

## Тест система для лабораторного выявления и дифференциации вируса Повассан от вируса клещевого энцефалита методом PCR и Real-Time qPCR

Научный руководитель – Карганова Галина Григорьевна

Федина М.П.<sup>1</sup>, Литов А.Г.<sup>2</sup>

1 - Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, E-mail: mfedina147@gmail.com; 2 - Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия, E-mail: novosti-wxo@yandex.ru

Вирус Повассан (POWV) (*Orthoflavivirus powassanense*) относится к семейству *Flaviviridae*, является арбовирусом, переносимым клещами. Вирус поражает центральную нервную систему людей, вызывая менингит, энцефалит, менингоэнцефалит, и является эндемичным в США, Канаде и России. На Дальнем Востоке России ареал POWV перекрывается с другим нейротропным вирусом, переносимым клещами, – вирусом клещевого энцефалита (TBEV). Клинические проявления болезней, вызываемые этими вирусами, схожи, при этом в зоне симпатрии оба вируса имеют общего переносчика – клеща *Ixodes persulcatus*. В связи с этим необходимы тест системы для дифференциального выявления этих вирусов в одной реакции или в смеси, поскольку нельзя исключить такое явление как коинфекция. Существуют импортные тест системы для детекции POWV и отечественные для TBEV на основе PCR и Real-Time qPCR. Однако эти системы не способны различать оба вируса в смеси, так как в них используются праймеры на консервативные участки геномов.

Целью данной работы являлось создание дифференцирующей тест системы для выявления POWV в смеси с TBEV и другими ортофлавивирусами. Для этого были подобраны праймеры и зонд на основе выравниваний последовательностей геномов восьми штаммов POWV и пяти штаммов TBEV. Специфичность праймеров была проверена с помощью PCR и последующего электрофореза с использованием шести штаммов разных подтипов TBEV и других ортофлавивирусов. Такой же эксперимент был проведен для метода Real-Time qPCR с использованием зонда и стандартов. Далее была оценена возможность измерять количество POWV в присутствии TBEV и наоборот с помощью известных концентраций вируса/ов в пробе методом Real-Time qPCR. Для точной диагностики POWV или TBEV в смеси нами дополнительно были подобраны и проанализированы олигонуклеотиды, поднимающие большие участки структурной области геномов POWV и TBEV для последующего секвенирования, поскольку разработанную тест систему на основе qPCR трудно верифицировать с помощью секвенирования.

Данная система продемонстрировала специфичность, не дав сигналов ни с одним из штаммов TBEV и других ортофлавивирусов. Предел обнаружения POWV составил  $1,6 \cdot 10^4$  копий/мл при эффективности амплификации равной 99,2%. Для каждой группы праймеров, способных поднимать большие участки структурной области геномов POWV и TBEV, экспериментально были найдены оптимальные условия амплификации. Пять из шести пар праймеров показали хорошие результаты по дифференцированию вирусов в смеси.

Созданная нами тест система для детекции POWV и дифференциации этого вируса от других ортофлавивирусов может быть использована как для лабораторного применения, так и для создания коммерческого набора для дифференциальной диагностики и проведения мониторинга.