

Разработка теста на основе изотермической амплификации для диагностики малярии

И.Ю.Щит, С.Ф.Бикетов

ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора,
Оболensk, Российская Федерация

В статье рассматриваются этапы создания тест-системы для диагностики малярии на основе изотермической амплификации. Малярия является одним из наиболее распространенных и опасных заболеваний в мире. Выявление одного из самых распространенных возбудителей малярии, *Plasmodium vivax*, в крови инфицированных людей – важный шаг в борьбе с этим заболеванием, поскольку позволяет своевременно начать лечебные и профилактические мероприятия и предотвратить распространение болезни и возможные осложнения. Тест-системы на основе изотермической амплификации для диагностики малярии имеют два преимущества: их можно использовать для детектирования низкоклубневой инфекции (<100 паразитов в 1 мкл крови), и для проведения анализа не требуется много времени и сложное оборудование. Разработанная нами тест-система с использованием отечественного фермента SD-полимеразы для диагностики малярии поможет улучшить диагностику и лечение малярии, особенно в регионах с ограниченными ресурсами.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация, LAMP, малярия, *Plasmodium vivax*, мтДНК

Для цитирования: Щит И.Ю., Бикетов С.Ф. Разработка теста на основе изотермической амплификации для диагностики малярии. Бактериология. 2024; 9(4): 41–48. DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-41-48

Development of an isothermal amplification test for the diagnosis of malaria

I.Yu.Shchit, S.F.Biketov

State Scientific Center of Applied Microbiology and Biotechnology, Obolensk, Russian Federation

The article discusses the process of creating a test for the diagnosis of malaria based on isothermal amplification. Malaria is one of the most common and dangerous diseases in the world. Identifying one of the most common malaria pathogens, *Plasmodium vivax*, in the blood of infected people is an important step in the fight against this disease, as it allows you to start treatment and preventive measures in a timely manner and prevent the spread of the disease and possible complications. The isothermal amplification test for the diagnosis of malaria has two advantages: it can be used to detect low-level infection (less than 100 parasites in a microliter of blood), and the analysis does not require a lot of time and complex equipment. The test we developed using the domestic SD polymerase enzyme for the diagnosis of malaria will help improve the diagnosis and treatment of malaria, especially in resource-limited regions.

Key words: loop mediated isothermal amplification, LAMP, malaria, *Plasmodium vivax*, mtDNA

For citation: Shchit I.Yu., Biketov S.F. Development of an isothermal amplification test for the diagnosis of malaria. Bacteriology. 2024; 9(4): 41–48. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2024-4-41-48

Малярия является серьезной проблемой общественно-го здравоохранения. Согласно оценкам Всемирной организации здравоохранения, в 2022 г. в 85 странах мира было зарегистрировано 249 млн случаев заболевания малярией и 608 тыс. случаев смерти от малярии [1]. Существует 5 видов паразитов рода *Plasmodium*, вызывающих малярию у людей, причем два из этих видов – *P. falciparum* и *P. vivax* – представляют наибольшую угрозу. Инфекция, вызываемая

P. vivax, является одной из наиболее распространенных форм малярии во всем мире, на нее приходится ~35% всех ежегодных случаев заболевания [2]. Она особенно распространена в тропических регионах, таких как Южная Азия (Индия), Юго-Восточная Азия, Центральная и Западная Африка, где на ее долю приходится до 97% всех зарегистрированных случаев [3]. Малярия, обусловленная *P. vivax*, также встречается в других частях света, включая Латинскую

Для корреспонденции:

Щит Ирина Юрьевна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Адрес: 142279, Московская обл., г.о. Серпухов, р.п. Оболensk, Территория «Квартал А», 24
Телефон: (4967) 36-0065

Статья поступила 09.10.2024, принята к печати 25.12.2024

For correspondence:

Irina Yu. Shchit, PhD (Biological Sciences), Senior Researcher, Department of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор

Address: 24 "Quarter A" Territory, Obolensk, City District Serpukhov, Moscow region, 142279, Russian Federation
Phone: (4967) 36-0065

The article was received 09.10.2024, accepted for publication 25.12.2024

Америку, Северную Америку и даже Европу. Согласно данным Роспотребнадзора, в России ежегодно регистрируется от 10 до 50 случаев малярии, в основном у граждан, которые вернулись из стран Африки, Юго-Восточной Азии и Южной Америки. В Российской Федерации в 2023 г. число завозных случаев малярии составило 136 (в 2022 г. – 110) [4].

Возбудитель *P. vivax* (как и другие виды плазмодиев) заражает людей через укус инфицированного ими комара рода *Anopheles*; инокуляция возбудителя в кровь человека происходит в форме спорозоитов, которые затем развиваются в мерозоиты, вызывая симптомы лихорадки, такие как озноб, головная боль, мышечные боли, тошнота, рвота и диарея. Клинические проявления инфекции *P. vivax* различаются в зависимости от нескольких факторов, таких как возраст, иммунный статус, паразитарная нагрузка (количество мерозоитов) и устойчивость к применяемым лекарственным препаратам. В целом симптомы заболевания, как правило, более мягкие, чем в случаях инвазии, которые вызываемой другими видами *Plasmodium*, включая *P. falciparum*. Однако тяжелые случаи клинического проявления болезни могут возникать у людей с ослабленным иммунитетом или инвазии с высокой паразитарной нагрузкой (>10% эритроцитов). Кроме этого, возбудитель способен сохраняться длительное время в клетках печени в форме гипнозоитов, что создает основу для последующих обострений инфекции.

P. vivax обычно выявляется с помощью световой микроскопии, визуализирующей мерозоитов в мазках крови пациентов с уровнем от 50–200 паразитов в микролитре. Для обнаружения меньших концентраций *P. vivax* в крови были разработаны амплификационные молекулярно-генетические тесты. Постановка тестов на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) требует сложного оборудования и квалифицированного персонала, поэтому их невозможно использовать для подтверждения диагноза и мониторинга ответа на проводимое лечение в регионах, удаленных от крупных медицинских центров. В отличие от ПЦР петлевая изотермическая амплификация (LAMP) не требует сложного оборудования и может быть осуществлена в слабо оснащенных лабораториях и даже в полевых условиях, поскольку амплификация ДНК при этом исследовании проходит при постоянной температуре и не требует использования термоджакета. Впервые этот метод был разработан в начале 2000-х гг. T. Notomi et al [5], которые использовали его для обнаружения бактериальной геномной ДНК, но позже технология была адаптирована для детекции других микроорганизмов, таких как вирусы, паразиты, грибки и даже раковые клетки. Принцип, лежащий в основе анализа LAMP, заключается в том, что определенный участок целевого генома может быть амплифицирован с использованием 4-6 праймеров (2 внешних и 2 внутренних) в сочетании с ферментом ДНК-полимеразой (обычно Bst или Bsm), способной вытеснять вторую цепь ДНК в изотермических условиях. Процесс амплификации происходит при постоянной температуре (обычно в диапазоне 60–65°C), что, несомненно, удобнее по сравнению с технологией ПЦР. Реакция амплификации приводит к экспоненциальному увеличению числа копий целевой последовательности, которую затем можно обнаружить с помощью целого ряда различных методов, в частности таких, как гель-электрофорез, нефелометрия или флуоро-

метрия в реальном времени или по конечной точке, с приборной регистрацией или визуализацией невооруженным глазом, например, на иммунохроматографических тест-полосках.

К настоящему времени опубликован ряд сообщений об успешном применении LAMP для диагностики малярии [6]. Для обнаружения *P. vivax* в клинических образцах разработаны несколько LAMP-тестов. Так, например, J.C. Patel et al. (2013) сообщают о создании теста RealAmp, который предусматривает проведение LAMP в портативном изотермическом приборе для быстрого обнаружения малярийных паразитов в режиме реального времени. Для амплификации использовали 3 пары праймеров к уникальной для генома *P. vivax* консервативной последовательности ДНК. Чувствительность обнаружения ДНК *P. vivax* в клинических образцах по сравнению с гнездовой ПЦР составила 94,59% (87,48–98,26%). RealAmp показал специфичность в интервале 90,40–100% [7].

Оценку диагностической точности LAMP с красителем малахитовым зеленым для визуализации продукта (MG-LAMP) проводили в удаленных медицинских пунктах штата Рорайма на севере Бразилии. В исследованиях принял участие 91 пациент. Чувствительность и специфичность MG-LAMP составили в среднем 90,0% (76,34–97,21%) и 94% (83,76–98,77%) соответственно. Исследователи отмечают, что MG-LAMP зарекомендовал себя как чувствительный, специфичный и простой в проведении молекулярный тест, который можно выполнять для обнаружения малярийных паразитов в отдаленных медпунктах [8].

Тем не менее у обоих тестов – RealAmp и MG-LAMP – были проблемы с выявлением низкоуровневой и смешанных инфекций, особенно при детекции *P. vivax* [9].

В настоящее время на рынке доступны 2 коммерческих набора для детекции малярии на основе LAMP: «LoopAmp malaria (Pan/Pf/Pv) detection kit» (Eiken Chemical Company, Япония) и «Alethia malaria» (Meridian Biosciences, США). Оба набора реагентов достаточно дорогие и имеют сложную систему пробоподготовки и регистрации результата. Чувствительность исследований с применением обоих наборов (нижний предел обнаружения) составляет ~1000 паразитов/мл, что не позволяет выявить часть бессимптомных пациентов, у которых уровень паразитов в крови может быть и меньше. Например, при обследовании бессимптомных пациентов в Занзибаре чувствительность исследования с набором LoopAmp составила лишь 40,8% [10]. Кроме того, «Alethia malaria» неспособен дифференцировать *P. vivax* и *P. falciparum* [6].

В Российской Федерации первый ПЦР-тест для диагностики малярии был разработан и зарегистрирован ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора в марте 2021 г. Набор реагентов «АмплиСенс® *Plasmodium* spp./*P. falciparum*/*P. vivax*-FL» обладает высокой аналитической чувствительностью (1–0,1 кл/мкл крови), что позволяет выявлять инфекцию даже при низком уровне инфицирования, а также в инкубационном и начальном периодах заболевания. При его применении снижается риск получения ложноположительных результатов, что нередко случалось при микроскопии мазков крови (старый золотой стандарт лабораторной диагностики малярии) [11]. Отечественного LAMP-

теста для выявления *P. vivax* не зарегистрировано. В то же время видоспецифическая диагностика возбудителя малярии имеет решающее значение для адекватного лечения. Немаловажную роль играет выбор мишени, особенно в отношении таких инфекционных заболеваний, как малярия. Стандартными молекулярными маркерами для дифференциации видов *Plasmodium* являются гены *18S* рРНК [12]. Для повышения чувствительности анализа предпочтительней использовать многокопийные геномные последовательности. Поэтому предлагалось использовать некодирующую повторяющуюся последовательность субтеломерной области хромосом *Pvr47*, которая имеется в 14 копиях в геноме *P. vivax* *Sal1* [13]. Хотя данная область оказалась вполне пригодной для конструирования ПЦР-праймеров, использование *Pvr47* для LAMP-анализа не увенчалось успехом – специфичность была невысокой и результаты не воспроизводились [7]. При попытках с помощью этих LAMP-праймеров обнаружить *P. vivax* в комарах *Anopheles* spp. были получены неспецифические сигналы [14].

Как одна из перспективных мишеней рассматривался многокопийный консервативный С-концевой участок семейства генов *vir*, но вариабельность этих участков оказалась настолько высокой, что найти фрагмент ДНК-последовательности достаточной длины и консервативности для подбора праймеров не удалось [15].

В отличие от высоковариабельных повторяющихся областей генома и *vir*-генов митохондриальная ДНК (мтДНК) содержит очень консервативные участки и в то же время позволяет различить малярийных паразитов до вида. Важно и то, что мтДНК присутствует в геноме в нескольких копиях (30–100 копий в клетке) и, не являясь ядерной, легко экстрагируется кипячением [16]. Все это предопределило использование мтДНК *P. vivax* в качестве мишени при разработке LAMP-теста для обнаружения ДНК паразитов вида *P. vivax*.

Хотя LAMP-тесты имеют ряд преимуществ по сравнению с другими методами, при разработке необходимо учитывать некоторые ограничения петлевой изотермической амплификации, в частности, независимую от матрицы неспецифическую амплификацию, с которой ранее столкнулись ряд разработчиков диагностических тест-систем на основе LAMP.

Целью нашей работы является разработка чувствительного, специфичного и простого в применении LAMP-амплификационного теста для обнаружения ДНК паразитов вида *P. vivax* в крови человека с использованием мтДНК в качестве мишени.

Материалы и методы

Конструирование праймеров

При выборе олигонуклеотидных праймеров использовали online-программу для расчета праймеров на основе целых геномов GLAPD (<https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/online/>). Анализ формирования вторичных структур (димеров, шпильки) выбранными праймерами проводили с помощью компьютерной программы mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/DNA-Folding-Form>) и Multiple Primer Analyzer ([https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/](https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/) molecular-biology-learning-center/

molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html). Структуры всех олигонуклеотидов сравнивались с помощью информационного ресурса NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) с последовательностями ДНК, размещенными в базе данных GenBank. При проведении этого анализа олигонуклеотиды с существенной гомологией с ДНК каких-либо других организмов исключали.

Проведение петлевой изотермической амплификации

Реакционная смесь объемом 25 мкл содержала 1× SD-буфер («РусЭнзим», Россия), 40 ед. SD-полимеразы («РусЭнзим», Россия), 3,5 mM MgCl₂, 0,5 mM каждого дНТФ, 4 праймера: 0,2 мкМ F3, 0,2 мкМ B3, 1,6 мкМ BIP, 1,6 мкМ FIP, 0,6 мкМ красителя SYTO 82, 5 мкл матрицы.

Реакцию комбинированной амплификации проводили на приборе для проведения ПЦР-анализа с детекцией продукта в режиме реального времени Applied Biosystems 7500 (США) в следующем режиме: первичная денатурация: при температуре 92°C – 1 мин 45 с, далее 4 цикла: при температуре 92°C – 15 с, при температуре 63°C – 1 мин, затем амплификация при температуре 63°C в течение 20 мин со считыванием флуоресценции каждую минуту. Накопление специфического продукта амплификации – участка ДНК *P. vivax* – детектировали по каналу VIC.

Учет результатов петлевой изотермической амплификации проводили с помощью программного обеспечения Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems.

Микробиологические методы

В работе использовали бактерии из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболensk».

Для проверки специфичности наборов праймеров использовали штаммы гетерологичных микроорганизмов: *Bacillus anthracis* 71/12, *Francisella tularensis* 15 НИИЭГ, *Yersinia pestis* EV НИИЭГ, *Yersinia pseudotuberculosis* C79, *Yersinia enterocolitica* C-126, *Brucella abortus* 19 BA, *Brucella melitensis* 16-M, *Brucella suis* 1330, *Vibrio cholerae* P-19241, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Escherichia coli* ATCC 25922.

Работу с возбудителями особо опасных инфекционных заболеваний проводили в соответствии с санитарными правилами и нормами.

Ампулы с культурой *F. tularensis* вскрывали и вносили по 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого. После растворения микробные взвеси высевали на чашки Петри с FT-агаром (ФБУН ГНЦ ПМБ) и инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 ± 1°C.

Ампулы с культурой *B. anthracis* вскрывали и вносили по 0,5 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого. После растворения микробные взвеси *B. anthracis* по 0,1 мл засевали в пробирки с 5 мл бульона Хоттингера (pH 7,2 ± 0,1) и инкубировали в течение 18–24 ч при температуре 37 ± 1°C. Затем производили посев на чашки Петри с агаром Хоттингера (pH 7,2 ± 0,1) и инкубировали 18 ч при температуре 37 ± 1°C.

Ампулы с лиофилизированными культурами *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* и *E. coli* вскрывали и после растворения микробные взвеси по 0,1 мл засевали на чашки Петри с агаром Хоттингера (pH 7,2) и инкубировали в

течение 18–24 ч при температуре 37°C для *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* и *E. coli* и температуре 28°C для *Y. pestis*.

После растворения микробную взвесь *V. cholerae* в объеме 0,1 мл высевали в 1%-ю пептонную воду, инкубировали в течение 3–6 ч при температуре 37 ± 1°C. Затем производили высеив с помощью бактериальной петли на чашки Петри с щелочным агаром, инкубировали при температуре 37 ± 1°C в течение 18–20 ч.

Штаммы возбудителя бруцеллеза выращивали на бруцеллагаре (ФБУН ГНЦ ПМБ). Культуры выращивали 48–72 ч при температуре 37 ± 1°C.

Штаммы возбудителя легионеллеза выращивали на питательной среде для культивирования легионелл – легионелбакагара (ФБУН ГНЦ ПМБ) при температуре 37 ± 1°C в присутствии 5% CO₂. Колонии образовывались на 3–5-й день инкубирования.

Из каждой культуры готовили отдельно суспензии в 2 мл 0,9%-го раствора натрия хлористого по отраслевому стандартному образцу мутности 10 ед. ГИСК им. Л.А.Тарасевича, что соответствует 1•10⁸ м.к./мл для *B. anthracis*, 1•10⁹ м.к./мл для *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Brucella*, *Legionella* и *E. coli*, 5•10⁹ м.к./мл для *F. tularensis*, 2,2•10⁹ м.к./мл для *V. cholerae*. Затем проводили десятикратные разведения подготовленных суспензий микроорганизмов в 0,9%-м растворе натрия хлористого до конечной концентрации 1•10⁷ м.к./мл.

Для обеззараживания материала в пробирки с тестируемыми микробными взвесями в объеме 100 мкл добавляли 11 мкл 0,1%-го натрия мертиолята (разведение 1:1000) до конечной концентрации 0,01% (разведение 1:10000) и прогревали при температуре 56 ± 1°C в течение 30 мин. По истечении заданного времени в пробирки с бактериальными взвесями вносили по 300 мкл лизирующего раствора из набора реагентов «РИБО-преп» и прогревали при температуре 65±1°C в течение 5 мин. После этого пробы считали обеззараженными.

Экстракция тотальной ДНК исследуемых штаммов осуществлялась с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (ПУ № ФСР 2008/03147 от 06.08.2021). Выделение ДНК осуществляли в соответствии с инструкцией производителя, начиная с этапа внесения сорбента.

Результаты

Выбор праймеров

В качестве целевой области для конструирования LAMP-праймеров была выбрана митохондриальная ДНК *P. vivax*, поскольку она является многокопийной. Online-ресурс GLAPD позволяет разработать олигонуклеотиды с высокой специфичностью на основе целых геномов. Для заданного целевого генома рассчитываются наборы праймеров, которые амплифицируют ДНК только этого генома [17]. С помощью GLAPD рассчитаны несколько наборов олигонуклеотидных праймеров для детекции возбудителя трехдневной малярии методом LAMP. В качестве целевой последовательности был выбран *P. vivax* mitochondrion RefSeq: NC_028626.1, в качестве фоновой – *P. falciparum* mitochondrion RefSeq: NC_037526.1.

Праймеры на *Plasmodium vivax*.

The 1 LAMP primers:

F3: pos:284,length:22 bp, primer(5'-3'):CCTGGTGTTTTAAATTAAGACG
F2: pos:306,length:21 bp, primer(5'-3'):CTGACTTCCTGGCTAAACTTC
F1c: pos:355,length:25 bp, primer(5'-3'):ACATGAATATAGACGGTTTTCTGCG
B1c: pos:393,length:25 bp, primer(5'-3'):AACCGCTAATTACGAATCTTCAAAG
B2: pos:436,length:23 bp, primer(5'-3'):CAGGAAAATTATAGACCGAACCT
B3: pos:469,length:25 bp, primer(5'-3'):CCATGAACATAAAACATGTGATCT

The 2 LAMP primers:

F3: pos:639,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTTTTCGCGTTTTTTCAG
F2: pos:672,length:23 bp, primer(5'-3'):ATCGATGTTTTTAAATCTACGC
F1c: pos:731,length:24 bp, primer(5'-3'):GCTGCTGGAAGTAGAAATCGTTAT
B1c: pos:781,length:24 bp, primer(5'-3'):TGCAACTACCATGTTACGACTTC
B2: pos:828,length:18 bp, primer(5'-3'):CTTCTGATCGACTCGTG
B3: pos:852,length:22 bp, primer(5'-3'):CATGTTACGAGATTTAAGGAT

The 3 LAMP primers:

F3: pos:957,length:25 bp, primer(5'-3'):ATTCTATTTATTAGGAGTCTCACAC
F2: pos:995,length:18 bp, primer(5'-3'):GGAAGTCGTTACACCGTT
F1c: pos:1036,length:25 bp, primer(5'-3'):GGTCCTAAGGTAGCAAAATTCCTTG
B1c: pos:1065,length:20 bp, primer(5'-3'):TACGATACAGCCGCGTTTA
B2: pos:1101,length:25 bp, primer(5'-3'):ATGAATAGTTCAAGTTACTGACATC
B3: pos:1136,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTACAACACAAGTCACTG

The 4 LAMP primers:

F3: pos:1362,length:18 bp, primer(5'-3'):CAGCCAACACCATCCAAT
F2: pos:1394,length:25 bp, primer(5'-3'):TCTGTGTACAATCTTTTGTATCC
F1c: pos:1446,length:25 bp, primer(5'-3'):GCATCTGTTTCTATTCTTTTGGGCT
B1c: pos:1492,length:25 bp, primer(5'-3'):AGAGCTATGACGCTATCTTTGAC
B2: pos:1538,length:21 bp, primer(5'-3'):GAGGATGAACGTTAAGTTCT
B3: pos:1572,length:20 bp, primer(5'-3'):TTGTTCCCTATCTACCGTTT

The 5 LAMP primers:

F3: pos:1679,length:21 bp, primer(5'-3'):AGATTGTAAGGTATAGCGTT
F2: pos:1714,length:19 bp, primer(5'-3'):ACAATGTATTCCACCGCT
F1c: pos:1775,length:20 bp, primer(5'-3'):TCTTTGCCTGGAGGTTACGT
B1c: pos:1796,length:21 bp, primer(5'-3'):AATGACCGGTCAAAACGGAAT
B2: pos:1857,length:21 bp, primer(5'-3'):ATGAGTATGCTGCTGAGT
B3: pos:1892,length:19 bp, primer(5'-3'):AGAAGGGAAGTGTGTTTCC

The 6 LAMP primers:

F3: pos:2948,length:19 bp, primer(5'-3'):TTAGCGTGTATTGTGCGC
F2: pos:2982,length:25 bp, primer(5'-3'):CGTCACGCCAAATTTATATTACTAAG
F1c: pos:3025,length:25 bp, primer(5'-3'):GTTTCCATCTCAACTCTACAGGTTA
B1c: pos:3053,length:23 bp, primer(5'-3'):CCGGAAGGAAATATTACGTCCA
B2: pos:3101,length:22 bp, primer(5'-3'):CATTTTTAGTCCCATGCTAGT
B3: pos:3124,length:21 bp, primer(5'-3'):GGGCTTAAACCAACAACATAA

The 7 LAMP primers:

F3: pos:6427,length:22 bp, primer(5'-3'):CCTGGTGTTTTAAATTAAGACG
F2: pos:6449,length:21 bp, primer(5'-3'):CTGACTTCCTGGCTAAACTTC
F1c: pos:6498,length:25 bp, primer(5'-3'):ACATGAATATAGACGGTTTTCTGCG
B1c: pos:6536,length:25 bp, primer(5'-3'):AACCGCTAATTACGAATCTTCCAAG
B2: pos:6579,length:23 bp, primer(5'-3'):CAGGAAAATTATAGACCGAACCT
B3: pos:6612,length:25 bp, primer(5'-3'):CCATGAACATAAAACATGTGATCT

The 8 LAMP primers:

F3: pos:6782,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTTTTCGCGTTTTTTCAG
F2: pos:6815,length:23 bp, primer(5'-3'):ATCGATGTTTTTAAATCTACGC
F1c: pos:6874,length:24 bp, primer(5'-3'):GCTGCTGGAAGTAGAAATCGTTAT
B1c: pos:6924,length:24 bp, primer(5'-3'):TGTCGAATACCATGTTACGACTTC
B2: pos:6971,length:18 bp, primer(5'-3'):CTTCTGATCGACTCGTG
B3: pos:6995,length:22 bp, primer(5'-3'):CATGTTACGAGATTTAAGGAT

The 9 LAMP primers:

F3: pos:7100,length:25 bp, primer(5'-3'):ATTCTATTTATTAGGAGTCTCACAC
F2: pos:7138,length:18 bp, primer(5'-3'):GGAAGTCGTTACACCGTT
F1c: pos:7179,length:25 bp, primer(5'-3'):GGTCCTAAGGTAGCAAAATTCCTTG
B1c: pos:7208,length:20 bp, primer(5'-3'):TACGATACAGCCGCGGTTTA
B2: pos:7244,length:25 bp, primer(5'-3'):ATGAATAGTTCAAGTTACTGACATC
B3: pos:7279,length:20 bp, primer(5'-3'):GGTTACAACACAAGTCACTG

The 10 LAMP primers:

F3: pos:7505,length:18 bp, primer(5'-3'):CAGCCAACACCATCCAAT
F2: pos:7537,length:25 bp, primer(5'-3'):TCTGTGTACAATCTTTTGTATCC
F1c: pos:7589,length:25 bp, primer(5'-3'):GCATCTGTTTCTATTCTTTTGGGCT
B1c: pos:7635,length:25 bp, primer(5'-3'):AGAGCTATGACGCTATCAATTTGAC
B2: pos:7681,length:21 bp, primer(5'-3'):GAGGATGAACGTTAAGTTCT
B3: pos:7715,length:20 bp, primer(5'-3'):TTGTTCCCTATCTACCGTTT

При отборе праймеров были применены строгие критерии – олигонуклеотиды, образующие стойкие вторичные структуры, которые могут повлиять на эффективность амплификации, исключали. В результате самыми перспективными для проведения изотермической амплификации признаны наборы №2 и №3.

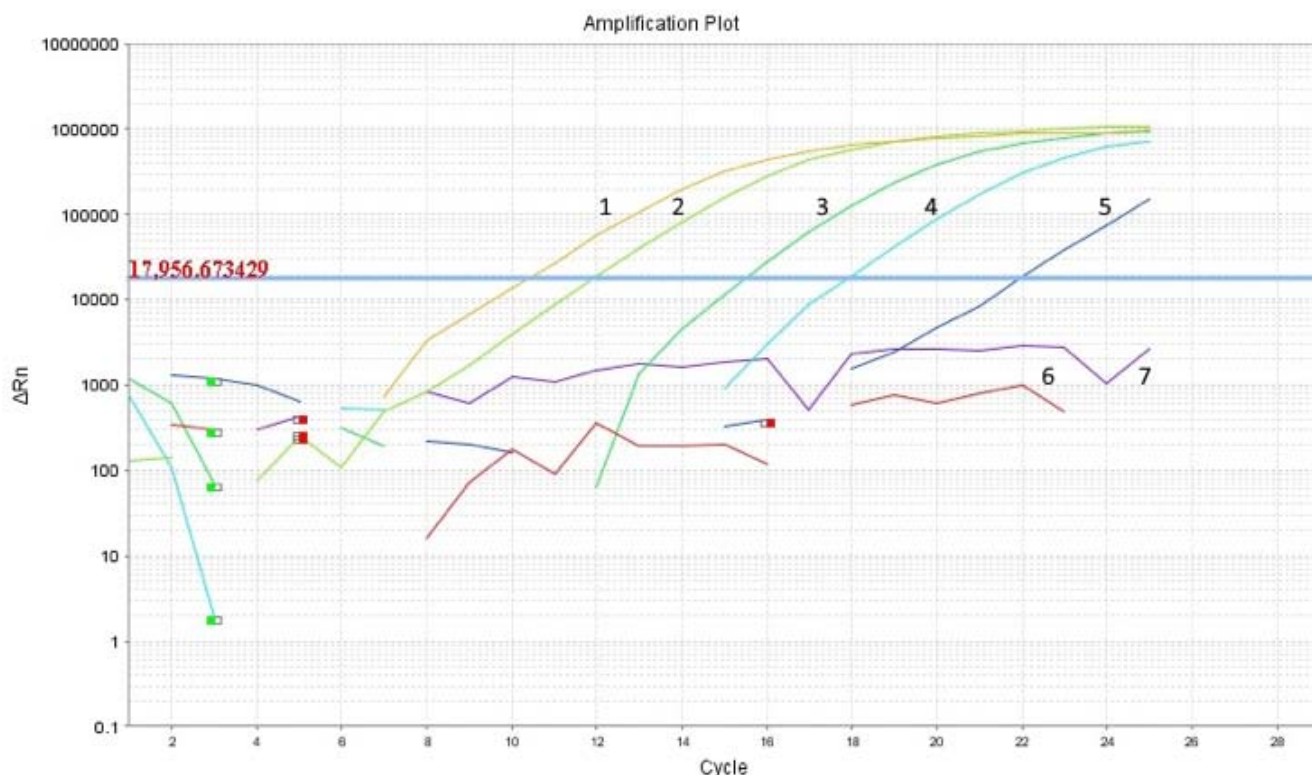


Рис. 1. Графики амплификации ЛАМР-продукта с помощью набора праймеров №2 с тестовой плазмидой pUC57-196 с фрагментом мтДНК *P. vivax*: 1 – 2 мг pUC57-196, 2 – 200 пг pUC57-196, 3 – 20 пг pUC57-196, 4 – 2 пг pUC57-196, 5 – 200 фг pUC57-196, 6 – 200 пг pUC57-Mal784 с фрагментом мтДНК *P. falciparum*, 7 – отрицательный контроль амплификации H₂O.

Fig. 1. Graphs of LAMP product amplification using primer set #2 with test plasmid pUC57-196 with a fragment of *P. vivax* mtDNA: 1 – 2 mg pUC57-196, 2 – 200 pg pUC57-196, 3 – 20 pg pUC57-196, 4 – 2 pg pUC57-196, 5 – 200 fg pUC57-196, 6 – 200 pg pUC57-Mal784 with a fragment of *P. falciparum* mtDNA, 7 – negative control of H₂O amplification.

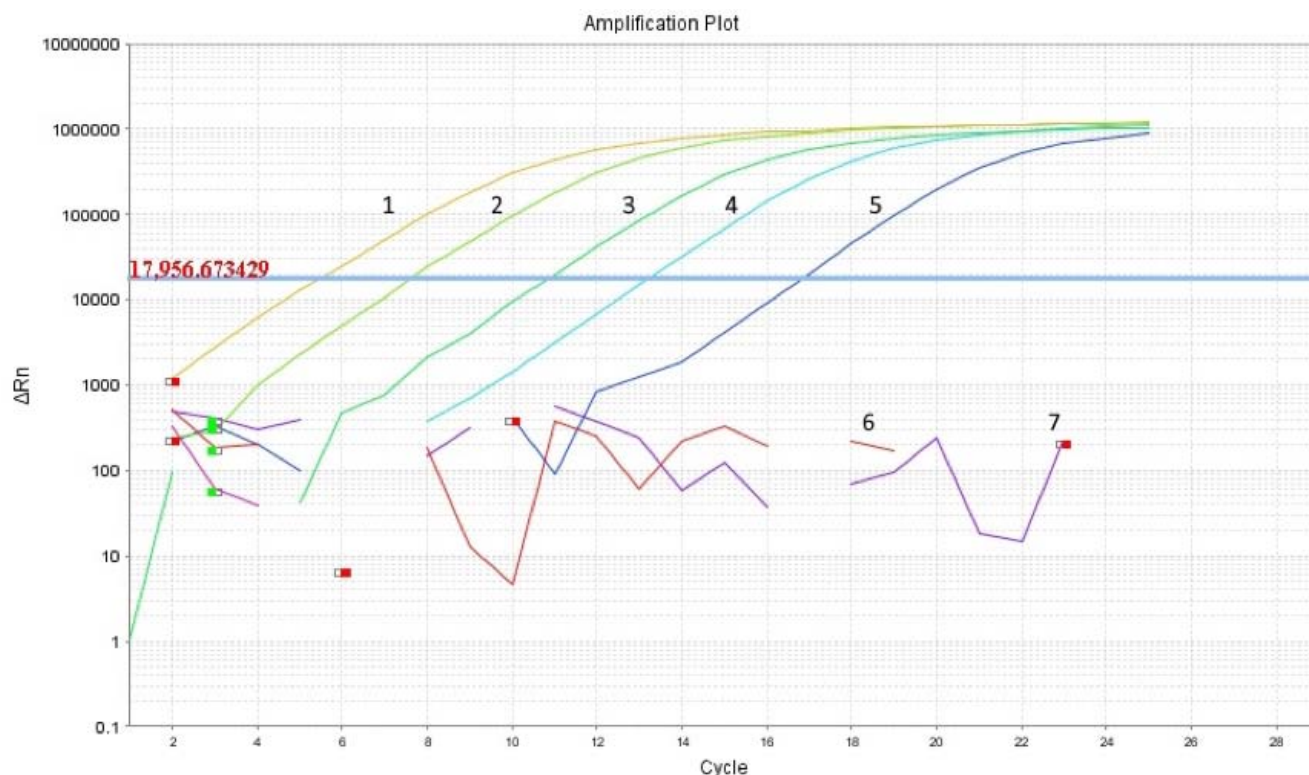


Рис. 2. Графики амплификации ЛАМР-продукта с помощью набора праймеров №3 с тестовой плазмидой pUC57-232 с фрагментом мтДНК *P. vivax*: 1 – 2 мг pUC57-232, 2 – 200 пг pUC57-232, 3 – 20 пг pUC57-232, 4 – 2 пг pUC57-232, 5 – 200 фг pUC57-232, 6 – 200 пг pUC57-Mal784 с фрагментом мтДНК *P. falciparum*, 7 – отрицательный контроль амплификации H₂O.

Fig. 2. Graphs of LAMP product amplification using primer set #3 with test plasmid pUC57-232 with a fragment of *P. vivax* mtDNA: 1 – 2 mg pUC57-232, 2 – 200 pg pUC57-232, 3 – 20 pg pUC57-232, 4 – 2 pg pUC57-232, 5 – 200 fg pUC57-232, 6 – 200 pg pUC57-Mal784 with a fragment of *P. falciparum* mtDNA, 7 – negative control of H₂O amplification.

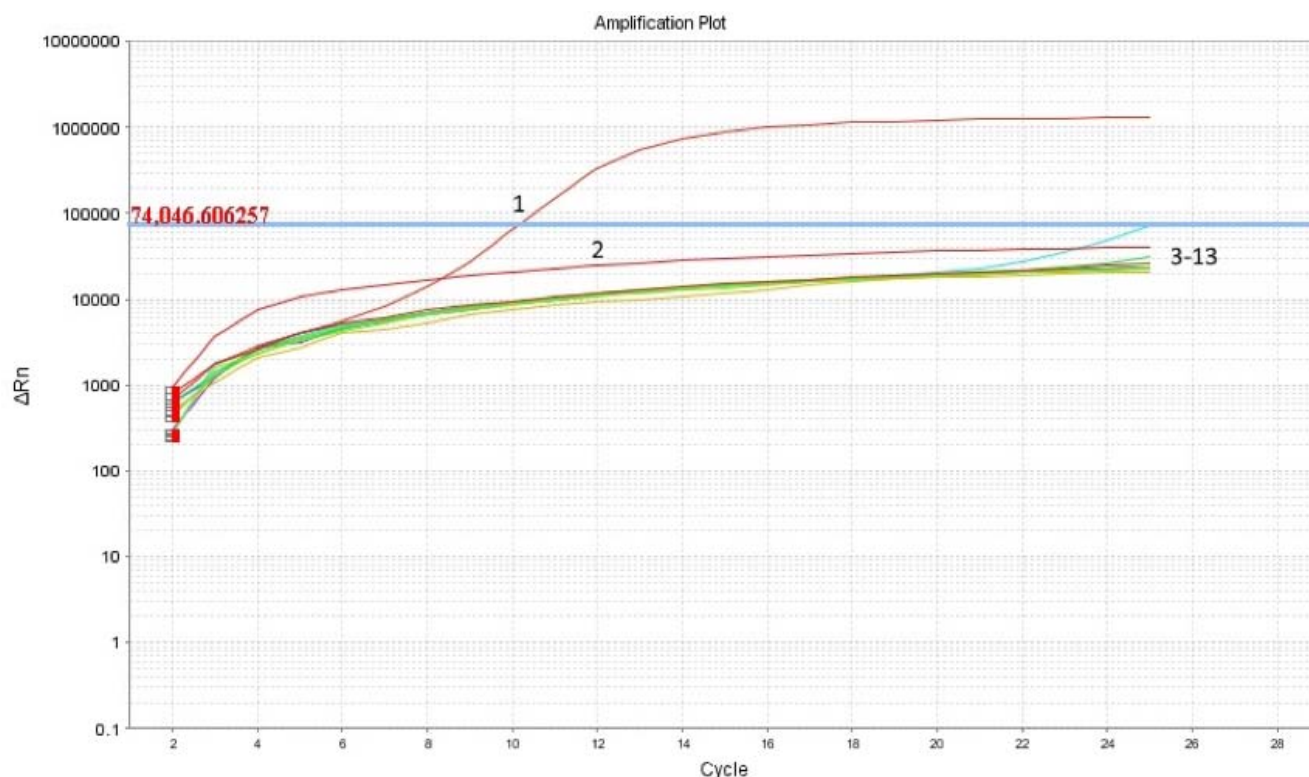


Рис. 3. Графики амплификации ЛАМР-продукта с помощью набора праймеров №2 с ДНК гетерологичных микроорганизмов: 1 – положительный контроль – плазмида pUC57-196 с фрагментом мтДНК *P. vivax*, 2 – отрицательный контроль амплификации H_2O , 3 – ДНК *B. anthracis* 71/12, 4 – ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 5 – ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ, 6 – ДНК *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – ДНК *Y. enterocolitica* C-126, 8 – ДНК *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – ДНК *B. suis* 1330, 11 – ДНК *V. cholerae* P-19241, 12 – ДНК *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – ДНК *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 3. Graphs of LAMP product amplification using primer set No. 2 with DNA of heterologous microorganisms: 1 – positive control – plasmid pUC57-196 with mtDNA fragment of *P. vivax*, 2 – negative control of H_2O amplification, 3 – DNA of *B. anthracis* 71/12, 4 – DNA of *F. tularensis* 15 NIEG, 5 – DNA of *Y. pestis* EV NIEG, 6 – DNA of *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – DNA of *Y. enterocolitica* C-126, 8 – DNA of *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – DNA of *B. suis* 1330, 11 – DNA of *V. cholerae* P-19241, 12 – DNA of *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – DNA of *E. coli* ATCC 25922.

В работе также использовали SD-полимеразу – фермент-мутант Taq-полимеразы, обладающий способностью вытеснения цепи, но с более высокой термостабильностью по сравнению с Bst-полимеразой, что позволяет добавить этап первичной высокотемпературной денатурации ДНК, повышающий эффективность реакции [18]. При проведении анализа использовали комбинированную реакцию амплификации – сочетание 4 циклов ПЦР и собственно петлевую изотермическую амплификацию. Это позволило значительно сократить время анализа – синтез продукта был замечен уже через несколько минут от начала реакции. Использование Real-Time PCR Systems позволило следить за накоплением ампликонов в режиме реального времени без использования этапа электрофореза. В качестве положительного контроля использовали тестовые плазмиды pUC57 с клонированными участками митохондриальной ДНК *P. vivax* (ShineGene Molecular Biotech, Inc., Shanghai, Китай). Продукт амплификации получен только с контрольной ДНК, содержащей фрагмент мтДНК *P. vivax*. Оба набора праймеров (№2 и №3) показали воспроизводимые результаты при амплификации 10-кратных разведений тестовых плазмид. При этом чувствительность набора №3 оказалась несколько выше (рис. 1, 2). С ДНК гетерологичных микроорганизмов сигналов получено не было (рис. 3, 4).

Таким образом, в ходе конструирования тест-системы на основе изотермической амплификации удалось получить

2 набора видоспецифических олигонуклеотидов, направляющих синтез ДНК *P. vivax* только в присутствии специфической мишени – мтДНК *P. vivax*.

Обсуждение

В заключение следует отметить, что малярия, вызванная *P. vivax*, является распространенной формой этого заболевания, которое поражает людей во всем мире. Диагностика и лечение имеют важное значение для предотвращения осложнений, связанных с этим заболеванием, включая латентное течение малярии с обострениями, анемию, почечную недостаточность и даже летальный исход. LAMP является эффективным методом молекулярной диагностики, который можно использовать для высокочувствительного обнаружения таких патогенов, как *P. vivax*. Этот метод имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами, но также выявлены и некоторые ограничения, которые следует учитывать при разработке теста и интерпретации результатов. Неспецифическая амплификация, независимая от матрицы, является существенной проблемой петлевой изотермической амплификации, что ранее было отмечено рядом авторов [19–21]. Она обусловлена использованием большого количества праймеров (4-6 праймеров на реакцию), два из которых являются чрезмерно длинными. Из-за амплификации димеров праймеров ложноположительные сигналы могут появиться в отрицательных

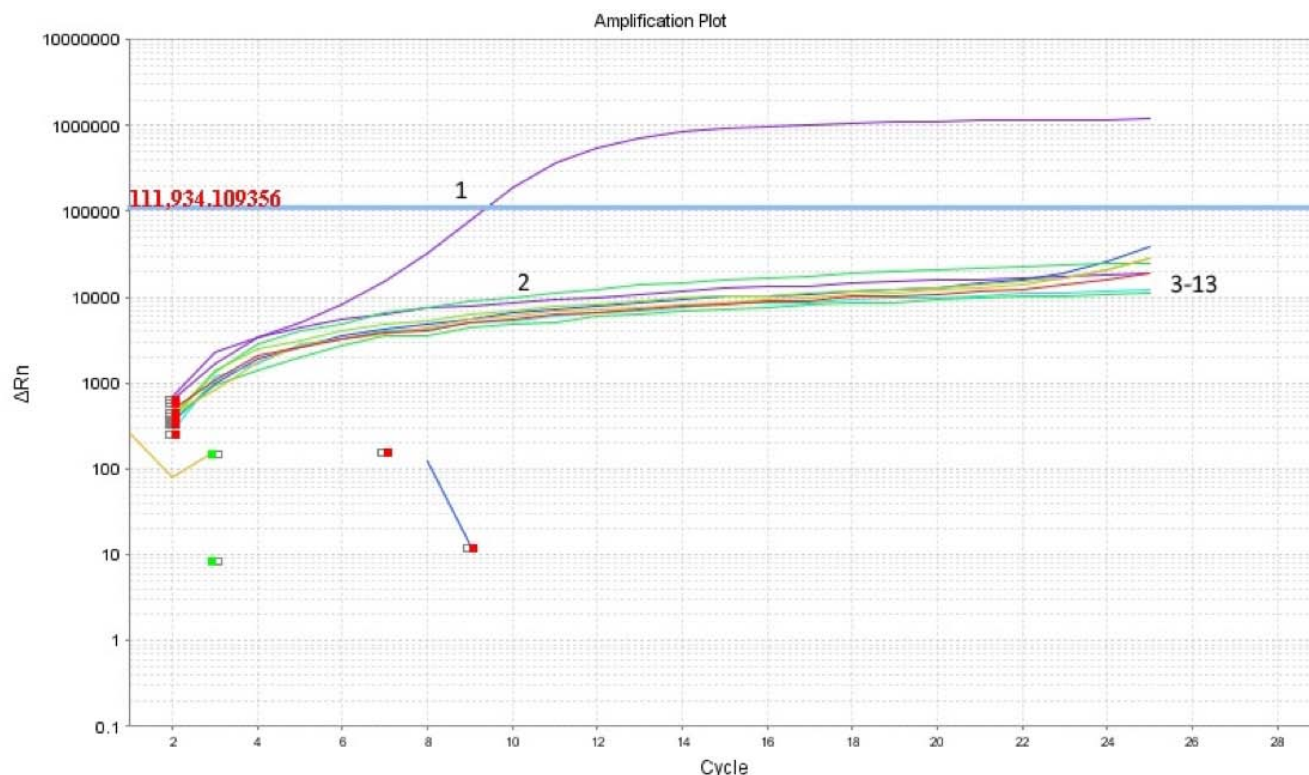


Рис. 4. Графики амплификации LAMP-продукта с помощью набора праймеров №3 с ДНК гетерологичных микроорганизмов: 1 – положительный контроль – плазмида pUC57-232 с фрагментом мтДНК *P. vivax*, 2 – отрицательный контроль амплификации H₂O, 3 – ДНК *B. anthracis* 71/12, 4 – ДНК *F. tularensis* 15 НИИЭГ, 5 – ДНК *Y. pestis* EV НИИЭГ, 6 – ДНК *Y. pseudotuberculosis* C79, 7 – ДНК *Y. enterocolitica* C-126, 8 – ДНК *B. abortus* 19 BA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – ДНК *B. suis* 1330, 11 – ДНК *V. cholerae* P-19241, 12 – ДНК *L. pneumophila* ATCC 33152, 13 – ДНК *E. coli* ATCC 25922.

Fig. 4. Graphs of LAMP product amplification using primer set #3 with DNA of heterologous microorganisms: 1 – positive control – pUC57-232 plasmid with mtDNA fragment of *P. vivax*, 2 – negative control of H₂O amplification, 3 – *B. anthracis* 71/12 DNA, 4 – *F. tularensis* 15 NIEG DNA, 5 – *Y. pestis* EV NIEG DNA, 6 – *Y. pseudotuberculosis* C79 DNA, 7 – *Y. enterocolitica* C-126 DNA, 8 – *B. abortus* 19 BA DNA, 9 – *B. melitensis* 16-M, 10 – *B. suis* 1330 DNA, 11 – *V. cholerae* P-19241 DNA, 12 – *L. pneumophila* DNA ATCC 33152, 13 – *E. coli* DNA ATCC 25922.

контролях, при этом их появление происходит случайным образом [22]. В итоге нет уверенности в результатах анализа, подобный тип амплификации невозможно отличить от контаминации реагентов. Более того, при сверхнизких концентрациях патогена на уровне предела обнаружения сложно доказать истинную позитивность образца [23]. Можно надеяться, что при разработке нашей тест-системы будут преодолены известные проблемы в виде неспецифической амплификации, ведущей к псевдоположительным результатам тестирования. Несомненно, что для оценки диагностической эффективности разработанной тест-системы необходимы дальнейшие исследования в различных клинических условиях, прежде чем ее можно будет широко применять в качестве инструмента для выявления возбудителя малярии *P. vivax*. Поэтому разработанные опытные образцы тест-систем планируется в ходе клинко-лабораторных исследований испытать на клинических пробах крови от заболевших малярией пациентов для завершения работ по созданию набора реагентов для LAMP-диагностики малярии, обусловленной *P. vivax*.

Информация о финансировании

Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.

Financial support

The work was supported by the Sectoral Scientific Program of the Rosпотребнадзор.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests

The authors declare no conflict of interests.

Литература / References

1. WHO. World malaria report 2022. 8 December 2022. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240064898>
2. Малярия: патогенез, клиника, эпидемиология и профилактика: учебное пособие. Под ред. Балахонова СВ. Иркутск: ИНЦХТ, 2019. / Malyariya: patogenez, klinika, epidemiologiya i profilaktika: uchebnoe posobie. Pod red. Balakhonova SV. Irkutsk: INTsKhT, 2019. (In Russian).
3. WHO. World Malaria Report 2021. 6 December 2021. Available at: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240040496>
4. 25 апреля – Всемирный день борьбы с малярией. 24.04.2023. / 25 aprelya – Vsemirnyi den' bor'by s malyariei. 24.04.2023. Available at: https://02.rospotrebnadzor.ru/content/170/42003/?sphrase_id=166509 (In Russian).
5. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000 Jun 15;28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
6. Lucchi NW, Demas A, Narayanan J, Sumari D, Kabanyanyi A, Kachur SP, et al. Real-time fluorescence loop mediated isothermal amplification for the diagnosis of malaria. *PLoS One.* 2010 Oct 29;5(10):e13733. DOI: 10.1371/journal.pone.0013733
7. Patel JC, Oberstaller J, Xayavong M, Narayanan J, DeBarry JD, Srinivasamoorthy G, et al. Real-time loop-mediated isothermal amplification (RealAmp) for the

- species-specific identification of *Plasmodium vivax*. PLoS One. 2013;8(1):e54986. DOI: 10.1371/journal.pone.0054986
8. Kudyba HM, Louzada J, Ljolje D, Kudyba KA, Muralidharan V, Oliveira-Ferreira J, et al. Field evaluation of malaria malachite green loop-mediated isothermal amplification in health posts in Roraima state, Brazil. Malar J. 2019 Mar 25;18(1):98. DOI: 10.1186/s12936-019-2722-1
9. Barazorda KA, Salas CJ, Bishop DK, Lucchi N, Valdivia HO. Comparison of real time and malachite-green based loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of *Plasmodium vivax* and *P. falciparum*. PLoS One. 2020 Jun 11;15(6):e0234263. DOI: 10.1371/journal.pone.0234263
10. Aydin-Schmidt B, Morris U, Ding XC, Jovel I, Msellem MI, Bergman D, et al. Field Evaluation of a High Throughput Loop Mediated Isothermal Amplification Test for the Detection of Asymptomatic *Plasmodium* Infections in Zanzibar. PLoS One. 2017 Jan 17;12(1):e0169037. DOI: 10.1371/journal.pone.0169037
11. О регистрации ПЦР-теста на выявление малярии. / O registratsii PTsR-testa na vyavlenie malyarii. Available at: https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=17226 (In Russian).
12. Nguyen TK, Jun H, Louis JM, Mazigo E, Lee WJ, Youm HC, et al. Enhancing malaria detection in resource-limited areas: A high-performance colorimetric LAMP assay for *Plasmodium falciparum* screening. PLoS One. 2024 Feb 9;19(2):e0298087. DOI: 10.1371/journal.pone.0298087
13. Demas A, Oberstaller J, DeBarry J, Lucchi NW, Srinivasamoorthy G, Sumari D, et al. Applied genomics: data mining reveals species-specific malaria diagnostic targets more sensitive than 18S rRNA. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2411-8. DOI: 10.1128/JCM.02603-10
14. Harrison GF, Foley DH, Rueda LM, Melanson VR, Wilkerson RC, Long LS, et al. *Plasmodium*-specific molecular assays produce uninterpretable results and non-*Plasmodium* spp. sequences in field-collected *Anopheles* vectors. Am J Trop Med Hyg. 2013 Dec;89(6):1117-1121. DOI: 10.4269/ajtmh.12-0581
15. Auburn S, Böhme U, Steinbiss S, Trimarsanto H, Hostettler J, Sanders M, et al. A new *Plasmodium vivax* reference sequence with improved assembly of the subtelomeres reveals an abundance of pir genes. Wellcome Open Res. 2016 Nov 15;1:4. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.9876.1
16. Polley SD, Mori Y, Watson J, Perkins MD, González IJ, Notomi T, et al. Mitochondrial DNA targets increase sensitivity of malaria detection using loop-mediated isothermal amplification. J Clin Microbiol. 2010 Aug;48(8):2866-71. DOI: 10.1128/JCM.00355-10
17. Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, et al. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. Front Microbiol. 2019 Dec 13;10:2860. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02860
18. Ignatov KB, Barsova EV, Fradkov AF, Blagodatskikh KA, Kramarova TV, Kramarov VM. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. Biotechniques. 2014 Aug 1;57(2):81-7. DOI: 10.2144/000114198
19. Hopkins H, González IJ, Polley SD, Angutoko P, Ategeka J, Asiimwe C, et al. Highly sensitive detection of malaria parasitemia in a malaria-endemic setting: performance of a new loop-mediated isothermal amplification kit in a remote clinic in Uganda. J Infect Dis. 2013 Aug 15;208(4):645-52. DOI: 10.1093/infdis/jit184
20. Tanner NA, Zhang Y, Evans TC Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. Biotechniques. 2012 Aug;53(2):81-9. DOI: 10.2144/0000113902
21. Cook J, Aydin-Schmidt B, González IJ, Bell D, Edlund E, Nassor MH, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for point-of-care detection of asymptomatic low-density malaria parasite carriers in Zanzibar. Malar J. 2015 Jan 28;14:43. DOI: 10.1186/s12936-015-0573-y
22. Katrak S, Murphy M, Nayebar P, Rek J, Smith M, Arinaitwe E, et al. Performance of Loop-Mediated Isothermal Amplification for the Identification of Submicroscopic *Plasmodium falciparum* Infection in Uganda. Am J Trop Med Hyg. 2017 Dec;97(6):1777-1781. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0225
23. Gruenberg M, Moniz CA, Hofmann NE, Wampfler R, Koepfli C, Mueller I, et al. *Plasmodium vivax* molecular diagnostics in community surveys: pitfalls and solutions. Malar J. 2018 Jan 30;17(1):55. DOI: 10.1186/s12936-018-2201-0

Информация о соавторе:

Бикетов Сергей Фёдорович, кандидат медицинских наук, главный научный сотрудник отдела иммунобиохимии патогенных микроорганизмов ФБУН «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора

Information about co-author:

Sergey F. Biketov, MD, PhD, Chief Researcher, of Immunobiochemistry of Pathogenic Microorganisms, State Research Center for Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor

НОВОСТИ НАУКИ

Новые инструменты для разработки препаратов против *Acinetobacter*

Эргостерол, обнаруженный в грибах и некоторых мембранах простейших, изучен недостаточно по сравнению с холестерином из мембран животных. Обычно предполагается, что эргостерол модулирует мембраны таким же образом, как и холестерин, на основе их схожих химических структур. Раскрыты некоторые фундаментальные структурные и динамические различия между ними. Нейтронная дифракция показывает, что эргостерол встроен в липидный бислой гораздо глубже, чем холестерин. Эргостерол не изменяет толщину мембраны так сильно, как холестерин, что указывает на небольшой эффект конденсации. Нейтронное спиновое эхо показывает, что эргостерол может делать мембраны жесткими и смягчать их при разных концентрациях. Боковая диффузия липидов, измеренная с помощью квазиупругого рассеяния нейтронов, показывает, что эргостерол способствует скачкообразной диффузии липидов, тогда как холестерин сохраняет ту же непрерывную боковую диффузию, что и чистая липидная мембрана. Эти результаты указывают на совершенно разные взаимодействия эргостерола с мембранами по сравнению с холестерином. Эти идеи дают базовое понимание мембран, содержащих эргостерол, с учетом таких явлений, как липидные плоты и лекарственные взаимодействия.

Qian S, Nagy G, Zolnierczuk P, Mamontov E, Standaert R.

Nonstereotypical Distribution and Effect of Ergosterol in Lipid Membranes. J Phys Chem Lett. 2024 May 2;15(17):4745-4752. DOI: 10.1021/acs.jpclett.4c00385