

Разработка тест-системы с дозозависимой детекцией условно-патогенных микроорганизмов на основе изотермической DAMP-амплификации

Научный руководитель – Кошель Елена Ивановна

Ачкасова Марина Алексеевна

Студент (магистр)

Санкт-Петербургский национальный исследовательский университет информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, Россия

E-mail: marina-achkasova@yandex.ru

В основе назначения корректной терапии лежит точная идентификация возбудителя, что создает отдельную проблему диагностики заболеваний, вызванных условно-патогенными микроорганизмами - естественными обитателями тела человека. Они обнаруживаются в образцах и больных, и здоровых людей, из-за чего невозможно утвердить возбудителя только по его присутствию в мазке. Сейчас в диагностике определяется количество клеток предполагаемого патогена и их пороговое число, при котором микроорганизм возбуждает инфекцию. На практике применяют классический метод ПЦР в реальном времени и микробиологический посев. Однако данные подходы требуют времени, лабораторного оснащения и обученного персонала, что делает их сложно доступными в слаборазвитых и отдалённых населённых пунктах.

Исследование нацелено на разработку экспресс-системы дозозависимого определения инфекций с амплификацией выбранных целевых фрагментов патогенов с помощью метода изотермической амплификации DAMP (Dual-Priming Isothermal Amplification), нового подхода, характеризующегося ультранизким неспецифическим сигналом благодаря дополнительным уникальным праймерам в реакции. Далее продукты амплификации детектируются путем измерения флуоресцентного сигнала от их связывания с тиофлавином. Количество ДНК микроорганизма в образце будет определяться сравнением флуоресцентного сигнала тестируемого образца с калибровочной кривой, построенной на основе флуоресцентных сигналов детекции выбранного фрагмента ДНК тигра в точно известных количествах. Тигр выбран как экзотическое животное, чья ДНК вряд ли встретится в больнице, то есть не попадёт в тест-систему с пробой.

В настоящий момент протестированы DAMP-праймеры для гена бета-актина как контроля выделения и амплификации, а также амплифицирован специфичный участок митохондриона тигра *Panthera tigris isolate WEFSCOM*, клонированный далее в культуру *E. coli* K12 с помощью вектора pJET (чтобы проводить амплификацию с точно известным количеством целевого фрагмента и гарантировать постоянную доступность ДНК тигра). Дальнейшая реализация проекта предполагает:

- 1) Проведение и оптимизация DAMP-амплификации ДНК тигра;
- 2) Построение калибровочной кривой на основе сигналов детекции тиофлавином продуктов амплификации DAMP целевого фрагмента ДНК тигра;

Данная система контролей предназначена для тест-системы детекции пневмонии, в связи с чем выбраны целевые патогены, подобраны на них праймеры для изотермической DAMP-амплификации.

Финальный вариант технологии-простой в эксплуатации мобильный диагностический аппарат, не требующий дорогостоящих реактивов и обученного персонала.

Работа выполняется в рамках проектов: РНФ "Разработка point-of-care диагностической системы на основе ДНК-наносенсоров для выявления инфекций респираторного

тракта и их лекарственной устойчивости", Государственного задания "Point-of-care диагностика на основе ДНК-наносенсорной технологии", Приоритета 2030 "Разработка платформы полного цикла для Point-of-care диагностики на основе технологии ДНК-наносенсоров".