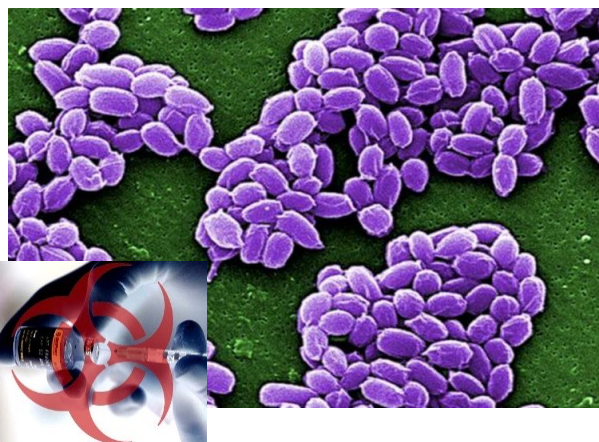


Новые методологии в разработке средств ускоренного выявления возбудителя сибирской язвы

Диагностика сибиреязвенной инфекции в плане детекции спор и вегетативных клеток возбудителя сибирской язвы достаточно хорошо разработана. Наряду с культуральными методами выделения патогена и его микробиологической идентификации уже созданы и зарегистрированы (ФБУН ГНЦ ПМБ) ускоренные методы выявления возбудителя, его спор с помощью иммунохроматографического (ИХ) анализа и иммуно-ПЦР для выявления протективного антигена и летального фактора возбудителя сибирской язвы, а также новый высокоспецифичный бактериофаг Оболенск-R1 (запатентован и зарегистрирован). Однако эти методы имеют некоторые недостатки.



ИХ-тесты специфично выявляют возбудитель и дифференцируют его от других бацилл при исследовании колоний, выросших на чашках после их ресуспендирования и нанесения на тест. Чувствительность метода – 10^5 – 10^6 клеток/мл, что делает его мало приемлемым для определения во внешней среде (скотомогильники) или в сибиреязвенных карбункулах и крови зараженного. В настоящее время мы развиваем этот метод с целью повышения чувствительности с помощью флуоресцентной метки, что позволяет выявлять клетки в концентрации до 10^3 (сравнимо с ПЦР). Для широкого внедрения данного метода необходимы отечественные недорогие флуоресцентные ридеры, которые находятся в стадии разработки.

Метод иммуно-ПЦР для выявления протективного антигена и летального фактора (наиболее значимого фактора вирулентности) высокочувствителен, однако не находит массового спроса из-за сложностей в постановке самой реакции (множество операций), а также дорогостоящ в производстве и имеет небольшой срок хранения. Автоматизация метода с помощью специальных приборов может решить эту задачу, что уже сделано в зарубежных странах.

Что касается использования бактериофага для диагностики, то для быстрого получения результата такой подход неприемлем. Им пользуются только для специальных целей. Например, мы применяли фаг для выявления патогена в сложных смесях с содержанием малого количества клеток возбудителя в реакции нарастания титра фага. Однако это направление могло бы развиваться при современных подходах с использованием наночастиц и автоматической регистрации взаимодействия фаг–клетка.

Нами разработан и зарегистрирован ПЦР-набор для определения в окружающей среде ДНК одновременно возбудителей чумы, туляремии и сибирской язвы («MULTI-FLU сухой вариант»), который пользуется большим спросом. Мультиплексные ПЦР наиболее перспективны в отношении развития биодетекции. В 2015 г. нами создана изотермическая LAMP-ПЦР для выявления возбудителя *Bacillus anthracis* во внешней среде. Метод LAMP хорошо зарекомендовал себя для массовых анализов как менее трудоемкий по сравнению с ПЦР, но для дискретных исследований, например выявления особо опасных инфекций, он малоприменим. Перспективно его использование при совмещении с CRISPR-Cas-детекцией.

Нами разработана технология выявления сибиреязвенного микроба на основе CRISPR-Cas-системы, отличающаяся сверхвысокой специфичностью. Основная задача этой технологии в настоящее время – повышение чувствительности с применением LAMP, PSR, RPA. Для целей биодетекции в мире обычно используют платформу SHERLOCK, которая выявляет РНК-мишень в образцах

с помощью комплексов gRNA-Cas13, или DETECTR, которая выявляет ДНК-мишень с помощью комплексов gRNA-Cas12a. Для выявления конечного продукта используется флюоресценция или иммунохроматография. Нами разработана гидовая РНК для сибиреязвенного микроба, а также создан продуцент универсального фермента Cas12a, который может производиться в больших количествах. Это наиболее перспективное направление в диагностике, которое развивается в мире ускоренными темпами. Однако высокая специфичность метода может дать отрицательный результат, связанный даже с незначительными изменениями в целевых генах, хотя эта проблема решается с разработкой мультиплексных вариантов метода.

Следует отметить несколько новых направлений в биодетекции сибиреязвенного микроба, которые могут войти в практику лабораторий.

В частности, проведена работа, аналогичная нашей, с применением другой нуклеазы. В данном исследовании разработана высокочувствительная технология экспресс-диагностики *B. anthracis*, когда метод множественной ферментативной изотермической быстрой амплификации (MIRA, сходна с нашим LAMP) был интегрирован с системой обнаружения регулярно расположенных коротких палиндромных повторов CRISPR-ассоциированного белка 13a (CRISPR/Cas13a). После тестирования выбора crRNA, праймеров MIRA, температуры реакции и условий обнаружения CRISPR система обнаружения CRISPR/Cas13a с использованием двух crRNA достигла предела обнаружения 1000 копий/мл для *B. anthracis*. Дополнительно был проведен количественный анализ. По сравнению с другими распространенными патогенами, анализ продемонстрировал высокую специфичность. В клинически смоделированных образцах все 20 положительных образцов были правильно идентифицированы, а все 13 отрицательных были однозначно классифицированы как отрицательные. На основе этих результатов разработана технология экспресс-диагностики. Благодаря разработке портативного устройства для экспресс-тестирования с использованием технологии CRISPR в сочетании с проверенной системой лиофилизированных реагентов устройство достигло предела обнаружения 250 копий/мл и выдавало результаты в течение 30 мин. Все образцы были точно классифицированы на положительные и отрицательные. Таким образом, данное исследование представляет собой высокочувствительную и портативную технологию для экспресс-диагностики *B. anthracis*. Она также может иметь значение для экспресс-диагностики других инфекционных заболеваний. Эта работа свидетельствует о том, что направление биодетекции, связанное с использованием CRISPR/Cas-технологии, интенсивно развивается и для обнаружения особо опасных инфекций, в т.ч. с использованием и других нуклеаз, в частности Cas13a (doi.org/10.1111/1751-7915.70240).

Еще две работы касаются разработки современных биосенсоров, т.е. направления, которое для развития индикаторных процедур представляется особенно важным в сфере обеспечения биологической безопасности.

Описан электрохимический иммуносенсор для выявления *B. anthracis*, отличающийся несложной методологией биодетекции с использованием золотого электрода, функционализированного самоорганизующимся монослоем на основе тиола и золотых наночастиц в качестве носителей антител, что повышает чувствительность за счет увеличения площади поверхности для связывания антигена. Инновационным является интеграция регенерируемой золотой поверхности, простого электрохимического метода считывания на основе циклической вольтамперометрии и потенциала миниатюризации до портативных форматов, что обеспечивает быструю диагностику на месте. В отличие от некоторых существующих биосенсоров, которые основаны на аптамерах или ферментативном усилении сигнала, эта система основана на прямом взаимодействии антигена и антитела с минимальной сложностью реагентов. Платформа предлагает многообещающую альтернативу для раннего обнаружения спор сибирской язвы в окружающей среде или в чрезвычайных ситуациях, особенно там, где быстрое принятие решений имеет решающее значение.

Основным достижением данного исследования является разработка методологии модификации электрохимических преобразователей, позволяющей селективно и чувствительно обнаруживать споры *B. anthracis* даже в присутствии других бактерий, включая близкородственные виды *Bacillus*. Полученные биосенсоры на основе модифицированных золотых электродов продемонстрировали высокую чувствительность и специфичность к целевому антигену и при использовании в лабораторной системе циклической вольтамперометрии позволили обнаруживать споры *B. anthracis* в концентрациях всего 10^3 клеток на мл. Процесс измерения выполняется за один этап без сложной пробоподготовки, требуя лишь микролитрового объема образца. Кроме того, использование одноразовых электродов исключает риск перекрестного загрязнения и необходимость дезинфекции после измерения.

Электрохимические биосенсоры – это относительно новый тип сенсоров, используемых для обнаружения биомолекул, таких как ДНК или белки. Электрохимическое детектирование осущест-

вляется с использованием трехэлектродной системы: рабочего электрода, на котором происходит реакция переноса электронов, электрода сравнения, поддерживающего стабильный потенциал относительно рабочего электрода, и вспомогательного электрода, который, помимо прочих функций, снижает сопротивление раствора.

В данной работе использовано моноклональное антитело к антигену спор *B. anthracis* SA26 и 6 типов моноклональных антител против спор *B. anthracis* (клоны антител класса IgG2a: B57G, G46D, SA27, 3G302 и 5E218). В ГНЦ ПМБ также наработана большая панель моноклонов против данного микроба, на чем и построена зарегистрированная ИХ-тест-система для выявления спор. Для определения специфичности работы сенсора в данной работе был использован большой набор близкородственных бацилл в виде суспензии спор: *B. mycoides*, *B. thuringiensis*, *B. thuringiensis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus* (3 штамма), *B. subtilis*, *B. anthracis*, и суспензия вегетативных клеток *Escherichia coli*. Полученные результаты весьма репрезентативны, что говорит о перспективности метода, особенно для поиска возбудителя во внешней среде – скотомогильниках, стационарно неблагополучных пунктах, почтовых отправлениях (пример – биотеррористический акт в США в 2001 г.).

По сравнению со стандартными диагностическими методами, такими как ПЦР и иммуноферментный анализ, разработанный биосенсор значительно сокращает время анализа. Данный метод дает результат менее чем за 15 мин, ПЦР – 1,5–3,0 ч, ELISA – 2,0 ч, FET-биосенсор – 30 мин, SPR-биосенсор – 45 мин. И еще одно неоспоримое преимущество перед всеми – миниатюризация оборудования. doi.org/10.3390/s25195948

Хорошо известно, что дипиколиновая кислота является важным компонентом бактериальных эндоспор, обеспечивая их термостойкость, и обнаруживается в высоких концентрациях в эндоспорах видов *Bacillus* и *Clostridium*. В этой связи еще один биосенсорный метод выявления *B. anthracis* основан на быстром и точном обнаружении биомаркера сибирской язвы – 2,6-пиридиндикарбоновой кислоты (DPA). Разработан новый метод обнаружения DPA с использованием двухэмиссионного флуоресцентного сенсора на основе органического висмута (Bi-MOF). Этот сенсор (Eu@Bi-MOF) получен путем функционализации Bi-MOF ионами Eu³⁺, синтезированного с использованием нитрата висмута в качестве металлического узла и 1,3,5-фенилтрикарбоновой кислоты в качестве лиганда, с помощью метода постсинтетической модификации. Метод показал высокую чувствительность флуоресцентной реакции на DPA. В присутствии DPA интенсивность флуоресценции сенсора Eu@Bi-MOF при 438 нм остается неизменной, в то время как красное флуоресцентное излучение при 615 нм значительно подавляется из-за эффекта внутренней фильтрации. Соотношение интенсивности флуоресценции 438/615 показало хорошую линейную зависимость от концентрации DPA в диапазоне 0,5–60 мкМ, а предел обнаружения составлял всего 0,36 мкМ. Этот метод представляет собой чувствительную и надежную альтернативную стратегию для быстрого мониторинга DPA. Таким образом, датчик Bi-MOF позволяет быстро выявлять биомаркеры сибирской язвы, что также является важным инструментом для скрининговых исследований внешней среды и подозрительных порошков. doi.org/10.1039/D5NJ01946J

Таким образом, развитие методик ускоренного выявления спор и вегетативных клеток возбудителя сибирской язвы ведется в трех основных направлениях – генодиагностика с высокой чувствительностью и специфичностью; иммунодиагностика на основе моноклональных антител к поверхностным антигенам спор и клеток; сенсорные технологии, в т.ч. с применением иммунохимических реакций. Все эти направления в основном связаны с развитием приборной базы для биодетекции, позволяющей многократно увеличивать сигнал от специфической реакции для его визуализации или автоматического регистрирования. Без этого условия будет достаточно сложно повысить чувствительность методов выявления патогена и ускорить получение достоверного результата.

Главный редактор, академик РАН И.А.Дятлов