

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-241

РАЗРАБОТКА ДИАГНОСТИЧЕСКОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВИРУСА *MAMMARENAVIRUS JUNINENSE* НА ОСНОВЕ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ RPA***DEVELOPMENT OF DIAGNOSTIC SYSTEM FOR *MAMMARENAVIRUS JUNINENSE* VIRUS DETECTION BASED ON ISOTHERMAL AMPLIFICATION RPA**М. А. Капитонова^{1,2}, А. В. Шабалина¹, В. Г. Дедков^{1,3}, А. С. Долгова¹¹Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера²Санкт-Петербургский государственный университет³Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е. И. Марциновского, МоскваM. A. Kapitonova^{1,2}, A. V. Shabalina¹, V. G. Dedkov^{1,3}, A. S. Dolgova¹¹Saint Petersburg Pasteur Institute²Saint Petersburg State University³Martsinovskiy Institute of Medical Parasitology, Tropical and Vector Borne Diseases, Moscow

✉ kapitonova.marin@gmail.com

Аннотация

В данной работе представлена разработка и тестирование двух способов обнаружения вируса *Mammarenavirus juninense* на основе изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA). Первый способ представляет собой совмещение RPA и метода детекции DETECTR на основе специфической нуклеазы Cas12a в одной пробирке. Второй способ детекции — RPA с обратной транскрипцией в реальном времени. Лимит детекции данного метода — менее 10 копий РНК фрагмента вируса.

Abstract

Here we present the development and testing of two methods for *Mammarenavirus juninense* virus detection based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA). The first method is a combination in a single tube of RPA and the DETECTR based on a specific nuclease activity of Cas12a. The second method is a real-time RPA with reverse transcription. The detection limit of the second approach is less than 10 copies of RNA.

Mammarenavirus juninense (JUNV) — это РНК-содержащий вирус из семейства *Arenaviridae*, рода *Mammarenavirus*. Для человека JUNV является возбудителем Аргентинской геморрагической лихорадки (АГЛ). Естественным носителем данного вируса является грызун *Calomys musculus*. Путь передачи вируса к человеку — непосредственный контакт или вдыхание аэрозолей от выделений инфицированных грызунов. Кроме того, зарегистрированы случаи передачи вируса от человека к человеку. Инкубационный период АГЛ составляет от 6 до 12 дней. Первыми появляются гриппоподобные симптомы, на вторую неделю заболевания возможно развитие тяжелых неврологических и геморрагических симптомов. Уровень смертности госпитализированных пациентов оценивается до 20 %. По подсчетам, около пяти миллионов людей находятся под риском заражения АГЛ [1]. Диагностика АГЛ производится на основе клинических и лабораторных анализов. Однако данные тесты могут занимать продолжительное время и требовать специального дорогостоящего оборудования, например амплификаторов реального времени, не всегда доступных в лабораториях стран Южной Америки. Поэтому остается актуальной задачей разработка дополнительных, в частности изотермических, методов быстрой диагностики АГЛ.

В данной работе представлены два метода обнаружения РНК вируса JUNV на основе изотермической рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA): 1) при помощи платформы DETECTR с использованием нуклеазы Cas12a, совмещенной с RPA в одной пробирке (DETECTR/RPA); 2) RPA с обратной транскрипцией в режиме реального времени с использованием специфических модифицированных зондов (RT-RPA ехо). В качестве участка для детекции на основе биоинформатического анализа выбран консервативный участок гена L-сегмента длиной 158 нуклеотидов.

В основе диагностической платформы DETECTR лежит способность фермента Cas12a к коллатеральной нуклеазной активности [2]. Для амплификации использованы реактивы из набора TwistAmp® Liquid Basic

* Исследование выполнено при поддержке государственной программы «Обеспечение химической и биологической безопасности Российской Федерации».

(TwistDx™, UK). Для проведения реакций амплификации и детекции в одной пробирке 14 мкл смеси для RPA (содержащей специфические праймеры к участку JUNV) наносятся внутрь пробирки и 10 мкл смеси DETECTR (с Cas12a, гРНК и зондом) — на крышку пробирки. В смесь для RPA добавляется 1 мкл образца нуклеиновых кислот, пробирка аккуратно закрывается и инкубируется 30 мин при +40 °С для прохождения амплификации. После этого капли с крышек сбрасываются, пробы перемешиваются и ставятся в прибор для регистрации флуоресцентного сигнала при +40 °С в течение 30 мин.

Для проведения анализа RT-RPA echo используется набор TwistAmp® echo kit (TwistDx™, UK). Подобран специфический флуоресцентный зонд с модификацией dSpacer CE фосфорамидит, в области которого происходит расщепление при комплементарной связывании с последовательностью мишени. Подобрана оптимальная концентрация обратной транскриптазы M-MuLV 0,5 мкл 200 U/ml на 1 реакцию 50 мкл. Анализ осуществляется при +40 °С за 20 мин.

Для тестирования обоих методов собраны положительные рекомбинантные контрольные образцы, включающие диагностическую область-мишень и фланкирующие последовательности. Контрольный образец ДНК К+ представляет собой линейную молекулу 620 п. о., РНК К+ — его транскрибированный аналог, а ПКО К+ — оболочки MS2-фага с РНК, содержащей целевой фрагмент. Концентрации ДНК и РНК К+ измерены при помощи Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрация РНК ПКО К+, выделенной набором «РИБО-преп» (АмплиСенс®, Россия), измерена методом ddPCR (BioRad, США). Все реакции и анализ флуоресцентного сигнала проведены на амплификаторе CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

Разработанные методы оптимизированы для достижения наибольшей чувствительности детекции. Подобраны условия для прохождения каждой реакции: температура и время. Выбраны специфические праймеры для изотермической амплификации, геновая РНК, флуоресцентный зонд для RPA echo и неспецифический зонд DETECTR. Лимит детекции метода DETECTR/RPA составляет менее 100 копий на реакцию для ДНК К+. RT-RPA echo показал лимит детекции менее 10 копий/мкл для РНК К+ и 50 копий/мкл ПКО К+. Таким образом, в данной работе представлены методы DETECTR/RPA и RT-RPA echo для достоверной диагностики вируса JUNV в изотермических условиях за 60 и 20 мин соответственно.

Литература

1. Gómez R. M., Jaquenod de G. C., Sanchez V. M. M. et al. Junin virus. A XXI century update // *Microbes and Infection*. 2011. Vol. 13 (4). P. 303–311.
2. Das A., Goswami H. N., Whymys C. T. et al. Structural principles of CRISPR-Cas enzymes used in nucleic acid detection // *Journal of Structural Biology*. 2022. Vol. 214. P. 107838.