

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра биофизики
кафедра

УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
_____ В.А. Кратасюк
подпись, инициалы, фамилия
« _____ » _____ 2021 г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

код – наименование направления

Использование метода LAMP для диагностики клещевых боррелиозов
тема

Руководитель	_____	<u>д-р физ.-мат. наук.</u>	<u>Столяр С.В.</u>
	подпись, дата	ученая степень	инициалы, фамилия
Научный консультант	_____	<u>канд. мед. наук.</u>	<u>Ольховский И.А.</u>
	подпись, дата	ученая степень	инициалы, фамилия
Выпускник	_____	<u>ББ17-31Б, 041722702</u>	<u>Васильева Д.И.</u>
	подпись, дата	группа, №	инициалы, фамилия

Красноярск 2021

РЕФЕРАТ

Бакалаврская работа по теме «Использование метода LAMP для диагностики клещевых боррелиозов» содержит 37 страниц текстового документа, 8 иллюстраций, 1 таблицу, 4 формулы и 45 источников литературы.

ИКСОДОВЫЙ КЛЕЩЕВОЙ БОРРЕЛИОЗ, БОЛЕЗНЬ ЛАЙМА, БОРРЕЛИИ, ИКСОДОВЫЕ КЛЕЩИ, ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ, ПЦР.

Цель работы: оценить возможность и эффективность диагностики клещевых боррелиозов методом LAMP. Для достижения поставленной цели были обозначены следующие задачи:

1. Оценить специфичность метода LAMP и получить значения уровня аналитической чувствительности;
2. Подобрать оптимальный способ визуальной детекции результата реакции для возможности использования метода в малооснащённых лабораториях или в полевых условиях;
3. Апробировать метод LAMP на образцах крови и на клещах без предварительного этапа выделения ДНК.

Актуальность исследования обусловлена высоким уровнем заболеваемости клещевым боррелиозом как на уровне страны, так и в Красноярском крае. Распространенные методы диагностики данной инфекции уступают методу петлевой изотермической амплификации по скорости выполнения анализа, уровню риска контаминации образцов и отсутствию необходимости в дорогостоящем оборудовании.

В результате проведенных работ определены значения диагностической чувствительности и специфичности (90% и 100% соответственно) метода LAMP, аналитическая чувствительность метода составила 21 копию плазмидной ДНК в пробе, а в качестве флуоресцентного красителя для визуальной детекции выбран бромистый этидий как наиболее эффективный. Метод LAMP успешно

апробирован на образцах крови и клещах без предварительного этапа выделения ДНК.

СОДЕРЖАНИЕ

РЕФЕРАТ	2
ВВЕДЕНИЕ	6
1 Обзор литературы	8
1.1 Иксодовый клещевой боррелиоз	8
1.1.1 Распространенность	8
1.1.2 Этиология.....	8
1.1.3 Патогенез.....	9
1.2 Применяемые методы диагностики боррелиоза	10
1.2.1 Метод иммуноферментного анализа (ИФА)	10
1.2.2 Метод полимеразной цепной реакции	11
1.3 Метод LAMP.....	12
1.3.1 Методы детекции результатов LAMP.....	16
1.3.1.1 Турбидиметрия	16
1.3.1.2 Флуоресцентная детекция	17
1.3.1.3 Использование интеркалирующих красителей.....	18
1.3.1.4 pH-чувствительные красители.....	19
1.3.1.5 Использование флуоресцентных зондов	19
1.3.2 Виды модификаций LAMP.....	20
1.3.2.1 LAMP с обратной транскрипцией	20
1.3.2.2 Мультиплексная LAMP	21
1.3.2.3 Электронная LAMP.....	21
1.3.2.4 LAMP на диске	22
2 Материалы и методы	23
2.1 Объекты исследования	23
2.2 Оценка специфичности и чувствительности метода LAMP	23
2.3 Исследование методом LAMP	24
2.4 Исследование методом ПЦР	24
2.5 Подбор оптимального способа визуальной детекции	24
2.6 Апробирование метода LAMP на образцах крови	25

2.7 Апробирование метода LAMP на образцах клещей без этапа выделения ДНК.....	25
3. Результаты.....	27
3.1 Оценка специфичности и чувствительности.....	27
3.2 Поиск оптимального способа визуальной детекции	27
3.3 Апробация метода LAMP на образцах крови	29
3.4 Апробация метода LAMP на образцах клещей без выделения ДНК.....	31
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	32
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	33

ВВЕДЕНИЕ

Клещевой боррелиоз (болезнь Лайма, лайм-боррелиоз, КБ) является природно-очаговым трансмиссивным заболеванием бактериального происхождения, активность клещей в природных очагах влечет за собой повышение случаев инфекционного заражения. Лайм-боррелиоз в настоящее время остается актуальной проблемой для стран Северной Америки и для многих стран Европы и Азии, но территория России также стала одним из наибольших ареалов распространения иксодовых клещей, переносящих возбудителя болезни. Комплекс спирохет вида *Borrelia burgdorferi sensu lato* включает в себя в настоящее время около 13 генотипов [1]. Основными патогенными видами боррелий для человека являются *B. burgdorferi*, *B. garinii*, *B. afzelii*, переносчиками которых становятся в частности *I. persulcatus* (таежный клещ) и *I. ricinus* (собачий клещ).

В России за 2019 год среди всех природно-очаговых инфекций ИКБ оказались на втором месте по частоте заболеваемости, потеряв лидирующую позицию 2018 года. В частности, показатели заболеваемости клещевыми боррелиозами (5,48 на 100 тыс. населения) превышают показатели заболеваемости клещевым вирусным энцефалитом (1,21 на 100 тыс. населения) в 4,5 раза [2]. В Красноярском крае клещевой боррелиоз также занимает ведущее место среди природно-очаговых заболеваний, показатель заболеваемости КБ по краю (13,6 на 100 тыс. населения) превысил средний показатель по Российской Федерации (5,48 на 100 тыс. населения) в 2,5 раза [3].

При клещевом боррелиозе происходит поражение многих систем организма: сердечно-сосудистая, нервная, также поражаются суставы и кожа. Клиническая картина осложняется переходом заболевания в хроническую форму [4]. Существующие методы диагностики боррелиоза основаны на поиске ДНК возбудителя методом ПЦР или на выявлении специфических антител методом ИФА. Несмотря на широкую распространенность данных методов, они имеют ряд недостатков: высокий риск контаминации образцов, длительное время

анализа и необходимость в наличии дорогостоящего оборудования. Альтернативным методом обнаружения характерной для патогенов последовательности ДНК является метод петлевой изотермической амплификации (LAMP). Его использование позволит устранить вышеперечисленные недостатки и получить информацию о наличии или отсутствии возбудителя.

Показано, что использование петлевых праймеров позволяет ускорить реакцию LAMP. Вместе с тем, модифицированная петлевыми праймерами методика ранее не оценивалась с точки зрения ее аналитической чувствительности и специфичности.

Цель работы – оценить возможность и эффективность диагностики клещевых боррелиозов методом LAMP.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Оценить специфичность метода LAMP и получить значения уровня аналитической чувствительности;
2. Подобрать оптимальный способ визуальной детекции результата реакции для возможности использования метода в малооснащённых лабораториях или в полевых условиях;
3. Апробировать метод LAMP на образцах крови и на клещах без предварительного этапа выделения ДНК.

1 Обзор литературы

1.1 Иксодовый клещевой боррелиоз

1.1.1 Распространенность

Начало болезни клещевого боррелиоза следует из города Old Lyme штата Коннектикут, в котором в 1970-х годах описали ряд случаев появления болезни в следствии укусов клещей, соответственно отсюда и возникло название. В Европе боррелиозная инфекция 12 лет имела разные названия: мигрирующая эритема, синдром Баннварта и др, но в 1982-м году был выделен возбудитель болезни и название обрело связь с ним. Еще через 10 лет официальная регистрация болезни Лайма началась и в России, а на данный момент эта болезнь является одной из самых распространенных инфекций, передающихся через клещей [5]. Клещевой боррелиоз вызывает множество вопросов, связанных с разнообразием клинических случаев, способах его лечения и диагностики и низкой осведомленностью населения. Человек достаточно восприимчив к возбудителю, что обусловлено высокой частотой хронизации, достигающей 30-40% полиморфности клинических проявлений [6]. Боррелиоз распространен в зонах леостепи по всей территории страны, начиная от Калининграда и заканчивая Сахалином. Наибольший уровень заболеваемости отмечен в Западносибирском, Волго-Вятском и Уральском округе страны. Ареал обитания клещей составляют пастбища, открытые местности, парки, городские улицы, садовые участки, скверы, кустарники и лесные зоны. Характерные пики активности клещей приходятся на весну и конец лета.

1.1.2 Этиология

Возбудители болезни Лайма – грамтрицательные ДНК-содержащие спирохеты *Borrelia burgdorferi*, *Borrelia afzelii* и *Borrelia garinii* из семейства Spirochaetaceae. В Северной Америке в большинстве случаев болезнь, вызываемая *B. burgdorferi*, проявляется артритом, поскольку это единственный

возбудитель, распространенный на данной территории. Заражение *B. afzelii* приводит к хроническому атрофическому дерматиту, а причиной неврологических проявлений является *B. garinii*. Мигрирующая эритема, несмотря на фенотипические и генотипические различия, является следствием активности всех вышеперечисленных возбудителей.

Естественным резервуаром *B. burgdorferi* являются млекопитающие (около 130 видов, преимущественно грызуны) и около 100 видов птиц, которым спирохета передается посредством укуса клеща. Акарифауна представлена приблизительно 60 видами иксодовых клещей, которые относятся к 14 родам и 2-м подсемействам [5].

1.1.3 Патогенез

В организме возбудитель вызывает генерализованный иммунный ответ в виде папулы на месте укуса, распространяясь лимфогенными и гематогенными путями по органам и тканям. На ранних стадиях болезни в организме начинают вырабатываться специфические антитела, прирост титра которых происходит по ходу протекания болезни. Персистенция может длиться несколько лет, что может привести к развитию васкулитов и сосудистой окклюзии. Антигены HLA-DR2(4) являются маркерами хронических артритов и нейроборрелиозов.

В общем случае болезнь подразделяется на несколько течений – подострое, острое и хроническое. Клиническая дифференцировка по стадиям – ранняя локальная инфекция, ранний диссеминированный боррелиоз и хронический боррелиоз на поздних стадиях. Период инкубации боррелий в организме составляет от 2 до 30 дней.

Симптомы первой стадии в 30% случаев составляют тошнота, головная боль, сонливость, потеря аппетита и субфебрильная лихорадка, продолжающаяся несколько дней. В месте укуса появляется отек и гиперемия, которая сопровождается болью и зудом. Отек постепенно распространяется от центра к краям. Обычно в области эритемы наблюдается повышенная

температура. Болезнь Лайма также может протекать без образования воспаления, но будет сопровождаться суставной или неврологической симптоматикой, что ухудшает качество диагностики заболевания.

На стадии диссеминированного боррелиоза происходит поражение сердца в виде артериовентрикулярной блокады 1 или 2 степени, нарушение сердечного ритма или внутренней проводимости желудочков сердца. В случае нарушения работы нервной системы возможны такие заболевания, как миелит, менингит, радикулоневрит и неврит черепно-мозговых нервов.

При хроническом боррелиозе возникает атрофический акродерматит, полиартрит, на фоне которых может развиваться В-клеточная лимфома. Без соответствующего лечения происходит деструкция костей и хрящей [5].

1.2 Применяемые методы диагностики боррелиоза

1.2.1 Метод иммуноферментного анализа (ИФА)

Специфическое связывание *антиген-антитело* является фундаментом серологического метода иммуноферментного анализа (ИФА, enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), образование которого выявляют с помощью ферментативной метки для регистрации сигнала. В связи со способностью метода определять различные объекты исследования, от низкомолекулярных соединений до бактерий, разработано большое количество типов этого метода, на что также влияет и вариативность условий проведения ИФА [7].

По рекомендации ВОЗ результаты данного метода следует подтверждать с помощью иммуноблота из-за вероятности выхода ложноположительных образцов ИФА [8]. Таким образом диагностика исследуемого образца проходит в два этапа.

Стоит заметить, что любой из способов проведения иммуноферментного анализа сводится к одному их скелету, состоящего из 3 стадий:

1. Происходит узнавание субстрата с антителом, в результате которого образуется иммунный комплекс;

2. Фермент-конъюгат связывается с комплексом антиген-антитело;
3. Ферментативная метка превращается в регистрируемый сигнал в ходе катализируемой ей реакции;

Ферментативные маркеры для ИФА отбираются по определенным критериям, в список которых входит высокая степень активности и стабильность фермента, наличие субстратов чувствительных к этому ферменту, изначальное отсутствие самого маркера и ингибиторов в биологической жидкости, выбранной для исследования и простота обнаружения продуктов ферментативной реакции.

Из-за высокой специфичности реакции фермент-субстрат, выбор субстрата опирается на фермент, используемый в роли метки. Также, как и для выбора фермента существует еще несколько требований к субстрату: ясное фиксирование продуктов реакции фермент-субстрат, безопасность и доступность субстрата [9].

1.2.2 Метод полимеразной цепной реакции

В основе метода полимеразной цепной реакции (ПЦР, PCR) лежит процесс экспоненциальной циклической амплификации ДНК, который проходит благодаря термостабильной полимеразе (Taq) бактерий *Thermus aquaticus*. Работа Taq-полимеразы инициируется парой синтетических олигонуклеотидных праймеров.

Каждый цикл ПЦР представляет собой три последовательных этапа: денатурация, отжиг и элонгация, изображенные на рисунке 1. На первом этапе, денатурации, двухцепочная ДНК-мишень при температуре 95°C начинает «плавиться», и комплементарные цепи расходятся, переходя в одноцепочечное состояние. Праймеры гибридизуются с одной из цепей в области, которая подвергнется амплификации. Таким образом, праймеры после отжига служат субстратом для Taq-полимеразы, начиная построение комплементарной цепи,

которая на следующем этапе достраивается с помощью добавления дезоксинуклеотидов [10].

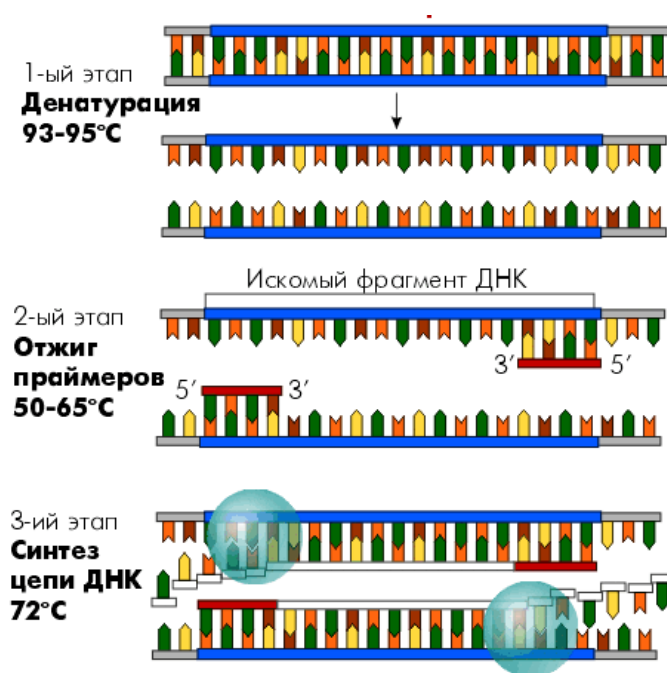


Рисунок 1 – Схема полимеразной цепной реакции

Существует несколько модификаций полимеразной цепной реакции: ПЦР в реальном времени, вложенная ПЦР, ПЦР с обратной транскрипцией и т.д. Распространенной разновидностью является ПЦР в реальном времени (Real-time PCR), в течение которой можно обнаружить накапливаемую ДНК, которая прямо пропорциональна флуоресцентному сигналу [11].

Применение метода ПЦР в диагностике инфекции боррелиоза человека позволяет определять содержание ДНК боррелий в различном биологическом материале: клещ, кровь, моча и т.д. [12, 13]

1.3 Метод LAMP

Существующие методы амплификации нуклеиновых кислот высокоспецифичны, но методы обнаружения и анализ результатов довольно

сложны. Вдобавок, требуемое оборудование не дает возможности широкого применения, например, такого сильного метода, как ПЦР.

В 2000 году японские ученые представили метод петлевой изотермической амплификации (англ. Loop-mediated isothermal amplification, LAMP), который оказался альтернативным вариантом для диагностики инфекционных заболеваний. Проведение реакции не требует дорогостоящего оборудования, к тому же чувствительность к примесям минимальна по сравнению с полимеразной реакцией. Меньше чем за час накапливается до 10^9 копий ДНК при изотермических условиях, которые являются преимуществом данного метода [14, 15]. Принцип метода заключен в автоциклическом синтезе ДНК, который выполняется ДНК-полимеразой, способной к высокой активности смещения цепи. Наиболее эффективным ферментом является Bst-полимераза, выделяемая из термофильных бактерий *Bacillus stearothermophilus* [16, 17]. Помимо постоянной температуры 60-65°C, которая является температурным оптимумом для фермента и удобна для облегченной посадки праймеров из-за менее стабильного состояния ДНК, значимыми характеристиками метода LAMP являются: высокая специфичность амплификации, создаваемая набором из четырех праймеров, которые различают определенные последовательности гена, а контаминации с посторонней ДНК становятся менее вероятными [15].

Комплекс праймеров состоит из пар внешних и внутренних олигонуклеотидных последовательностей, принимающих активное участие в синтезе новых цепей только до циклической части реакции, на которой остаются лишь внутренние праймеры. Обе группы имеют прямые (Forward Inner Primer - FIP, Forward Outer Primer - F3) и обратные (Backward Inner Primer - BIP, Backward Outer Primer - B3) праймеры, которые комплементарны смысловой и антисмысловой цепи ДНК-мишени [14].

Как и любую процедуру LAMP можно разделить на стадии: в первую, нециклическую, стадию синтезируется затравочная петля. Полимеризация инициируется связью прямого внутреннего праймера (FIP) с целевой последовательностью. Затем с продуктом связывается прямой внешний праймер

(F3), и происходит замещение его на одноцепочечное затравочное полукольцо. Ту же процедуру проходят обратные праймеры: обратный внутренний праймер (BIP) имеет дело с одноцепочечной ДНК, после чего происходит связывание и очередное замещение обратным внешним праймером (B3).

К второй, циклической, стадии получается гантелеобразная структура, с гибридизации которой FIP праймером этап начинается. Как только одна цепочка ДНК вытесняется, начинается образование ДНК с новой затравочной петлей на одном конце и копией последовательности искомого гена, как показано на рисунке 2. Такие заготовки нужны для следующего синтеза ДНК внутренними праймерами. Таким образом, происходит накопление копируемых последовательностей с искомым геном, Т-образных петлевых структур ДНК [18].

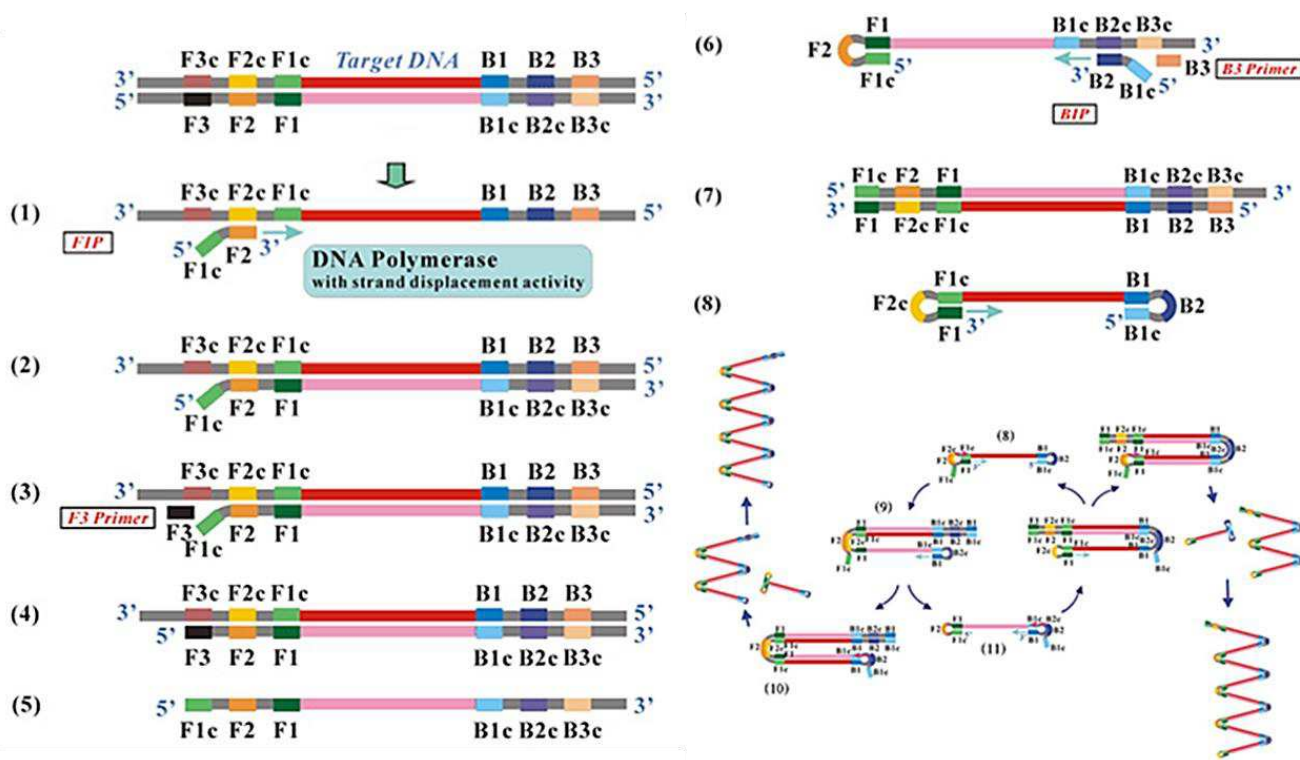


Рисунок 2 – Схема петлевой изотермической амплификации (LAMP): нециклическая стадия (1-8), циклическая стадия (9-11) [19]

В скором времени было предложено улучшить метод использованием дополнительных, петлевых, праймеров (Forward Loop Primer - FLP, Backward

Loop Primer - BLP). Схема реакции изображена на рисунке 3. Такое решение было предложено для ускорения реакции амплификации, которое выполняется за счет связываний с дополнительными сайтами, которые не доступны для внутренних праймеров [20].

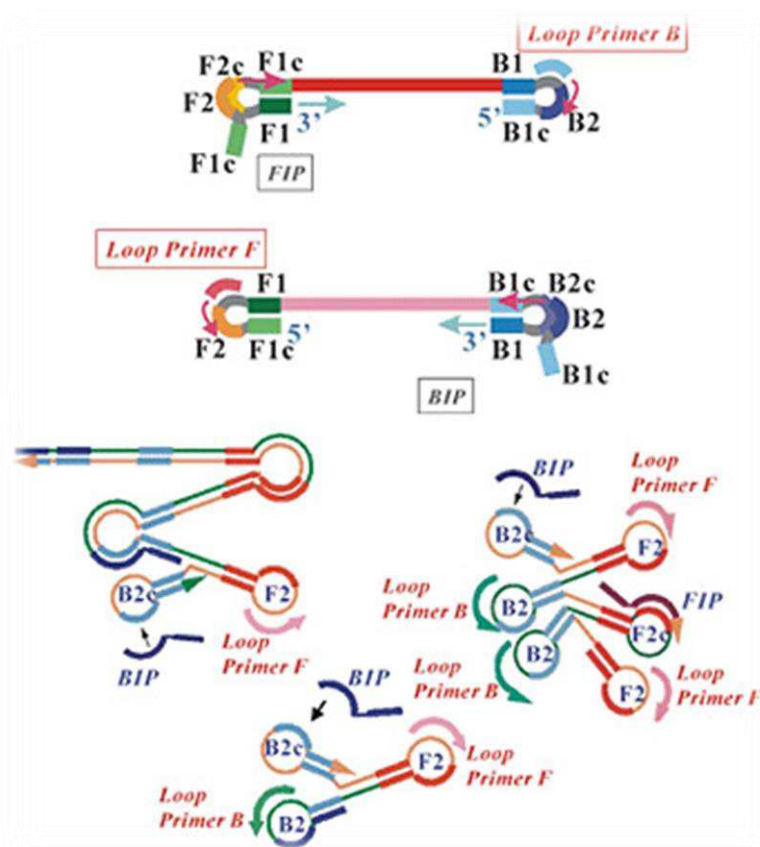


Рисунок 3 – Схема LAMP с добавлением в реакцию петлевых праймеров [19]

Структура вышеупомянутых шести типов праймеров основана на восьми различных областях целевого гена: F3с, F2с, F1с и FLP на 3'-конце и областях B1, B2, B3 и BLP на 5'-конце. Прямой внутренний праймер состоит из области F2 на 3'-конце, которая комплементарна области F2с, и такой же последовательности как в области F1с на 5'-конце. Обратный включает в себя область B2 на 3'-конце, комплементарный области B2с, и область, соответствующую области B1с целевого гена на 5'-конце. Между двумя областями внутренних праймеров расположен спейсер TTTT. Прямой внешний праймер состоит из области F3 комплементарной области F3с, обратный

соответственно из области В3 комплементарной В3с. Петлевые праймеры включают комплементарные последовательности областям между регионами F1 и F2, и B1 и B2 соответственно [14].

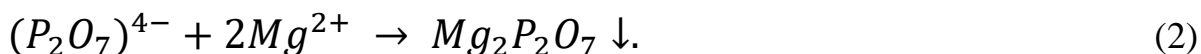
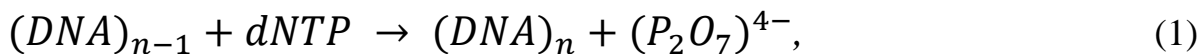
1.3.1 Методы детекции результатов LAMP

Существует большое разнообразие методов детекции продуктов LAMP, которые условно можно разделить на 2 группы [21]. Первая группа, прямых методов, основанна на фиксации накопленных ампликонов в течение реакции, например, флуориметрический метод, предусматривающий использование интеркалирующих красителей [22]. К второй группе методов, косвенных, относятся способы фиксации изменения химического состава реакционной смеси, среди которых можно выделить турбидиметрию в реальном времени [21]. Кроме перечисленных методов детекции можно отметить колориметрический метод с гидроксинафтоловым синим, иммуноферментный анализ, детекцию с помощью наночастиц золота, традиционный метод электрофореза на геле из агарозы, флуоресцентный метод с кальцеином и т.д. [23].

1.3.1.1 Турбидиметрия

Турбидиметрический метод основан на измерении количества света, поглощаемого суспензией, которую образуют частицы исследуемого материала. Большое количество продукта реакции LAMP, который накапливается в количестве 10^9 - 10^{10} копий ДНК [14, 17], определенно подходит для использования данного метода. Реакция амплификации ДНК описывается уравнением (1), которая катализируется ферментом полимеразой. Количество синтезируемой ДНК коррелирует с увеличением мутности, полученное из-за выпадения белого нерастворимого осадка, который видно невооруженным глазом [24]. Осадок представляет собой соединение пирофосфата магния

(Mg₂P₂O₇), образованное в результате взаимодействия ионов Mg²⁺ из буфера смеси и ионов пирофосфата (P₂O₇)⁴⁻, освобожденных из нуклеотидов, как показано в уравнении (2) [15, 18].



Для исследований инфекционных заболеваний описанный тип детекции показывает высокую эффективность [25, 26] и низкий риск контаминации [18].

1.3.1.2 Флуоресцентная детекция

Еще один перспективный метод: использование кальцеина и флуоресценции. Образованный комплекс кальцеина и марганца в ходе реакции разрушается, и ион магния с пирофосфатом, как и в предыдущем методе, образуют осадок. Флуоресценция возникает в результате освобождения кальцеина из комплекса. Данный процесс хорошо заметен при ультрафиолетовом (УФ) излучении, а изменение окраса смеси можно увидеть и при дневном свете. Свободные ионы Mg²⁺ в реакционной смеси при взаимодействии с кальцеином могут усиливать свечение [27, 28].

Для такого метода не обязательно иметь оборудование, риск контаминации низок, а благодаря простому применению он может использоваться при исследовании инфекционных заболеваний [21]. При наличии в образце инфекционной ДНК раствор вызывает изменение окраса с оранжевого на желто-зеленый цвет при детекции в дневном освещении [29].

Аналогичную работу выполняет гидроксинтафтоловый синий (ГНС, НВС), связанная с уменьшением концентрации магния за счет связывания с пирофосфатом. Гидроксинтафтоловый синий меняет фиолетовый окрас на голубой при истощении свободных ионов магния [27]. Увидеть смену цвета

можно невооруженным глазом, а также используя спектофотометр. Чувствительность метода - $6,4 \cdot 10^3$ и она на порядок выше, чем с использованием кальцеина и близка к чувствительности с использованием SYBR Green I. Метод имеет недостаток: отсутствие количественного анализа ампликонов и отслеживания результатов в реальном времени [21].

1.3.1.3 Использование интеркалирующих красителей

Интеркалирующие красители представляют собой соединения, способные к флуоресценции при встраивании в двуцепочечную ДНК. Наиболее распространенные SYBR Green I и EvaGreen красители, испускающие мощный сигнал при связывании с цепями ДНК. SYBR Green I обладает ингибирующим действием на ход реакции полимеризации, поэтому используется только способом добавления в пробирку после амплификации и проведением детекции по конечной точке. Положительную пробу можно детектировать по смене с оранжевого окраса на зеленый, видимого при дневном свете, а если использовать УФ излучение мы можем наблюдать зеленое свечение [18, 30]. Для детекции в реальном времени подходит краситель EvaGreen, который не способен влиять на реакцию изотермической амплификации [31, 32]. Помимо описанных соединений существуют альтернативные варианты: PicoGreen [33], берберин [29], ряд красителей SYTO, который показывает высокий уровень сигнала и оказывает малое ингибирующее действие, связанное с низкой силой взаимодействия с двуцепочечной ДНК [34].

При использовании флуоресцентных интеркалирующих красителей можно воспользоваться электрофорезом, в результате которого мы получаем «лестницу» на агарозном геле, составленную из конкатемерных продуктов различной длины. Электрофорез широко используется для детекции продуктов LAMP [35], но существует высокий риск контаминации, а также нет возможности количественно оценить наличие ампликонов [21].

1.3.1.4 pH-чувствительные красители

Этот метод обнаружения непосредственно реагирует на высвобождение протонов, что является естественным следствием любой реакции амплификации, катализируемой полимеразой.

Феноловый красный является кислотно-основным индикатором, и изменение окраса зависит состояния окружающей среды. Желтая окраска указывает на кислые среды, а ярко-красная – щелочные. Для перехода желтой окраски в красную необходим интервал в pH 6,8 - 8,4. Также в качестве pH-чувствительных красителей используют крезоловый красный (изменение окраса от красного к желтому), нейтральный красный (смена цвета от слабо-оранжевого до розового) и м-крезоловый пурпурный [36].

1.3.1.5 Использование флуоресцентных зондов

Метод детекции при амплификации нуклеиновых кислот с помощью переноса энергии олигонуклеотидных зондов является высокоспецифичным и чувствительным способом, но имеющим недостатки: слабую флуоресценцию и дороговизну. Петлевой зонд с меткой подавлен в своем несвязанном состоянии и флуоресцирует только тогда, когда он связан со своей мишенью. Флуоресценция петлевого праймера при самозатухании-LAMP (Fluorescence of Loop Primer Upon Self Dequenching-LAMP, FLOS-LAMP) позволяет детектировать LAMP-ампликоны, специфичные для последовательности. Данная разработка была синтезирована для быстрого обнаружения вируса ветряной оспы в клинических образцах. FLOS-LAMP имеет предел обнаружения 500 копий ДНК-мишеней, 96,8%-ую диагностическую чувствительность и 100%-ую специфичность, что является большим достижением [37].

Для изотермической реакции предложен метод с использованием флуоресценции и добавлением расщепляющихся шпилечных маяков (cleavable

hairpin beacon, CHB). Подобный зонд выглядит как одиночный шпилечный олигонуклеотид с флуорофором в качестве метки, который содержит пять непрерывных рибонуклеотидов. Участок петли зонда CHB специфичен для мишени и при его отжиге происходит разрушение шпильки по причине образования гибридной пары ДНК-РНК в рибонуклеотидных сайтах зонда. Такая конструкция позволяет специфично инициировать амплификацию нуклеиновой кислоты и имеет сильную флуоресценцию. Фосфодиэфирные связи, возникшие между ДНК-РНК парами, гидролизуются РНКазами H2, образовав свободный 3`-ОН-конец, а свободный зонд способен участвовать в дальнейших реакциях амплификации в качестве праймера. Стержень зонда CHB, поддерживающий петлю, больше, чем у остальных зондов, что обеспечивает стабильность структуры при высоких температурах (60° C). Метод CHB-LAMP сопоставим по эффективности с методом ПЦР при диагностике генетического материала боррелий из клещей, вызывающих болезнь Лайма. Кроме того, детекцию возможно производить с помощью программного обеспечения, установленного на смартфон, что позволяет использовать данную методику в ограниченных условиях [38].

1.3.2 Виды модификаций LAMP

Как и любой метод диагностики LAMP начинали преобразовывать и модифицировать. Известны следующие разновидности петлевой изотермической амплификации: LAMP с обратной транскрипцией, мультиплексная LAMP. Также петлевую амплификацию комбинируют с другими методами детекции антигенов, например, с ПЦР или с иммуноферментным анализом.

1.3.2.1 LAMP с обратной транскрипцией

LAMP применим не только к ДНК-содержащим мишеням. Благодаря ферменту обратной транскриптазы возможно использовать данный метод к РНК-содержащим возбудителям совместно с использованием ДНК-полимеразы [14]. В первую очередь происходит процесс синтеза комплементарной ДНК (кДНК) из РНК, а затем полученная цепочка амплифицируется вторым ферментом [23]. Данный метод высоко оценивается из-за возможности выполнения анализа в одну стадию, инкубируя все составляющие реакции, ферменты и праймеры при постоянной температуре [39].

1.3.2.2 Мультиплексная LAMP

Обнаружение нескольких генов-мишеней одновременно встречается при инфицировании несколькими патогенами или в случае выявления мутаций. Для экономии реактивов и быстрого получения результатов используют мультиплексную LAMP (multiplex LAMP, mLAMP). В пробирку добавляют весь необходимый набор праймеров для амплификации всех интересующих фрагментов [23, 40]. Для специфической дифференцировки большого количества ампликонов данный метод необходимо комбинировать с несколькими видами методов обнаружения продуктов реакции. Например, с уже упомянутым иммуноферментным анализом [41] и ПЦР [42].

1.3.2.3 Электронная LAMP

Существуют электронные инструменты для облегчения процесса диагностического тестирования методом LAMP. Одни предназначены для дизайна праймеров [43], другие – для прогнозирования активности имеющихся наборов. Последний вариант дает возможность, не совершая амплификации в реальном времени, протестировать совместимость исследуемой последовательности нуклеиновых кислот и праймеров. Электронная LAMP

(electric LAMP, eLAMP) позволяет сэкономить реагенты и показывает степень успеха имитированной постановки [44].

1.3.2.4 LAMP на диске

ID-LAMP – портативное устройство для количественного оптического считывания патогенов в режиме реального времени, в структуру которого входит несколько микрореакторов, встроенных в компакт-диски. Этот метод является экономичным посредством меньшего использования ДНК-мишени, а также сопоставим с эффективностью с обычным методом LAMP. Во время циклического сканирования при изотермической инкубации положительные образцы подадут оптический сигнал, который равен степени поглощения света движущегося лазера, проходящего через растворы [45].

2 Материалы и методы

2.1 Объекты исследования

Объектом исследования стали образцы ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l., выделенные из клещей и предоставленные Омским НИИ природно-очаговых инфекций и Центром гигиены и эпидемиологии города Красноярска, плазмидная ДНК боррелий, выделенная из трансформированных клеток *E. coli* штамма XL1-Blue, которая выступает в качестве положительного контрольного образца. А также образцы клещей, собранные на лесных территориях Красноярска. Образцы перед анализом хранились при температуре -20° С в морозильной камере.

2.2 Оценка специфичности и чувствительности метода LAMP

Были выполнены постановки 9 последовательных разведений плазмиды от 207 800 до 0,02 копий плазмидной ДНК в пробе. С помощью коллег из Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН г. Новосибирска методом цифровой ПЦР получены количественные значения копий ДНК боррелий в образцах плазмид.

Произведены сравнительные постановки реакций LAMP и ПЦР-РВ на 20 положительных образцах ДНК клещей и 16 отрицательных для оценки диагностической чувствительности (Se) и специфичности (Sp) метода с использованием формул (3 и 4):

$$Se = \frac{TP}{TP+FN} \times 100\%, \quad (3)$$

где TP - количество истинно положительных результатов;

FN – количество ложноотрицательных результатов,

$$Sp = \frac{TN}{TN+FP} \times 100\%, \quad (4)$$

где TN - количество истинно отрицательных результатов;

FP – количество ложноположительных результатов.

2.3 Исследование методом LAMP

Реакционная смесь для постановки LAMP состояла из 4,9 мкл ДНК боррелий, компонентов для изотермической амплификации: 0,8 М бетаина, 4 mM MgCl₂, 1X Bsm буфера, 1,4 mM смеси дезоксинуклеотидов dNTP, смеси праймеров (по 0,2 μM F3 и B3, по 1,6 μM FIP и VIP и по 0,4 μM FL и BL). В реакционную смесь добавляли ДНК-полимеразу Bsm, а в качестве красителя использовали Eva-Green. Реакцию проводили при 60° С с использованием амплификатора Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, Сингапур) с детекцией результатов по изменению интенсивности флуоресценции. Все условия для проведения реакции подбирались экспериментально.

2.4 Исследование методом ПЦР

В качестве дополнительного подтверждения результатов LAMP ставили ПЦР с использованием амплификатора Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, Сингапур) по протоколу производителя набора «РеалБест ДНК *Borrelia burgdorferi* s.l.» (Вектор-Бест, Россия). Режим термоциклирования имел следующие параметры: 50° С - 2 минуты, 95° С - 2 минуты, 94° С – 10 секунд и 60° С – 20 секунд.

2.5 Подбор оптимального способа визуальной детекции

Для проведения визуального тестирования была подготовлена смесь для амплификации методом LAMP, но без добавления интеркалирующего красителя Eva-Green. Недостающий объем реакционной смеси компенсировали деионизированной водой. Процесс амплификации проводился в шейкер-термостате SkyLine ST-3L (ELMI, Латвия) с температурным режимом в 60°С – 60 минут, с последующим нагревом до 80°С в течение 10 минут для прекращения работы фермента, после этого в пробирки добавлялся 1 мкг/мкл флуоресцентного красителя бромистого этидия. Оценка результатов проводилась как при дневном освещении, так и с использованием ультрафиолетового излучения на УФ-трансиллюминаторе Vilber Lourmat ECX-F20.M (Vilber Lourmat, Франция), где наличие светло-розового окрашивания и интенсивного свечения образцов свидетельствует о присутствии ДНК боррелий в образце, а коричневое окрашивание и малозаметное свечение означает их отсутствие в образце соответственно.

2.6 Апробирование метода LAMP на образцах крови

Было проведено центрифугирование образца крови в течение 15 минут на 3000 об/мин с использованием микроцентрифуги Eppendorf MiniSpin (Eppendorf AG, Германия) для отделения плазмы от форменных элементов крови. В плазму крови добавляли плазмидную ДНК до конечной концентрации 20 780 и 2 078 копий на пробу. Подготовленные образцы амплифицировали методом LAMP на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad, Сингапур), после чего также проводили визуальную детекцию ампликонов с помощью бромистого этидия (1 мкг/мкл) на УФ-трансиллюминаторе Vilber Lourmat ECX-F20.M (Vilber Lourmat, Франция).

2.7 Апробирование метода LAMP на образцах клещей без этапа выделения ДНК

Каждый образец клеца помещен в отдельную лунку планшета, куда была добавлена готовая реакционная смесь LAMP. Амплификацию проводили в шейкер-термостате SkyLine ST-3L (ELMI, Латвия) с температурным режимом: 60° C – 60 минут, 80° C – 10 минут. Для детекции результата к каждому образцу после реакции амплификации был добавлен бромистый этидий (1 мкг/мкл), планшет с пробамии под УФ-освещение трансиллюминатора Vilber Lourmat ECX-F20.M (Vilber Lourmat, Франция).

3. Результаты

3.1 Оценка специфичности и чувствительности

С помощью коллег из Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН г. Новосибирска методом цифровой ПЦР получены количественные значения копий ДНК боррелий в образцах плазмид. Предельная чувствительность метода LAMP составила 21 копию плазмидной ДНК в пробе.

В таблице 1 приведены результаты анализа 36 проб ДНК методом LAMP и ПЦР, выявлена 90% диагностическая чувствительность, а также найдена 100% специфичность метода LAMP.

Таблица 1 - Сравнение результатов анализа положительных и отрицательных образцов методами ПЦР и LAMP

Результат тестирования	Исследованные пробы	
Положительный	Всего проб, шт	
	20	
	из них методом ПЦР	из них методом LAMP
	20	18
Отрицательный	Всего проб, шт	
	16	
	из них методом ПЦР	из них методом LAMP
	16	16

3.2 Поиск оптимального способа визуальной детекции

Визуальная детекция была выполнена с помощью добавления 1 мкг/мкл бромистого этидия в образцы после их амплификации. Результат можно увидеть и при дневном свете на рисунке 4, и при УФ-излучении на рисунке 5. Образцы № 1,3 и 5, которые содержат ПКО с 2 078 копией плазмидной ДНК в пробе, имеют светло-розовый окрас при дневном свете (рис.4) и яркое свечение в УФ

(рис.5), что свидетельствует о положительном результате. Образцы № 2,4 и 6, содержащие отрицательные образцы ДНК, окрашены в коричневый цвет (рис.4) и имеют слабое свечение (рис.5) – отрицательный результат диагностики.



Рисунок 4 – Визуальная детекция образцов бромистым этидием при дневном свете: 1,3,5 – ПКО с 2 078 копией плазмидной ДНК в пробе; 2,4,6 – отрицательные образцы ДНК.

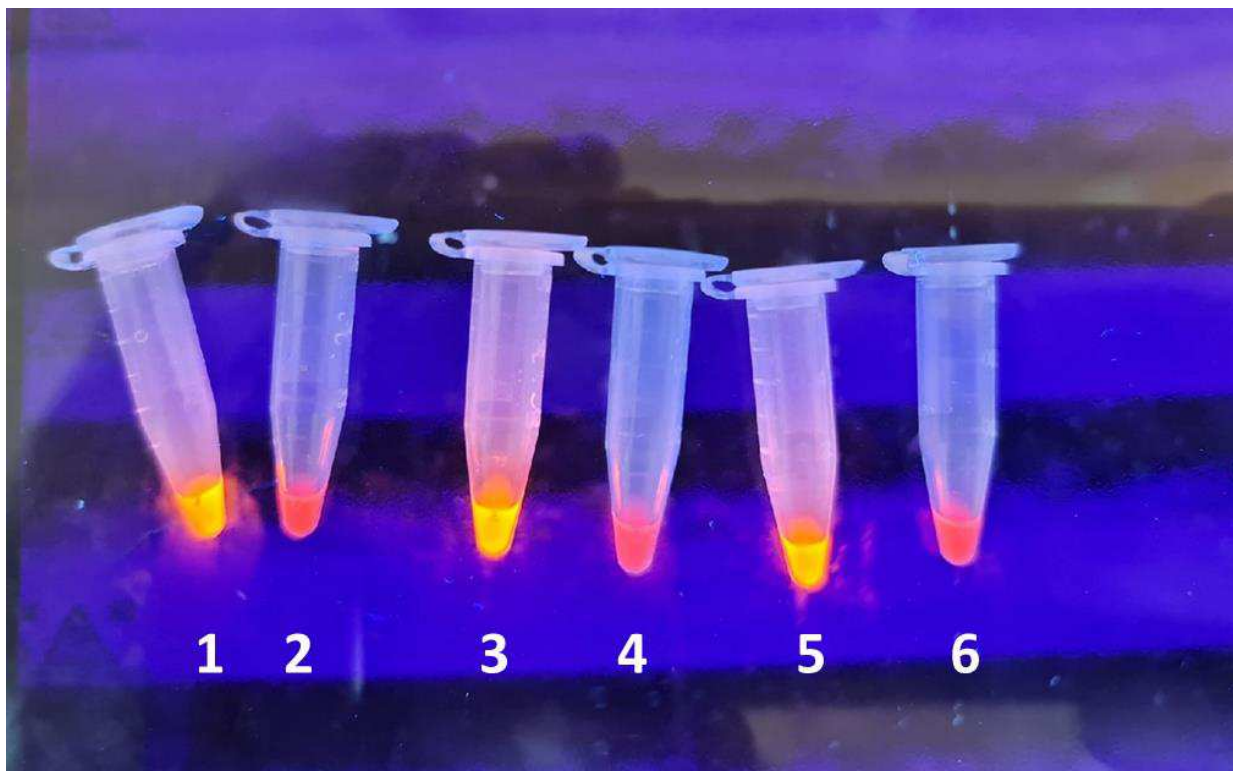


Рисунок 5 – Визуальная детекция образцов бромистым этидием в УФ свете: 1,3,5 – ПКО с 2 078 копией плазмидной ДНК в пробе; 2,4,6 – отрицательные образцы ДНК.

3.3 Апробация метода LAMP на образцах крови

На рисунках 6 и 7 изображены результаты реакции LAMP с использованием ПЦР-РВ амплификатора и с использованием визуального метода детекции, подразумевающего добавление в реакционную смесь после амплификации 1 мкг/мкл бромистого этидия соответственно, где наблюдается полное совпадение по всем исследуемым пробам. Образец № 4 (рис.6) с наиболее ранним временем начала флуоресценции при визуальной детекции также имеет более интенсивное свечение в УФ-спектре среди других положительных образцов (рис.7), поскольку содержит в себе высокую концентрацию плазмидной ДНК в количестве 2078 копий. Образцы № 1 и 2 соответствуют образцам с разведенными в плазме крови 20780 и 2078 копий плазмидной ДНК в пробе. Время начала флуоресценции на графике и интенсивность свечения в УФ зависит от степени разведения: чем выше концентрация ДНК в образце, тем раньше происходит детекция флуоресцентного сигнала и тем ярче свечение.

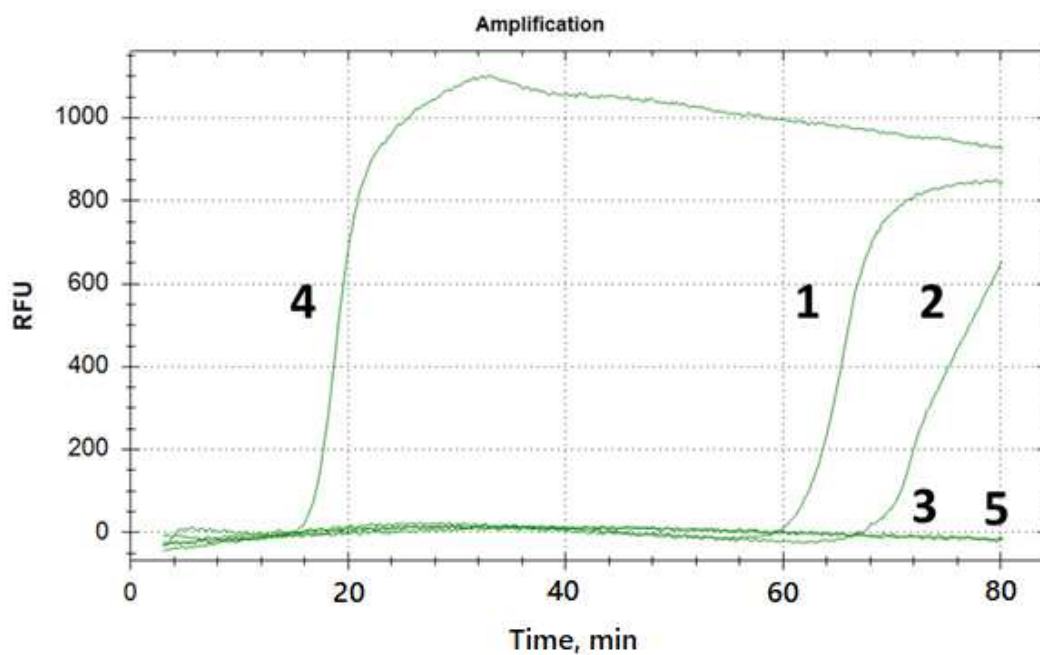


Рисунок 6 – График амплификации методом LAMP разведенных плазмид в плазме крови: 1 – 20 780 копий плазмидной ДНК в пробе разведенные в плазме; 2 – 2 078 копий плазмидной ДНК в пробе разведенные в плазме, 3 – ОКО (плазма), 4 – ПКО (2 078 копий плазмидной ДНК), 5 - ОКО.



Рисунок 7 – Фотоснимок в УФ свете образцов с добавлением бромистого этидия (1 мкг/мкл): 1 – 20 780 копий плазмидной ДНК в пробе разведенные в плазме; 2 – 2 078 копий плазмидной ДНК в пробе разведенные в плазме, 3 – ОКО (плазма), 4 – ПКО (2 078 копий плазмидной ДНК), 5 - ОКО.

3.4 Апробация метода LAMP на образцах клещей без выделения ДНК

Из 6 образцов клещей после амплификации и добавления бромистого этидия на рисунке 8 яркое свечение при УФ-излучении наблюдается у трех образцов № 1, 5 и 6, следовательно, данные образцы содержат ДНК боррелий.

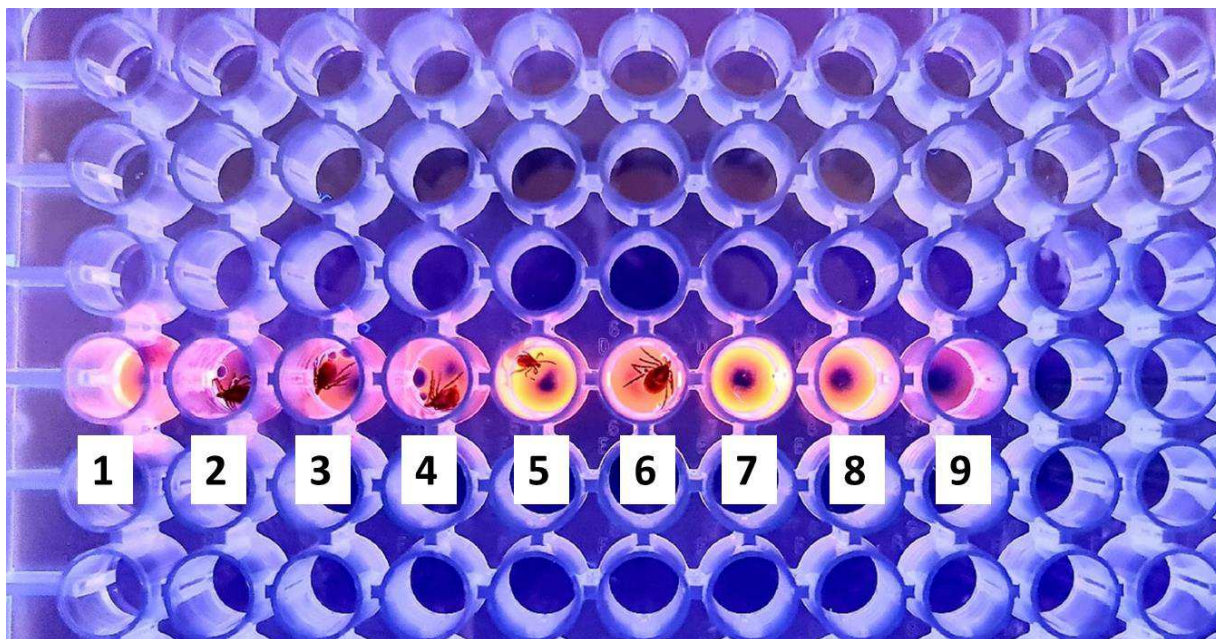


Рисунок 8 - Фотоснимок в УФ свете образцов клещей после процесса амплификации методом LAMP с добавлением бромистого этидия (1 мкг/мкл): 1,5,6 – клещи положительные на боррелиоз; 2,3,4 – клещи отрицательные на боррелиоз; 7,8 – ПКО (2 078 копий плазмидной ДНК), 9 - ОКО.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведенных работ были определены следующие параметры: диагностическая чувствительность метода LAMP составляет 90%, а специфичность 100%. Предельная чувствительность метода составила 21 копию плазмидной ДНК в пробе. В качестве флуоресцентного красителя для визуальной детекции с возможностью выполнения теста в малооснащённых лабораториях или в полевых условиях выбран бромистый этидий. Метод LAMP успешно апробирован на образцах крови и образцах клещей без этапа выделения ДНК с последующей визуальной детекцией с помощью бромистого этидия для диагностики клещевого боррелиоза.

Метод петлевой изотермической амплификации составит хорошую конкуренцию традиционным методам диагностики в качестве экономически выгодного и быстрого способа анализа биологического материала на наличие такой инфекции, как иксодовый клещевой боррелиоз.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Кормиленко И. В. Экологические и эпидемиологические аспекты Крымской геморрагической лихорадки, лихорадки Ку и иксодовых клещевых боррелиозов в Ростовской области: дис. – Рос. науч.-исслед. противочум. ин-т" Микроб" МЗ РФ, 2010.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году: Государственный доклад. –М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2020. – С. 299.
3. Государственный доклад «О состоянии и охране окружающей среды в Красноярском крае в 2019 году» — Красноярск, 2020.
4. Артамонова О. А., Оборин М. С. Медико-биологические аспекты развития клещевого энцефалита и Лайм-боррелиоза //Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2016. – №.1 (57).
5. Липов А. В., Товмасын В. Э., Корой П. В. Болезнь Лайма: обзор литературы и клинический случай //Вестник молодого ученого. – 2017. – №. 2. – С. 39-47.
- 6 Курмангалиева К. Б. и др. Случай болезни Лайма в неэндемичном регионе //Журнал инфектологии. – 2014. – Т. 6. – №. 1. – С. 93-94.
7. Wilson C. R., et al. Methods for Analysis of Gastrointestinal Toxicants // Comprehensive Toxicology – 2010. – Т.10. – С. 145-152
8. Wilske B., Fingerle V., Schulte-Spechtel U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis //FEMS Immunology & Medical Microbiology. – 2007. – Т. 49. – №. 1. – С. 13-21.
9. Жаворонок С.В. ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ. - Гомель: Гомельский государственный медицинский университет, 2004
10. Overbergh L. et al. Real-time polymerase chain reaction //Molecular diagnostics. – Academic Press, 2010. – С. 87-105

11. Jia Y. Real-time PCR //Methods in Cell Biology. – Academic Press, 2012. – Т. 112. – С.55-68.
12. Courtney J. W. et al. Multiplex real-time PCR for detection of Anaplasma phagocytophilum and Borrelia burgdorferi //Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Т. 42. – №. 7. – С. 3164-3168.
13. Schwaiger M., et al. Routine diagnosis of Borrelia burgdorferi (sensu lato) infections using a real-time PCR assay //Clinical microbiology and infection. – 2001. – Т. 7. – №. 9. – С. 461-469
14. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA //Nucleic acids research. – 2000. – Т. 28. – №. 12. – С. e63-e63
15. Mori Y. et al. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation //Biochemical and biophysical research communications. – 2001. – Т. 289. – №. 1. – С. 150-154
16. Ushikubo H. The principle of LAMP method — A simple and rapid gene amplification method // Uirusu. 2004. №54 (1). P. 107–112
17. Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А. и др. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии // Онкоурология. – 2018. – 14(2) – С. 88–99.
18. Parida M. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases //Reviews in medical virology. – 2008. – Т. 18. – №. 6. – С. 407-421.
19. Eiken GENOME SITE – The principle of LAMP method [электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/principle.html>
20. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers //Molecular and cellular probes. – 2002. – Т. 16. – №. 3. – С. 223-229
21. Петруша О. А., Файзулов Е. Б. Методы детекции результатов реакции петлевой изотермической амплификации ДНК //Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65. – №. 1. – С. 67-72

22. Jeon Y. S. et al. Improved pipeline for reducing erroneous identification by 16S rRNA sequences using the Illumina MiSeq platform //Journal of Microbiology. – 2015. – T. 53. – №. 1. – C. 60-69.
23. Wong Y. P. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms //Journal of applied microbiology. – 2018. – T. 124. – №. 3. – C. 626-643.
24. Abdul-Ghani R., Al-Mekhlafi A. M., Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: would it come to clinical reality as a point-of-care test? //Acta tropica. – 2012. – T. 122. – №. 3. – C. 233-240.
25. Aydin-Schmidt B. et al. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) accurately detects malaria DNA from filter paper blood samples of low-density parasitaemias //PloS one. – 2014. – T. 9. – №. 8.
26. Yuan X. et al. Rapid detection of Mycoplasma pneumoniae by loop-mediated isothermal amplification assay //Medicine. – 2018. – T. 97. – №. 25.
27. Tomita N. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // Nat. Protoc. –2008. –3(5). – C. 877-82.
28. Houmansadr F., Soleimani M., Naddaf S. R. Development of A Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Detection of Relapsing Fever Borreliae //Journal of Arthropod-Borne Diseases. – 2020. – T. 14. – №. 1. – C. 47.
29. Fischbach J. et al. Shining a light on LAMP assays' A comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine //Biotechniques. – 2015. – T. 58. – №. 4. – C. 189-194
30. Njiru Z. K. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for rapid detection of Trypanosoma brucei rhodesiense //PLoS neglected tropical diseases. – 2008. – T. 2. – №. 2
31. Mair G. et al. Isothermal loop-mediated amplification (LAMP) for diagnosis of contagious bovine pleuro-pneumonia //BMC veterinary research. – 2013. – T. 9. – №. 1. – C. 108

32. Notomi T. et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects // *J Microbiol.* – 2015. – 53(1). – C. 1–5.
33. Qin C. et al. Rapid detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification // *Intervirology.* – 2009. – T. 52. – №. 2. – C. 86-91.
34. Ocorbin I.P. et al. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP) // *Biotechniques.* – 2016. – 61(1).
35. Huang Q. et al. Specific and rapid identification of the *Pheretima aspergillum* by loop-mediated isothermal amplification // *Bioscience reports.* – 2019. – T. 39. – №. 2.
36. Tanner N. A., Zhang Y., Evans Jr T. C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes // *Biotechniques.* – 2015. – T. 58. – №. 2. – C. 59-68.
37. Gadkar V. J. et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes // *Scientific reports.* – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1-10.
38. Ding X. et al. Cleavable hairpin beacon-enhanced fluorescence detection of nucleic acid isothermal amplification and smartphone-based readout // *Scientific reports.* – 2020. – T. 10. – №. 1. – C. 1-9.
39. Mori, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): recent progress in research and development // *Journal of infection and chemotherapy.* – 2013. – 19(3). – C. 404-411.
40. Lau YL et al. Colorimetric Detection of Dengue by Single Tube Reverse-Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification // *PLoS One.* – 2015. – 10(9).
41. Nkouawa A. et al. Simple identification of human taenia species by multiplex loop-mediated isothermal amplification in combination with dot enzyme-linked immunosorbent assay // *The American journal of tropical medicine and hygiene.* – 2016. – 94(6). – C. 1318-1323.
42. Lee MF et al. One-tube loop-mediated isothermal amplification combined with restriction endonuclease digestion and ELISA for colorimetric detection of resistance to

isoniazid, ethambutol and streptomycin in *Mycobacterium tuberculosis* isolates // *Journal of microbiological methods*. – 2010. – 83(1). – C. 53-58.

43. Torres C. et al. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures // *BMC bioinformatics*. – 2011. – 12(1). – C.240.

44. Salinas NR et al. Electric LAMP: virtual loop-mediated isothermal amplification // *ISRN bioinformatics*. – 2012.

45. Santiago-Felipe S. et al. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2016. –79. – C. 300-306.

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт фундаментальной биологии и биотехнологии
институт
Кафедра биофизики
кафедра

УТВЕРЖДАЮ

Заведующий кафедрой

В.А. Кратасюк
подпись, инициалы, фамилия

« 21 » июня 2021 г

БАКАЛАВРСКАЯ РАБОТА

06.03.01 – Биология

код – наименование направления

Использование метода LAMP для диагностики клещевых боррелиозов
тема

Руководитель

Столяр С.В.
подпись, дата

д-р физ.-мат. наук.
ученая степень

Столяр С.В.
инициалы, фамилия

Научный консультант

Ольховский И.А.
подпись, дата

канд. мед. наук.
ученая степень

Ольховский И.А.
инициалы, фамилия

Выпускник

Васильева Д.И.
подпись, дата

ББ17-31Б, 041722702
группа, №

Васильева Д.И.
инициалы, фамилия

Красноярск 2021