

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Терновой В.А.¹, Кононова Ю.В.¹, Зайковская А.В.¹, Чуб Е.В.¹, Волынкина А.С.², Микрюкова Т.П.¹, Котенев Е.С.², Пьянков О.В.¹, Семенцова А.О.¹, Локтев В.Б.¹

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОБНАРУЖЕНИЯ РНК ВИРУСА КРЫМСКОЙ-КОНГО ГЕМОРРАГИЧЕСКОЙ ЛИХОРАДКИ МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ

¹ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Новосибирская обл., пгт. Кольцово, Россия;

²ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 355035, г. Ставрополь, Россия

В настоящей работе представлены результаты лабораторных испытаний набора реагентов для быстрого обнаружения РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ) методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (reverse transcription, loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP). Разработанный набор реагентов RT-LAMP был использован для идентификации вируса ККГЛ и показал чувствительность 10³ ГЭ/мл вирусной РНК, что достаточно для ранней диагностики ККГЛ в начальном периоде заболевания. Набор показал высокую специфичность и отсутствие перекрёстной реактивности при тестировании с панелями вирусов из Государственной коллекции вирусов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (арбовирусами и возбудителями вирусных геморрагических лихорадок). Лабораторные испытания показали высокую аналитическую и диагностическую чувствительность, специфичность набора RT-LAMP для обнаружения РНК вируса ККГЛ, высокую скорость постановки анализа (60-70 мин с учетом пробоподготовки) в сравнении с ПЦР в реальном времени. Апробация полевого варианта набора показала возможность постановки реакции RT-LAMP и учёта результатов анализа без использования сложного оборудования.

Ключевые слова: Крымская-Конго геморрагическая лихорадка; петлевая изотермическая амплификация; молекулярная диагностика; мобильная лаборатория.

Для цитирования: Терновой В.А., Кононова Ю.В., Зайковская А.В., Чуб Е.В., Волынкина А.С., Микрюкова Т.П., Котенев Е.С., Пьянков О.В., Семенцова А.О., Локтев В.Б. Разработка и оценка набора реагентов для обнаружения РНК вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией. Клиническая лабораторная диагностика. 2019; 64 (9): 571-577

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-571-577>

Ternovoi V.A.¹, Kononova Yu.V.¹, Zaykovskaya A.V.¹, Chub E.V.¹, Volynkina A.S.², Mikryukova T.P.¹, Kotenev E.S.², Pyankov O.V.¹, Sementsova A.O.¹, Loktev V.B.¹

DEVELOPMENT AND ASSESSMENT OF A REAGENT KIT FOR RNA DETECTION OF CRIMEAN-CONGO HEMORRHAGIC FEVER VIRUS WITH USING REVERSE TRANSCRIPTION LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD

¹FBRI State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Rospotrebnadzor, 630559, Novosibirsk region, Koltsovo, Russian Federation;

²FKUZ Stavropol Antiplague Scientific Research Institute, Rospotrebnadzor, 355035, Stavropol, Russian Federation

This study presents the results of laboratory trials of the reagent kit for the rapid detection of RNA of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus (CCHFV) using loop-mediated isothermal amplification with reverse transcription (RT-LAMP). The developed RT-LAMP reagent kit was used to detect the CCHFV and showed a sensitivity of 10³ GE/ml of viral RNA, which is sufficient for detection of the CCHFV in the early stage of human infections. The kit showed high specificity and no cross-reactivity with viral panel from the State collection of viruses of the FBRI SRC VB «Vector» (arboviruses and hemorrhagic fever viruses). Laboratory trials of the RT-LAMP kit are showed a high analytical and diagnostic sensitivity and specificity for RNA detection of the CCHFV and high speed of the analysis (60-70 min with sample preparation) compared to real-time PCR. Approbation of the kit field version has showed the possibility of setting the RT-LAMP reaction and viral RNA detection without the using of analytical equipments.

Key words: Crimean-Congo hemorrhagic fever; loop-mediated isothermal amplification; molecular diagnostics; mobile laboratory.

For citation: Ternovoi V.A., Kononova Yu.V., Zaykovskaya A.V., Chub E.V., Volynkina A.S., Mikryukova T.P., Kotenev E.S., Pyankov O.V., Sementsova A.O., Loktev V.B. Development and assessment of a reagent kit for RNA detection of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus with using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2019; 64 (9): 571-577. (in Russ.) DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2019-64-9-571-577>

For correspondence: Ternovoi V.A., PhD., Head of Laboratory for Molecular Epidemiology of Particularly Dangerous Infections, Department for Molecular Virology of Flaviviruses and Viral Hepatitis; e-mail: tern@vector.nsc.ru

Information about authors:

Ternovoi V.A., <http://orcid.org/0000-0003-1275-171X>

Mikryukova T.P., <http://orcid.org/0000-0003-4350-4260>

Kononova Yu.V., <https://orcid.org/0000-0002-3677-3668>

Kotenev E.S., <https://orcid.org/0000-0002-8036-8926>

Для корреспонденции: Терновой Владимир Александрович, канд. биол. наук, зав. лаб. мол. эпидемиологии особо опасных инфекций отд. мол. вирусологии flavivirusов и вирусных гепатитов; e-mail: tern@vector.nsc.ru

Zaykovskaya A.V., <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
Chub E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1521-897X>
Sementsova A.O., <https://orcid.org/0000-0002-7188-5948>

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

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

Pyankov O.V., <https://orcid.org/0000-0003-3340-8750>
Volyunkina A.S., <https://orcid.org/0000-0001-5554-5882>
Loktev V.B., <http://orcid.org/0000-0002-0229-321X>

Received 05.07.2019
Accepted 26.08.2019

Введение. Крымская-Конго геморрагическая лихорадка (ККГЛ, 1D49 по МКБ 11) – зоонозное природно-очаговое заболевание человека, вызываемое вирусом Крымской-Конго геморрагической лихорадки (Crimean-Congo hemorrhagic fever orthonaviruses, род *Orthonairovirus*, семейство *Nairoviridae*, порядок *Bunyavirales*). Вирус ККГЛ широко распространён в Азии, Африке, Ближнем Востоке и на юге Европы [1], в РФ природные очаги ККГЛ зарегистрированы на территории Южного и Северо-Кавказского федеральных округов [2]. Вирус передаётся человеку при присасывании клеща, при контакте с насосавшимися клещами, кровью и тканями инфицированных животных, а также при контакте с кровью и выделениями больных людей, что приводит к возникновению внутрисемейных и внутрибольничных вспышек ККГЛ. Течение ККГЛ у человека включает инкубационный период (1-13 дней), пре-геморрагическую (1-7 дней) и геморрагическую фазы (2-3 дня), период выздоровления (15-20 дней). В тяжелых случаях уровень летальности составляет 5-50% [1, 3, 4]. При этом выделение вируса происходит, в большинстве случаев, в течение 5 дней от начала болезни, при появлении симптомов, характерных для многих инфекционных заболеваний вирусной, бактериальной или паразитарной этиологии, что снижает настороженность при ранней постановке диагноза ККГЛ, особенно при отсутствии в анамнезе заболевшего присасывания клеща или контакта с установленным больным. Как следствие, невозможность в ряде случаев быстро и надежно диагностировать ККГЛ, особенно в первую неделю болезни, способствует вторичному заражению родственников больного или медицинского персонала независимо от уровня медицинского учреждения [5, 6].

С учётом особенностей течения ККГЛ, тяжести заболевания, способности вируса передаваться от человека к человеку, а также отсутствия в настоящее время средств специфической профилактики и лечения, особенно актуальной является ранняя диагностика маркеров вируса ККГЛ. К наиболее чувствительным и специфичным в настоящее время относятся молекулярно-генетические методы детекции вирусной РНК в разных видах клинических образцов. Существующие на сегодняшний день диагностические наборы для обнаружения РНК вируса ККГЛ методом ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) позволяют выявлять вирусную РНК в малых количествах (~10 копий РНК в мл) [7], в том числе различных генотипов вируса. С использованием этого метода можно количественно определять вирусную нагрузку в организме больного с целью оценки эффективности лечения и прогноза заболевания [8]. Однако использование этого метода диагностики возможно в специально оборудованных лабораториях персоналом с соответствующей квалификацией, что в ряде случаев недоступно медицинским учреждениям в сельских и отдалённых районах.

Одним из современных методов обнаружения генетического материала различных микроорганизмов является петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)), впервые предложенная Т. Notomi с соавт. [9] и широко используемая в настоящее время для идентификации различных патогенов бактериального, вирусного, грибкового и паразитарного происхождения [10]. Метод LAMP характеризуется высокой чувствительностью, быстротой проведения анализа (менее 60 мин) и не требует сложного оборудования, что позволяет использовать его в полевых условиях. В отличие от ПЦР в реальном времени, метод LAMP менее чувствителен к загрязнениям, что снижает требования к пробоподготовке образцов, а также позволяет проводить стадию обратной транскрипции в одной пробирке с последующей амплификацией (вариант RT-LAMP) и визуализацией продуктов реакции. При высокой концентрации в образце вирусной РНК её можно выявлять без предварительной экстракции, как было показано Lamb с соавт. на примере детекции РНК вируса Зика методом RT-LAMP в образцах мочи от больных людей и инфицированных комарах [11], что невозможно при диагностике методом ПЦР в реальном времени. Это может быть особенно актуально при проведении быстрой диагностики во время вспышек и эпидемий, вызванных вирусами 1-2 групп патогенности, большинство из которых имеют РНК-геном.

В Российской Федерации в настоящее время метод LAMP рассматривается, главным образом, применительно для диагностики бактериальных патогенов [12, 13]. Что касается диагностики вирусных инфекций, имеется сообщение об использовании метода LAMP для диагностики вируса мешотчатого расплода пчел (Picornavirales, *Iflaviridae*, *Iflavirus*) [14], однако в отношении вирусов, патогенных для человека, использование этого метода описано не было.

Целью настоящей работы было создание и лабораторные испытания набора реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (RT-LAMP).

Материал и методы. Образцы сывороток крови 6 больных с диагнозом «Крымская геморрагическая лихорадка», зарегистрированных в Ростовской области в эпидсезон 2016 г. были предоставлены Референс-центром по мониторингу за ГЛЛ на базе ФКУЗ Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Пробы сывороток крови отобраны на 1-6 день от начала заболевания. Разрешения на использование сывороток для исследовательских целей были выданы этическими комитетами при медицинских учреждениях, где пациенты проходили лечение. Образцы сывороток крови хранились при температуре -70°C до исследования. Наличие РНК вируса ККГЛ в сыворотках подтверждали при исследовании методом ПЦР с использованием набора реагентов для выявления

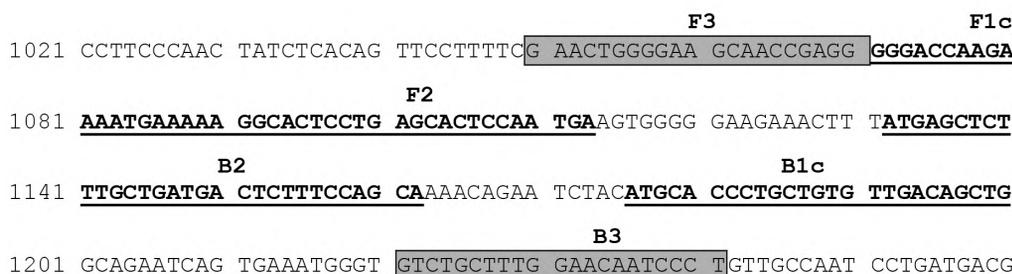


Рис. 1. Схематическое изображение участка S-сегмента генома вируса ККГЛ с расположением праймеров F3 и B3 (выделены серым цветом), FIP (F1c-F2) и VIP (B2-B1c) (подчеркнуты и выделены жирным шрифтом). В качестве прототипа использована последовательность фрагмента S-сегмента генома вируса ККГЛ (изолят CCHF/Russia/Kalmykia/Shch_1/2016, KY982868).

РНК вируса ККГЛ «АмплиСенс® CCHFV-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), а также секвенированием участка кодирующей области S-сегмента генома вируса (538 н.о.), с определением принадлежности вируса к генотипу Европа-1, подгруппам Va – Ставрополь-Ростов-Астрахань и Vb – Волгоград-Ростов-Ставрополь [2].

Праймеры для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP были рассчитаны для участка S-сегмента вирусного генома на основании выровненных доступных в GenBank нуклеотидных последовательностей изолятов вируса ККГЛ с использованием программного обеспечения MEGA7 и Lasergene 8. Был проведен дизайн четырех праймеров, включающий два внешних (F3 и B3) и два внутренних (FIP и VIP), как показано на рис. 1.

В качестве положительного контрольного образца (ПКО) использовалась плаزمиды, содержащая целевой участок S-сегмента генома вируса ККГЛ. Нарработку вируса ККГЛ проводили на культуре клеток SW-13 (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) путем последовательных пассажей клинического материала от больного (цельная кровь, CCHF/Russia/Kalmykia/Shch_1/2016), предоставленного В.Г. Дедковым [15]. Культивирование проводили с использованием среды Игла MEM (Gibco, США) с добавлением 2% эмбриональной сыворотки KPC (Gibco, США) и антибиотиков Anti-Anti (Gibco, США) в течение 14 суток при 37°C. Наличие РНК вируса ККГЛ в культуральной жидкости определяли методом ПЦР в реальном времени с использованием набора «АмплиСенс® CCHFV-FL» (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). После третьего пассажа из вирусосодержащей культуральной жидкости проводили экстракцию РНК с использованием набора Рибо-Преп (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), реакцию обратной транскрипции (Реверта-Л, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), и далее проводили амплификацию целевого фрагмента S-сегмента вирусного генома. Полученный фрагмент очищали с использованием набора для элюции ДНК из агарозного геля (БиоСилика, Россия), клонировали с использованием набора pCR-2.1 (Invitrogen, США) с последующей наработкой рекомбинантной плазмиды в *E. coli* (штамм TOP10, Invitrogen, США). Концентрацию ДНК определяли на спектрофлуориметре Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, США).

Для определения аналитической чувствительности реакцию LAMP проводили с серией 10-кратных разведе-

ний ПКО, в конечном объеме 15 мкл, содержащем реакционный буфер 40 мМ Трис-НСl, 20 мМ КСl, 16 мМ MgSO₄, 20 мМ (NH₄)₂SO₄, 0,2% Tween 20, 0,6 М бетаин, 2,8 мМ каждого dNTP, смесь праймеров (по 10 пмоль F3 и L3, по 40 пмоль FIP и VIP) и 1 мкл ПКО. В реакционную смесь добавляли ДНК-полимеразу Bst 3.0 (New England BioLabs, Великобритания) в концентрации 6 единиц на реакцию. В качестве красителя использовали EvaGreen (Biotium, США). Образцы анализировали при 63°C в течение 40 мин на амплификаторе Genie II (OptiGene Limited, Великобритания) с детекцией результатов реакции по изменению интенсивности флуоресценции. Продукты LAMP также визуализировались путем электрофореза в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием с использованием системы для фото-документации гелей (Universal Hood II, Bio-Rad, США).

Для сравнения аналитической чувствительности ПЦР и LAMP с теми же образцами ставили ПЦР с использованием набора HS-Screen (Евроген, Россия) с добавлением праймеров F3 и L3 (по 10 пмоль каждого) и 1 мкл ПКО, в присутствии красителя EvaGreen. Режим термоциклирования: 95°C – 5 мин, затем 95°C – 5 с, 52°C – 15 с, 72°C – 30 с (40 циклов); 72°C – 7 мин. Образцы анализировали на амплификаторе Real-time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США).

Для определения аналитической специфичности и исключения перекрестной реактивности проводили проверку используемых праймеров в RT-LAMP с РНК вирусов из Государственной коллекции вирусов при ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора: а) арбовирусы – вирус Венесуэльского энцефалита лошадей (штамм ТС-83), вирус японского энцефалита (Пекин-1, Jagar), вирус клещевого энцефалита (Софьин, Абсеттаров, Глубинное 2004, 205), вирус желтой лихорадки (Кинтампо, 17D, Asibi), вирусы денге 1 и 2 типов (DENV-2/RUS/MX-Novosibirsk 01/2012, DENV-1/RUS/TH-Novosibirsk 02/2012), вирус Западного Нила (Eg-101, Волгоград 28889), вирус лихорадки долины Рифт (ZH-501, RVF-113/09-ПС); б) вирусы-возбудители геморрагических лихорадок – вирус Хантаан (Hantaan 76-188, Amur AP 94-415, FE HTN P-98-87), вирус Ласса (Джозия), вирус Мачупо (Карвалло, 208), эболавирус Заир (Заир 76 Mayinga), Марбургвирус (Porp). Экстракцию РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости проводили с использованием набора Рибо-Преп (ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), выделенную РНК хранили при -70°C до использования.

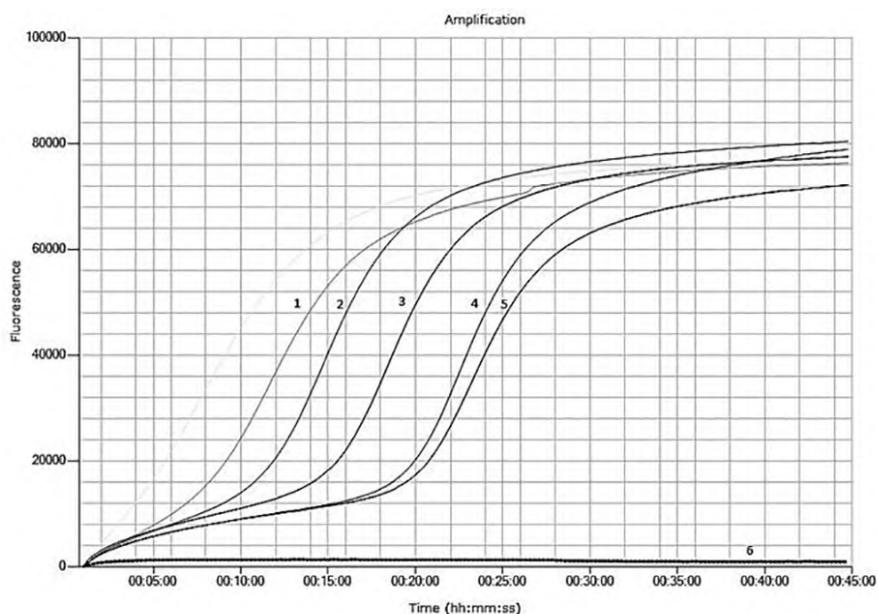


Рис. 2. Аналитическая чувствительность реакции LAMP с серийными 10-кратными разведениями ПКО. 1 – 10^7 ГЭ/мл, 2 – 10^6 ГЭ/мл, 3 – 10^5 ГЭ/мл, 4 – 10^4 ГЭ/мл, 5 – 10^3 ГЭ/мл, 6 – отрицательный контроль (вода).

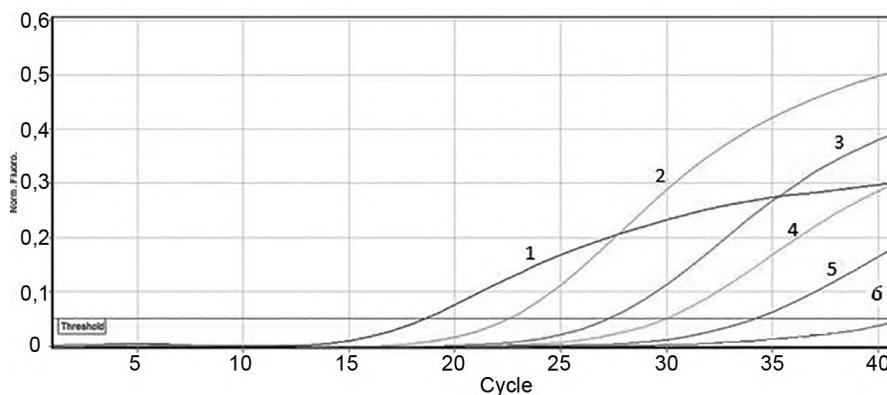


Рис. 3. Аналитическая чувствительность ПЦР в реальном времени с серийными 10-кратными разведениями ПКО. Нумерация кривых соответствует данным для рис. 2.

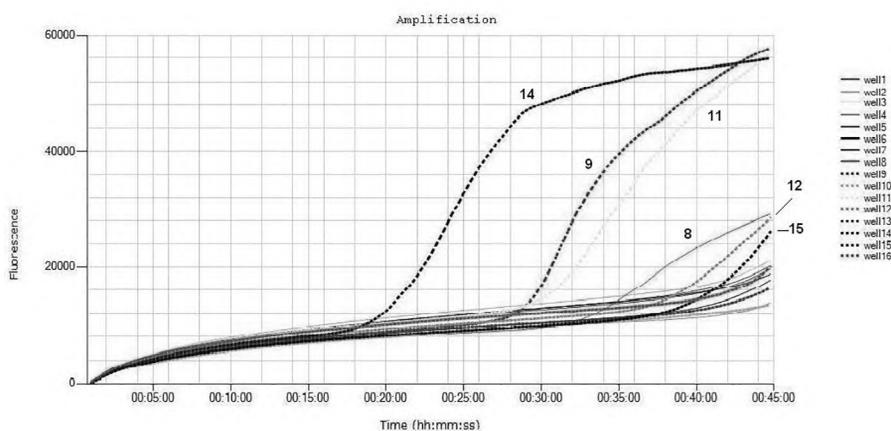


Рис. 4. RT-LAMP с клиническими образцами. №8, 9, 11, 12, 14, 15 – сыворотки больных с диагнозом ККГЛ; №1-7, 13, 16 – сыворотки здоровых доноров; №10 – вода.

Диагностическую чувствительность и специфичность набора реагентов определяли с использованием сывороток крови больных с диагнозом «Крымская геморрагическая лихорадка». В качестве отрицательного контроля использовались донорские человеческие сыворотки. Экстракцию РНК из сывороток проводили с использованием реактива GenePurgeDirect Sample Preparation Reagent (Nimagen, Нидерланды) согласно инструкции производителя. Количество суммарной РНК определяли с использованием спектрофлуориметра Qubit 2.0 и набора реагентов для количественного определения (Invitrogen, США). Выделенную РНК хранили при -70°C до использования. В реакционную смесь LAMP (как описано выше) добавляли 50 ед. фермента обратной транскриптазы (Invitrogen, США) и 1 мкл РНК, выделенной из сывороток крови. Конечный объем реакционной смеси RT-LAMP доводили до 15 мкл водой. RT-LAMP проводили на Genie II: 42°C – 15 мин (обратная транскрипция), 63°C – 40 мин (изотермическая амплификация) с детекцией результатов реакции по изменению интенсивности флуоресценции.

Для апробации полевого варианта набора реагентов проводили RT-LAMP в конечном объеме 50 мкл с добавлением красителя 0,2 ммоль HNB (Hydroxy Naphtol Blue, Fluka, США) согласно методике, описанной X.Wang с соавт. [16]. Реакцию проводили в твердотельном термостате Термит (ДНК-Технология, Россия) в температурно-временном режиме, описанном ранее. Учет результатов реакции проводили визуально, по изменению цвета реакционной смеси в видимом свете (розовая окраска – наличие РНК вируса ККГЛ, фиолетовая – отсутствие) и в ультрафиолетовом излучении с использованием системы для фотодокументации гелей.

Результаты. Аналитическая чувствительность. В результате реакции LAMP с серийными 10-кратными разведениями ПКО чувствительность метода составила 10^3 ГЭ/мл (геном-эквивалент/мл), что соответствует 10 копиям РНК вируса ККГЛ в исследуемом образце (объем до 10 мкл). Учет результатов проводился через 45 мин (рис. 2).

Для сравнения аналитической чувствительности метода LAMP с теми же образцами проводили ПЦР в реальном времени с использовани-

ем праймеров F3 и B3, чувствительность при этом составила 10^4 ГЭ/мл (рис. 3), время проведения анализа составило около 2 ч.

Аналитическая специфичность. Постановка RT-LAMP с образцами РНК арбовирусов, вирусов-возбудителей геморрагических лихорадок и интактных человеческих сывороток показала отсутствие перекрестной реактивности используемых праймеров с генетическим материалом этих вирусов и человеческой РНК.

Диагностическая чувствительность и специфичность. На рис. 4 представлены результаты RT-LAMP с клиническими образцами – сыворотками больных ККГЛ и сыворотками здоровых доноров (отрицательный контроль).

Как видно из рис. 4, в реакции RT-LAMP уже через 20-30 мин можно успешно регистрировать наличие вирусспецифической РНК у больных (сыворотки №8, 9, 11, 12, 14, 15). Специфичность продуктов реакции можно оценить по температуре плавления 86–89°C (рис. 5).

Электрофоретический анализ продуктов RT-LAMP сывороток больных ККГЛ показал наличие гетерогенных по длине фрагментов, что свидетельствует о протекании изотермической амплификации в реакционной смеси (рис. 6).

Апробация полевого варианта. Результаты RT-LAMP в полевом варианте представлены на рис. 7. Можно видеть, что интенсивность свечения продуктов реакции при ультрафиолетовом облучении для клинического образца, содержащего РНК вируса ККГЛ, сравнима с таковой для ПКО. При визуальном учёте результатов реакции окраска продуктов RT-LAMP в пробирках с вируссодержащей сывороткой и ПКО была розовая, в остальных пробирках – светло-фиолетовая. Общее время анализа составило 55–60 минут.

Обсуждение. Согласно статистике Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно в мире регистрируется 10-15 тыс. случаев заболевания ККГЛ и примерно 500 смертельных случаев [1]. Большая часть эндемичных по ККГЛ территорий приходится на бедные и развивающиеся страны с низким уровнем медицины (значительная часть эндемичных районов Африки и Центральной Азии) и страны с длительными вооруженными конфликтами (Афганистан, Ирак), где может отсутствовать достоверная статистика о заболеваемости ККГЛ и числе смертельных случаев, в связи с чем реальное число заболевших и умерших от ККГЛ может быть существенно выше. Существует также риск интродукции вируса ККГЛ за пределы эндемичных регионов при перемещении людей, сельскохозяйственных животных или инфицированных клещей [17]. Учитывая вышеперечисленные обстоятельства, а также особенности эпидемиологии и патогенеза ККГЛ, ранняя и быстрая диагностика возбудителя является одной из мер, препятствующих возникновению и распространению внутрисемейных и внутрибольничных вспышек этого заболевания.

Вирус ККГЛ характеризуется наибольшим среди арбовирусов генетическим разнообразием [18], что

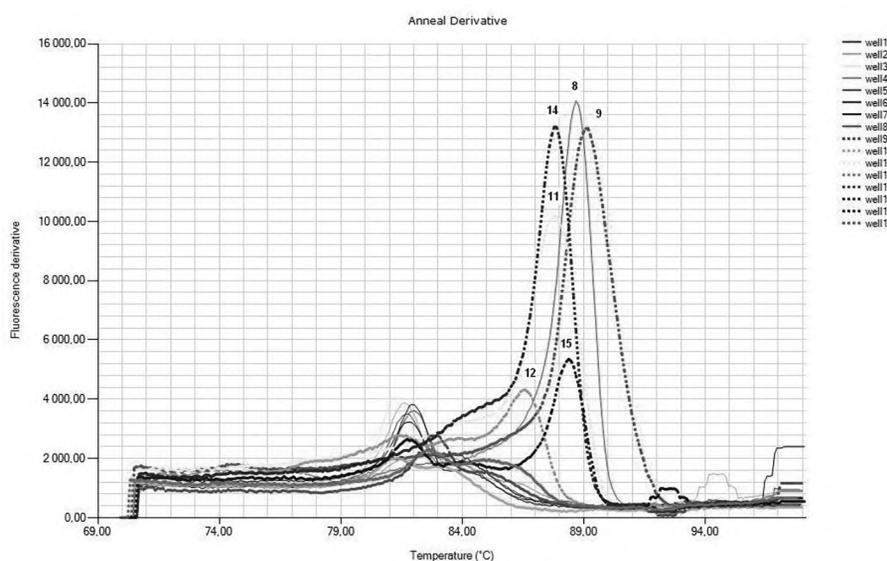


Рис. 5. Температура плавления продуктов RT-LAMP клинических образцов. Обозначение кривых соответствует данным для рисунка 4.

затрудняет разработку диагностических наборов на основе молекулярно-генетических методов. Наиболее предпочтительным для диагностики и генотипирования является S-сегмент генома вируса ККГЛ [3, 7], что было учтено при дизайне используемых в нашем наборе внешних (F3, B3) и внутренних (FIP, VIP) праймеров.

В настоящее время «золотым стандартом» среди методов диагностики ККГЛ у пациентов считается ПЦР в реальном времени [8], однако ее использование суще-

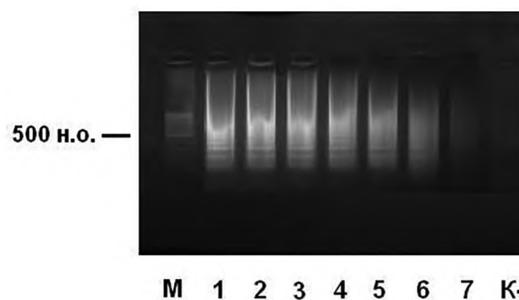


Рис. 6. Электрофорез продуктов RT-LAMP клинических образцов. Сыворотки больных ККГЛ: 1 - №14, 2 - 11, 3 - 9, 4 - 8, 5 - 15, 6 - 12; сыворотка здорового донора (№2); K- – вода; M – маркер длин фрагментов 100+ (Евроген, Россия).

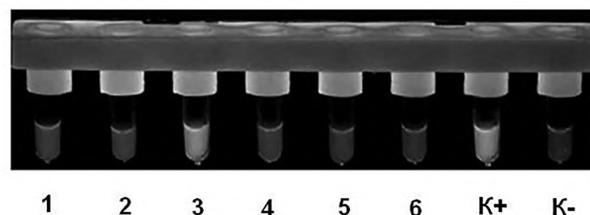


Рис.7. RT-LAMP в полевом варианте. 1 – вирус денге 1 типа, 2 – вирус желтой лихорадки, 3 – сыворотка больного ККГЛ (№14), 4 – сыворотка здорового донора (№2), 5 – эболавирус Заир, 6 –Марбургвирус; K+ – ПКО; K- – вода.

ственно ограничивается техническими возможностями лаборатории. Впервые использование RT-LAMP для выявления РНК вируса ККГЛ в клиническом материале было описано Н.Оsman с соавт. [19], при этом чувствительность метода была в 100 раз выше по сравнению с двухраундовой вложенной ПЦР. В нашем исследовании аналитическая чувствительность метода RT-LAMP составила 10^3 ГЭ/мл, при этом наблюдалась зависимость накопления флуоресцентного сигнала от концентрации ПКО (рис. 2), аналитическая чувствительность ПЦР в реальном времени при использовании тех же внешних праймеров F3 и B3 была на порядок ниже (рис. 3). Отсутствие перекрёстного взаимодействия используемых в наборе RT-LAMP праймеров с РНК арбовирусов и вирусов-возбудителей геморрагических лихорадок является подтверждением аналитической специфичности набора.

При анализе клинических образцов от больных ККГЛ методом RT-LAMP вирусная РНК обнаруживалась в количестве, соответствующем 10^3 - 10^2 ГЭ/мл (рис. 4, сыворотки №8, 12, 15), специфичность флуоресценции была подтверждена при определении температуры плавления (рис. 5) и электрофоретической детекцией продуктов реакции (рис. 6). Полученные результаты свидетельствуют о том, что разработанный набор реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP может быть использован как для ранней диагностики ККГЛ в начальном периоде заболевания, так и для подтверждения отсутствия вируса в организме в период выздоровления, исходя из чувствительности метода и значений вирусной нагрузки [7, 20]. Время анализа клинических образцов методом RT-LAMP составило 50 мин, при этом время выделения РНК с использованием реактива GenePurgeDirect Sample Preparation Reagent заняло 5-10 мин. Таким образом, общее время анализа методом RT-LAMP с учётом пробоподготовки в нашем исследовании было 60-70 мин, что позволяет уточнять диагноз ККГЛ при поступлении подозрительного больного в стационар вместе с проведением стандартных анализов и диагностических процедур.

Отдельным достоинством метода LAMP является возможность его использования в полевых условиях. Так, метод показал свою эффективность при анализе клинических образцов на базе мобильной лаборатории в отдалённых районах Гвинеи во время эпидемии болезни, вызываемой вирусом Эбола в 2013-2016 гг. [21]. Согласно результатам нашего исследования, анализ клинических образцов на наличие РНК вируса ККГЛ в полевых условиях можно проводить как на амплификаторе Genie II с учётом результатов по изменению сигнала флуоресценции, так и с постановкой реакции LAMP в микротермостате с визуальным учётом результатов анализа. Используемый в нашей работе экспресс-метод GenePurgeDirect Sample preparation Reagent позволяет проводить выделение РНК из малого объёма вирусосодержащего материала (2,5 мкл согласно инструкции производителя) без стадий экстракции и очистки, для которых необходимы вакуумный насос и центрифуга с охлаждением. Анализ клинического материала на амплификаторе Genie II возможен как при использовании для питания прибора источника переменного тока, так и при отсутствии энергоснабжения с использованием аккумулятора прибора. Таким образом, использование разработанного набора для выявления РНК вируса ККГЛ в клиническом материале методом RT-LAMP может быть альтернативой

широко применяемой для этих целей ПЦР в реальном времени, особенно при необходимости проведения экстренной диагностики в полевых условиях.

Выводы. Лабораторные испытания набора реагентов для выявления РНК вируса ККГЛ методом RT-LAMP показали, что аналитическая и диагностическая чувствительность составила 10^3 ГЭ/мл при 100% аналитической и диагностической специфичности. Скорость проведения анализа клинических образцов составила 60-70 мин с учётом пробоподготовки. Диагностическая чувствительность набора позволяет выявлять вирусную РНК у пациентов с ККГЛ в начальном периоде заболевания. Анализ клинических образцов от больных ККГЛ с использованием разработанного набора реагентов можно проводить как в стационарных лабораториях, оснащённых амплификаторами для ПЦР в реальном времени (программирование в режим термостата), так и на базе мобильных лабораторий с постановкой реакции в портативном амплификаторе Genie II или твердотельном микротермостате.

Финансирование. Исследование проводилось в рамках выполнения государственного задания Федеральной службы в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 1, 3, 4, 6-11, 15-21 см. REFERENCES)

2. Онищенко Г.Г., Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Василенко Н.Ф., Манин Е.А., Вольнкина А.С., Прислегина Д.А., Семенко О.В.. Крымская геморрагическая лихорадка. Воронеж: Фаворит; 2018.
5. Петрова И.Д., Кононова Ю.В., Чаусов Е.В., Шестопалов А.М., Тишкова Ф.Х. Генетические варианты вируса Крымской-Конго геморрагической лихорадки, циркулировавшие в 2009 г. в эндемичных районах южного Таджикистана. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 3: 29-36.
12. Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Кудрявцева Т.Ю., Шишкова Н.А., Миронова Р.И., Маринин Л.И. и др. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибиреязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 35(2): 69-76.
13. Щит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63(6): 378-84.
14. Тронин А.В., Келин Л.В., Рябова А.А. Диагностика вируса мшотчатого расплода методом ПЦР в полевых условиях. *Пчеловодство*. 2018; 9: 26-8.

REFERENCES

1. Introduction to Crimean-Congo Haemorrhagic Fever. Available at: <https://www.who.int/emergencies/diseases/crimean-congo-haemorrhagic-fever/introduction.pdf> (update 27.06.2019)
2. Onishchenko G.G., Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Vasilenko N.F., Manin E.A., Volynkina A.S., Prisleгина D.A., Semenko O.V. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever [Krymskaya gemorragicheskaya likhoradka]. Voronezh: Favorit; 2018. (in Russian)
3. Shayan S., Bokaeian M., Shahrivar M.R., Chinikar S. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. *Lab Med*. 2015; 46(3):180-9.
4. Hawman D.W., Feldmann H. Recent advances in understanding Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *F1000Res*. 2018; 7. pii: F1000 Faculty Rev-1715. doi: 10.12688/f1000research.16189.1.
5. Petrova I.D., Kononova Iu.V., Chausov E.V., Shestopalov A.M.,

- Tishkova F.Kh. Genetic variants of the Crimean-Congo hemorrhagic fever virus circulating in endemic areas of the southern Tajikistan in 2009. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2013; (3):29-36. (in Russian)
6. Conger N.G., Paolino K.M., Osborn E.C., Rusnak J.M., Günther S., Pool J. et al. Health care response to CCHF in US soldier and nosocomial transmission to health care providers, Germany, 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(1): 23-31.
 7. Wölfel R., Paweska J.T., Petersen N., Grobelaar A.A., Leman P.A., Hewson R. et al. Virus detection and monitoring of viral load in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus patients. *Emerg. Infect. Dis.* 2007; 13(7):1097-100.
 8. Papa A. Diagnostic approaches for Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2019; doi: 10.1080/14737159.2019.1615450.
 9. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. 28(12):E63.
 10. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 124(3): 626-43.
 11. Lamb L.E., Bartolone S.N., Tree M.O., Conway M.J., Rossignol J., Smith C.P. et al. Rapid Detection of Zika Virus in Urine Samples and Infected Mosquitos by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Sci. Rep.* 2018; 8(1): 3803.
 12. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Kudryavtseva T.Yu., Shishkova N.A., Mironova R.I., Marinin L.I. et al. Application of loop Mediated isothermal DNA Amplification to reveal and identify Bacillus Anthracis. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya*. 2017; 35(2): 69-76. (in Russian)
 13. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Biketov S.F. Comparative analysis of LAMP and Real Time PCR methods to detect pathogens of glanders and meliodosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63(6): 378-84. (in Russian)
 14. Tronin A.V., Kelin L.V., Ryabova A.A. Diagnosis of sacbrood virus by PCR in field conditions. *Pchelovodstvo*. 2018; 9: 26-8. (in Russian)
 15. Dedkov V.G., Shchelkanov M.Y., Bushkueva B.T., Rudenko T.A., Kurdyukova O.V., Galkina I.V. et al. A neonatal death associated with Crimean-Congo hemorrhagic fever (Republic of Kalmykia, Russia, June 2016). *Antiviral Res.* 2017; 146:146-8.
 16. Wang X., Zhang Q., Zhang F., Ma F., Zheng W., Zhao Z. et al. Visual detection of the human metapneumovirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *Viol. J.* 2012; 9:138.
 17. Spengler J.R., Bergeron É., Spiropoulou C.F. Crimean-Congo hemorrhagic fever and expansion from endemic regions. *Curr. Opin. Virol.* 2019; 34:70-8.
 18. Bente D.A., Forrester N.L., Watts D.M., McAuley A.J., Whitehouse C.A., Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res.* 2013; 100(1):159-89.
 19. Osman H.A., Eltom K.H., Musa N.O., Bilal N.M., Elbashir M.I., Aradaib I.E. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for detection of Crimean Congo hemorrhagic fever virus in Sudan. *J. Virol. Methods*. 2013; 190(1-2): 4-10.
 20. Hasanoglu I., Guner R., Carhan A., K. Tufan Z., Y. Caglayik D., Yilmaz G.R. et al. Dynamics of viral load in Crimean Congo hemorrhagic fever. *J. Med. Virol.* 2018; 90(4): 639-43.
 21. Kurosaki Y., Magassouba N., Bah H.A., Soropogui B., Doré A., Kourouma F. et al. Deployment of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Ebola Virus Surveillance in Remote Areas in Guinea. *J. Infect Dis.* 2016; 214(suppl. 3):S229-S233.

Поступила 05.07.19
Принята к печати 26.08.19