпотребнадзор

Sergey F. Biketov, PhD (Biological Science), Leading Researcher of Department of Immunobiology of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology

НОВОСТИ НАУКИ

Новое оружие против устойчивых к антибиотикам бактерий

Klebsiella pneumoniae является возбудителем ряда тяжелых инфекций. Многие штаммы *K. pneumoniae* устойчивы ко многим антибиотикам, и эта ситуация создает потребность в новых антибактериальных молекулах. Патогенность *K. pneumoniae* во многом зависит от ее способности избегать фагоцитоза и внутриклеточного уничтожения фагоцитирующими клетками. Вмешательство в эти механизмы побега может позволить снизить вирулентность бактерий и бороться с инфекциями. В исследовании использован *Dictyostelium discoideum* в качестве модельного фагоцита для скрининга коллекции из 1099 химических соединений. Клетки Phg1A KO *D. discoideum* не могут питаться бактериями *K. pneumoniae*, если только бактерии не несут мутации, снижающие их вирулентность. Идентифицировали 3 неантибиотических соединения, которые восстанавливали рост клеток phg1A KO на *K. pneumoniae*, и охарактеризовали механизм действия одного из них, 5-этил-2'-дезоксинуридина (K2). Бактерии, обработанные K2, быстрее погибали в фагосомах *D. discoideum*, чем необработанные бактерии. Они были более чувствительны к полимиксину, а их внешняя мембрана была более доступна для гидрофобного флуоресцентного зонда. Эти результаты предполагают, что K2 действует, делая мембрану *K. pneumoniae* доступной для антибактериальных эффекторов. K2 был эффективен в отношении трех различных штаммов *K. pneumoniae* и действовал при таких низких концентрациях, как 3 мкМ. K2 ранее использовался для лечения вирусных инфекций, но его точный молекулярный механизм действия на *K. pneumoniae* еще предстоит определить.



Ifrid E., et al.

5-ethyl-2'-deoxyuridine fragilizes *Klebsiella pneumoniae* outer wall and facilitates intracellular killing by phagocytic cells. *Plos One*. 2022;10(17):e0269093.