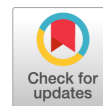


ИДЕНТИФИКАЦИЯ ДНК *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ С ФЛЮОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ



А.С. Долгова, М.А. Капитонова, А.В. Шабалина, А.Т. Саитова, Д.Е. Полев,
М.А. Макарова, Л.А. Кафтырева, В.Г. Дедков

ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. *Введение.* Наряду с применяемым для диагностики брюшного тифа методом ПЦР в реальном времени можно использовать метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), который позволяет проводить исследование за 30–40 минут. В литературе описано несколько вариантов дизайна такой реакции для детекции *Salmonella enterica* serovar Typhi. По литературным данным эти праймеры были протестированы на штаммах, характерных для Малайзии и Китая. Мы взяли на себя труд оценить описанные выше варианты праймеров LAMP для выявления штаммов *S. Typhi* характерных для Российской Федерации и сравнить их чувствительность и специфичность между собой. *Материалы и методы.* Проведен сравнительный *in silico* анализ целевых последовательностей как по открытой базе данных NCBI, так и среди генетических последовательностей коллекционных штаммов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Протестировано несколько наборов праймеров для LAMP амплификации различных участков генома *S. Typhi*. Апробируемые праймеры амплифицируют фрагменты SalTyp1 — участок гена STY1607, SalTyp2 — участок гена STY2879, SalTyp3 — участок гена STBHUCSB_38510 шаперона ParD. *Результаты.* *In silico* анализ наборов праймеров для LAMP показал, что только набор SalTyp 3, обладает строгой специфичностью в отношении *Salmonella enterica* serovar Typhi. Для наборов SalTyp 1 и SalTyp 2 показана возможность ложноположительных реакций с некоторыми штаммами *E. coli*. Разработана методика детекции ДНК возбудителя брюшного тифа методом LAMP с флюоресцентной детекцией. В качестве молекулярной мишени был выбран фрагмент гена *Salmonella enterica* serovar Typhi STBHUCSB_38510, амплификация которого осуществлялась шестью специфическими праймерами. Аналитическая чувствительность системы составила 20 копий в реакцию, а время проведения реакции составило 35 минут. Специфичность методики была проверена на ДНК 20 изолятов *S. Typhi* и 90 штаммов других гетерологичных бактерий 24 разных видов. При этом ложноположительных и ложноотрицательных результатов не выявлено. *Заключение.* Разработанная методика может быть применена в клинической практике для лабораторного подтверждения диагноза брюшной тиф, в рамках эпидемиологического мониторинга объектов окружающей среды, а также продуктов питания.

Ключевые слова: *Salmonella enterica* serovar Typhi, LAMP, молекулярная диагностика, STBHUCSB_38510, изотермическая амплификация, брюшной тиф.

Адрес для переписки:

Долгова Анна Сергеевна
197101, Россия, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14,
ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера.
Тел.: 8 (903) 242-06-14.
E-mail: dolgova@pasteurorg.ru

Contacts:

Anna S. Dolgova
197101, Russian Federation, St. Petersburg, Mira str., 14,
St. Petersburg Pasteur Institute.
Phone: +7 (903) 242-06-14.
E-mail: dolgova@pasteurorg.ru

Для цитирования:

Долгова А.С., Капитонова М.А., Шабалина А.В., Саитова А.Т., Полев Д.Е., Макарова М.А., Кафтырева Л.А., Дедков В.Г. Идентификация ДНК *Salmonella enterica* serovar Typhi методом петлевой изотермической амплификации с флюоресцентной детекцией // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 1. С. 66–76. doi: 10.15789/2220-7619-IOS-17545

Citation:

Dolgova A.S., Kapitonova M.A., Shabalina A.V., Saitova A.T., Polev D.E., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Dedkov V.G. Identification of salmonella enterica serovar typhi DNA by loop-mediated isothermal amplification with fluorescent detection // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 1, pp. 66–76. doi: 10.15789/2220-7619-IOS-17545

IDENTIFICATION OF *SALMONELLA ENTERICA* SEROVAR TYPHI DNA BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION WITH FLUORESCENT DETECTION

Dolgoва A.S., Kapitonova M.A., Shabalina A.V., Saitova A.T., Polev D.E., Makarova M.A., Kaftyreva L.A., Dedkov V.G.

St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Introduction. Real-time PCR may be used along with loop isothermal amplification method (LAMP) allowing to conduct the study in 30–40 minutes to diagnose typhoid fever. Several LAMP assay variations for detecting *Salmonella enterica* serovar Typhi have been described. The studies report that relevant primers were tested on strains specific for Malaysia and China. We attempted to evaluate the LAMP primers described above for identifying *S. Typhi* strains specific for the Russian Federation and compare their sensitivity and specificity with each other. **Materials and methods.** A comparative *in silico* analysis of target sequences was carried out both in the open NCBI database and among the genetic sequences of collection strains at the St. Petersburg Pasteur Institute. Several sets of primers for LAMP amplification of various *S. Typhi* genome regions were tested. The tested primers amplify the following fragments: SalTyp1 — region of the STY1607 gene, SalTyp2 — region of the STY2879 gene, SalTyp3 — region of the STBHUCCB_38510 gene of the PapD chaperone. **Results.** *In silico* analysis of LAMP primers showed that only the SalTyp 3 set has strict specificity for *Salmonella enterica* serovar Typhi. For the SalTyp 1 and SalTyp 2 an opportunity of false-positive reactions with some *E. coli* strains was shown. A LAMP method for DNA fluorescent detection of the typhoid fever causative agent was chosen. Assay has been based on a marker gene termed STBHUCCB_38510 and amplification with six specific primers. The detection limit was 20 copies/reaction in reference plasmids and the reaction time lasted for 35 minutes. The specificity of the method was tested on DNA specimens of 20 *S. Typhi* isolates and 90 strains of other heterologous bacteria from 24 different species. No false positive or false negative results were identified. **Conclusion.** The developed method can be used in clinical practice for laboratory confirmation of typhoid fever diagnosis as a part of epidemiological monitoring of environmental objects as well as food products.

Key words: *Salmonella enterica* serovar Typhi, LAMP, molecular diagnostics, STBHUCCB_38510, isothermal amplification, typhoid fever.

Введение

Брюшной тиф — тяжелая системная антропонозная инфекция, вызываемая *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi (*S. Typhi*), способная к широкому эпидемическому распространению. Ежегодно в мире регистрируется 21 млн новых случаев брюшного тифа и 216 000 смертей от него [19]. При этом у пациентов с брюшным тифом может наблюдаться неспецифическая клиническая картина, требующая дифференциальной лабораторной диагностики с другими лихорадочными заболеваниями, вызываемыми, например, *Salmonella Paratyphi A*, *Leptospira interrogans* и *Streptococcus pneumoniae* [12, 13], что подчеркивает важность этиологической диагностики этого заболевания. Государственная система выявления и регистрации инфекционных заболеваний в Российской Федерации позволяет отнести нашу страну к территории с низким уровнем заболеваемости брюшным тифом и низким риском инфицирования при посещении туристами. Однако за последнее десятилетие отмечен завоз брюшного тифа как минимум из 13 стран Центральной, Южной и Юго-Восточной Азии и Африки (Таджикистан, Узбекистан, Кыргызстан, Азербайджан, Абхазия, Бангладеш, Индия, Камбоджа, Пакистан, Непал, Египет, Объединенные Арабские Эмираты, Мадагаскар и др.) [8].

Оценка истинного уровня заболеваемости брюшным тифом остается сложной проблемой, решению которой мешает отсутствие во многих,

особенно развивающихся странах, современной лабораторной диагностики. Традиционно для диагностики брюшного тифа используется микробиологический метод, который считается «золотым стандартом», но требует значительных временных затрат (не менее 3–5 дней) и имеет низкую чувствительность (30–60%) [15]. Согласно рекомендациям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), окончательный диагноз «брюшной тиф» должен быть подтвержден выделением бактерии *Salmonella Typhi* из крови больного. Тем не менее в ряде случаев проведение микробиологических исследований вызывает затруднения, как в связи с отсутствием необходимого микробиологического оборудования, так и в связи с отсутствием необходимых компетенций у персонала диагностической лаборатории. Как правило, в регионах с высокой заболеваемостью брюшным тифом уровень развития лабораторной диагностики находится на низком уровне. В этой связи быстрые, простые и недорогие методы специфической молекулярной диагностики *S. Typhi* могут быть востребованы в таких регионах как для лабораторного подтверждения диагноза «брюшной тиф», так и в рамках эпидемиологического мониторинга объектов окружающей среды и продуктов питания.

Для выявления *S. Typhi* разработано несколько иммунологических методов, основанных на типировании антигенов O и H, Vi, включая тест Видаля, Typhi-Dot, Tubex [5], ИХА [1] и SPR-диагностика на основе поверхностного

плазмонного резонанса [11]. Несмотря на их простоту и быстроту, чувствительность этих методов относительно низка, и оценка иммунологической реакции зависит от продукции антител и их титра, которые обычно индуцируются, по крайней мере, через неделю после инфекции *S. Typhi*, что делает невозможным раннюю диагностику с помощью этих методов. Кроме того, противоречивые результаты в отношении специфичности и чувствительности этих серологических тестов были представлены в различных эндемичных по брюшному тифу районах [15, 16, 20, 21]. В этой связи иммунологические тесты используют для выявления хронических бактерионосителей *S. Typhi*, а не больных в острой фазе. Метод SPR для обнаружения *S. Typhi* еще не прошел проверку в полевых условиях. Молекулярно-диагностические методы на основе амплификации ДНК методом ПЦР в реальном времени являются более быстрыми, специфичными и чувствительными [3, 5, 10, 14, 17]. Однако, ограничением ПЦР в реальном времени является потребность в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных специалистах. Более приемлемым может оказаться метод петлевой изотермической амплификации (LAMP), который широко используется для обнаружения патогенов в клинической диагностике как быстрый, точный и экономичный метод [6, 18]. Этот метод позволяет эффективно амплифицировать ДНК (до 10^9 копий ДНК-мишени), специфически и быстро (в течение 60 минут) в изотермических условиях без явных неспецифических реакций. Реакция LAMP проста в проведении и требует только подходящих праймеров, полимеразы Bst (ДНК-полимераза с вытесняющей активностью) и водной бани или простого термостата, что делает анализ потенциально быстрым и простым инструментом обнаружения *S. Typhi*. При необходимости детекцию можно проводить в режиме реального времени на более сложных приборах, как это принято для ПЦР. Более того LAMP позволяет проводить определение в более сжатые сроки, укладываясь менее чем в 60 минут.

На данный момент в литературе описано несколько наборов праймеров для выявления генетических маркеров *S. Typhi* в формате LAMP [2, 7, 9]. Данные наборы праймеров были протестированы на штаммах, характерных для Малайзии и Китая.

Мы взяли на себя труд оценить описанные выше варианты праймеров LAMP для выявления штаммов *S. Typhi*, характерных для Российской Федерации, и сравнить их чувствительность и специфичность между собой, а также с зарегистрированной диагностической системой на основе метода ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) «ДНК ОМ-Скрин-Холера/БТ-

РВ» (ЗАО «Синтол», Россия (№ РЗН 2015/2865)), с целью определения возможности применения методики LAMP в реальном времени (LAMP-РВ) для целей клинической диагностики и эпидемиологического надзора.

Материалы и методы

Характеристика штаммов. ДНК 30 штаммов *Salmonella enterica*, принадлежащих к 9 серологическим вариантам (serovar): *S. Typhi* (20 штаммов возбудителей брюшного тифа, выделенных на территории РФ), а также возбудителей сальмонеллезов *S. Enteritidis* (2 штамма EI425, EI431), *S. Typhimurium* (2 штамма EI426, EI427), *S. Newport* (1 штамм EI429), *S. Senftenberg* (1 штамм EI452), *S. Kentucky* (1 штамм EI453), *S. Kottbus* (1 штамм, EI45), *S. Muenchen* (1 штамм EI454), *S. Virchow* (1 штамм EI424), а также 80 штаммов бактерий 23 разных видов (*Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter pittii*, *Citrobacter braakii*, *Citrobacter diversus*, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kobei*, *Escherichia vulneris*, *Hafnia alvei*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas mitroreducens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas monteillii*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Stenotrophomonas maltophilia*), являющихся возбудителями острых кишечных инфекций (шигеллезов или дизентерии). Остальные — возбудители ИСМП (инфекции, связанные с оказанием медицинской помощи). Выделение, типирование и паспортизация штаммов (включая полногеномное секвенирование) были выполнены на базе лаборатории кишечных инфекций и Референс-центра по мониторингу за брюшным тифом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (Санкт-Петербург).

Видовую идентификацию микроорганизмов проводили с использованием автоматического бактериологического анализатора «VITEK-2 Compact» (bioMérieux, Франция), а также методом матрично-ассоциированной лазерной десорбции/ионизации — времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI-ToF MS) с помощью системы «Microflex LT» и программного обеспечения «MALDI Biotyper v.30» (Bruker Daltonics, Германия) — значения «Score» $\geq 2,2$ были использованы в качестве критерия надежной идентификации. Антигенную характеристику штаммов *Salmonella* spp. изучали согласно действующим методическим указаниям МУ 4.2.2723-10 «Лабораторная диагностика сальмонеллезов, обнаружение сальмонелл в пищевых продуктах и объектах окружающей среды» с диагностическими адсорбированными поливалентными и моновалентными

ми О- и Н-сыворотками (ФГУП СПбНИИВС «ПЕТСАЛ», ЗАО «ЭКОлаб», Россия).

In silico анализ. Анализ уникальности целевых последовательностей, детектируемых тремя рассматриваемыми методиками на основе LAMP, проводили методом выравнивания и поиска гомологичных участков в программе BLAST.

Поиск гомологий был проведен как среди генетических последовательностей штаммов, собранных на территории РФ, представленных в коллекции Референс-центра по мониторингу за брюшным тифом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, так и представленных в международной генетической базе NCBI.

LAMP-РВ. Были апробированы 3 набора праймеров, структура которых была опубликована ранее. Апробируемые праймеры амплифицируют фрагменты SalTyp1 — участок гена STY1607 [2], SalTyp2 — участок гена STY2879 [7], SalTyp3 — участок гена STVHUCSB_38510 шаперона ParD [9]. Праймеры и детектируемые ими

последовательности представлены в табл. 1. Амплификацию проводили в реакционной смеси, содержащей 12,5 мкл 2-кратной смеси «БиоМастер LAMP SYBR Green» (Biolabmix, Новосибирск, Россия), в состав которой входит Bst полимераза, 40 пмоль FIP и BIP праймеров, 5 пмоль F3 и B3 праймеров, 20 пмоль LF и LB (в SalTyp2 два последних праймера отсутствовали), 1 мкл ДНК. Объем реакционной смеси доводили до 25 мкл H₂O (milliQ, Simplicity, Millipore, США). Приготовление реакционной смеси осуществляли в охлаждающем штативе. Реакцию проводили в амплификаторе «CFX96 Touch 100» (Bio-Rad, Hercules, США) при 63°C 35 мин. Флуоресцентный сигнал детектировали с шагом в 1 мин на канале FAM. В качестве отрицательного контроля LAMP использовали H₂O (milliQ, Simplicity, Millipore, США).

Положительные контрольные образцы LAMP-РВ. В качестве положительных контрольных образцов были сконструированы плазмиды на основе детектируемых последо-

Таблица 1. Последовательности детектируемых участков генов *S. Typhi* и праймеров для проведения LAMP

Table 1. Sequences of target *S. Typhi* gene regions and primers for LAMP

SalTyp1	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STY1607	GACTTGCCTTTAAAAGATACCAGAGCCCGAATGACTCGACCATCAGGAACGAAGCCATCCGATAACTCCAAC TCTTCAGCAGCAAGTTTACCAGATACTCCTCGGGAGCCTGGGGCCAAATGGCATTAAACAAGGGTTTCAAGA CTAAGTGGTTCACCAGCCTTACTTAGTGCATGTAAGTGTTCAAACGCACTCT
SalTyp1 F3	GACTTGCCTTTAAAAGATACCA
SalTyp1 B3	AGAGTGCCTTTGAACACTT
SalTyp1 FIP (F1c-F2)	AACTTGCTGCTGAAGAGTTGGA-CCGAATGACTCGACCATC
SalTyp1 BIP (B1c-B2)	CCTGGGGCCAAATGGCATTG-TGCACTAAGTAAGGCTGG
SalTyp1 Loop F (LF)	TCGGATGGCTTCGTTCTT
SalTyp1 Loop B (LB)	CAAGGGTTTCAAGACTAAGTGGTTC
SalTyp2	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STY2879	GCCAAATTGTTTGACGAGATGATCACATCATCCATACACACACTTAGCTTGAGATCATGATGTTTGTTCATCG GCGTAGTAAGCTACCAAAATAACTTTTATCTAAGCAGAGGGTTGCAAGTATTGGAGATTGAACAAAACCAAAA GGGAGGACATGCTTATGTGGACTATGGGACAAGTTTCTTACAG
SalTyp2 F3	GCCAAATTGTTTGACGAGA
SalTyp2 B3	CTGTAAGAACTTGTCCCATAG
SalTyp2 FIP (F1c-F2)	TACTACGCCGATTGAACAAACAT TGATCACATCATCCATAAACACA
SalTyp2 BIP (B1c-B2)	CTAAGCAGAGGGTTGCAAGTATT CCACATAAGCATGTCTCTC
SalTyp3	Последовательности участка детектируемого гена <i>Salmonella Typhi</i> и олигонуклеотидов (3'-5') Sequences of target <i>Salmonella Typhi</i> gene region and oligonucleotides (3'-5')
STVHUCSB_38510	TCTGGCACTCCTGTGCCTTAATCTTCCCTCTGCTTTTGCAGGTATTGTGGTCGGTGGAACCTCGCGTCATTTTT CATGGCAACGATCCTGACTCTACTATTTCTATTTACAATAAAGAAGTTGATTTGCCCTTATCTAATACAAGTATGG GTTGATCCTTTCAGTAAGGATGATAAGAGCAAACCACCTTTTACCGTCATCCGCTGTTTCTCGTCTTGAGC
SalTyp3 F3	CTGGCACTCCTGTGCCTT
SalTyp3 B3	GCTCAAGACGAGAAACAGG
SalTyp3 FIP (F1c-F2)	TAGAAATAGTAGAGTCAGG TTTTT GCTTTTGCAGGTATTGTGG
SalTyp3 BIP (B1c-B2)	TTGCCCTTATCTAATACAAGT TTTTGATAAAGGTGGTTGCTCT
SalTyp3 Loop F (LF)	ATGAAAAATGACGCGAGTT
SalTyp3 Loop B (LB)	GTTGATCCTTTCAGTAAGG

вательностей, представленных в табл. 1. С помощью ПЦР были получены соответствующие рекомбинантные фрагменты ДНК, которые далее были клонированы в плазмиду «pGEM®-T Easy» (Promega, Madison, США), содержащую ген ампициллиновой устойчивости — β -лактамазу. Плазмиды были трансформированы в *Escherichia coli* (Turbo cells) (New England BioLabs, Великобритания). Рекомбинантные плазмиды были очищены с помощью набора «Plasmid Miniprep kit» (Zymo Research, США) и исследованы на наличие мутаций в клонированных ПЦР фрагментах с помощью прибора для автоматического капиллярного секвенирования «ABI-Prism 3100 XL» (Applied Biosystems, США). Были отобраны плазмиды с отсутствием мутаций в области посадки праймеров для проведения реакции LAMP.

Аналитическая чувствительность. Аналитическую чувствительность определяли методом серийных разведений. С этой целью концентрации рекомбинантных плазмид были измерены с помощью спектрофотометра «NanoDrop OneC» (Thermo Scientific, США). На основании данных спектрофотометрии были рассчитаны концентрации в копиях/мл с использованием программы SciencePrimer (<http://scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>) и сделаны серии разведений 10^7 –100 копий/мкл для каждой рекомбинантной плазмиды pGEM-SalTyp1, pGEM-SalTyp2 и pGEM-SalTyp3. Для вариантов pGEM-SalTyp1 и pGEM-SalTyp3 были сделаны также дополнительные разведения для определения порога чувствительности, составляющие 80, 60, 40, 30 и 20 копий/мкл.

Аналитическая специфичность. Аналитическую специфичность изучали с помощью панели образцов ДНК, из штаммов *S. Typhi*, выделенных в разные годы в разных регионах Российской Федерации, а также ДНК других бактерий, вызывающих заболевания кишечника и внутрибольничные инфекции.

Сравнение методик LAMP-PB и ПЦР-PB. Сравнительные исследования разработанной методики LAMP-PB и метода ПЦР-PB проводили с помощью набора реагентов для выявления *S. Typhi* методом ПЦР в реальном времени «ДНК ОМ-Скрин-Холера/БТ-PB» (ЗАО «Синтол», Россия (№ РЗН 2015/2865), используемого в качестве мишени участок локуса STY3672 *S. Typhi*. Для проведения сравнительного исследования параллельно тестировали панель охарактеризованных образцов ДНК из штаммов *S. Typhi*, а также других бактерий, вызывающих заболевания кишечника и внутрибольничные инфекции.

Результаты

In silico анализ. Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp1 выявлены гомологи среди ряда штаммов *E. coli*: штамм 90-9133 (CP042947.1), штамм F16EC0617 (CP088374.1), штамм M-17 (CP068394.1), штамм H1998 (CP121347.1), штамм DLI.5a (CP103972.1), O78 штамм 3 (CP084096.1), штамм RIVM_C036569 (CP086627.1), штамм 18SC05VL02-EC (CP063736.1), штамм RHB30-C16 (CP057287.1), штамм RHB30-C17 (CP057281.1), штамм RHB30-C19 (CP055669.1), штамм RHB30-C20 (CP055945.1), штамм RHB14-C15 (CP057812.1), штамм RHB14-C22 (CP057796.1), штамм CE0011 (CP119008.1), изолят L4_E1441_ETEC (LR883012.1) (рис. 1А). Также обнаружена гомология с генетической последовательностью бактериофага *Caudoviricetes* sp., изолят cteTN1 (BK021514.1). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp2, выявлены гомологи среди штаммов *E. coli* штамм Z0117EC0133 (CP098183.1), штамм JL05 (CP049936.1) и штамм EcPNK004 (CP071439.1) (рис. 1Б). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp3, совпадений с известными штаммами других микроорганизмов не выявлено.

Кроме того, был произведен поиск гомологий среди генетических последовательностей коллекционных штаммов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp1 выявлен фрагмент с высокой степенью гомологии в генетической последовательности штамма *E. coli* EI0304, который содержал 202 идентичных нуклеотидных остатка, однако не перекрывался праймером F3 (рис. 1А). Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp2, был выявлен практически полностью гомологичный фрагмент в генетической последовательности штамма *E. coli* EI0386 (рис. 1Б). Отличия заключались в одном нуклеотиде на 5'- и 3'-концах соответственно. Такие незначительные отличия, очевидно, могут приводить к возникновению ложноположительной реакции.

Для целевой последовательности *S. Typhi*, детектируемой набором праймеров SalTyp3, был выявлен гомологичный фрагмент в генетической последовательности штамма *Escherichia coli* EI0274, содержащий идентичные 175 из 221 нуклеотидов целевой последовательности (рис. 1В). Однако он не перекрывался праймером В3, что позволило предположить отсутствие кросс-реакции с этим штаммом.

Аналитическая чувствительность. Для набора праймеров SalTyp2 аналитическая чувствительность составила 10^6 копий в реакцию, в то время как для наборов SalTyp1 и SalTyp3 порог аналитической чувствительности составил 20 копий в реакцию (рис. 2).

Результаты наших исследований показали, что увеличение времени реакции с 35 до 60 минут не влияет на чувствительность. Все положительные образцы детектируются до 30 минуты. Таким образом, анализ методом LAMP-РВ занимает чуть более получаса.

Сравнение методик LAMP-РВ и ПЦР-РВ. Анализ характеристик методики LAMP-РВ на осно-

ве набора праймеров SalTyp3 показал отсутствие ложноположительных результатов при тестировании ДНК штаммов гетерологичных бактерий (90 образцов 24 видов) сформированной панели. При этом все образцы ДНК штаммов *S. Typhi* детектировались как положительные (табл. 2). Для штамма *Escherichia coli* EI0274, в котором при *in silico* анализе был выявлен фрагмент с частичной гомологией к целевому участку гена STVHUCSB_38510, было подтверждено отсутствие неспецифического сигнала.

В то же время при скрининге панели набором реагентов ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ (ЗАО «Синтол») выявлено восемь ложноположитель-

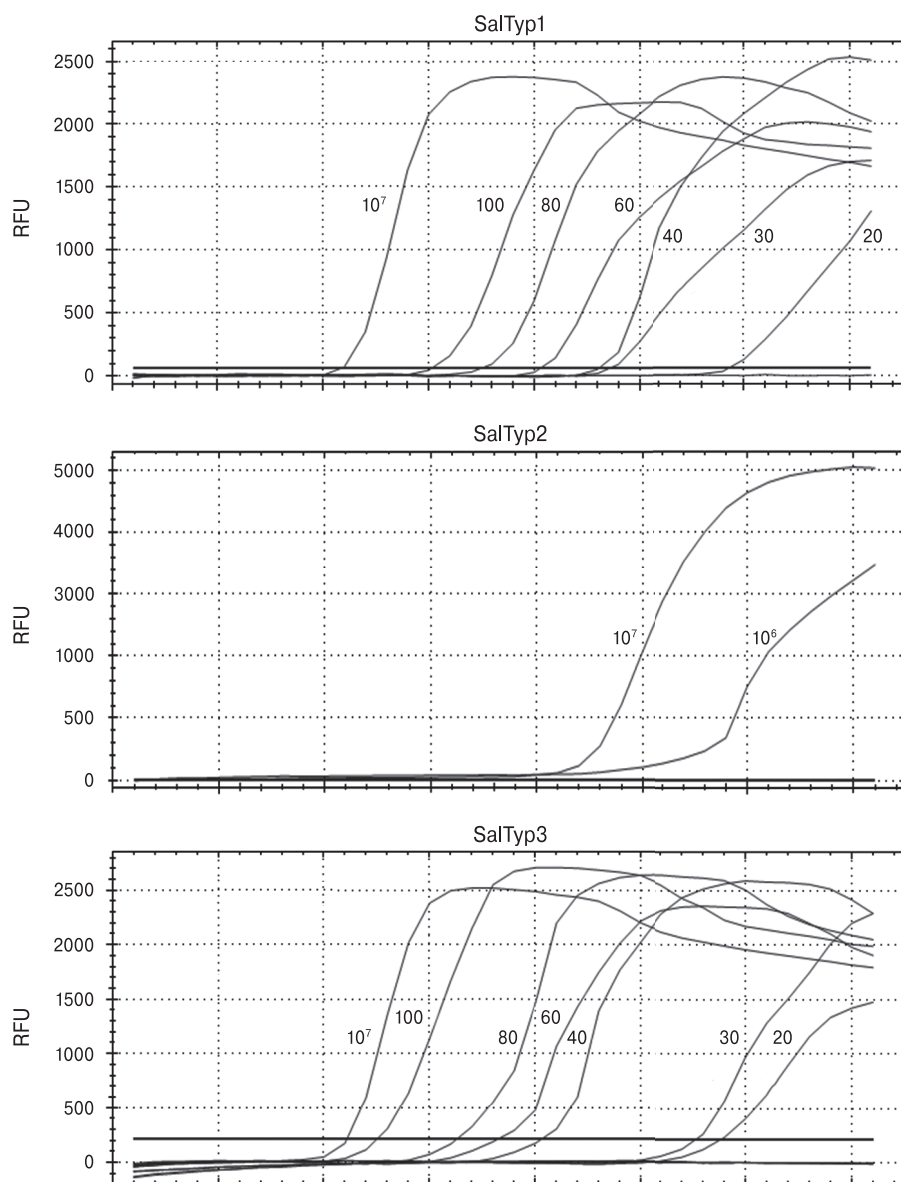


Рисунок 2. Детекция флуоресцентного сигнала реакции LAMP-РВ на приборе «CFX96 1000 Touch» для определения аналитической чувствительности

Figure 2. Detection of LAMP-RT fluorescent signal on the “CFX96 1000 Touch” to determine analytical sensitivity

Примечание. Ось Y — относительные единицы флуоресценции (RFU), ось X — минуты. Разведения в копиях в реакцию показаны для каждого варианта праймеров.

Note. Y axis — relative fluorescence units (RFU), X axis — minutes. Copy dilutions per reaction are shown for each primer variant.

Таблица 2. Сравнение методик LAMP-РВ на основе сета праймеров SalTyp 3 и ПЦР-РВ (ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ (ЗАО «Синтол»))

Table 2. Comparison of LAMP-RT method based on the SalTyp 3 primer set and RT-PCR (OM-Screen-Cholera/BT-RT (JSC Synthol))

Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct	Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct	Вид Species	Штамм Strain	LAMP, мин LAMP, min	PCR, Ct PCR, Ct	
<i>A. baumannii</i>	16-60	-	-	<i>E. coli</i>	14-1009	-	-	<i>S. enterica</i>	16-465	-	-	
<i>A. pittii</i>	19-2	-	-		20-226	-	-		18-504	-	-	
	16-93	-	-		20-227	-	-		19-235	-	-	
<i>C. braakii</i>	14-488	-	-		20-238	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis	EI425	-	-	
	14-494	-	-		20-239	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Kentucky	EI431	-	-	
	14-579	-	-		20-240	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Kottbus	EI453	-	-	
<i>C. diversus</i>	14-64	-	-		20-241	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Muenchen	EI454	-	-	
	<i>C. freundii</i>	19-245	-		-	16-48	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Newport	EI429	-	-
<i>C. koseri</i>		14-78	-		-	15-158	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Senftenberg	EI452	-	-
	<i>E. asburiae</i>	14-575	-		-	22-574	-	-	EI332	6,8	21,1	
<i>E. cloacae</i>		14-75	-		-	22-575	-	-	EI333	6,4	20,9	
	14-92	-	-		22-576	-	-	EI334	6,5	20,4		
	14-478	-	-		22-577	-	-	EI335	6,3	20,3		
	14-591	-	-		22-578	-	-	EI336	6,7	20,5		
<i>E. coli</i>	4-3	-	27,2		20-251	-	-	EI337	6,4	21		
	4-6	-	26,5		20-253	-	-	EI338	6,8	20,3		
	4-8	-	26,6		20-254	-	-	EI339	6,3	20,3		
	4-9	-	28,7		<i>E. kobei</i>	14-572	-	-	EI340	7,0	27,7	
	4-13	-	29,0		<i>E. vulneris</i>	15-233	-	-	EI341	6,5	24,3	
	4-15	-	27,7		<i>H. alvei</i>	14-555	-	-	EI342	6,6	23,3	
	30316/23	-	26,2		<i>K. oxytoca</i>	16-278	-	-	EI343	6,4	23,2	
	EI274	-	-			14-551	-	-	EI344	6,3	22,3	
	72/1	-	-		<i>K. pneumoniae</i>	14-554	-	-	EI345	6,4	31,2	
	72/2	-	-			14-592	-	-	EI346	6,7	21,1	
	19-119	-	-			17-508	-	-	EI347	6,3	21,3	
	14-640	-	-		<i>P. aeruginosa</i>	17-532	-	-	EI348	6,4	25,1	
	20-228	-	-			14-559	-	-	EI349	6,1	22,6	
	14-860	-	-		<i>P. mirabilis</i>	14-558	-	-	EI131	7,1	31,1	
	14-666	-	-			16-77	-	-	EI132	6,4	28	
	14-432	-	-		<i>P. monteillii</i>	14-576	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium	EI426	-	-
	20-229	-	-			16-61	-	-	<i>S. enterica</i> ser. Virchow	EI427	-	-
	22-5	-	-		<i>P. putida</i>	17-133	-	-	<i>S. flexneri</i>	18-275	-	-
	20-230	-	-			17-151	-	-		19-374	-	-
	20-231	-	-		<i>P. vulgaris</i>	14-102	-	-		19-375	-	-
14-831	-	-	17-147			-	-	16-116	-	-		
14-848	-	-	<i>S. enterica</i>		17-117	-	-	14-515	-	-		
14-477	-	-			14-581	-	-	16-190	-	-		
15-1153	-	-	<i>S. enterica</i>		14-591	-	-	19-135	-	-		
16-292	-	-			14-574	-	-	19-140	-	-		
15-681	-	-			14-582	-	-	18-670	-	-		
14-549	-	-		22-4	-	-	K+	5,4	31,6			
14-788	-	-		18-488	-	-	K-	-	-			
				22-9	-	-						
				16-401	-	-						

Примечание. Численные значения в случае положительной реакции представлены минутами для LAMP-РВ и пороговыми циклами (Ct) для ПЦР-РВ.
Note. Numerical values for positive reaction are presented in minutes for LAMP-RT and threshold cycles (Ct) for PCR-RT.

ных результатов (семь образцов ДНК штаммов *E. coli* и один образец ДНК из штамма *S. enterica* serovar Virchow были детектированы как позитивные. При этом все образцы штаммов *S. Typhi* также детектировались как положительные (табл. 2).

Обсуждение

In silico анализ наборов праймеров для LAMP показал, что только набор SalTyp3 обладает строгой специфичностью в отношении *Salmonella enterica* serovar Typhi. Для наборов SalTyp 1 и SalTyp 2 показана возможность ложноположительных реакций с некоторыми штаммами *E. coli*, что, вероятно, обусловлено межвидовым дрейфом генов STY1607 и STY2879 вследствие пластичности генома бактерий группы кишечных инфекций. Данное предположение подкреплено тестированием различных наборов праймеров для LAMP на панели ДНК из гомологичных (штаммы *S. Typhi*) и гетерологичных штаммов бактерий 27 видов. При этом только для набора SalTyp 3 показано отсутствие ложноположительных реакций, что позволяет нам рекомендовать именно этот вариант праймеров для детекции *S. Typhi*. Высокая специфичность варианта праймеров SalTyp 3 вероятно обусловлена выбором в качестве мишени фрагмента гена STVHUCSB_38510, менее склонного к межвидовому генетическому дрейфу. Тем не менее полностью исключить вероятность такого переноса невозможно, что требует дальнейшего изучения.

На основе структуры трех наборов праймеров для выявления ДНК *S. Typhi* нами была разработана методика LAMP с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green I, позволяющего проводить учет результатов в реальном времени с использованием стандартного оборудования для ПЦР-РВ. При этом в качестве реагентов для проведения LAMP-РВ нами был использован набор «БиоМастер LAMP SYBR Green I» (Biolabmix, Новосибирск, Россия), содержащий Bst-полимеразу. Для оценки аналитической чувствительности были сконструированы рекомбинантные контрольные образцы, содержащие соответствующие каждому набору праймеров фрагменты детектируемых генов *S. Typhi*.

Измеренная с помощью этих образцов чувствительность методики LAMP-РВ в нашей модификации составила 10^6 копий в реакцию (10^9 копий/мл в исходном образце) для набора праймеров SalTyp2 и 20 копий в реакцию для наборов SalTyp1 и SalTyp3 (2×10^4 копий/мл в исходном образце). При этом время проведения реакции составило 35 мин. Аналитическая чувствительность для наборов праймеров SalTyp1 и SalTyp3 согласуется с литературными данными [7], в которых аналитическая чувствительность, измеренная сходным способом, составляет 15 копий в реакцию. Для варианта SalTyp2 чувствительность оказалась существенно ниже приведенной в литературе [7], что вероятно связано с неоптимальным для данного набора праймеров составом коммерческой реакционной смеси.

Сравнительным тестированием LAMP-РВ с вариантом праймеров SalTyp3 и набора реагентов «ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ» на основе метода ПЦР в реальном времени показано, что обе методики позволяют выявлять все образцы ДНК из штаммов *S. Typhi*, актуальных для России. При этом набор реагентов «ОМ-Скрин-Холера/БТ-РВ» имеет, по данным разработчиков, большую аналитическую чувствительность (10^3 копий/мл исходного образца). Однако 8 образцов ДНК из гетерологичных штаммов данным набором были детектированы как положительные. При этом 7 образцов являлись ДНК из штаммов *E. coli*, а 1 — ДНК из штамма *Salmonella enterica* serovar Virchow. Таким образом можно заключить, что данные штаммы и *Salmonella enterica* serovar Typhi имеют в своем геноме ряд общих гомологичных последовательностей, наличие которых приводит к появлению ложноположительных результатов, а выбор разработчиками набора в качестве мишени фрагмента гена STY3672 *S. Typhi* не является оптимальным.

Брюшной тиф является социально опасным заболеванием, характеризующимся фекально-оральным механизмом передачи.

Для успешного эпидемиологического контроля за циркуляцией *S. Typhi*, помимо диагностики брюшного тифа или его хронического носительства у людей, необходим и мониторинг объектов окружающей среды (сточные воды, пищевые продукты и т.д.). В этой связи наличие современных средств молекулярной диагностики, позволяющих оперативно выявлять ДНК *S. Typhi*, может

Таблица 3. Характеристики методов LAMP и ПЦР в реальном времени при 95% доверительном интервале (CI)

Table 3. Characteristics of LAMP and real-time PCR methods with 95% confidence interval (CI)

Методика Method	Чувствительность, % Sensitivity, %	95% ДИ 95% CI	Специфичность, % Specificity, %	95% ДИ 95% CI
LAMP	100	83,2–100	100	96,7–100
PCR	100	83,2–100	92,7	86,2–96,8

существенно облегчить поставленную задачу. Наше исследование показало, что метод LAMP-РВ, равно как и метод ПЦР-РВ, обладают приемлемой аналитической чувствительностью и могут быть использованы для подобных исследований. Следует отметить, однако, что выявление *S. Typhi* требует проведения комплекса оперативных противоэпидемических мероприятий. Поэтому кросс-реактивность молекулярных диагностикомов для выявления генетических маркеров *S. Typhi* (особенно в отношении гетерологичных микроорганизмов «кишечной группы») может приводить к нежелательным социально-экономическим последствиям. С целью исключения ложноположительных результатов целесообразно

одновременное применение не менее двух молекулярных диагностикомов, детектирующих фрагменты различных генов *S. Typhi*. Наличие же феномена горизонтального межвидового переноса генов между бактериями «кишечной группы» требует проведения постоянного генетического мониторинга возбудителей острых кишечных инфекций и регулярной актуализации структуры праймеров в используемых средствах молекулярной диагностики.

Благодарности

Работа выполнена в рамках реализации Федерального проекта «Санитарный щит».

Список литературы/References

1. Abdullah J., Saffie N., Sjasri F.A., Husin A., Abdul-Rahman Z., Ismail A., Aziah I., Mohamed M. Rapid detection of Salmonella Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Braz. J. Microbiol.*, 2015, vol. 45, no. 4, pp. 1385–1391. doi: 10.1590/s1517-83822014000400032
2. Ali A., Haque A., Haque A., Sarwar Y., Mohsin M., Bashir S., Tariq A. Multiplex PCR for differential diagnosis of emerging typhoidal pathogens directly from blood samples. *Epidemiol. Infect.*, 2009, vol. 137, no. 1, pp. 102–107. doi: 10.1017/S0950268808000654
3. Ali K., Zeinab A., Zahra S., Akbar K., Saeid M. Development of an ultra rapid and simple multiplex polymerase chain reaction technique for detection of Salmonella typhi. *Saudi Med. J.*, 2006, vol. 27, no. 8, pp. 1134–1138.
4. Ambati S.R., Nath G., Das B.K. Diagnosis of typhoid fever by polymerase chain reaction. *Indian J. Pediatr.*, 2007, vol. 74, no. 10, pp. 909–913. doi: 10.1007/s12098-007-0167-y
5. Bhutta Z.A. Current concepts in the diagnosis and treatment of typhoid fever. *BMJ*, 2006, vol. 333, no. 7558, pp. 78–82. doi: 10.1136/bmj.333.7558.78
6. Crump J.A., Mintz E.D. Global trends in typhoid and paratyphoid fever. *Clin. Infect. Dis.*, 2010, vol. 50, no. 2, pp. 241–246. doi: 10.1086/649541
7. Dong B., Galindo C.M., Shin E., Acosta C.J., Page A.L., Wang M., Kim D., Ochiai R.L., Park J., Ali M., Seidlein L.V., Xu Z., Yang J., Clemens J.D. Optimizing typhoid fever case definitions by combining serological tests in a large population study in Hechi City, China. *Epidemiol. Infect.*, 2007, vol. 135, no. 6, pp. 1014–1020. doi: 10.1017/S0950268806007801
8. Егорова С.А., Кулешов К.В., Кафтырева Л.А., Матвеева З.Н. Чувствительность к антибиотикам, механизмы резистентности и филогенетическая структура популяции *S. typhi*, выделенных в 2005–2018 гг. в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10, № 1. С. 99–110. [Egorova S.A., Kuleshov K.V., Kaftyreva L.A., Matveeva Z.N. The antimicrobial susceptibility, resistance mechanisms and phylogenetic structure of *S. typhi* isolated in 2005–2018 in the Russian Federation. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2020, vol. 10, no. 1, pp. 99–110. (In Russ.)] doi: 10.15789/10.15789/2220-7619-ASM-1171
9. Fan F., Du P., Kan B., Yan M. The development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method for the rapid detection of Salmonella enterica serovar Typhi. *PLoS One*, 2015, vol. 10, no. 4: e0124507. doi: 10.1371/journal.pone.0124507
10. Fan F., Yan M., Du P., Chen C., Kan B. Rapid and sensitive salmonella typhi detection in blood and fecal samples using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Foodborne Pathog. Dis.*, 2015, vol. 12, no. 9, pp. 778–786. doi: 10.1089/fpd.2015.1950
11. Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., Perkins M.D., Schrenzel J. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2011, vol. 62, no. 1, pp. 41–48. doi: 10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x
12. Kawano R.L., Leano S.A., Agdamag D.M. Comparison of serological test kits for diagnosis of typhoid fever in the Philippines. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, vol. 45, no. 1, pp. 246–247. doi: 10.1128/JCM.01403-06
13. Levy H., Diallo S., Tennant S.M., Livio S., Sow S.O., Tapia M., Fields P.I., Mikoleit M., Tamboura B., Kotloff K.L., Lagos R., Nataro J.P., Galen J.E., Levine M.M. PCR method to identify Salmonella enterica serovars Typhi, Paratyphi A, and Paratyphi B among Salmonella isolates from the blood of patients with clinical enteric fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2008, vol. 46, no. 5, pp. 1861–1866. doi: 10.1128/JCM.00109-08
14. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.*, 2004, vol. 59, no. 2, pp. 145–157. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
15. Murdoch D.R., Woods C.W., Zimmerman M.D., Dull P.M., Belbase R.H., Keenan A.J., Scott R.M., Basnyat B., Archibald L.K., Reller L.B. The etiology of febrile illness in adults presenting to Patan hospital in Kathmandu, Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2004, vol. 70, no. 6, pp. 670–675. doi: 10.4269/ajtmh.2004.70.670
16. Naheed A., Ram P.K., Brooks W.A., Mintz E.D., Hossain M.A., Parsons M.M., Luby S.P., Breiman R.F. Clinical value of Tubex and Typhidot rapid diagnostic tests for typhoid fever in an urban community clinic in Bangladesh. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2008, vol. 61, no. 4, pp. 381–386. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.03.018
17. Nakhla I., El Mohammady H., Mansour A., Klena J.D., Hassan K., Sultan Y., Pastoor R., Abdoel T.H., Smits H. Validation of the Dri-Dot Latex agglutination and IgM lateral flow assays for the diagnosis of typhoid fever in an Egyptian population. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, vol. 70, no. 4, pp. 435–441. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2011.03.020
18. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 12: E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63

19. Olsen S.J., Pruckler J., Bibb W., Nguyen T.M., Tran M.T., Nguyen T.M., Sivapalasingam S., Gupta A., Phan T.P., Nguyen T.C., Nguyen V.C., Phung D.C., Mintz E.D. Evaluation of rapid diagnostic tests for typhoid fever. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 5, pp. 1885–1889. doi: 10.1128/JCM.42.5.1885-1889.2004
20. Petit P.L., Wamola I.A. Typhoid fever: a review of its impact and diagnostic problems. *East Afr. Med. J.*, 1994, vol. 71, no. 3, pp. 183–188.
21. Singh A., Verma H.N., Arora K. Surface plasmon resonance based label-free detection of Salmonella using DNA self assembly. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2015, vol. 175, no. 3, pp. 1330–1343. doi: 10.1007/s12010-014-1319-y

Авторы:

Долгова А.С., к.б.н., зав. лабораторией молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Капитонова М.А., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Шабалина А.В., младший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики патогенных микроорганизмов ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Саитова А.Т., лаборант-исследователь, группа метагеномных исследований, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Полев Д.Е., к.б.н., руководитель группы метагеномных исследований, ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Макарова М.А., д.м.н., зав. лабораторией кишечных инфекций ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Кафтырева Л.А., д.м.н., ведущий научный сотрудник группы эпидемиологии брюшного тифа ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
Дедков В.Г., к.м.н., зам. директора по научной работе ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Dolgova A.S., PhD (Biology), Head of Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kapitonova M.A., Junior Researcher, Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Shabalina A.V., Junior Researcher, Laboratory for Molecular Genetics of Pathogens, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Saitova A.T., Research Laboratory Assistant, Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Polev D.E., PhD (Biology), Head of Metagenomic Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Makarova M.A., DSc (Medicine), Head of Laboratory of Enteric Infections, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Kaftyreva L.A., DSc (Medicine), Leading Researcher, Typhoid Epidemiology Research Group, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Dedkov V.G., PhD (Medicine), Deputy Director for Scientific Work, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 04.12.2023
Отправлена на доработку 11.12.2023
Принята к печати 23.12.2023

Received 04.12.2023
Revision received 11.12.2023
Accepted 23.12.2023