

Детекция патогенов центральной нервной системы в образцах спинномозговой жидкости с применением технологий ДНК-наномашин

Научный руководитель – Кошель Елена Ивановна

Шкоденко Л.А.¹, Гончарова Е.А.², Недорезова Д.Д.³, Ковтунов Е.А.⁴

1 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: shkodenko@scamt-itmo.ru*; 2 -

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: katerina.burmina@gmail.com*;

3 - Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия, *E-mail: darianedorez@icloud.com*; 4 -

Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского, Биологический факультет, Саратов, Россия, *E-mail: iamyourfear12@mail.ru*

В настоящее время актуальным вопросом для медицины является разработка быстрых и эффективных методов диагностики инфекционных заболеваний. ПЦР анализ является рутинным методом клинической диагностики, однако обладает рядом существенных недостатков, среди которых необходимость в квалифицированных специалистах и специализированных лабораторных помещениях, что часто бывает недоступно в небольших клиниках, особенно в развивающихся странах [1,2]. Еще одним слабым местом ПЦР диагностики является контаминация образцов и как следствие высокий процент ложноположительных результатов. Использование бинарных дезоксирибозимных биосенсоров, высокоспецифичных к ДНК или РНК патогенов может стать хорошей альтернативой стандартным методам анализа [3].

Целью данной работы явилась разработка протокола для высокоспецифичной детекции патогенов центральной нервной системы *Neisseria meningitidis* и *Streptococcus pneumoniae* в образцах спинномозговой жидкости с использованием технологий ПЦР и ДНК наномашин.

В работе использовали культуры *N. meningitidis* и *S. pneumoniae*. Количество КОЕ определяли путем посева серийных 10-кратных разведений клеточных суспензий на 1,5% колумбийский агар. Бактерий смывали с поверхности колумбийского агара и готовили серийные разведения в образцах спинномозговой жидкости. Полученную суспензию использовали в качестве матрицы для ПЦР. Результаты ПЦР оценивали с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле. Ампликоны очищали набором Cleanup Standard (Евроген) концентрировали и обрабатывали экзонуклеазой фага лямбда (New England Biolabs) для получения одноцепочечных фрагментов. Полученную таким образом библиотеку одноцепочечных ПЦР фрагментов ДНК *S. pneumoniae* и *N. meningitidis* использовали для визуальной детекции путем добавления 1 мкМ биосенсора на основе G-квадруплекса (Pneum-f-1 и Pneum-m-1 для обнаружения *S. pneumoniae* и neiss-f-1 и neiss-m-1 для обнаружения *N. meningitidis*), 1 mM DAB, 1% H₂O₂ и 1 мкМ гемина. Образцы инкубировали при комнатной температуре 20 минут с последующей визуальной оценкой и измерением оптической плотности на спектрофлуориметре Cary Eclipse (длина волны 500 нм).

Нами было определено, что предел детекции с помощью данного метода составляет 10-20 бактерий в пробе. При этом создается визуальный сигнал, который может быть обнаружен невооруженным глазом. Так как разработанные нами зонды, благодаря своей структуре, обладают высокой селективностью к распознаванию аналита, данная технология имеет преимущество перед существующими. Дальнейшее ее развитие позволит создать доступный тест для выявления возбудителей менингита в местах оказания медицинской помощи.

Работа выполнена на базе университета ИТМО и ФБУН Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера

Источники и литература

- 1) Diawara I. et al. A duplex real-time PCR for the detection of *Streptococcus pneumoniae* and *Neisseria meningitidis* in cerebrospinal fluid //The Journal of Infection in Developing Countries. – 2016. – Т. 10. – №. 01. – С. 53-61.
- 2) Dong J. et al. Emerging pathogens: challenges and successes of molecular diagnostics //The Journal of Molecular Diagnostics. – 2008. – Т. 10. – №. 3. – С. 185-197.
- 3) Kolpashchikov D. M. Split DNA enzyme for visual single nucleotide polymorphism typing //Journal of the American Chemical Society. – 2008. – Т. 130. – №. 10. – С. 2934-2935.