

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Ольховский И.А.<sup>1,2</sup>, Горбенко А.С.<sup>1,2</sup>, Комаровский Ю.Ю.<sup>1,2</sup>, Столяр М.А.<sup>1,2</sup>, Васильева Д.И.<sup>3</sup>, Епифанова О.С.<sup>4</sup>, Ходов Д.А.<sup>4</sup>, Рудакова С.А.<sup>5</sup>, Рудаков Н.В.<sup>5</sup>, Оскорбин И.П.<sup>6</sup>, Филипенко М.Л.<sup>6</sup>

### МОДИФИКАЦИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОГО ТЕСТА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК ВОЗБУДИТЕЛЕЙ КЛЕЩЕВОГО БОРРЕЛИОЗА

<sup>1</sup>Красноярский филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ, 660036, Красноярск, Россия;

<sup>2</sup>ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН», 660036, Красноярск, Россия;

<sup>3</sup>Институт фундаментальной биологии и биотехнологии Сибирского федерального университета, 660041, Красноярск, Россия;

<sup>4</sup>ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае» Роспотребнадзора, 660100, Красноярск, Россия;

<sup>5</sup>ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, Омск, Россия;

<sup>6</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН, 630090, Новосибирск, Россия

*Ранняя диагностика клещевого боррелиоза определяет показания для этиотропной терапии, а выявление боррелий в присосавшемся клеще служит обоснованием проведения антибиотикопрофилактики. Для определения возбудителя боррелиоза наиболее широко используются методы ПЦР, что требует особых условий организации работы лабораторий, использование дорогостоящего оборудования. Процедура выделения ДНК бактерий и последующая амплификация занимает несколько часов рабочего времени. Описаны методы детекции боррелий в изотермической реакции LAMP, что позволяет существенно ускорить диагностику, не требует сложного оборудования и высокой квалификации персонала. LAMP в ряде случаев позволяет выполнять анализ без предварительной экстракции нуклеиновых кислот. Цель работы: разработка модифицированного теста изотермической детекции ДНК возбудителей боррелиоза для ускоренного получения результата с возможностью исключения стадии экстракции нуклеиновых кислот. Использованы 40 образцов ДНК боррелий и 11 клещей *Ixodes persulcatus*. С целью сокращения времени детекции боррелий описанную ранее методику LAMP модифицировали введением дополнительных петлевых праймеров. Оценку количества копий в позитивном образце плазмидной ДНК боррелий определяли с помощью цифровой ПЦР. Результаты реакции LAMP сравнивали с результатами коммерческого теста ПЦР-РВ. Дополнительное использование петлевых праймеров примерно вдвое сократило время детекции ДНК боррелий, не оказывая влияния на сравнительную диагностическую эффективность. Предел аналитической чувствительности модифицированного метода LAMP равен 21 молекуле добавленного в реакцию плазмидного стандарта. В сравнительном тестировании с помощью ПЦР-РВ чувствительность метода LAMP составила 90%, специфичность 100%. Впервые продемонстрирована возможность детекции боррелий в клещах без этапа экстракции ДНК. Разработан модифицированный изотермический метод детекции возбудителей клещевого боррелиоза, позволяющий выполнять анализ в течение 20-30 минут, в том числе в клещах без предварительной экстракции ДНК.*

**Ключевые слова:** ПЦР-РВ, LAMP, клещевые боррелиозы.

**Для цитирования:** Ольховский И.А., Горбенко А.С., Комаровский Ю.Ю., Столяр М.А., Васильева Д.И., Епифанова О.С., Ходов Д.А., Рудакова С.А., Рудаков Н.В., Оскорбин И.П., Филипенко М.Л. Модификация изотермического теста выявления ДНК возбудителей клещевого боррелиоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1):59-64. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-59-64>

**Для корреспонденции:** Ольховский Игорь Алексеевич, канд. мед. наук, дир. Красноярского филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава РФ; [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке программы «Умник» ФГБУ «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» в рамках проекта «Разработка набора реагентов для экспресс-диагностики клещевых боррелиозов с помощью реакции LAMP» с дополнительным привлечением гранта Ассоциации «Федерации лабораторной медицины» и поддержки МИП ООО «Формула гена». ОИП и ФМЛ выполняли исследование в рамках проекта, осуществляемого за средства федерального бюджета, «Поиск, дизайн и валидация новых белков как фармакологических мишеней и инструментов для генетических технологий» № 121031300056-8.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 02.07.2021

Принята к печати 25.08.2021

Опубликовано 28.01.2022

Olkhovskiy I. A.<sup>1,2</sup>, Gorbenko A.S.<sup>1,2</sup>, Komarovskiy Yu.Yu.<sup>1,2</sup>, Stolyar M.A.<sup>1,2</sup>, Vasil'eva D.I.<sup>3</sup>, Epifanova O.S.<sup>4</sup>, Khodov D. A.<sup>4</sup>, Rudakova S.A.<sup>5</sup>, Rudakov N.V.<sup>5</sup>, Oskorbin I.P.<sup>6</sup>, Filipenko M.L.<sup>6</sup>

#### MODIFICATION OF ISOTHERMAL TEST FOR DETECTING DNA OF PATHOGENS OF TICK-BORNE BORRELIOSIS

<sup>1</sup>Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>2</sup>Federal Research Center Krasnoyarsk Scientific Center of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 660036, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>3</sup>Institute of Fundamental Biology and Biotechnology of Siberian Federal University, 660041, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>4</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing of Center for Hygiene and Epidemiology, 660100, Krasnoyarsk, Russia;

<sup>5</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing of Omsk Research Institute of Natural Focal Infections, 644080, Omsk, Russia;

<sup>6</sup>Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090, Novosibirsk, Russia

*Early diagnosis of tick-borne borreliosis determines the indications for etiotropic therapy, and the detection of borrelia in a tick that has bitten you serves as the basis for antibiotic prophylaxis. To determine the causative agent of borreliosis, PCR methods are most widely used, which requires special conditions for organizing the work of laboratories and the use of expensive equipment. In addition, the procedure for isolating bacterial DNA and subsequent amplification takes several hours of working time. At the same time, methods for detecting borrelia in the isothermal LAMP-reaction are described, which makes it possible to significantly speed up the diagnosis, does not require complex equipment and highly qualified personnel. It is also known that LAMP in some cases allows analysis without prior extraction of nucleic acids. The purpose was a development of a modified test for isothermal detection of DNA of borreliosis pathogens for an accelerated result and the possibility of excluding the stage of nucleic acid extraction. We used 40 samples of Borrelia DNA and 11 Ixodes persulcatus ticks. To shorten the detection time for Borrelia, the previously described LAMP method was modified by the introduction of additional loop primers. The copy number of the positive DNA sample of the borrelia plasmid was estimated using digital PCR. The results of the LAMP reaction were compared with those of the commercial PRC-RT test.*

*The additional use of loop primers approximately halved the detection time for Borrelia DNA without affecting the comparative diagnostic efficiency. The analytical sensitivity limit of the modified LAMP method was 4 copies/μl or 21 molecules of the plasmid standard added to the reaction. In comparative testing with RT-PCR, the sensitivity of the LAMP method is 90%, and the specificity is 100%. The possibility of detecting borrelia in ticks without the stage of DNA extraction has been demonstrated for the first time. A modified isothermal method for the detection of pathogens of tick-borne borreliosis has been developed, which allows analysis within 20-30 minutes, including in ticks without preliminary DNA extraction.*

**Key words:** PCR-RT; LAMP; tick-borne borelioses.

**For citation:** Olkhovskiy I.A., Gorbenko A.S., Komarovskiy Yu.Yu., Stolyar M.A., Vasil'eva D.I., Epifanova O.S., Khodov D.A., Rudakova S.A., Rudakov N.V., Oskorbin I.P., Filipenko M.L. Modification of isothermal test for detecting DNA of pathogens of tick-borne borreliosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022, 67 (1): 59-64 (in Russ.) DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-59-64>

**For correspondence:** *Olkhovskiy I.S.*, PhD, docent, director of Krasnoyarsk branch of the «National Research Center for Hematology» Department of Health, research fellow of the Krasnoyarsk Scientific Center SB RAS; e-mail: [krashemcenter@mail.ru](mailto:krashemcenter@mail.ru)

#### Information about authors:

Stolyar M.A., <https://orcid.org/0000-0002-8037-9844>;

Gorbenko A.S., <https://orcid.org/0000-0001-8756-2660>;

Olkhovskiy I.A., <https://orcid.org/0000-0003-2311-2219>;

Komarovskiy Yu.Yu., <https://orcid.org/0000-0003-0569-5502>.

**Acknowledgment.** *The work was carried out with the financial support of the Federal State Budgetary Institution «Fund for Assistance to the Development of Small Forms of Enterprises in the Scientific and Technical Sphere» within the framework of the project «Development of a set of reagents for the rapid diagnosis of tick-borne borreliosis using the LAMP reaction» with the involvement of a grant from the Association «Federation of Laboratory Medicine» and the support of LLC «Formula Gena». OIP and FML carried out the research within the framework of the project «Search, design and validation of new proteins as pharmacological targets and tools for genetic technologies» No. 121031300056-8, implemented at the expense of the federal budget.*

**Conflict of interest.** *The authors declare no conflict of interest.*

Received 02.07.2021

Accepted 25.08.2021

Published 28.01.2022

**Введение.** Вызываемая спирохетами *Borrelia burgdorferi* зоонозная клещевая инфекция (болезнь Лайма или иксодовый клещевой боррелиоз (ИКБ)), передающаяся человеку при присасывании клещей рода *Ixodes* – наиболее распространенное трансмиссивное инфекционное заболевание людей, проживающих в умеренном климатическом поясе северного полушария [1, 2]. В России ИКБ находится на 2-м месте по заболеваемости среди природно-очаговых и зооантропонозных инфекций, опережая заболеваемость клещевым энцефалитом

в 4,5 раза [3, 4]. Клинические проявления заболевания включают как локальное поражение кожи в месте присасывания клеща, так и характерные для спирохетозов отсроченные системные поражения разных органов. Согласно клинической классификации, выделяют период инкубации и дальнейшего развития по 3-м стадиям: локализованная, диссеминированная, поздняя. Симптомы инфекции могут проявляться как через несколько дней, так и через несколько месяцев после инфицирования. Хотя выявление боррелий в присосавшемся клеще не

всегда приводит к развитию клинической картины заболевания, информация о факте контакта с возбудителем ИКБ необходима для своевременного превентивного использования антибактериальных препаратов и дальнейшего контроля иммунного ответа.

Для верификации ИКБ в клинико-диагностических лабораториях в настоящее время используется два основных подхода: опосредованный, основанный на выявлении антител к антигенам боррелий и методы прямой детекции специфических антигенов или нуклеиновых кислот возбудителя инфекции. В последнем случае широко используются методы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР). Хотя перечисленные методы чувствительны и специфичны, они имеют свои недостатки, связанные с повышенными требованиями к организации лабораторий, риском взаимной контаминации проб и длительностью выполнения анализов, высокой стоимостью оборудования. Совершенствование прямых молекулярно-генетических методов выявления боррелий признается наиболее перспективным направлением [5]. Один из таких многообещающих методов – изотермальная петлевая амплификация нуклеиновых кислот (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), разработанная японским учёным Цугунори Нотоми [6]. Отсутствие термоциклирования, характерного для классической ПЦР, нивелирует необходимость сложного дорогостоящего оборудования, что делает метод экономически целесообразным и доступным в «полевых условиях». Поскольку LAMP менее чувствительна к ингибиторам используемых ферментов, возможна детекция ДНК боррелий, минуя стадию её экстракции [7, 8].

Использование LAMP с применением олигонуклеотидов, комплементарных гену 16S rRNA, для выявления *Borrelia burgdorferi s.l.* в клещах *Dermacentor sp.*, *Haemaphysalis sp.*, *Rhipicephalus sp.*, *Boophilus sp.* описано китайскими коллегами [9]. Известно о разработке метода LAMP, основанного на праймерах к гену флагалина (fla), для детекции ДНК *Borrelia burgdorferi sensu stricto*, *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia valaisiana* в пробах сыворотки крови пациентов [10]. Сведения о возможности использования LAMP для выявления ДНК возбудителей ИКБ в таёжных клещах *Ixodes persulcatus* в доступной литературе отсутствуют. Тест на наличие боррелий в клещах, снятых с пострадавших от их присасывания пациентов, в «полевых условиях» является основанием для своевременного назначения эффективной превентивной терапии ИКБ.

Цель работы – разработка модифицированного теста изотермической детекции ДНК возбудителей боррелиоза для ускоренного получения результата с возможностью исключения стадии экстракции нуклеиновых кислот.

**Материал и методы.** Для отработки методики использовано 4 изолята боррелий (*B. garinii* – № 502, *B. garinii* – № 309, *B. afzelii* – 620, *B. afzelii* – 620), генотипированных с помощью секвенирования 16S rDNA, из коллекции микроорганизмов ФБУН «Омского НИИ природно-очаговых инфекций», 36 образцов ДНК боррелий из коллекции лаборатории особо опасных инфекций ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Красноярском крае», 11 образцов клещей *Ixodes persulcatus*, сбор которых проводился в сезон 2019 г. на лесных и лесостепных участках Красноярска и его окрестностей.

Для конструирования положительного контрольного образца ДНК проводили амплификацию ДНК фрагмента

гена fla размером 189 п.н. с помощью олигонуклеотидных праймеров F3 5'-GCTGTTGAGTCCSTTCTTG-3' и B3 5'-CACAGCGTCACTTTCAG-3' на матрице ДНК *Borrelia burgdorferi s.l.* Полученный амплифицированный фрагмент клонировали с помощью набора для клонирования «Quick-TA kit» (Евроген, Россия), затем трансформировали полученной смесью клетки *E. coli* с последующим отбором клонов, несущих рекомбинантные плазмиды. Нуклеотидную последовательность отобранного клона подтверждали секвенированием по Сенгеру. Для дальнейшей работы полученную рекомбинантную плазмиду линеаризовали путём инкубации с рестриктазой MroXI (СибЭнзим, Россия). Концентрацию ДНК в полученном позитивном контрольном образце определяли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX200™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad; США) согласно инструкциям производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую плазмидную ДНК (около 10<sup>3</sup> копий на 20 мкл, оценка на основе спектрофотометрического анализа при длине волны 260 нм), 1× ПЦР-смесь (Bio-Rad; США), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и зонд: Bla-F 5'-CGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC-3', Bla-R 5'-AGGACCGAAGGAGCTAACCCG-3' и Bla-P HEX-CGGTTCCTCAACGATCAAGGCGAG-BHQ1. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель переносили в соответствующие лунки картриджа DG8, помещали все в генератор капель. 40 мкл полученных микрокапель переносили в 96-луночный ПЦР-планшет, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Амплификацию проводили согласно следующей программе: 96°C – 10 мин и далее 45 циклов 96°C – 15 с, 58°C – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98°C, скорость нагрева планшета для всех шагов равна 2 °C/с. Микрокапли подвергали считыванию с помощью проточного анализатора капель, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Для детекции ДНК использован набор «РеалБест Экстракция 100» (Вектор-Бест, Россия). Для выполнения реакции LAMP использованы олигонуклеотиды, описанные ранее [10] с дополнительным включением оригинальных последовательностей петлевых праймеров (LF и LB), разработанных с применением интернет-сервиса PrimerExplorer V5. Синтез олигонуклеотидов выполнялся в ООО «ДНК-Синтез», Россия.

Для постановки LAMP готовили реакционную смесь объёмом 25 мкл, включающую 0,8 М бетаин, 6 mM MgSO<sub>4</sub>, 1X изотермический буфер (New England Biolabs, Англия), 1,4 mM dNTP, 0,2 мкл 1X EvaGreen (НПО «Синтол», Россия), 8 ед. Bst 2.0 полимеразы (New England Biolabs, Англия), 0,2 μM праймеров F3 и B3, 1,6 μM праймеров FIP и BIP, 0,4 μM праймеров LF и LB, 5 мкл ДНК. Анализ проводили на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad) при постоянной температуре 63°C. Результаты тестирования выражали в минутах до появления стабильного флуоресцентного сигнала.

LAMP без использования этапа выделения ДНК проводили следующим образом: клеща помещали в пластиковую пробирку объёмом 1,5 мл, в которую добавляли готовую для LAMP реакционную смесь в объёме 50 мкл. Стеклопипеткой проводили его тщательное перетирание в течение 2-х мин 25 мкл полученного гомогената использовали для постановки LAMP. Параллельно проводили сравнение с результатами реакции в ПЦР-РВ. Для

этого оставшийся объём гомогената растертых клещей однократно отмывался 0,9% раствором NaCl от реакционной смеси и далее выделяли ДНК и выполняли ПЦР-РВ коммерческим набором по стандартному протоколу производителя.

Классический анализ ПЦР-РВ выполняли с использованием набора «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l./РНК ВКЭ» (Вектор-Бест, Россия) в соответствии с инструкцией производителя.

Статистический анализ результатов осуществляли с помощью программы Statistica 12.0 (StatSoft, США). Результаты представляли в виде медианы (Me) и межквартильного диапазона (Q25%-Q75%). Использовали методы описательной статистики, корреляционного анализа и ROC-анализа.

**Результаты. Влияние дополнительных петлевых праймеров на время детекции положительных образцов.** Для оценки влияния петлевых праймеров на ход реакции проведено тестирование стандартного положительного образца в 3-х повторах с использованием двух реакционных смесей: первая приготовлена с добавлением всех шести олигонуклеотидов, вторая соответствовала описанию в статье [10] и не имела в своем составе двух петлевых праймеров. Результаты эксперимента изображены на рис. 1.

Добавление в реакционную смесь петлевых олигонуклеотидов сократило время реакции на 15 минут. Флуоресцентные сигналы отрицательных образцов наблюдались не ранее, чем через 60 мин, как при использовании исходной методики, так и модифицированной, что свидетельствует о достаточной специфичности теста.

**Оценка предела аналитической чувствительности модифицированной реакции LAMP.** Разведённые аликвоты разработанного стандартного плазмидного образца протестированы с использованием LAMP. Результаты реакции показаны в табл. 1.

Максимальное разведение, при котором происходит детекция флуоресцентного сигнала, составляет 4 копии/мкл или 21 молекула добавленной в реакцию плазмидной ДНК, что сравнимо с данными о пределе чувствительности метода, описанного в статье [10].

**Сравнение диагностической эффективности модифицированного метода LAMP и коммерческого**

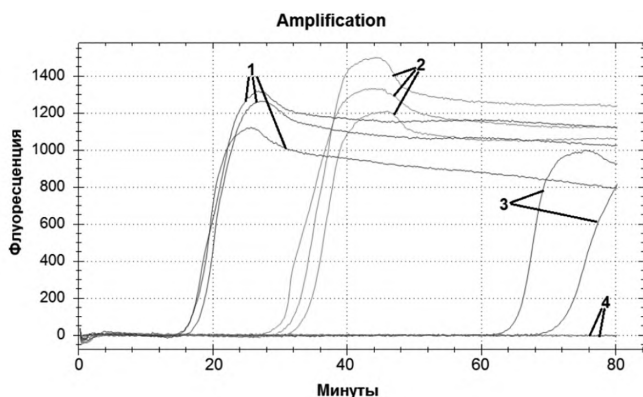


Рис. 1. Кривые флуоресценции положительных и отрицательных образцов ДНК на боррелиоз. 1 – положительные образцы на смеси с 6-ю праймерами, 2 – положительные образцы на смеси с 4-мя праймерами, 3 – отрицательные образцы на смеси с 6-ю праймерами, 4 – отрицательные образцы на смеси с 4-мя праймерами.

**метода ПЦР-РВ.** Для сравнения чувствительности разработанного теста в качестве референсного метода использовали классическую ПЦР-РВ. В качестве матрицы использовали равное количество (по 5 мкл) ДНК, выделенной из клещей. Результаты реакций, в которых выявлена ДНК боррелий, представлены в табл. 2.

Из 20 положительных проб, выявленных с помощью ПЦР-РВ, в реакции LAMP оказались положительными 18. Расчётная чувствительность разработанного теста составила 90%, специфичность составила 100% (95% доверительный интервал (95% ДИ) = 0,82-0,99,  $p < 0,0001$ , AUC=0,950) (рис. 2). При этом оба не совпадающих образца имели пороговые циклы ПЦР больше 32, что свидетельствует, вероятно, о низкой концентрации ДНК боррелий в пробе. Все 16 отрицательных образцов в ПЦР-РВ совпали и в LAMP.

**Постановка реакции LAMP без выделения ДНК.**

Для проверки возможности использования LAMP для детекции боррелиоза без этапа выделения ДНК, исполь-

Таблица 1

**Время детекции положительного результата в последовательно разведенных аликвотах плазмидной ДНК боррелий**

Количество копий плазмидной ДНК в пробе	Количество измерений (из них положительные)	Время детекции положительного результата, мин (Me; Q25-Q75%)
2078	10 (10)	16,5; 16,1-18,6
208	21 (21)	19,4; 19,2-20,2
21	26 (26)	22,0; 20,6-22,4
2	7 (2)	32,0

Таблица 2

**Сравнение результатов тестирования положительных образцов в реакции LAMP и ПЦР-РВ**

Образец	ПЦР (5 мкл ДНК), Ct	LAMP (5 мкл ДНК), мин
<b>КЛ8221</b>	<b>34,0</b>	<b>Н/Д</b>
КЛ8151	32,5	15
КЛ8168	32,3	23
КЛ8212	32,2	14
<b>КЛ8249</b>	<b>32,1</b>	<b>Н/Д</b>
КЛ8186	31,8	19
КЛ3952	31,6	13
КЛ8124	31,2	23
КЛ8239	30,6	13
КЛ8200	30,0	16
КЛ8139	29,9	13
КЛ3903	29,4	14
КЛ3857	29,0	12
КЛ8170	28,7	15
КЛ8197	28,4	13
КЛ8251	26,7	16
КЛ8259	26,7	11
КЛ8290	25,9	11
КЛ8303	24,8	12
КЛ3938	21,8	11

**Примечание.** Здесь и в табл. 3: Н/Д – сигнал флуоресценции не детектировался. Жирным шрифтом выделены образцы с отличными друг от друга результатами тестирования на обоих методах.

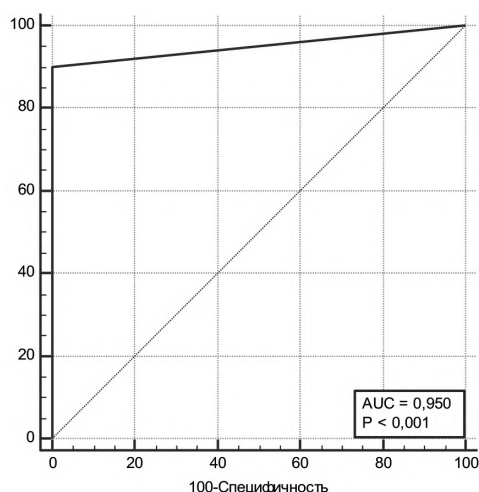


Таблица 3

Сравнение результатов LAMP без предварительного выделения ДНК и результатов параллельной ПЦР-РВ

Образец (клещ)	ПЦР, Ct	LAMP, мин
КЛ23	Н/Д	Н/Д
КЛ24	Н/Д	Н/Д
КЛ25	29,1	29
КЛ26	26,2	45
КЛ27	Н/Д	Н/Д
КЛ28	30	27
КЛ29	Н/Д	Н/Д
КЛ30	33,4	33
КЛ31	Н/Д	Н/Д
КЛ32	Н/Д	Н/Д
КЛ33	Н/Д	Н/Д

Рис. 2. ROC-кривая, построенная по результатам детекции ДНК боррелий с помощью LAMP в сравнении с ПЦР-РВ.

зовали в качестве образцов растертых клещей при их непосредственном помещении в реакционную смесь для проведения LAMP. Полученные результаты представлены в табл. 3. Из 11 исследованных клещей, в четырёх обнаружена ДНК возбудителя ИКБ, при этом результаты в LAMP и ПЦР-РВ полностью совпали. Это свидетельствует об устойчивой работе LAMP даже в присутствии сложных биологических смесей, потенциально содержащих большое количество ингибирующих ферментативные реакции соединений.

**Обсуждение.** Актуальность разработки экспресс-методов детекции ДНК возбудителей клещевых инфекций не вызывает сомнений в связи с необходимостью принятия мер экстренной индивидуальной профилактики при присасывании инфицированных клещей или для оперативного проведения дифференциального диагноза при поступлении пациентов с симптомами нейроинфекции. Технологии изотермической амплификации представляются идеальным решением данных проблем ввиду достаточно быстрого получения результата с возможностью его визуальной оценки в полевых условиях, отсутствия необходимости использования дорогостоящего и громоздкого оборудования для амплификации нуклеиновых кислот. Дополнительное преимущество имеют варианты технологических решений прямой детекции ДНК без необходимости специальной предварительной процедуры ее выделения.

Авторы методики LAMP [9] использовали в работе клещей рода *Ixodes* китайского ареала обитания, однако, представители вида *Ixodes persulcatus* ими не включены в исследование, что оставляет открытым вопрос однозначного переноса полученных авторами результатов на виды, обитающие в таёжных регионах Сибири.

В основе дизайна олигонуклеотидных праймеров в нашей разработке мы использовали описанные в статье последовательности [10]. Хотя метод этих авторов не апробирован на клещах, но он показал свою высокую эффективность на образцах крови пациентов. Наше решение позволяет надеяться, что разработанная модификация будет равно эффективна при детекции ДНК возбудителей ИКБ как в клещах, так и в биологических образцах пациентов. С целью повышения специфичности метода и получения более быстрого результата реак-

ции мы добавили к описанным праймерам оригинально сконструированные последовательности дополнительных петлевых праймеров (LB, FB). Внедрение этих праймеров сократило время получения флуоресцентного сигнала от положительных образцов (см. рис. 1), при этом модификация не сказалась на чувствительности или специфичности метода. Использование разработанной модификации метода при тестировании коллекционных образцов ДНК продемонстрировало приемлемую сопоставимость с результатами их тестирования на коммерческом наборе для ПЦР-РВ.

При использовании теста для детекции боррелий в клещах, где они выявляются даже визуально в световом микроскопе, предел аналитической чувствительности не так важен, как в случае анализа в биологических жидкостях пациента. Для целей настоящей разработки использования диагностического теста в полевых условиях более важным является время выполнения исследования и его специфичность. Достигнутые значения этих показателей вполне приемлемы и позволяют надеяться на реализацию метода на базе портативных устройств.

Важным результатом работы является демонстрация возможности использования разработанного метода для выявления инфекционного агента в клещах без предварительного этапа выделения ДНК, что значительно уменьшает время выполнения теста и делает его более удобным для использования в полевых условиях.

В настоящей работе исследована небольшая выборка клещей и выявление положительных результатов LAMP в клещах требует больше времени, чем при тестировании плазмидных стандартных образцов. Мы не получили пока окончательных данных о диагностической эффективности метода при исследовании образцов биологического материала пациентов. Требуется дальнейшая разработка технология визуальной детекции результата LAMP, приемлемой для использования в «полевых» условиях. Указанные задачи будут решаться в период очередного эпидемического сезона.

**Выводы:**

1. Разработан модифицированный изотермический метод детекции ДНК возбудителей ИКБ из преобладающих на территории России клещей *Ixodes persulcatus*, позволяющий ускорить получение результата тестирования.
2. Предел аналитической чувствительности метода LAMP, оцениваемый по стандартной рекомбинантной

плазмиде, составил составляет 21 молекулу в пробе или 4 копии/мкл.

3. При тестировании коллекционных проб ранее выделенной из клещей ДНК, совпадение результатов с ПЦР-РВ положительных образцов составило 90% (18 из 20 проб), а отрицательных 100% (16 из 16 проб).

4. Впервые продемонстрирована возможность детекции ДНК боррелий методом LAMP в клещах без выполнение предварительной процедуры выделения ДНК.

---

#### ЛИТЕРАТУРА (pp. 5–10 см. REFERENCES)

1. Лобзин Ю.В., Усков А.Н., Козлов С.С. Лайм-боррелиоз (иксодовые клещевые боррелиозы). Санкт-Петербург: Фолиант; 2000.
2. Оберт А.С., Дроздов В.Н., Рудакова С.А. Иксодовые клещевые боррелиозы: Нозогеографические и медико-экологические аспекты. Новосибирск: Наука; 2001.
3. Рудакова С.А., Пеньевская Н.А., Рудаков Н.В., Пакскина Н.Д., Савельев Д.А., Блох А.И. Интенсивность и тенденции развития эпидемического процесса иксодовых клещевых боррелиозов в Российской Федерации в 2002–2018 гг. и прогноз на 2019 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2019; (2):22-9.
4. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. Доступно по ссылке: [https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=14933](https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933).

---

#### REFERENCES

1. Lobzin Yu.V., Uskov A.N., Kozlov S.S. Lyme borreliosis (Ixodic tick-borne borrelioses). St. Petersburg: Foliant; 2000. (in Russian)
2. Obert A.S., Drozdov V.N., Rudakova S.A. Ixodic tick-borne borrelioses: Geographical and medical-ecological aspects. Novosibirsk: Nauka; 2001. (in Russian)

3. Rudakova S.A., Pen'evskaya N.A., Rudakov N.V., Pakskina N.D., Savel'ev D.A., Blokh A.I. Intensity and trends in development of epidemic process of ixodes tick-borne borrelioses in the Russian Federation in 2002-2018 and forecast for 2019. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2019; (2):22-9. (in Russian)
4. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2020. Available from: [https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT\\_ID=14933](https://www.rosпотребнадзор.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=14933) (In Russian)
5. Schutzer S.E., Body B.A., Boyle J., Branson B.M., Dattwyler R.J., Fikrig E. et al. Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease. *Clinical Infectious Diseases*. 2019; 68(6):1052-7.
6. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Ushikubo H. Principle of LAMP method – a simple and rapid gene amplification method. *Uirusu*. 2004;54(1):107-12. DOI: 10.2222/jsv.54.107.
8. Kaneko H., Kawana T., Fukushima E., Suzutani T. Tolerance of loop-mediated isothermal amplification to a culture medium and biological substances. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007; 70(3):499-501. DOI: 10.1016/j.jbbm.2006.08.008.
9. Yang J., Guan G., Niu Q., Liu Z., Li Y., Liu J. et al. Development and application of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Borrelia burgdorferi* s. l. in ticks. *Transbound Emerg. Dis*. 2013; 60(3):238-44. DOI: 10.1111/j.1865-1682.2012.01335.x.
10. Zhang L.L., Hou X.X., Geng Z., Lou Y.L., Wan K.L., Hao Q. Combination of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Nested PCR for Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Human Serum Samples. *Biomed. Environ. Sci*. 2015; 28(4):312-5. DOI: 10.3967/bes2015.044.