

## КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 579.843.1:579.253.4.083.1

Хунхеева Ж.Ю.<sup>1</sup>, Миронова Л.В.<sup>1</sup>, Балахонов С.В.<sup>1</sup>, Афанасьев М.В.<sup>2</sup>

### ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕАКЦИИ МИНИСЕКВЕНИРОВАНИЯ С MALDI-TOF МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ ГЕНЕТИЧЕСКИ ИЗМЕНЕННЫХ ВАРИАНТОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ХОЛЕРЫ

<sup>1</sup>Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 664047, Иркутск;

<sup>2</sup>Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр, 664022, Иркутск, Российская Федерация

Для детекции генетически измененных вариантов *V. cholerae* eltor, характеризующихся наличием однонуклеотидных полиморфизмов в гене *ctxB*, предложен метод минисеквенирования с MALDI-ToF масс-спектрометрическим анализом продуктов реакции с подобранными зондами, прилегающими к 115 и 203 позициям указанного ранее гена. При масс-спектрометрическом анализе результатов реакции минисеквенирования штаммов *V. cholerae* eltor, изолированных при эпидемических осложнениях на территории Сибири и Дальнего Востока, выявлены масс-спектры, соответствующие значениям молекулярных масс зондов (*ctxB*115, *ctxB*203) и достроившихся комплементарно к точкам соответствующих замен (T/C) дидезоксиинуклеотидов (ddTTP, ddCTP). Для исследуемых штаммов *V. cholerae* eltor, изолированных в 70-х годах XX столетия установлена элонгация обоих зондов дидезокситимидином, что свидетельствует о присутствии в их геноме характерной для типичных представителей *V. cholerae* eltor *ctxB*3 аллели с тиминем в 115 и 203 позициях. Для *V. cholerae* eltor, изолированных в 90-х годах, установлен отжиг к точкам замен дидезоксицитозина и наличие *ctxB*1 аллели с цитозином в анализируемых позициях, характерной для вибриона классического биовара, и обнаруживаемая в геноме одного из вариантов атипичных генетически измененных клонов *V. cholerae* eltor. По чувствительности и специфичности метод не уступает прямому секвенированию гена *ctxB* штаммов *V. cholerae* eltor и оказывается перспективным для анализа других значимых однонуклеотидных полиморфизмов.

Ключевые слова: *V. cholerae*; ген *ctxB*; однонуклеотидный полиморфизм; минисеквенирование; MALDI-ToF масс-спектрометрический анализ.

Для цитирования: Хунхеева Ж.Ю., Миронова Л.В., Балахонов С.В., Афанасьев М.В. Использование реакции минисеквенирования с MALDI-ToF масс-спектрометрической детекцией для обнаружения генетически измененных вариантов возбудителя холеры. Клиническая лабораторная диагностика. 2017; 62 (2):116-120

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-116-120>

Для корреспонденции: Хунхеева Жанна Юрьевна, врач-бактериолог лаб. холеры Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, e-mail: [Khunkheeva2015@yandex.ru](mailto:Khunkheeva2015@yandex.ru)

Khunkheeva J.Yu.<sup>1</sup>, Mironova L.V.<sup>1</sup>, Balakhonov S.V.<sup>1</sup>, Afanasiev M.V.<sup>2</sup>

THE APPLICATION OF MALDI-TOF MINI-SEQUENCING FOR DETECTING GENETICALLY ALTERED VERSIONS OF CHOLERA AGENT

<sup>1</sup>The Irkutskii research anti-plague institute of the Rospotrebnadzor, 664047 Irkutsk, Russia

<sup>2</sup>The Irkutskii oblastnoii clinical consultative diagnostic center, 664022 Irkutsk, Russia

The genetically altered modifications of *V. cholerae* eltor are characterized by occurrence of single-nucleotide polymorphisms in gene *ctxB*. To detect these modifications the technique is proposed based on mini-sequencing with MALDI-ToF by of products of reaction with selected probes adjacent to 115 and 203 positions of gene mentioned previously. The mass-spectrometry analysis of the results of reaction of mini-sequencing of strains of *V. cholerae* eltor isolated during epidemic complications at the territory of the Siberia and the Far East revealed mass-specters corresponding to values of molecular masses of probes (*ctxB*115, *ctxB*203) and those complementary completed to points of corresponding replacements (T/C) of didesoxynucleotides (ddTTP, ddCTP). For analyzed strains of *V. cholerae* eltor isolated in the 1970s, elongation is established for both probes by didesoxynucleotide that testifies presence in their genome *ctxB*3 allele with thymine in 115 and 203 positions, distinctive for typical representatives of *V. cholerae* eltor. For *V. cholerae* eltor, isolated in 1990s, hybridization to points of replacement of didesoxycytosine and presence of *ctxB*1 allele with cytosine at analyzed positions, distinctive to vibrio of classic biovars. This allele is detected in genome of one of modifications of atypical genetically altered clones of *V. cholerae* eltor. This technique, by its sensitivity and specificity, matches direct sequencing of gene *ctxB* of strains of *V. cholerae* eltor and proves promising for analysis of other valuable single-nucleotide polymorphisms.

Key words: *V. cholerae*; gene *ctxB*; single-nucleotide polymorphism; mini-sequencing; MALDI-ToF mass-spectrometry analysis.

For citation: Khunkheeva J.Yu., Mironova L.V., Balakhonov S.V., Afanasiev M.V. The application of MALDI-ToF mini-sequencing for detecting genetically altered versions of cholera agent. Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics) 2017; 62 (2): 116-120. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-116-120>

Для корреспонденции: Хунхеева Жанна Юрьевна, врач-бактериолог лаб. холеры Иркутского научно-исследовательского противочумного института Роспотребнадзора, e-mail: [Khunkheeva2015@yandex.ru](mailto:Khunkheeva2015@yandex.ru)

**For correspondence:** *Khunkheeva J.Yu.*, physician-bacteriologist of the laboratory of cholera. e-mail: [Khunkheeva2015@yandex.ru](mailto:Khunkheeva2015@yandex.ru)

**Conflict of interests.** *The authors declare absence of conflict of interests.*

**Acknowledgment.** *The study was carried out within the framework of state scientific research (state registration № GR 01201068224)*

Received 09.06.2016  
Accepted 01.07.2016

**Введение.** Особенность современного этапа седьмой пандемии холеры — формирование и широкое распространение атипичных геновариантов возбудителя, обладающих повышенным патогенным потенциалом и выступающих в качестве этиологического агента холеры как в эндемичных странах [11, 16], так и на ранее свободных от холеры территориях [5, 15, 18]. Высокая патогенность атипичных вариантов *V. cholerae eltor*, обусловленная способностью продуцировать холерный токсин классического типа, наряду с высокими адаптационными свойствами определяют значимость оперативного выявления генетически измененных вариантов *V. cholerae eltor*.

Один из подходов к выявлению геномных особенностей атипичных вариантов *V. cholerae* — детекция однонуклеотидных полиморфизмов (SNPs — single nucleotide polymorphisms) в гене *ctxB*, детерминирующем биосинтез субъединицы В холерного токсина. Золотой стандарт анализа SNP как в целом, так и для определения аллели гена *ctxB* — прямое определение нуклеотидной последовательности (в модификации Сэнгера) исследуемой мишени с анализом замен по определенным позициям. Недостаток метода — высокая стоимость расходных материалов и реактивов, обусловленная необходимостью использования флуоресцентных меток, и сложная поэтапная процедура выполнения анализа. Другим методом анализа SNP в гене *ctxB* служит предложенная М. Morita и соавт. [14] аллель-специфическая ПЦР с использованием специфических праймеров, комплементарных участку гена с варибельной комплементарной позицией. Предложена тест-система для определения аллели гена *ctxB* в мультиплексной ПЦР [3].

Один из перспективных методов определения точечных нуклеотидных полиморфизмов — метод минисеквенирования с последующим анализом продуктов реакции в MALDI-ToF масс-спектрометрии [4, 8]. Реакция минисеквенирования основана на селективном достраивании прилегающего к точке замены олигонуклеотидного зонда в зависимости от нуклеотидного контекста подобранным набором dNTP/ddNTP. Метод характеризуется простотой выполнения процедуры, высокой производительностью и скоростью, низкой стоимостью расходных материалов [4, 8].

Цель исследования — выявление атипичных геновариантов *V. cholerae* на основании MALDI-ToF масс-спектрометрической детекции однонуклеотидных полиморфизмов в гене *ctxB*.

**Материал и методы.** Использованы препараты ДНК 12 штаммов *V. cholerae eltor*, изолированных при эпидемических осложнениях на территории Сибири и Дальнего Востока в период седьмой пандемии (Омск, 1972, 1994; Красноярск, Сургут, Барнаул, 1973 г.; Владивосток, Южно-Сахалинск, 1999 г.). Контрольные штаммы двух биоваров *V. cholerae cholerae* 569В и *V. cholerae eltor* М-878 использовали на начальном этапе для анализа чувствительности и специфичности метода минисеквенирования в выявлении структурных особенностей гена субъединицы В холерного токсина (*ctxB*). Все штаммы *V. cholerae* по результатам ПЦР охарактеризованы как положительные на наличие вышеуказанного гена.

Подбирали специфические нуклеотидные зонды для

реакции минисеквенирования с использованием модулей ContigExpress и AlignX программного пакета Vector NTI 9.0 (Informax Inc., США) на обратную нуклеотидную последовательность гена *ctxB* референсных штаммов *V. cholerae cholerae* 569В и *V. cholerae eltor* № 16961.

В реакции минисеквенирования в качестве матрицы использовали наработанные в ПЦР продукты амплификации гена *ctxB*, очищенные экзонуклеазой I (ExoI) и щелочной фосфатазой согласно инструкции производителя (Fermentas, Литва). Реакцию проводили в 10 мкл реакционной смеси: 10xReaction Buffer C; 10 мМ MgCl<sub>2</sub>; 1 Ед TermiPol DNA Polymerase (Solis Biodyne, Эстония); по 0,5 мМ ddNTP (ddTTP, ddCTP) (GE HealthCare, Великобритания); по 10 пмоль зондов *ctxB*115, *ctxB*203 и 5 мкл амплифицированных фрагментов гена *ctxB*. Нарботка продуктов минисеквенирования осуществлялась по программе: стартовая денатурация 94°C — 60 с, 59 циклов (94°C — 20 с, 52°C — 20 с, 72°C — 10 с), элонгация 72°C — 60 с на амплификаторе C100 (BioRad, США). Очистку продуктов минисеквенирования проводили добавлением суспендированной в воде катионообменной смолы (НПФ «Литех», Россия) с экспозицией при комнатной температуре в течение часа при периодическом перемешивании. После экспозиции пробы центрифугировали при 2000 об/мин 5 мин. Полученный супернатант использовали для масс-спектрометрического анализа. Матрицу на основе 3-гидроксипиколиновой кислоты предварительно наносили на AnchorChip (600 мкм, Bruker Daltonics, Германия) и высушивали на воздухе, после чего на чип наносили продукты реакции в объеме 0,2 мкл.

Получали масс-спектры на MALDI-времяпролетном масс-спектрометре Microflex LT (Bruker Daltonics, Германия). Получение, обработку, анализ масс-спектров производили в программах flexControl 2.4 (Build 38) и flexAnalysis 2.4 (Build 11). По идентификации масс-спектров с ожидаемыми молекулярными массами с учетом молекулярных масс дидезокси-нуклеотидов судили о нуклеотидном контексте.

В качестве эталонного метода анализа SNP в гене *ctxB* использовали прямое определение нуклеотидной последовательности по Сэнгеру на приборе ABI Prism 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США; Hitachi, Япония).

**Результаты и обсуждение.** Реакция минисеквенирования применима как для генетической диагностики заболеваний человека [12], так и для исследования ряда микроорганизмов [9, 10, 13]. Для анализа однонуклеотидных замен в гене *ctxB* *V. cholerae* методом минисеквенирования выбрано два значимых полиморфизма в 115 и 203 позициях, идентификация которых позволяет дифференцировать генотип *ctxB* — классический или эльтор и соответственно идентифицировать измененные варианты *V. cholerae eltor* [17].

Для проведения реакции минисеквенирования подобраны олигонуклеотидные зонды, прилегающие к 115 (*ctxB*115 3'-gcagaataccasacacasaata-5') и 203 позициям (*ctxB*203 3'-gctatcattactttaagaatggtgcaa-5') гена *ctxB*. Расчетная молекулярная масса зонда *ctxB*115 составила 7300 Да, зонда *ctxB*203 — 8598 Да, что подтверждено масс-спектрометрическим анализом. Достраивали зонды за счет использования комбинации дидезоксинуклеотидов — ddCTP (молекулярная масса 273,2 Да) и ddTTP (молекулярная мас-

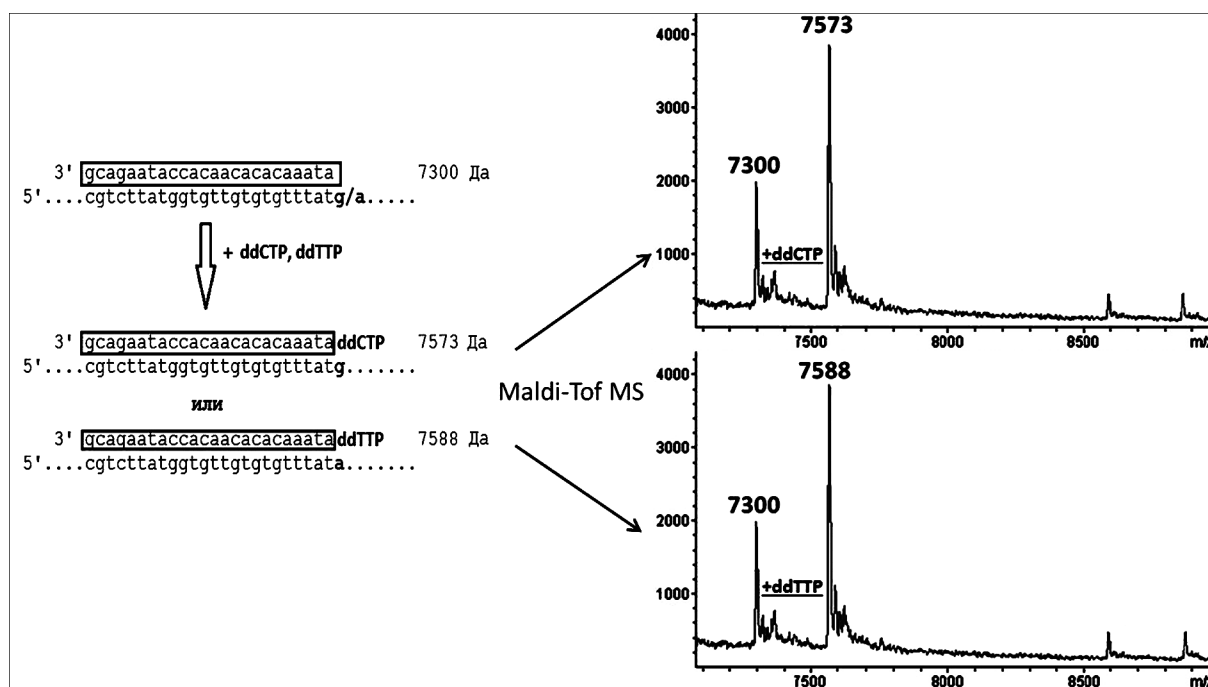


Рис. 1. Схема реакции минисеквенирования с масс-спектрометрической детекцией (на примере анализа SNP в 115 позиции гена *ctxB*).

Рамкой выделен зонд *ctxB*115; «g/a» — нуклеотидные основания, расположенные на обратной цепи ДНК референсных штаммов *V. cholerae cholerae* 569В (Accession number VCU25679) и *V. cholerae eltor* N16961 (Accession number NC\_002505), комплементарные исследуемым полиморфизмам.

са 288,2 Да), комплементарно присоединившихся к точке полиморфизма и одновременно терминировавших реакцию в точке отжига (рис. 1).

При апробации метода на контрольных штаммах классического и элтор биоваров установлено, что для штамма *V. cholerae* классического биовара разница молекулярных масс зонда и продукта элонгации соответствовала молекулярной массе ddCTP (273,2 Да), что свидетельствует о наличии цитозина в 115 и 203 позициях гена *ctxB*; для *V. cholerae eltor* — молекулярной массе ddTTP (288,2 Да), подтверждая присутствие тимина в анализируемых позициях (рис. 2). Соответственно разработанный мультиплексный вариант реакции минисеквенирования с масс-спектрометрической детекцией позволяет эффективно определить нуклеотидный контекст в полиморфных сайтах *ctxB* гена.

Детекция SNP в группе исследуемых *V. cholerae eltor* по-

казала, что в реакции минисеквенирования в образцах, полученных из изолированных в 70-е годы XX столетия при эпидемических осложнениях в Сибири штаммов *V. cholerae* ( $n = 7$ ), происходила элонгация обоих зондов в среднем от 287,4 до 288,4 Да, что свидетельствует о присутствии в их геноме *ctxB*3 аллели анализируемого гена (с тиминном в 115 и 203 позициях), специфичной для типичных представителей *V. cholerae eltor* (см. таблицу). У выделенных в Сибири и на Дальнем Востоке в 90-е годы XX века изолятов *V. cholerae eltor* ( $n = 5$ ) выявлена аллель *ctxB*1 с цитозином в анализируемых позициях: для зонда *ctxB*115 установлена элонгация в среднем на 273,6 Да, для *ctxB*203 — на 273,8 Да (см. таблицу). Указанная аллель гена *ctxB* характерна для *V. cholerae* классического биовара и обнаруживается в геноме одного из вариантов атипичных генетически измененных клонов *V. cholerae eltor*.

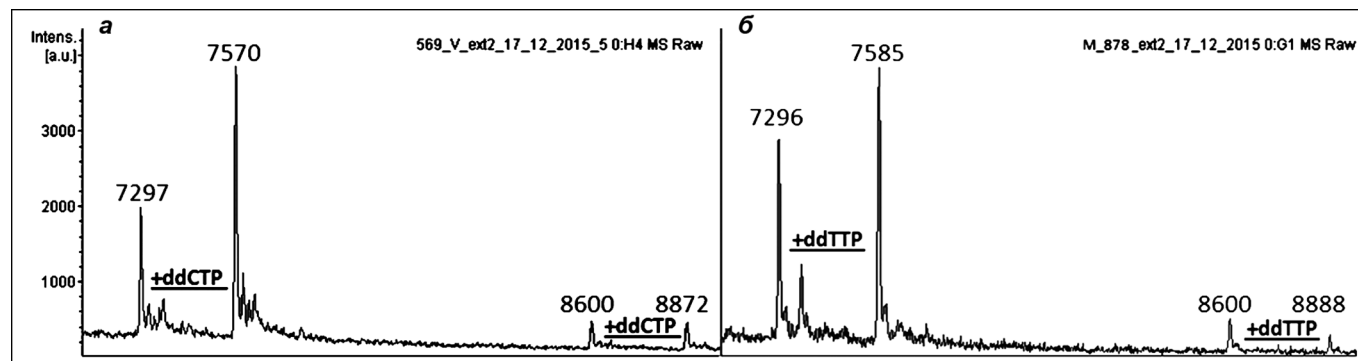


Рис. 2. Масс-спектры контрольных штаммов холерного вибриона. а — *V. cholerae cholerae* 569В; б — *V. cholerae eltor* M-878.

**Результаты масс-спектрометрической детекции продуктов реакции минисеквенирования штаммов *V. cholerae* eltor, изолированных при эпидемических осложнениях на территории Сибири и Дальнего Востока**

Штаммы <i>V. cholerae</i>	ММ* зонда ctxB115 (Да)	ММ* с учетом до-страивания ddNTP (Да)	ММ* зонда ctxB203 (Да)	ММ* с учетом до-страивания ddNTP (Да)	Результаты минисеквенирования (SNP115/SNP203)
И-441 (Омск, 1972 г.)	7297	7586 (+ddTTP)	8596	8886 (+ddTTP)	T/T
И-477 (Омск, 1972 г.)	7297	7585 (+ddTTP)	8600	8889 (+ddTTP)	T/T
И-570 (Красноярск, 1973 г.)	7295	7583 (+ddTTP)	8596	8883 (+ddTTP)	T/T
И-571 (Красноярск, 1973 г.)	7297	7585 (+ddTTP)	8601	8887 (+ddTTP)	T/T
И-718 (Сургут, 1973 г.)	7296	7585 (+ddTTP)	8598	8886 (+ddTTP)	T/T
И-561 (Барнаул, 1973 г.)	7295	7585 (+ddTTP)	8598	8888 (+ddTTP)	T/T
И-576 (Красноярск, 1973 г.)	7296	7584 (+ddTTP)	8597	8889 (+ddTTP)	T/T
И-1185 (Омск, 1994 г.)	7296	7570 (+ddCTP)	8599	8874 (+ddCTP)	C/C
И-1298 (Южно-Сахалинск, 1999 г.)	7301	7573 (+ddCTP)	8602	8875 (+ddCTP)	C/C
И-1300 (Южно-Сахалинск, 1999 г.)	7295	7568 (+ddCTP)	8600	8873 (+ddCTP)	C/C
И-1334 (Владивосток, 1999 г.)	7297	7570 (+ddCTP)	8599	8873 (+ddCTP)	C/C
И-1335 (Владивосток, 1999 г.)	7297	7573 (+ddCTP)	8598	8872 (+ddCTP)	C/C

\* — молекулярная масса (ММ).

Результаты прямого определения нуклеотидной последовательности гена *ctxB* исследуемых штаммов в 100% случаев совпадают с данными, полученными в реакции минисеквенирования, что свидетельствует о высокой эффективности MALDI-ToF масс-спектрометрического определения аллели гена субъединицы В холерного токсина.

**Заключение.** Показана возможность оперативной высокочувствительной и специфичной детекции *V. cholerae* классического и эльтор биоваров, а также генетически измененных вариантов *V. cholerae* eltor на основании MALDI-ToF масс-спектрометрического анализа однонуклеотидных полиморфизмов в гене *ctxB*. Учитывая формирование в последние годы новых клонов *V. cholerae* eltor с дополнительными нуклеотидными заменами в структуре гена *ctxB*, мы считаем, что в перспективе целесообразно расширение спектра анализируемых в реакции полиморфизмов.

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

**Финансирование.** Исследование проводилось в рамках научно-исследовательской работы с государственной регистрацией (№ ГР 01201068224).

ЛИТЕРАТУРА (пп. 4—18 см. REFERENCES)

- Афанасьев М.В., Миронова Л.В., Басов Е.А., Остяк А.С., Куликалова Е.С., Урбанович Л.Я. и др. MALDI-TOF масс-спектрометрический анализ в ускоренной идентификации микроорганизмов рода *Vibrio*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2014; (3): 22—9.
- Миронова Л.В., Балахонов С.В., Урбанович Л.Я., Половинкина В.С., Кожевникова А.С., Куликалова Е.С. и др. Обнаружение «гибридных» штаммов *Vibrio cholerae* eltor при эпидемических осложнениях в Сибири и на Дальнем Востоке. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011; (5): 12—8.
- Смирнова Н.И., Агафонов Д.А., Заднова С.П., Черкасов А.В., Кутырев В.В. Алгоритм идентификации токсигенных генетически измененных штаммов *V. cholerae* биовара эльтор. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014; (2): 36—46.

REFERENCES

- Afanas'ev M.V., Mironova L.V., Basov E.A., Ostyak A.S., Kulikalova E.S., Urbanovich L.Ya. et al. MALDI-TOF mass-spectrometric analysis in the accelerated identification of the *Vibrio* genus micro-

- organisms. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2014; (3): 22—9. (in Russian)
- Mironova L.V., Balakhonov S.V., Urbanovich L.Ya., Polovinkina V.S., Kozhevnikova A.S., Kulikalova E.S. et al. Detection of « hybrid» *Vibrio cholerae* eltor strains during epidemic complications in Siberia and Far East. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; (5): 12—8. (in Russian)
- Smirnova N.I., Agafonov D.A., Zadnova S.P., Cherkasov A.V., Kutyrev V.V. Algorithm of toxigenic genetically altered *Vibrio cholerae* El Tor biovar strain identification. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2014; (2): 36—46. (in Russian)
- Blondal T., Waage B.G., Smarason S.V., Jonsson F., Fjalldal S.B., Stefansson K. et al. A novel MALDI-ToF based methodology for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res.* 2003; 31(24): e155.
- Chin C.S., Sorenson J., Harris J.B., Robins W.P., Charles R.C., Jean-Charles R.R. et al. The origin of the Haitian cholera outbreak strain. *N. Engl. J. Med.* 2011; 364(1): 33—42.
- Dieckmann R., Strauch E., Alter T. Rapid identification and characterization of *Vibrio* species using whole-cell MALDI-ToF mass spectrometry. *J. Appl. Microbiol.* 2010; 109(1): 199—211.
- Eddabra R., Prévost G., Scheffel J.M. Rapid discrimination of environmental *Vibrio* by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Microbiol. Res.* 2012; 167(4): 226—30.
- Haff L.A., Smirnov I.P. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-ToF mass spectrometry. *Genome Res.* 1997; 7(4): 378—88.
- Ikryannikova L.N., Afanas'ev M.V., Akopian T.A., Ill'ina E.N., Kuz'min A.V., Larionova E.E. et al. Mass-spectrometry based minisequencing method for the rapid detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Microbiol. Methods*. 2007; 70(3): 395—405.
- Ikryannikova L.N., Shitikov E.A., Zhivankova D.G., Il'ina E.N., Edelstein M.V., Govorun V.M. A MALDI-ToF MS-based minisequencing method for rapid detection of TEM-type extended-spectrum beta-lactamases in clinical strains of Enterobacteriaceae. *J. Microbiol. Methods*. 2008; 75(3): 385—91.
- Kanungo S., Sah B.K., Lopez A.L., Sung J.S., Paisley A.M., Sur D. et al. Cholera in India: an analysis of reports, 1997—2006. *Bull. World Health Organ.* 2010; 88(3): 185—91.
- Liao N.K., Su Y.N., Kao H.Y., Hung C.C., Wang H.T., Chen Y.J. Parallel minisequencing followed by multiplex matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry assay for beta-thalassemia mutations. *J. Hum. Genet.* 2005; 50(3): 139—50.
- Malakhova M.V., Vereshchagin V.A., Il'ina E.N., Govorun V.M., Zubkov M.M., Pripitnevich T.V. Analysis of genetic markers of *N.*

- gonorrhoeae resistance to beta-lactam antibiotics. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2006; 141(5): 610—5.
14. Morita M., Ohnishi M., Arakawa E., Bhuiyan N.A., Nusrin S., Alam M. et al. Development and validation of a mismatch amplification mutation PCR assay to monitor the dissemination of an emerging variant of *Vibrio cholerae* O1 biotype El Tor. *Microbiol. Immunol.* 2008; 52(6): 314—7.
15. Safa A., Nair G.B., Kong R.Y. Evolution of new variants of *Vibrio cholerae* O1. *Trends Microbiol.* 2009; 18(1): 46—54.
16. Safa A., Sultana J., Cam P.D., Mwansa J.C., Kong R.Y. *Vibrio cholerae* O1 Hybrid El Tor strains Asia and Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(6): 987—8.
17. Olsvik O., Wahlberg J., Petterson B., Uhlen M., Popovic T., Wachsmuth K. et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(1): 22—5.
18. Cholera, 2014. *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015; 90(40): 517—28.

Поступила 09.06.16

Принята к печати 01.07.16

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017

УДК 616.932:577.21.083

<sup>1</sup>Миронова Л.В., <sup>1</sup>Адельшин Р.В., <sup>2</sup>Бикетов С.Ф., <sup>2</sup>Щит И.А., <sup>2</sup>Дятлов И.А., <sup>1</sup>Балахонов С.В.

## ПЕТЛЕВАЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ ДНК: ПРИНЦИП МЕТОДА И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ ДИАГНОСТИКЕ ХОЛЕРЫ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

<sup>1</sup>ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт» Роспотребнадзора, 664047, Иркутск, Россия;

<sup>2</sup>ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора, 142279, Оболенск, Россия

*Рассмотрены особенности технологии реакции петлевой изотермической амплификации ДНК (Loop mediated isothermal amplification — LAMP), вопросы оптимизации реакции и перспективы ее применения в качестве быстрого высокоспецифичного теста в молекулярной диагностике инфекционных болезней и мониторинге контаминации патогенами объектов окружающей среды. Анализ данных литературы об использовании LAMP в диагностике холеры свидетельствует о высокой диагностической ценности метода. LAMP обеспечивает возможность прямой ускоренной детекции токсин-продуцирующих штаммов *Vibrio cholerae* в клинических образцах, выявление детерминант холерного вибриона в чистой культуре, пробах из объектов окружающей среды, пищевых продуктах. Исследователями установлено превышение параметров чувствительности и специфичности LAMP в сравнении с ПЦР, что позволяет рассматривать ее в качестве перспективного метода при экспресс-анализе клинического материала от больных с подозрением на холеру, а также в скрининговых исследованиях объектов окружающей среды и определяет необходимость разработки тест-систем, основанных на использовании данной технологии.*

**Ключевые слова:** молекулярная диагностика; экспресс-методы; петлевая изотермическая амплификация ДНК; холера; *Vibrio cholerae*.

**Для цитирования:** Миронова Л.В., Адельшин Р.В., Бикетов С.Ф., Щит И.А., Дятлов И.А., Балахонов С.В. Петлевая изотермическая амплификация ДНК: принцип метода и перспективы применения в молекулярной диагностике холеры. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2017; 62 (2): 120-124. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-120-124>

<sup>1</sup>Mironova L.V., <sup>1</sup>Adelshin R.V., <sup>2</sup>Biketov S.F., <sup>2</sup>Shchit I.A., <sup>2</sup>Dyatlov I.A., <sup>1</sup>Balakhonov S.V.

### THE LOOP MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA: PRINCIPLE OF METHOD AND PERSPECTIVES OF APPLICATION IN MOLECULAR DIAGNOSTICS OF CHOLERA: PUBLICATIONS REVIEW

<sup>1</sup>The Irkutskii research anti-plague institute of the Rospotrebnadzor, 664047 Irkutsk, Russia

<sup>2</sup>State Research Center for Applied Microbiology and biotechnology, Rospotrebnadzor, Obolensk, Moscow Region, Russia

*The article considers characteristics of technology of reaction of loop mediated isothermal amplification of DNA (LAMP), issues of optimization of reaction and and perspectives of its application as a quick highly-specific test in molecular diagnostics of infectious diseases and monitoring of contamination of environment objects with pathogens. The analysis of publications data concerning application of LAMP in diagnostics of cholera testifies high diagnostic value. The LAMP supports possibility of direct rapid detection of toxin-producing strains of *Vibrio cholerae* in clinical samples. This technique also provides identification of determinants of cholera vibrio in pure culture, samples from environment objects and food products. The research studies established exceeding of parameters of sensitivity and specificity of LAMP as compared with polymerase chain reaction that permits considering LAMP as a perspective technique for express-analysis of clinical material from patients with suspicion on cholera. The LAMP technique can be also used in screening studies of environment objects. The development of test-systems based on application of this technology is required.*

**Key words:** molecular diagnostics; express-method; loop mediated isothermal amplification of DNA; cholera; *Vibrio cholerae*

**For citation:** Mironova L.V., Adelshin R.V., Biketov S.F., Shchit I.A., Dyatlov I.A., Balakhonov S.V. The loop isothermal amplification of DNA: principle of method and perspectives of application in molecular diagnostics of cholera: publications review. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)* 2017; 62 (2): 120-124. (in Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-120-124>

**Для корреспонденции:** Миронова Лилия Валерьевна, канд. мед. наук, зав. лаб. холеры ФКУЗ «Иркутский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора»; e-mail: [mironova-lv@yandex.ru](mailto:mironova-lv@yandex.ru)