

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2023

Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачёв А.Л., Носков А.К., Морозова И.В.

АНАЛИЗ СПЕЦИФИЧНОСТИ ПРАЙМЕРОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ГЕНОВ *VIBRIO CHOLERAЕ* МЕТОДОМ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP) *IN SILICO* И *IN VITRO*

ФКУЗ «Ростовский-на-Дону противочумный институт» Роспотребнадзора, 344002, г. Ростов-на-Дону, Россия

*Представлены результаты идентификации штаммов холерных вибрионов и определения их патогенности методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) с использованием сконструированных оригинальных праймеров. Оптимизированы временные и температурные условия анализа (65°С в течение 30-60 мин). Чувствительность составила 1×10⁴ м.кл./мл. Не обнаружено перекрёстных реакций с ДНК представителей других близкородственных видов и родов. Разработанные праймеры для LAMP являются точным и ценным инструментом для выявления *V. cholerae*, в том числе, продуцирующих холерный токсин. Этот анализ может заменить трудоёмкие биохимические тесты для идентификации *V. cholerae*.*

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация; LAMP; холерные вибрионы; холерный токсин; праймеры.

Для цитирования: Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачёв А.Л., Носков А.К., Морозова И.В. Анализ специфичности праймеров для выявления генов *Vibrio cholerae* методом изотермической петлевой амплификации (LAMP) *in silico* и *in vitro*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (3): 178-184.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-3-178-184>

Для корреспонденции: Цырулина Оксана Алексеевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории «Коллекция патогенных микроорганизмов»; e-mail: rykowskaya.oxana@yandex.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 01.02.2023

Принята к печати 09.02.2023

Опубликовано 20.03.2023

Chemisova O.S., Cyulina O.A., Trukhachev A.L., Noskov A.K., Morozova I.V.

ANALYSIS OF THE SPECIFICITY OF PRIMERS FOR THE DETECTION OF *VIBRIO CHOLERAЕ* GENES BY ISOTHERMAL LOOP AMPLIFICATION (LAMP) *IN SILICO* AND *IN VITRO*

The Federal Government Health Institution «Rostov-on-Don Plague Control Research Institute» of the Federal Service for Surveillance in the Sphere of Consumers Rights Protection and Human Welfare, 344002, Rostov-on-Don, Russia

*Presents the results of identification of vibrio cholera strains and determination of their pathogenicity by isothermal loop amplification (LAMP) using constructed original primers. The time and temperature conditions of the analysis were optimized (65°C for 30-60 minutes). The sensitivity was 1×10⁴ m. cl. /ml. There were no cross-reactions with the DNA of representatives of other closely related species and genera. It has been established that the developed primers for LAMP are an accurate and valuable tool for detecting *V. cholerae*, including those producing cholera toxin. This analysis can replace time-consuming biochemical tests to identify *V. cholerae*.*

Key words: loop isothermal amplification; LAMP; cholera vibrios; cholera toxin; primers.

For citation: Chemisova O.S., Cyulina O.A., Trukhachev A.L., Noskov A.K., Morozova I.V. Analysis of the specificity of primers for the detection of *Vibrio cholerae* genes by isothermal loop amplification (LAMP) *in silico* and *in vitro*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2023; 68 (3): 178-184 (in Russ.)
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2023-68-3-178-184>

For correspondence: Cyulina Oksana Alekseevna, candidate of biological sciences, Senior researcher of the laboratory «Collection of pathogenic microorganisms»; e-mail: rykowskaya.oxana@yandex.ru

Information about authors:

Chemisova O.S., <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>;

Cyulina O.A., <https://orcid.org/0000-0001-6176-2605>;

Trukhachev A.L., <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>;

Noskov A.K., <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>;

Morozova I.V., <https://orcid.org/0000-0002-0781-0394>.

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

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 01.02.2023

Accepted 09.02.2023

Published 20.03.2023

Введение. Холера – острое инфекционное диарейное заболевание, которое вызывается бактерией *Vibrio cholerae* при попадании в организм заражённых

пищевых продуктов или воды. Из-за высокой контагиозности и летальности относится к группе особо опасных инфекций. При отсутствии адекватного

Таблица 1

Штаммы микроорганизмов, использованные в работе

№ п/п	Вид микроорганизма	Наличие гена <i>ctx</i> (по результатам ПЦР-тестирования)	Количество штаммов
1	<i>V. cholerae</i> O ₁	+	20
2	<i>V. cholerae</i> O ₁	-	20
3	<i>V. cholerae</i> O ₁₃₉	+	4
4	<i>V. cholerae</i> O ₁₃₉	-	4
5	<i>V. cholerae</i> nonO ₁ /nonO ₁₃₉	+	1
6	<i>V. cholerae</i> nonO ₁ /nonO ₁₃₉	-	8
7	<i>V. parahaemolyticus</i>	-	10
8	<i>V. alginolyticus</i>	-	5
9	<i>V. vulnificus</i>	-	5
10	<i>V. fluvialis</i>	-	3
11	<i>V. harveyi</i>	-	3
12	<i>E. coli</i>	-	3
13	<i>Aeromonas</i>	-	3
14	<i>Plesiomonas</i>	-	2
15	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	1

лечения болезнь может в короткие сроки привести к обезвоживанию, появлению судорожного синдрома и смерти [1]. Эпидемическая ситуация в мире по заболеваемости холерой остается напряжённой. Ежегодно в мире по данным ВОЗ регистрируется до 150 тыс. случаев холеры более чем в 50 странах, часть из которых заканчиваются летальными исходами. Вспышки холеры по всему миру происходят и по сей день. Это определяет необходимость совершенствования клинической лабораторной диагностики холеры. Разработан ряд методов эффективной детекции бактерий *V. cholerae* в пищевых продуктах и воде. По сравнению с культуральным микробиологическим методом обнаружения, молекулярные методы более быстрые и чувствительные [2-6]. Совершенствование существующих и внедрение в лабораторную практику новых методов с возможностью более высокой скорости, точности, простоты использования и меньших затрат, по-прежнему, является насущной необходимостью. Один из подходов – новый метод амплификации нуклеиновых кислот, называемый петлевой изотермической амплификацией (LAMP) [7]. Технология основана на использовании для амплификации ДНК четырёх (шести) олигонуклеотидных праймеров (пара наружных, пара внутренних, пара петлевых) и большого фрагмента Bst ДНК-полимеразы, обладающего сильной вытесняющей активностью. Реакция протекает при постоянной температуре 60-65°C [8]. Это даёт ряд преимуществ: во-первых, использование трёх пар праймеров предполагает узнавание минимум шести специфических последовательностей, что увеличивает специфичность тестирования [9]; во-вторых, реакция может быть проведена в изотермических условиях; в-третьих, обнаружение упрощается за счёт визуальной оценки невооружённым глазом без проведения электрофоретического

разделения фрагментов. Метод LAMP быстрее, специфичнее и проще в выполнении, чем ПЦР-анализ.

Имеются сообщения о применении LAMP для детекции ряда генов *V. cholerae*, однако их немного и, как правило, они зарубежные [10-12]. Тест-системы для выявления ДНК *V. cholerae* на основе LAMP в РФ не зарегистрированы.

Цель исследования – подбор, конструирование и проверка специфичности праймеров *in silico* и *in vitro* для изотермической петлевой амплификации к видоспецифичным генам, и генам, кодирующим факторы патогенности *V. cholerae*.

Материал и методы. В работе использованы 57 клинических штаммов *V. cholerae* O₁, O₁₃₉, nonO₁, nonO₁₃₉ серогрупп с различными генетическими характеристиками и для проверки специфичности праймеров – 35 штаммов близкородственных видов и родов (табл. 1). Культуры были получены из коллекции микроорганизмов ФКУЗ Ростовский-на-Дону противочумный институт Роспотребнадзора.

Ампулы с культурами *V. cholerae* вскрывали и высевали на агар Мартена и инкубировали в течение 18 ч при температуре 37±1°C. Штаммы близкородственных видов и родов высевали на общепринятые для них питательные среды (агар и бульон Мартен с 2% NaCl – для галофильных вибрионов, агар и бульон Хоттингера – для *E. coli*, *Aeromonas* и *Plesiomonas*).

Для дальнейшего использования из каждой чистой культуры холерного вибриона, готовили суспензии в 2 мл 0,9% раствора натрия хлористого в концентрации 1×10⁹ м. кл./мл по стандарту мутности бактериальных взвесей ОСО 42-28-86-2018 (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России). В целях определения чувствительности праймеров разведения подготовленных взвесей в 0,9% растворе натрия хлористого доводили до конечной концентрации 1×10² м. кл./мл. ДНК выделяли из 100 мкл суспензии. Культуры гетерологичных микроорганизмов взяты в работу в концентрации 1×10⁹ м. кл./мл.

Для выделения ДНК из чистой культуры микроорганизмов использован набор реагентов «ДНК-сорб В» («Интерлабсервис», Москва). Работу проводили в соответствии с инструкцией производителя.

Для конструирования праймеров использован интернет-сервис Primer Explorer 5 (LAMP primer designing software: <http://primerexplorer.jp/e/>), VNTI9 и BLAST NCBI. Праймеры синтезированы фирмой Евроген (Москва).

Реакционная смесь для LAMP содержала 12,5 мкл колориметрической смеси для LAMP («New England BioLabs», США), 2,5 мкл смеси праймеров (10X), 1-5 мкл образца, воды до конечного объёма 25 мкл. Образцы инкубировали в амплификаторе («ДНК-Технология») Терцик при 65°C в течение 30-60 минут. Детекция продуктов амплификации осуществлялась колориметрическим методом: смеси, в которых накапливался продукт, в ходе реакции меняли цвет с красного на жёлтый. Это достигается за счёт сдвига в ходе реакции pH раствора в кислую сторону, в связи с чем становится возможным детектирование с помощью pH-чувствительных индикаторов, которые при добавлении в реакционную смесь меняют свой цвет.

Олигонуклеотидные праймеры, разработанные и использованные в исследовании

Праймеры	Целевой ген	Последовательность (от 5' до 3')
FIP-	<i>ompW</i>	ATGGGGACTTGCCTGCTAACGTTTTTCGTTGAGGAACCAGCTATC
BIP-		AATCACTCAATCCAGCATTAGTACCTTTTGAATTACACCACCTTTCTTTGATGA
F3-		TGGCATAACCACACAGAAG
B3		GTCCATAAGTTGGTGCGG
LF-		TTGGCCTTTGATTATATGCTCAAT
LB-		GTACCATAAAGCTTTCATC
FIP-	<i>ctxA1</i>	GCTGCTGGAGCAATATCTAAGTTACTTTTCAATTACATCGTAATAGGGGCT
BIP-		AGGTTTCCCTCCGGAGCATATTTTTTGGAGCATTCCCACAAC
F3-		CATTTTGGGGTGCTTGATG
B3		TCGCAAGTATTACTCATCGA
LF-		GTAATATCTATCTCTGTAGC
LB-		GAGCCGTGGATTATCATGTC
FIP-	<i>ctxB2</i>	AGTAGAAGTACCAGGTAGTCAACATTTTTTCCCTCAGGGTATCCTTCA
BIP-		TGATAGCCATCTCTTTTTTCCAGTTTTAACACACAAATACATACGCTAA
F3-		CACATAACTTTTCGACTTTAGC
B3		ATTTGTGTGCAGAATACCAC
LF-		AGTCAACATATAGATTACACA
LB-		TCCAGCTAGAGATTCTGTAT
FIP-	<i>Vc02130</i>	ATGCCTGCTTCCAATCCGACATTTTTCAAGGAGCCCTCAACCGA
BIP-		TGTGGAATCAGACCAGCAACGCTTTTCCAGTGGTGGCAACATCAA
F3-		CCATGAGTGACGAGGAAACC
B3		CATCGCCGAGCTCTTTAGC
LF-		CTCTGCACCAGGGTGGCGCT
LB-		AGAATCACGCAGTGCCTGTT

В случае детектирования продуктов реакции с помощью *real-time* амплификатора в состав реакционной смеси входили: 12,5 мкл колориметрической смеси для LAMP («New England BioLabs», США), 2,5 мкл смеси праймеров (10X), 0,5 мкл флуоресцентного красителя, 1-5 мкл образца, воды до конечного объёма 25 мкл. Детекция специфического сигнала проводилась по каналу для флуорофора FAM с использованием амплификатора DT-lite 5.

10-кратная смесь праймеров для LAMP включала: 16 мкМ каждого FIP- и BIP- праймеров, 2 мкМ каждого F3- и B3-праймеров, 4 мкМ каждого LoopF- и Loop B-праймеров, вода без нуклеаз до конечного объёма 100 мкл.

С целью подтверждения воспроизводимости экспериментов их повторяли 3 раза.

Все исследования, в том числе и обеззараживание исследуемых бактериальных суспензий, проводили в соответствии с требованиями безопасности^{1,2}.

Результаты. В результате анализа генов холерных вибрионов для детекции видо-, серогруппоспецифичных детерминант и факторов патогенности в качестве мишеней отобраны следующие *ompW*, *lolB*, *ctxA*, *ctxB*, *vc02130*, *vc01416* (согласно VCN16961), к которым сконструированы по несколько наборов праймеров для проведения LAMP (табл. 2). Помимо внешних и внутренних пар праймеров получены «петлевые праймеры» (loop-primers), которые комплементарны участкам петлевых фрагментов шпильки структуры, незадействованным во взаимодействиях с первыми 4-мя праймерами. Это позволит увеличить чувствительность реакции и уменьшить время её проведения: продукт можно детектировать не через час, а через 10-15 мин после начала реакции.

OmpW – является членом основного семейства белков, которое локализуется на внешней мембране бактерий и участвует в транспорте небольших гидрофобных молекул и железа [13]. Ген *ompW* присут-

¹СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. М.; 2021.

²Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности: методические указания МУ 1.3.2569-09. М.; 2009.

ствуется в штаммах *V. cholerae* и широко используется в качестве специфической мишени для обнаружения и идентификации *V. cholerae* [14].

LolB – высоко консервативный видоспецифичный для *V. cholerae* ген, который кодирует поверхностно-локализованный липопротеин внешней мембраны [15].

Vc02130 – ген кластера острова пандемичности VSP-II, кодирующий предположительно сигнальный белок. Характерен для штаммов *V. cholerae* биовара Эль Тор.

Vc01416 – ген кластера RTX (кодирует гипотетический протеин).

Гены *ctxA* и *ctxB* (вместе именуемые *ctxAB*) кодируют холерный токсин СТХ (белковый экзотоксин), гексамер с одной субъединицей А и пятью субъединицами В. Субъединица А обладает каталитической активностью. Остальные пять субъединиц нужны для связывания холерного токсина с белком-рецептором клеток человека.

На первом этапе работы праймеры из полученных наборов F3 и B3 к вышеуказанным генам виртуально *in silico* с помощью программы BLAST (NCBI, USA) были апробированы на 500 штаммах *V. cholerae* из базы данных GenBank (NCBI, USA) (табл. 3).

Для проверки праймеров *in vitro* отобраны те наборы для каждого из генов, которые показали 100% специфичность *in silico*.

Для оптимизации LAMP варьировали следующие параметры: изменение температуры от 60⁰С до 68⁰С и время реакции от 10 минут до 1,5 часов. Выявлено, что оптимальным является проведение реакции изотермической амплификации при температуре 65⁰С в течение 30-60 минут, что согласуется с данными литературы [2, 12] и предложением производителей Bst-полимеразы, оптимум для которой составляет 65⁰С.

Специфичность всех сконструированных праймеров проверена на коллекционных штаммах *V. cholerae* (табл. 4). Отобраны наборы праймеров для каждого из генов, которые показали наибольшую специфичность. Таковыми оказались по одному набору из всех сконструированных праймеров к генам *ompW*, *ctxA*, *ctxB*, *Vc02130*.

Праймеры *ompW* обеспечивали межвидовую дифференциацию. Выявляли ДНК всех штаммов *V. cholerae*, не зависимо от серогруппы и токсигенности (рис. 1).

Праймеры *ctxA*, *ctxB* позволяли отличить токсигенные штаммы от нетоксигенных (рис. 2).

Специфичность отобранных праймеров подтверждена путём исследования культур близкородственных видов и родов. Выявлена 100% специфичность, перекрестных реакций не выявлено.

При этом при использовании всех наборов праймеров к видоспецифичному для *V. cholerae* гену *lolB* и гену кластера RTX *Vc02130* выход продуктов реакции LAMP низкий, результаты плохо воспроизводились.

Праймеры *Vc02130* имели потенциал для внутривидового типирования. Существует необходимость в их дополнительной дальнейшей доработке.

В целях определения чувствительности метода с использованием разработанных праймеров приготовлены серийные разведения взвесей взятых в работу штаммов в концентрации от 1×10⁹ м. кл./мл. до 1×10² м. кл./мл. Из них проводили выделение ДНК, используя зарегистрированный в установленном порядке набор реагентов. Результаты типового эксперимента приведены в табл. 5.

Праймеры позволяют выявлять *V. cholerae*, показывая чувствительность 1×10⁴ м. кл./мл. Причём чувствительность без использования петлевых праймеров меньше, чем с их применением.

Таблица 3

Результаты ПЦР *in silico*

Штамм	Праймеры						
	<i>ompW</i>	<i>lolB</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>Vc02130</i>	<i>Vc01416</i>	
<i>V. cholerae</i> O ₁	<i>ctx</i> ⁺	183 bp	236 bp	209 bp	209 bp	234 bp	189 bp
	<i>ctx</i> ⁻	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> O ₁₃₉	<i>ctx</i> ⁺	183 bp	236 bp	+	+	-	189 bp
	<i>ctx</i> ⁻	-	-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> nonO1/nonO139	<i>ctx</i> ⁺	183 bp	236 bp	+	+	-	-
	<i>ctx</i> ⁻	-	-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	-	-	-	-	-	91%
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	-	-	-	91%
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> (taxid:642)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas</i> (taxid:702)	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-

Таблица 4

Результаты проверки специфичности праймеров для LAMP *in vitro*

Штамм	Праймеры					
	<i>ompW</i>	<i>lolB</i>	<i>ctxA</i>	<i>ctxB</i>	<i>Vc02130</i>	<i>Vc01416</i>
<i>V. cholerae</i> O ₁ <i>ctx+</i>	100%	+/-	100%	100%	+/-	-
<i>V. cholerae</i> O ₁ <i>ctx-</i>	100%	+/-	-	-	+/-	-
<i>V. cholerae</i> O ₁₃₉ <i>ctx+</i>	100%	+/-	100%	100%	-	-
<i>V. cholerae</i> O ₁₃₉ <i>ctx-</i>	100%	+/-	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i> nonO ₁ /nonO ₁₃₉ <i>ctx+</i>	100%	+/-	100%	100%	-	-
<i>V. cholerae</i> nonO ₁ /nonO ₁₃₉ <i>ctx-</i>	100%	+/-	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. vulnificus</i>	-	-	-	-	-	91%
<i>V. fluvialis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>V. harveyi</i>	-	-	-	-	-	91%
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> (taxid:642)	-	-	-	-	-	-
<i>Plesiomonas</i> (taxid:702)	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	-	-	-	-

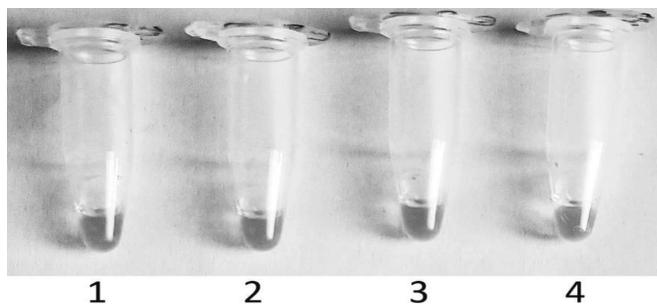


Рис. 1. Результаты детекции гена *ompW* *V. cholerae* колориметрическим методом.

1 – *V. cholerae* O₁ P-15415; 2 – *V. cholerae* O₁₃₉ P-17919; 3 – *V. cholerae* non O₁/non O₁₃₉ 20565; 4 – *V. parahaemolyticus* 20652.

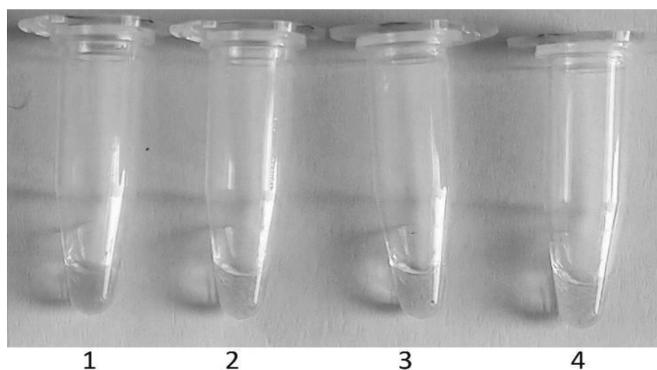


Рис. 2. Результаты детекции гена *ctxA* *V. cholerae* колориметрическим методом.

1 – *V. cholerae* O₁ P-15415 *ctx+*; 2 – *V. cholerae* O₁ 20000 *ctx+*; 3 – *V. cholerae* O₁₃₉ P-17919 *ctx+*; 4 – *V. parahaemolyticus* 20652.

Помимо визуального колориметрического способа, детекцию продуктов амплификации LAMP проводили классическим методом агарозного геле-электрофореза с последующим окрашиванием ин-

Таблица 5

Оценка чувствительности используемых в работе праймеров

<i>V. cholerae</i>	Ген <i>ompW</i>	Ген <i>ctxA</i>
	Ст по каналу FAM	
10 ⁸ копий генов/мл	15,4	12,4
10 ⁷ копий генов/мл	17,9	14,9
10 ⁶ копий генов/мл	21,1	18,3
10 ⁵ копий генов/мл	22,4	21,7
10 ⁴ копий генов/мл	25,0	24,9
10 ³ копий генов/мл	-	-
10 ² копий генов/мл	-	-

теркалирующим красителем этидиомом бромидом. При этом видна характерная «лестница» – ДНК-конкатемеры кратной длины, дорожки с отрицательными результатами или отрицательными контролями остаются пустыми. Этот способ трудоёмок, занимает много времени и увеличивает вероятность загрязнения ампликонами рабочего пространства.

Учёт результатов осуществляли в реальном времени, где продукты реакции детектировали за счёт добавления в реакционную смесь интеркалирующего флуоресцентного красителя. За изменением флуоресценции окрашенной реакционной смеси следили в ходе процесса с помощью реал-тайм амплификатора (рис. 3).

В итоге при применении различных методов детекции результатов анализа получены идентичные результаты.

В связи с высокой стоимостью реактивов зарубежного производства, в целях повышения экономической эффективности на следующем этапе работы проведена оценка возможности применения реагентов для LAMP отечественного производства

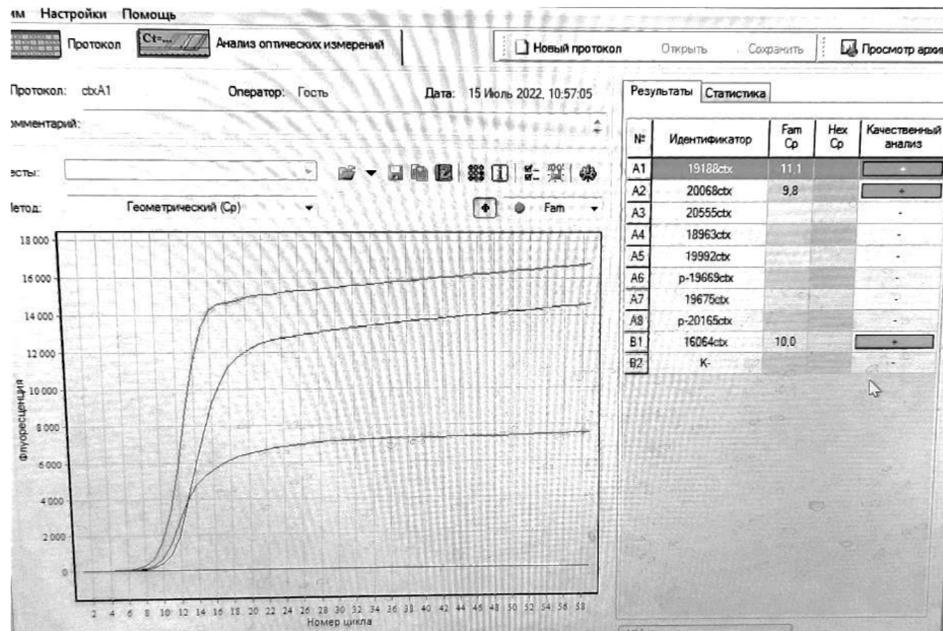


Рис. 3. Регистрация результатов амплификации ДНК гена *ctxA* *V. cholerae* в режиме «реального времени». A1, A2, B1 – *ctx⁺* штаммы *V. cholerae*; A3–A8 – *ctx⁻* штаммы *V. cholerae*; B2 – отрицательный контроль.

(ООО «Биолабмикс»). Экспериментальным путем определен состав реакционной смеси: 10хбуфер для *Bst* ДНК-полимеразы – 2,5 мкл, $MgSO_4$ (100 мМ) – 2 мкл, смесь dNTP – (25 мМ) – 1,5 мкл, смесь праймеров – 2,5 мкл, *Bst* ДНК-полимераза – 2 мкл, флуоресцентный краситель EvaGreen (20X водный раствор) – 1,25 мкл, образец ДНК – 2 мкл, вода, свободная от нуклеаз – до 25 мкл (общий объем реакционной смеси – 25 мкл). Детекцию результатов амплификации осуществляли с помощью амплификатора Real-time по каналу FAM. Полученные результаты сопоставимы с таковыми, как и при использовании зарубежных аналогов.

Обсуждение. Благодаря высокой скорости реакции и возможности протекания при постоянной температуре LAMP имеет значительный потенциал для создания тестов для применения в полевых условиях, что актуально при решении ряда эпидемиологических задач, в частности, при индикации патогенов в окружающей среде.

Показано, что реакция с использованием праймеров, показавших в ходе исследования высокую специфичность, позволяет воспроизводимо выявлять мишени, специфичные для тех штаммов *V. cholerae*, к которым они сконструированы, при отсутствии перекрестных реакций с ДНК штаммов других видов и родов.

Не все сконструированные наборы праймеров к генам *ompW*, *lolB*, *ctxA*, *ctxB*, *vc02130*, *vc01416* работали и показали высокую специфичность, а только некоторые (*ompW*, *ctxA*, *ctxB*, *Vc02130*). Можно предположить, что это связано с дизайном олигонуклеотидов, их сложным строением (использование 6 пар праймеров), возможностью формирования вторичных структур или условиями петлевой изотермической амплификации.

Результативность генетического анализа методом LAMP зависит не только от эффективности самой амплификации ДНК, но также от метода детектирования продуктов реакции. В исследовании результаты реакции LAMP проанализированы путём выполнения электрофореза в 2% агарозном геле с окраской бромистым этидием, в режиме реального времени с добавлением интеркалирующего флуоресцентного красителя EvaGreen (продукт амплификации детектируется по каналу FAM) и регистрацией изменения флуоресценции с помощью реал-тайм амплификатора, визуальным колориметрическим способом детекции, где в случае положительного результата цвет в ходе реакции менялся с красного на желтый. Все три способа показали эффективность при использовании отобранных праймеров. За счёт отсутствия необходимости в приборной базе и времязатратности, колориметрическая визуализация реакции амплификации с помощью pH-чувствительных индикаторов может способствовать использованию LAMP в качестве диагностического инструмента, который позволит проводить диагностику, в том числе, и в полевых условиях с надёжной и быстрой визуальной детекцией.

Планируется провести исследования по возможности использования и оценке применимости других альтернативных способов детекции продуктов амплификации (например, путём измерения мутности реакционной смеси в режиме реального времени визуально или с помощью турбидиметра).

Заключение. Анализ на основе LAMP является альтернативным методом обнаружения нуклеиновых кислот, который имеет ряд преимуществ, таких, как простота в эксплуатации, скорость, низкая стоимость, скромные требования к оборудованию, что делает его удобным для использования в полевых условиях.

Разработанные в данном исследовании праймеры для изотермической петлевой амплификации к видоспецифичным генам, и генам, кодирующим факторы патогенности *V. cholerae*, позволяют дифференцировать штаммы холерных вибрионов от культур других близкородственных видов и родов, токсигенные штаммы от нетоксигенных. Подобраны оптимальные условия для протекания реакции LAMP. Продемонстрирована возможность детекции специфических продуктов реакции различными способами. По результатам исследования рассчитаны диагностические показатели сконструированных праймеров для реакции изотермической амплификации (LAMP) в целях выявления видоспецифичных и кодирующих факторы патогенности генов *V. cholerae*. Чувствительность составила 1×10^4 м. кл. /мл, специфичность 100%. Продемонстрированы высокие аналитические показатели при времени реакции 30–60 минут, что превосходит ПЦР. Возможность применения реагентов отечественного производства для этих целей способствует экономической эффективности, которая заключается в снижении затрат на исследования, что позволяет использовать данные праймеры для дальнейшей работы по оптимизации реакции LAMP и рассматривать их в качестве компонентов новых современных тест-систем для клинической лабораторной диагностики холеры и мониторинговых исследований.

ЛИТЕРАТУРА (пп. 2-15 см. REFERENCES)

1. Шувалова Е.П., Белозеров Е.С., Беляева Т.В., Змушко Е.И. Инфекционные болезни. СПб: СпецЛит; 2016.

REFERENCES

1. Shuvalova E. P., Belozеров E. S., Belyaeva T. V., Zmushko E. I. Infectious diseases [Infektsionnye bolezni]. St.Petersburg: SpetsLit; 2016. (in Russian)
2. Xu M., Fu H., Chen D., Shao Z., Zhu J., Alali W. et al. Simple Visualized Detection Method of Virulence-Associated Genes of *Vibrio cholerae* by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Frontiers in Microbiology*. 2019; 10: 2899. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02899.
3. Zago V., Zambon M., Civettini M., Zaltum O., Manfrin A. Virulence-associated factors in *Vibrio cholerae* non-O₁/non-O₁₃₉ and *V. mimicus* strains isolated in ornamental fish species. *J. Fish Dis*. 2017; 40: 1857-68. DOI: 10.1111/jfd.12659.

4. Casasola-Rodriguez B., Ruiz-Palacios G. M., Pilar R. C., Losano L., Ignacio M., Velásquez M. Detection of VBNC *Vibrio cholerae* by RTreal time PCR based on differential gene expression analysis. *FEMS Microbiol. Lett*. 2018; 365(15): fny156. DOI: 10.1093/femsle/fny156.
5. Bwire G., Debes A.K., Orach C.G., Kagirita A., Ram M., Komakech H. et al. Environmental surveillance of *Vibrio cholerae* O1/O139 in the five African great lakes and other major surface water sources in Uganda. *Front. Microbiol*. 2018; 9: 1560. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01560.
6. Nandi B., Nandy R.K., Mukhopadhyay S., Nair G. B., Shimada T., Ghose A.C. et al. Rapid method for species-specific identification of *Vibrio cholerae* using primers targeted to the gene of outer membrane protein OmpW. *J. Clin. Microbiol*. 2000; 38: 4145-51. DOI: 10.1128/JCM.38.11.4145-4151.2000.
7. 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. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
8. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. 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; 18 (6): 407-21. DOI: 10.1002/rmv.593.
9. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell*. 2002; 16: 223-9. DOI: 10.1006/mcpr.2002.0415.
10. Ke X.M., Chen Y.Y., Gao L.L., Du Z., Feng X., Liao R. et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae*. *Nan. Fang. Yi Ke Da Xue Xue Bao*. 2009; 29(10): 2059-63. PMID: 19799145.
11. Okada K., Chantaroj S., Taniguchi T., Suzuki Y., Roobthaisong A., Puiprom O. et al. A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2010; 66(2): 135-9. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio. 2009.09.004.
12. Yamazaki W., Seto K., Taguchi M., Ishibashi M., Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholerae toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol*. 2008; 8: 94. DOI: 10.1186/1471-2180-8-94.
13. Gil F., Ipinza F., Fuente J., Fumeron R., Villarreal J. M., Aspee A. et al. The ompW (porin) gene mediates methyl viologen (paraquat) efflux in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *RES. Microbiol*. 2007; 158: 529-36. DOI: 10.1016/j.resmic.2007.05.004.
14. Srisuk C., Chaivisuthangkura P., Rukpratanporn S., Longyant S., Sridulyakul P., Sithigorngul P. Rapid and sensitive detection of *Vibrio cholerae* by loop-mediated isothermal amplification targeted to the gene of outer membrane protein ompW. *Lett Appl. Microbiol*. 2010; 50(1): 36-42. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02749.x.
15. Lalitha P., Siti Suraiya M.N., Lim K.L., Lee S.Y., Haslindawaty A.R., Chan Y. Y. et al. Analysis of *lolB* gene sequence and its use in the development of a PCR assay for the detection of *Vibrio cholerae*. *J. Microbiol. Methods*. 2008; 75(1):142-4. DOI: 10.1016/j.mimet.2008.05.001.