

Быстрая и портативная система тестирования для идентификации ДНК *Borrelia burgdorferi*

Ефименко Е.^{1*}, Спалвис А.², Макашов А.³

¹ Средняя общеобразовательная школа № 225, Санкт-Петербург, Россия

² Гимназия № 406, Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, Санкт-Петербург, Россия

* 6888008@bk.ru

Современные диагностические системы, основанные на обнаружении нуклеиновых кислот, такие как полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени, позволяют сравнительно быстро диагностировать заболевания, вызываемые РНК содержащими вирусами, и обладают высокой чувствительностью. Кроме того, они достаточно просты в разработке, и их производство может быть быстро поставлено на поток при вспышках различных инфекций. Однако методы, основанные на ПЦР, требуют дополнительной стадии обратной транскрипции – синтеза на основе выделенной из образца РНК цепи комплементарной ДНК (кДНК). Кроме того, амплификация нуклеиновых кислот с помощью ПЦР требует многократно повторяющихся циклов нагрева и охлаждения, что значительно увеличивает временные затраты на проведение теста. Также следует отметить, что для самого процесса пробоподготовки – выделения РНК из клинического образца, требуется наличие специального оборудования и реактивов. Кроме того, дополнительные операции повышают риск как ложноотрицательного (потери генетического материала вируса на этапе выделения), так и ложноположительного (контаминация образцов) результатов. В результате требуется проведение достаточно сложных операций, длительное время реакций и относительно дорогое оборудование. Таким образом, в идеальной диагностической системе число шагов должно быть сведено к минимуму, но без ущерба чувствительности.

Известно, что Bst ДНК-полимераза обладает также и ревертазной активностью, что позволяет использовать её для одношаговой детекции РНК содержащих вирусов. Благодаря подобным свойствам Bst-полимеразы, был разработан метод strand exchange amplification (SEA). Однако параллельное использование рестриктаз позволяет значительно увеличить чувствительность данного метода. В данном случае фрагменты нуклеиновых кислот, полученные в результате воздействия рестриктаз, способны служить в качестве праймеров, увеличивая тем самым скорость накопления детектируемых продуктов, что значительно снижает время проведения анализа без снижения чувствительности по сравнению с классическими методами, основанными на ПЦР.

Подобный метод был использован для диагностики вируса Зика (Ma et al., 2018) и продемонстрировал высокую скорость – время анализа заняло 25 минут – и чувствительность – образцы с концентрацией РНК 10^{-18} моль/л давали положительный результат. Ввиду того что метод основан на принципе изотермической амплификации, он не требует специального дорогостоящего оборудования в отличие от методов, основанных на ПЦР в реальном времени.

Также следует отметить, что визуализация результатов производится невооруженным глазом.

Вirus клещевого энцефалита относится к роду *Flavivirus*, его геном представлен одноцепочечной молекулой РНК (+ssRNA). Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (Еженедельный эпидемиологический бюллетень, № 24, 2011, 86, 241-256, 2011) вирус клещевого энцефалита является важной причиной возникновения вирусной инфекции центральной нервной системы в восточных, центральных и северных странах Европы, северном Китае, Монголии и Российской Федерации. Ежегодно фиксируется до 12000 случаев заражения клещевым энцефалитом, хотя это число считается сильно заниженным. Несмотря на наличие эффективных вакцин, уровень вакцинации не достигает близких к 100% значений, в том числе и в сельских регионах, находящихся в очагах распространения заболевания. Поэтому создание экспресс-системы детекции РНК вируса, а также портативной системы для проведения изотермической амплификации с визуальной детекции, может быть достаточно актуально и востребовано.

Болезнь Лайма вызывается бактериями рода *Borrelia* и передается иксодовыми клещами. На территории России заболевание встречается повсеместно. Боррелиоз выявляется приблизительно в 1.2% случаев укуса клеща. Прогноз при своевременном начале лечения благоприятный, однако заболевание может вызывать поражения суставов, такие, как хронический артрит. Эффективных вакцин против возбудителя болезни Лайма на сегодняшний день не существует. Мы планируем применить подобный метод SEA для обнаружения геномной РНК вируса клещевого энцефалита, а также ДНК возбудителя болезни Лайма.

План работ:

Создание тест-системы для детекции РНК вируса клещевого энцефалита.

Подбор специфических праймеров для генома вируса клещевого энцефалита.

Подбор рестриктаз. Подбор праймера, содержащего сайт рестрикции.

Отработка условий изотермической амплификации.

Определение чувствительности метода детекции геномной РНК вируса клещевого энцефалита.

Создание тест-системы для детекции ДНК возбудителя клещевого боррелиоза (*Borrelia sp.*).

Подбор специфических праймеров для консервативных участков генома *Borrelia sp.*

Подбор рестриктаз. Подбор праймера, содержащего сайт рестрикции.

Отработка условий изотермической амплификации.

Определение чувствительности метода ДНК возбудителя клещевого боррелиоза.