

СОЗДАНИЕ И ОПТИМИЗАЦИЯ МЕТОДА ДЛЯ БЫСТРОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИЙ ЦНС НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ LAMP И ДЕЗОКСИРИБОЗИМНЫХ СЕНСОРОВ

Шуб А.С. (Университет ИТМО), Колесникова М.А. (Университет ИТМО), Бобков Г.А. (Университет ИТМО), Шкоденко Л.А. (Университет ИТМО)

Научный руководитель – доцент, кандидат биологических наук, Кошель Е.И. (Университет ИТМО)

Введение. Острые менингиты и энцефалиты являются инфекциями центральной нервной системы (ЦНС), которые могут привести к неврологическим заболеваниям и летальному исходу [1]. Для своевременного лечения необходимо вовремя обнаружить и идентифицировать микробных возбудителей. Неспецифические симптомы инфекций ЦНС в начальной фазе затрудняют постановку правильного диагноза. Пациенты с заболеваниями ЦНС в основном имеют схожие жалобы на головную боль, лихорадку и неврологические нарушения. Дифференциальный диагноз менингита и энцефалита установить сложно, поскольку у пациента проявляются перекрывающиеся симптомы. Из-за отсутствия целевого тестирования этиологию в большинстве случаев трудно распознать. Рутинно используемые методы, включающие окрашивание по Граму, посев, обнаружение антигена, биохимический и клеточный анализ, не обладают чувствительностью и специфичностью, требуют много времени. Диагностику можно проводить с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) [2]. Однако данный способ требует наличия дорогостоящего оборудования. Исходя из этого актуальной является разработка тест-системы для быстрой, точной и недорогой диагностики возбудителей нейроинфекций.

Основная часть. Целью работы являлось создание детекционной системы на основе изотермической амплификации LAMP и бинарных дезоксирибозимных сенсоров. В качестве объекта исследования были выбраны следующие патогены ЦНС: вирус Эпштейна-Барра (EBV), *Streptococcus agalactiae*, *Mycobacterium tuberculosis*. Для каждого из этих микроорганизмов были подобраны оптимальные условия петлевой амплификации: температура, состав реакционной смеси, количество геномных копий. Дизайн праймеров для реакций (наружные F3, B3 и внутренние FIP, BIP) создан в программе Oligoanalyzer. Гель-электрофорез в 2% агарозном геле применялся для визуализации результата амплификации. Дезоксирибозимные сенсоры были сконструированы в программах NuPack и mFold. Сенсоры (20 nM) смешивали с ампликоном (1 nM), детектировали флуоресценцию F-sub (200 nM) и вычисляли соотношение сигнал/шум (ОСШ). Предварительная инкубация ДНК-сенсоров с аналитом проводилась в течении 60 мин при температуре 55 °С для бактериальных возбудителей *S. agalactiae*, *M. tuberculosis*, при комнатной температуре для вируса Эпштейна-Барра.

В ходе LAMP амплификации был получен целевой продукт, что подтверждено на гель-электрофорезе. После инкубации бинарных дезоксирибозимных сенсоров с продуктом получено ОСШ 2.8 для *S. agalactiae*, 4.2 для EBV, 1.5 для *M. tuberculosis*.

Выводы. LAMP амплификация с детекцией бинарными дезоксирибозимными сенсорами является перспективным методом для быстрой, чувствительной, специфической и недорогой диагностики нейроинфекций. В будущем планируется расширение списка выявляемых патогенов.

Исследование выполнено на базе научного центра SCAMT (Университет ИТМО) в рамках программы Приоритет 2030.

Список использованных источников:

1. Zhou F. Inflammatory diseases of the meninges //Imaging of CNS Infections and Neuroimmunology. – 2019. – С. 193-199.
2. Tarai B., Das P. FilmArray® meningitis/encephalitis (ME) panel, a rapid molecular platform for diagnosis of CNS infections in a tertiary care hospital in North India: one-and-half-year review //Neurological Sciences. – 2019. – Т. 40. – С. 81-88.