

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2021

Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции

Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф.

ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия

Введение. В настоящее время основой молекулярной диагностики большинства инфекционных заболеваний является использование полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR). Альтернативой этому методу при решении диагностических задач могут выступать технологии, основанные на петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ; reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, RT-LAMP). В данном исследовании нами выполнено сравнение ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР с целью анализа как преимуществ, так и недостатков обоих подходов.

Материал и методы. При проведении экспериментов использованы наборы реагентов, предназначенные для анализа на основе ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ. В работе использовался биологический материал, полученный из мазков со слизистой оболочки рото- и носоглотки у лиц с симптомами новой коронавирусной инфекции.

Результаты. В ходе исследования протестирован 381 образец РНК вируса SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) от различных пациентов. Полученные значения порогового числа циклов (cycle threshold, Ct) для ОТ-ПЦР составили в среднем $20,0 \pm 3,7$ (диапазон 1530 ± 300 с), для ОТ-ИТ – $12,8 \pm 3,7$ (диапазон 550 ± 160 с). Исходя из теоретических предпосылок, в качестве гипотетической была предложена линейная зависимость представленных величин; коэффициент корреляции составил $\approx 0,827$. При этом для проб с низкой вирусной нагрузкой (ВН) более высокие значения Ct при ОТ-ИТ не всегда соответствовали таковым в случае ОТ-ПЦР.

Обсуждение. Мы отметили существенное преимущество во времени при выполнении анализа с помощью ОТ-ИТ по сравнению с ОТ-ПЦР, что может быть важно в условиях тестирования большого количества образцов. Разработанные на основе методики ОТ-ИТ тест-системы в силу простоты в использовании и относительной быстроты получения результата могут быть применены в процессе массового скрининга с целью выявления лиц со средней и высокой ВН, представляющих наибольшую угрозу распространения SARS-CoV-2. В свою очередь, диагностические методы на базе ОТ-ПЦР подходят в том числе для оценки ВН и её динамики у пациентов с COVID-19.

Ключевые слова: *коронавирусная инфекция; коронавирус SARS-CoV-2; полимеразная цепная реакция (ПЦР); петлевая изотермическая амплификация с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ)*

Для цитирования: Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(6): 417–424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

Для корреспонденции: Хафизов Камилль Фаридович, канд. биол. наук, руководитель научной группы разработки новых методов диагностики на основе технологий секвенирования следующего поколения отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор), 111123, Москва, Россия. E-mail: kkhafizov@gmail.com

Участие авторов: Акимкин В.Г. – написание резюме, научное редактирование и общая редакция статьи; Петров В.В. – руководство разработкой набора реагентов на основе петлевой изотермической амплификации; Красовитов К.В. – написание текста, разработка набора реагентов на основе петлевой изотермической амплификации; Борисова Н.И. – написание текста, выполнение экспериментов; Котов И.А. – написание текста, подготовка иллюстраций, анализ данных; Родионова Е.Н. – руководство разработкой и производством наборов реагентов; Черкашина А.С. – разработка наборов реагентов, приготовление контрольных образцов; Кондрашева Л.Ю. – организация сбора биологического материала и первичного тестирования с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией; Тиванова Е.В. – организация сбора биологического материала; Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстраций, общая редакция статьи.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Этическое утверждение. Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (Роспотребнадзор) (ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора) (Протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.)

Поступила 18.10.2021

Принята в печать 24.11.2021

Опубликована 30.12.2021

ORIGINAL ARTICLE

<https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction

Vasiliy G. Akimkin, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitev, Nadezhda I. Borisova, Ivan A. Kotov, Elena N. Rodionova, Anna S. Cherkashina, Larisa Yu. Kondrasheva, Elena V. Tivanova, Kamil F. Khafizov

FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia

Introduction. Currently, the basis for molecular diagnostics of most infections is the use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). Technologies based on reverse transcription isothermal loop amplification (RT-LAMP) can be used as an alternative to RT-PCR for diagnostic purposes. In this study, we compared the RT-LAMP and RT-PCR methods in order to analyze both the advantages and disadvantages of the two approaches.

Material and methods. For the study, we used reagent kits based on RT-PCR and RT-LAMP. The biological material obtained by taking swabs from the mucous membrane of the oropharynx and nasopharynx in patients with symptoms of a new coronavirus infection was used.

Results. We tested 381 RNA samples of the SARS-CoV-2 virus (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) from various patients. The obtained values of the threshold cycle (Ct) for RT-PCR averaged 20.0 ± 3.7 s (1530 ± 300 s), and for RT-LAMP 12.8 ± 3.7 s (550 ± 160 s). Proceeding from the theoretical assumptions, a linear relationship between values obtained in two kits was proposed as a hypothesis; the correlation coefficient was approximately 0.827. At the same time, for samples with a low viral load (VL), the higher Ct values in RT-LAMP did not always correlated with those obtained in RT-PCR.

Discussion. We noted a significant gain in time for analysis using RT-LAMP compared to RT-PCR, which can be important in the context of testing a large number of samples. Being easy to use and boasting short turnaround time, RT-LAMP-based test systems can be used for mass screening in order to identify persons with medium and high VLs who pose the greatest threat of the spread of SARS-CoV-2, while RT-PCR-based diagnostic methods are also suitable for estimation of VL and its dynamics in patients with COVID-19.

Key words: coronavirus infection; coronavirus SARS-CoV-2; polymerase chain reaction (PCR); reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP)

For citation: Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovitev K.V., Borisova N.I., Kotov I.A., Rodionova E.N., Cherkashina A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(6): 417-424. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-86>

For correspondence: Kamil' F. Khafizov, Ph.D. (Biol.), Head, Scientific Group for the Development of New Diagnostic Methods, Molecular Diagnostics and Epidemiology Department, FSBI «Central Research Institute for Epidemiology» of the Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rosпотребнадзор), Moscow, 111123, Russia. E-mail: kkhafizov@gmail.com

Information about the authors:

Akimkin V.G., <https://orcid.org/0000-0003-4228-9044>

Petrov V.V., <https://orcid.org/0000-0002-3503-2366>

Krasovitev K.V., <https://orcid.org/0000-0001-7237-1810>

Borisova N.I., <http://orcid.org/0000-0002-9672-0648>

Kotov I.A., <http://orcid.org/0000-0003-2416-5689>

Rodionova E.N., <https://orcid.org/0000-0003-0192-1832>

Cherkashina A.S., <https://orcid.org/0000-0002-1888-4903>

Kondrasheva L.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-0147-4262>

Tivanova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-1286-2612>
Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

Contribution: Akimkin V.G. – writing of the resume, scientific editing and general editing of the article; Petrov V.V. – leadership in the development of a kit based on loop-mediated isothermal amplification; Krasovtsov K.V. – writing of the text, developing a set of reagents based on loop-mediated isothermal amplification; Borisova N.I. – writing of the text, performing of experiments; Kotov I.A. – writing of the text, preparing of the illustrations, data analysis; Rodionova E.N. – management of the development and production of reagent kits; Cherkashina A.S. – development of reagent kits; Kondrasheva L.Yu. – organization of biological material collection and primary testing using reverse transcription polymerase chain reaction; Tivanova E.V. – organization of biological material collection; Khafizov K.F. – writing of the text, collecting and processing of materials, preparing of the illustrations, general editing of the article.

Funding. The research was funded by the State budget.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Ethics approval. The study was conducted with informed consent of the patients. The study protocol was approved by the Ethics Committee of the FBSI «Central Research Institute of Epidemiology» of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Welfare (Rospotrebnadzor) (FBSI CRIE of Rospotrebnadzor) (Protocol No. 111 dated December 22, 2020).

Received 18 October 2021
Accepted 24 November 2021
Published 30 December 2021

Введение

Новая коронавирусная инфекция (COVID-19), вызываемая вирусом, получившим название «коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2» (Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2, SARS-CoV-2), впервые была зарегистрирована в конце 2019 г. в Ухане, провинция Хубэй, Китайская Народная Республика (КНР), и затем быстро распространилась по всему миру [1, 2]. Уже через 2,5 месяца, 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) официально объявила о начале пандемии COVID-19. Несмотря на многочисленные противоэпидемические мероприятия с длительными карантинными периодами по всему миру, по состоянию на ноябрь 2021 г. было зарегистрировано >260 млн подтверждённых случаев этого заболевания, в т.ч. >5 млн смертей (<https://www.worldometers.info/coronavirus/>). Другой серьёзной проблемой в сложившейся обстановке стала перегрузка диагностической инфраструктуры. Вследствие этого существующие лабораторные мощности не всегда справлялись с большим количеством аналитических лабораторных исследований, которые требовалось провести в сжатые сроки, особенно в периоды резких подъёмов заболеваемости. В связи с этим возникла острая необходимость в разработке новых, дающих быстрый и при этом точный результат тест-систем для выявления возбудителя COVID-19, что могло бы иметь решающее значение в контроле распространения инфекции среди населения.

Молекулярно-генетические методы занимают особое место в системе инфекционной диагностики и эпидемиологического надзора, так как отличаются в большинстве своём высокими показателями специфичности/чувствительности, воспроизводимости и скорости выполнения анализа. Важнейшее достоинство такого диагностического подхода – минимальная степень медицинского вмешательства, поскольку исследование проводится *in vitro*. Решения, основанные на методах амплификации нуклеиновых кислот (МАНК), к которым принадлежит, в частности, ши-

роко распространённая методика полимеразной цепной реакции (ПЦР), предпочтительны и оправданны в случаях, когда определяемый патоген относится к группе трудно- или некультивируемых, а также присутствует в малом количестве.

Основой молекулярной диагностики многих инфекционных заболеваний, в т.ч. новой коронавирусной инфекции, на сегодняшний день служит использование полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР; reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) [3, 4]. Наборы реагентов на основе ПЦР позволяют обнаруживать присутствие нуклеиновой кислоты вируса в образцах, выделенных из мазков со слизистой оболочки носо- и ротоглотки, с очень высокими чувствительностью/специфичностью. В подтверждение этого положения следует заметить, что ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for disease control and prevention, CDC) одобрили применение тестов на базе ОТ-ПЦР в качестве «золотого стандарта» диагностики COVID-19 [2, 5]. Однако, несмотря на достоинства данной методики, объясняющие её значительную популярность и занимаемые ею позиции в лабораторной диагностической аналитике, ПЦР-анализ имеет ряд недостатков и ограничений. К ним можно отнести прежде всего необходимость наличия дорогостоящего оборудования и относительно длительный период амплификации (часто в пределах 1–2 ч) [6, 7], что вместе с необходимой пробоподготовкой занимает достаточно большое количество времени. Это, в свою очередь, является существенной проблемой на фоне высокой загруженности лабораторий.

Полноценной альтернативой ОТ-ПЦР при решении диагностических задач могут выступать технологии, основанные на петлевой изотермической амплификации, совмещённой с обратной транскрипцией (ОТ-ИТ – ИзоТермическая амплификация с Обратной Транскрипцией; RT-LAMP, Reverse Transcription Loop-mediated Amplification) [8–10]. В общем виде изотермическая амплификация в отличие от ПЦР не требует термоденатурации, а следовательно, дорогостоящего специального оборудования, относительно проста

в исполнении, позволяя достаточно быстро получить результат исследования. Для ОТ-ИТ необходимы обратная транскриптаза, термостабильная ДНК-полимераза с вытесняющей активностью (большой фрагмент *Bst*-полимеразы бактерии *Geobacillus stearothermophilus* или *Bsm*-полимеразы *Bacillus smithii*) и не менее 4 праймеров, что обеспечивает значительное повышение специфичности методики. Реакция петлевой изотермической амплификации протекает при постоянной температуре – около 65 °С [11] и, как правило, занимает не более 30 мин, включая этап обратной транскрипции. Кроме того, ранее неоднократно отмечалось, что этап экстракции РНК, общий для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ, в последнем случае можно пропустить, хотя и с некоторой потерей чувствительности, но со значительным преимуществом с точки зрения экономии времени [12–14]. В связи с этим ОТ-ИТ можно рассматривать как инструмент оперативного тестирования в диагностических ситуациях с пределом обнаружения от 2 до 100 копий вирусной РНК в реакции. Данная методика характеризуется вариативностью в зависимости от технологии пробоподготовки, используемых ферментов и мастер-миксов, а также способов детекции результата [15]. Кроме того, использование наборов реагентов на основе ОТ-ИТ послужит оптимальным решением при необходимости увеличить пропускную способность лаборатории без дооснащения дополнительными приборами мощностями.

С учётом большого количества работ, содержащих обсуждение преимуществ и недостатков обоих рассматриваемых МАНК без приведения ссылок на публикации с результатами прямого сравнения, нами сопоставлены методы ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР с использованием 2 наборов реагентов, разработанных в ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора на протяжении 2020–2021 гг. Данное экспериментальное исследование имело целью проведение анализа как преимуществ, так и недостатков обоих подходов. При этом основное внимание уделено оценке скорости выполнения, удобства, простоты использования и взаимосогласованности результатов для каждого метода. В то же время определение точных значений чувствительности/специфичности отдельных наборов не входило в основную задачу работы, поскольку эти параметры указаны в соответствующей документации.

Материал и методы

В исследовании использован биологический материал, полученный при взятии мазков со слизистой оболочки рото- и носоглотки у пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции. Наличие РНК SARS-CoV-2 в образцах подтверждено методом ОТ-ПЦР с применением комплекта реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) для выявления и количественного определения генетического материала возбудителя COVID-19 (РУ № РЗН 2021/14026). Исследование проводилось при информированном согласии пациентов; протокол

исследования одобрен Этическим комитетом ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора (протокол № 111 от 22 декабря 2020 г.) Образцы помещали в транспортную среду (РУ № ФСР 2009/05011). Выделение РНК из клинического материала осуществляли с использованием набора реагентов «РИБО-преп» (ЗАО «ИнтерЛабСервис», Россия) (РУ № ФСР 2008/03147). Суммарно в работу вошла 381 проба, однако преимущественно отбирались те клинические образцы, для которых значение порогового цикла (threshold cycle, Ct) при ОТ-ПЦР-анализе не превышало 20 (245 образцов, 64% от общего количества). Указанное требование обусловлено тем, что эти пробы отбирали в том числе для исследования методом высокопроизводительного секвенирования, или секвенирования нового поколения (next generation sequencing, NGS), с последующим биоинформатическим анализом и загрузкой полученных геномных последовательностей в базу данных VGenus (<https://genome.criie.ru>). Учитывалось также, что в получении качественных прочтений геномов существенную роль играют высокая вирусная нагрузка (ВН) и низкая степень деградации РНК. Получаемые в ходе NGS данные служили для проверки участков отжига праймеров с целью определения влияния имеющихся в них мутаций на результат амплификации. Кроме того, для оценки возможности использования ОТ-ИТ при анализе не только образцов с высокими значениями Ct в ОТ-ПЦР, но и проб со средней и низкой ВН в работу были взяты образцы с показателями Ct ОТ-ПЦР в диапазоне 25–35.

В экспериментах использовали 2 комплекта реагентов: «АмплиСенс COVID-19-FL», предназначенный для работы методом ОТ-ПЦР, и «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT» (АмплиСенс, ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора) (РУ № РЗН 2021/14599), основанный на технологии ОТ-ИТ. Имеющиеся образцы РНК SARS-CoV-2 протестировали при помощи указанных наборов согласно инструкциям производителя на амплификаторе CFX96 Real-Time System (BioRad, США). Анализ полученных данных проводили в программе Bio-Rad CFX Manager v3.1 также в соответствии с инструкциями производителя. На **рис. 1** схематически показаны этапы исследования.

Результаты

Нами протестирован 381 образец РНК вируса SARS-CoV-2 от различных (по полу, возрасту, форме и тяжести течения) пациентов с симптомами COVID-19. Подготовка к эксперименту включала размораживание реагентов, приготовление и разнесение реакционной смеси по пробиркам, внесение в неё образцов РНК и при постановке в полном 96-луночном ПЦР-планшете занимала ≈40 мин как для ОТ-ПЦР, так и для ОТ-ИТ. Непосредственно заданная длительность программ амплификации на приборе CFX96 Real-Time System составляла 93 мин при ОТ-ПЦР и 40 мин – в случае ОТ-ИТ. Наряду с этим период до начала детектирования интенсивности флуоресцентного сигнала, включавший в себя время обратной транскрипции и в случае ОТ-ПЦР – также активации

полимеразы при 95 °С, был равен 40 и 5 мин для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ соответственно. Полученные в результате амплификации значения C_t для ОТ-ПЦР составили в среднем $20,0 \pm 3,7$ с (диапазон 1530 ± 300 с), для ОТ-ИТ – $12,8 \pm 3,7$ с (диапазон 550 ± 160 с); при этом приведённые величины C_t для набора реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» не включают 5 «слепых» циклов. Таким образом, показатели длительности реакций амплификации различаются примерно в 2,7 раза, однако необходимо учитывать, что в экспериментах существенную долю составляли пробы с достаточно низкими значениями C_t , что могло сказаться на результатах.

На рис. 2 показаны значения показателя C_t для разных методик. Следует отметить, что длительности циклов не равны по времени между собой: для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ 1 цикл равен 78 и 43 с соответственно, несмотря на то что согласно инструкциям к наборам реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL» и «АмплиСенс SARS-CoV-2-ИТ» продолжительность 1 цикла без учёта времени детекции флуоресцентного сигнала и изменения температуры термоблока составляет 30 с. Исходя из теоретических предпосылок, в качестве альтернативной гипотезы была предложена линейная зависимость между C_t для ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ. Коэффициент корреляции составил $\approx 0,827$, что соответствует коэффициенту детерминации R^2 , равному 0,684. Таким образом, предлагаемая линей-

ная регрессия удовлетворительно объясняет экспериментальные данные и позволяет обобщить зависимость показателей C_t ОТ-ПЦР от таковых при ОТ-ИТ для сравниваемых наборов.

Как указано выше, в силу того что отобранные пробы проанализированы также методом высокопроизводительного секвенирования, большая часть исследуемых биологических образцов характеризуется сравнительно высокой ВН. С целью оценки области применимости изотермической амплификации для исследования образцов с низкой ВН были использованы в том числе и те пробы, в которых полученные с помощью ОТ-ПЦР значения C_t достигали 35. При уменьшении же ВН результаты ОТ-ИТ менее точно отражают содержание генетического материала патогена в образце ввиду количества и специфичности используемых праймеров, а также стохастичности процесса их отжига и формирования конкатемеров амплифицируемой области. Таким образом, для образцов с низкой ВН более высокие значения C_t при ОТ-ИТ не всегда соответствуют таковым в случае ОТ-ПЦР. В дополнение к этому представляется важным, что 2 пробы со значениями C_t ОТ-ПЦР 31 и 35 были отрицательными при постановке ОТ-ИТ. При этом случаев, когда образец при анализе ОТ-ИТ был положительным, а в ОТ-ПЦР – отрицательным, не зарегистрировано.

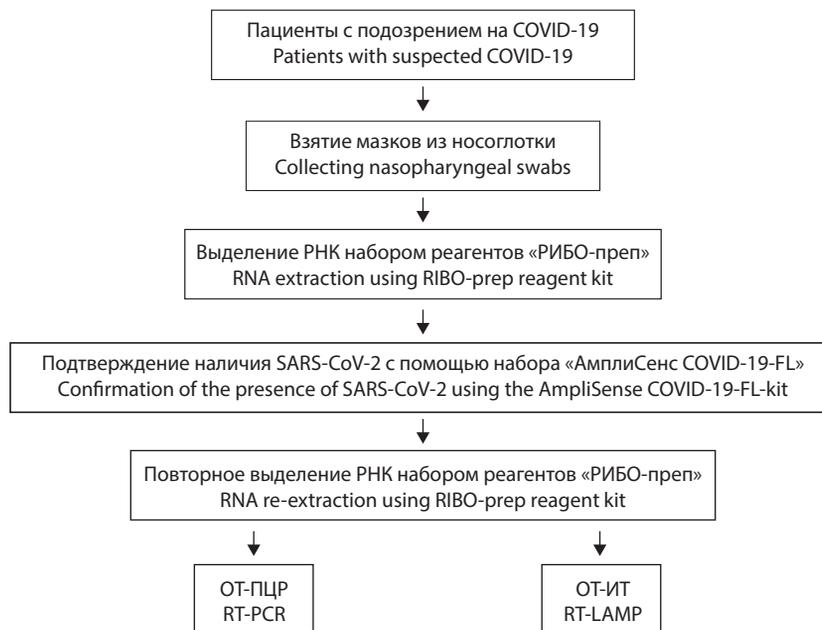


Рис. 1. Общая схема проведения исследования.

Первоначально у пациентов с симптомами новой коронавирусной инфекции забирали мазки из рото- и носоглотки. Наличие или отсутствие в биоматериале SARS-CoV-2 подтверждали методом ОТ-ПЦР с применением набора реагентов «АмплиСенс COVID-19-FL». Положительные нативные образцы со значениями C_t , удовлетворяющими условиям эксперимента, повторно использовали для выделения РНК вируса, проведения обратной транскрипции и амплификации.

Fig. 1. General scheme of the study.

Initially, oropharyngeal and nasopharyngeal swabs were taken from patients with symptoms of the new coronavirus infection. The presence or absence of SARS-CoV-2 in the biological material was confirmed by RT-PCR using the AmpliSens COVID-19-FL reagent kit. Then, positive native samples with C_t values suitable for the experimental conditions were reused to isolate the virus RNA, and reverse transcription and amplification had been performed.

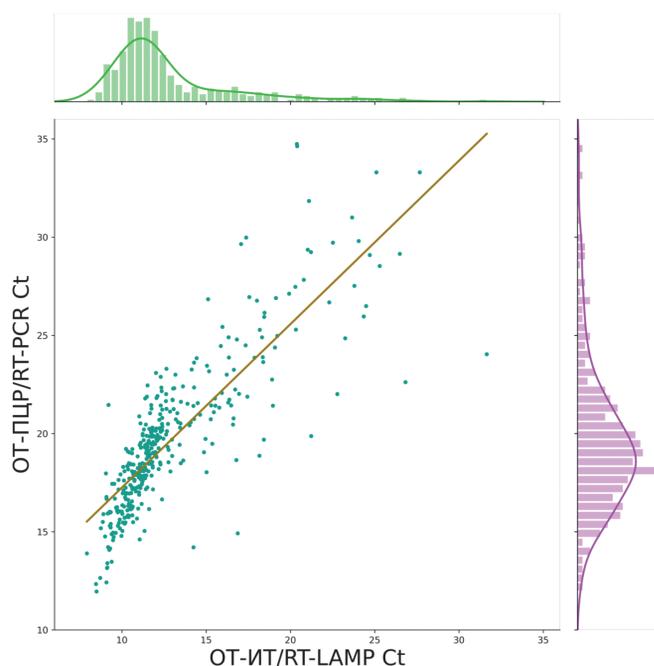


Рис. 2. Диаграмма рассеяния, демонстрирующая значения пороговых циклов Ct для образцов, исследованных методами ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР.

Примечание. Каждый образец проанализирован двумя методами. По оси абсцисс – значения пороговых циклов Ct для ОТ-ИТ; по оси ординат – аналогичные показатели для ОТ-ПЦР. Приведены гистограммы распределения величин Ct для LAMP и ПЦР (выделены зелёным и лиловым цветом соответственно).

Fig. 2. Scatter plot showing Ct values for samples analyzed by RT-LAMP and RT-PCR.

Note. Each sample was analyzed by two methods. The abscissa axis shows the Ct values for RT-LAMP, the ordinate axis shows the same values for RT-PCR. Histograms of Ct values distribution for LAMP and PCR (highlighted in green and purple, respectively) are also shown.

Обсуждение

В данном исследовании мы сравнили 2 ведущих МАНК – ОТ-ПЦР и ОТ-ИТ, используемые для выявления РНК нового коронавируса SARS-CoV-2, на примере 2 наборов реагентов: «АмплиСенс COVID-19-FL» и «АмплиСенс SARS-CoV-2-IT». В то время как ПЦР на протяжении многих лет остаётся наиболее популярным методом молекулярной диагностики, доказавшим свою эффективность и надёжность, изотермическая амплификация лишь недавно стала получать распространение в диагностических лабораториях; ранее упоминания технологий на её основе встречались главным образом в научных публикациях. Однако пандемия COVID-19 показала острую необходимость в более быстрых и эффективных способах детекции нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных заболеваний, что послужило стимулом к внедрению недостаточно распространённых, но перспективных методов амплификации в диагностическую практику.

Мы протестировали 381 образец от пациентов с новой коронавирусной инфекцией. Отмечено значительное преимущество во времени для анализа

с помощью ОТ-ИТ по сравнению с ОТ-ПЦР, что может иметь существенное значение в условиях тестирования большого объёма биологического материала в сжатые сроки.

Главным ограничением настоящего исследования является то, что большая часть образцов получена от пациентов с высокой ВН (низкие значения пороговых циклов Ct). Это связано среди прочего с тем, что данные пробы были дополнительно проанализированы методом NGS-секвенирования [16]. Тем не менее мы ввели в исследование также образцы с более высокими (до 35) значениями Ct ОТ-ПЦР. В целом полученные с помощью ОТ-ИТ и ОТ-ПЦР результаты согласуются друг с другом, но для 2 образцов с Ct 31 и 35 при ОТ-ПЦР вирусная РНК не обнаружена в реакции ОТ-ИТ, что для пациента формально могло бы означать ложноотрицательный результат теста. Данные нашего исследования показывают, что ОТ-ИТ является подходящим инструментом выявления SARS-CoV-2 у пациентов со средней и высокой ВН ($>5 \times 10^4$ копий/мл), однако чувствительность метода может быть недостаточна для пациентов с уровнем ВН $<2 \times 10^3$ копий/мл (низкая и очень низкая ВН).

Одновременно с этим до настоящего времени остаётся дискуссионным вопрос о том, какое значение порогового цикла Ct следует учитывать при положительном результате ОТ-ПЦР как значимое в плане возможности передачи вируса от человека человеку. Хотя в случае длительного течения заболевания показатель ВН может быть выше или ниже в зависимости от момента забора биологического материала, общая тенденция такова, что наибольшую опасность для окружающих представляют лица с высокой ВН. При этом, согласно имеющемуся опыту разных исследователей, шансы на культивирование SARS-CoV-2 уменьшаются в образцах биоматериала, для которых значения Ct при ОТ-ПЦР превышают 25 [17]. Показано, что вероятность успешного культивирования этого вируса снижается до 8% при величине Ct ОТ-ПЦР >35 [18]. Опубликованы данные, подтверждающие, что новый коронавирус потенциально может быть культивирован из 70% образцов с Ct ≤ 25 (ОТ-ПЦР), в то же время для случаев Ct >35 (ОТ-ПЦР) для этого могут быть использованы лишь $<3\%$ образцов [19]. Другие исследовательские группы сообщали, что культивирование данного патогена невозможно в пробах Ct >24 (ОТ-ПЦР) [20]. Указывается также на возможность обнаружения SARS-CoV-2 у пациентов в течение нескольких недель после исчезновения симптомов с помощью ОТ-ПЦР при отсутствии рисков передачи вируса другому человеку [20].

Обобщая сказанное, можно заключить, что тест-системы на базе ОТ-ИТ позволяют детектировать РНК нового коронавируса в биологических образцах от пациентов, способных активно передавать инфекционный агент другим лицам, в редких случаях давая ложноотрицательный результат у выздоровевших (реконвалесцентов), имеющих «остаточную» ВН. Другое ограничение технологий на основе LAMP состоит в том, что они требуют тщательной оптими-

зации ряда параметров реакционной среды и не являются количественными, поскольку амплификация конкатемеров не тождественна удвоению продуктов на каждом цикле амплификации в ПЦР [21]. Однако эти недостатки следует сопоставлять со многими преимуществами и прежде всего – с высокой скоростью аналитического процесса и широким набором способов детекции продуктов амплификации. Молекулярная LAMP-диагностика всё чаще используется в качестве экономичного инструмента выявления новой коронавирусной инфекции и эпидемиологического надзора за этим заболеванием [22, 23]. Помимо этого, тестирование на наличие SARS-CoV-2 непосредственно на месте оказания медицинской помощи (point-of-care testing) на основе ОТ-ИТ в настоящее время разрабатывается для развёртывания в отдалённых районах [23, 24]. Исходя из изложенного, следует констатировать необходимость дальнейшего исследования диагностических систем, в основе которых лежит технология изотермической амплификации, с большими размерами выборки и представленностью образцов с низкой ВН.

Заключение

Полученные нами результаты позволяют сделать вывод о том, что настоящее исследование подтверждает применимость технологий на основе изотермической амплификации в лабораторной диагностике для обнаружения РНК SARS-CoV-2 в клинических образцах. Тест-системы на основе ОТ-ИТ в силу своей простоты и достаточной скорости получения результата могут быть использованы для массового скрининга с целью выявления лиц с относительно высокой ВН, представляющих наибольшую угрозу распространения нового коронавируса, тогда как базирующиеся на ОТ-ПЦР диагностические методы в большей степени пригодны для оценки ВН и её динамики у пациентов с COVID-19, особенно в случаях течения заболевания на фоне сравнительно низкой ВН. В связи с сохраняющейся потребностью в тест-системах для своевременного установления присутствия SARS-CoV-2 LAMP-технологии позволяют расширить возможности молекулярной диагностики, а в совокупности с ПЦР-анализом и тестами на выявление соответствующего антигена делают эпидемиологический надзор за распространением нового коронавируса более гибким и эффективным.

ЛИТЕРАТУРА

- Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Sharfstein J.M., Becker S.J., Mello M.M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA*. 2020; 323(15): 1437–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3864>
- Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(4): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
- Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453–4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>
- Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., et al. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Virolog. Sin.* 2020; 35(3): 344–7. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
- Jiang M., Pan W., Arasthfer A., Fang W., Ling L., Fang H., et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
- 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. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации. *Вопросы вирусологии.* 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
- Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 257–63. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.257-263.2004>
- Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.* 2015; 115(22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
- Bruno A., de Mora D., Freire-Paspuel B., Rodriguez A.S., Paredes-Espinosa M.B., Olmedo M., et al. Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 109: 315–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038>
- Lalli M.A., Langmade J.S., Chen X., Fronick C.C., Sawyer C.S., Bureca L.C., et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* 2021; 67(2): 415–24. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
- Anastasiou O.E., Holtkamp C., Schäfer M., Schön F., Eis-Hübinger A.M., Krumbholz A. Fast Detection of SARS-CoV-2 RNA Directly from Respiratory Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test. *Viruses.* 2021; 13. <https://doi.org/10.3390/v13050801>
- Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports.* 2020; 2: 100017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>
- Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy Virusologii.* 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
- Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe.* 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
- Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
- La Scola B., Le Bideau M., Andreani J., Hoang V.T., Grimaldier C., Colson P., et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(6): 1059–61. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
- Bullard J., Dust K., Funk D., Strong J.E., Alexander D., Garnett L., et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10): 2663–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>

21. Mora-Cárdenas E., Marcello A. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(24): 500. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.10.19>
22. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*. 2020; 9(8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
23. Rabe B.A., Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(39): 24450–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>
24. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975–7. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>

REFERENCES

1. Wu Z., McGoogan J.M. Characteristics of and important lessons from the coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak in China: summary of a report of 72 314 cases from the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*. 2020; 323(13): 1239–42. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
2. Sharfstein J.M., Becker S.J., Mello M.M. Diagnostic Testing for the Novel Coronavirus. *JAMA*. 2020; 323(15): 1437–8. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.3864>
3. Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., et al. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, Rift Valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(4): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>
4. Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>
5. Tahamtan A., Ardebili A. Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20(5): 453–4. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1757437>
6. Lu R., Wu X., Wan Z., Li Y., Zuo L., Qin J., et al. Development of a novel reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of SARS-CoV-2. *Virology*. 2020; 553(3): 344–7. <https://doi.org/10.1007/s12250-020-00218-1>
7. Jiang M., Pan W., Arasther A., Fang W., Ling L., Fang H., et al. Development and validation of a rapid, single-step reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) system potentially to be used for reliable and high-throughput screening of COVID-19. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2020; 10: 331. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00331>
8. 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. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
9. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification [Ekspress-diagnostika novoy koronavirusnoy infektsii s pomoshch'yu reaktivnoy petlevoy izotermicheskoy amplifikatsii]. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
10. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42(1): 257–63. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.257-263.2004>
11. Zhao Y., Chen F., Li Q., Wang L., Fan C. Isothermal amplification of nucleic acids. *Chem. Rev.* 2015; 115(22): 12491–545. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00428>
12. Bruno A., de Mora D., Freire-Paspuel B., Rodriguez A.S., Paredes-Espinosa M.B., Olmedo M., et al. Analytical and clinical evaluation of a heat shock SARS-CoV-2 detection method without RNA extraction for N and E genes RT-qPCR. *Int. J. Infect. Dis.* 2021; 109: 315–20. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.06.038>
13. Lalli M.A., Langmade J.S., Chen X., Fronick C.C., Sawyer C.S., Burcea L.C., et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin. Chem.* 2021; 67(2): 415–24. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa267>
14. Anastasiou O.E., Holtkamp C., Schäfer M., Schön F., Eis-Hübinger A.M., Krumbholz A. Fast Detection of SARS-CoV-2 RNA Directly from Respiratory Samples Using a Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Test. *Viruses*. 2021; 13. <https://doi.org/10.3390/v13050801>
15. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sensors and Actuators Reports*. 2020; 2: 100017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.snrs.2020.100017>
16. Borisova N.I., Kotov I.A., Kolesnikov A.A., Kaptelova V.V., Speranskaya A.S., Kondrasheva L.Yu., et al. Monitoring the spread of the SARS-CoV-2 (*Coronaviridae: Coronavirinae: Betacoronavirus; Sarbecovirus*) variants in the Moscow region using targeted high-throughput sequencing. *Voprosy virusologii*. 2021; 66(4): 269–78. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-72>
17. Cevik M., Tate M., Lloyd O., Maraolo A.E., Schafers J., Ho A. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Microbe*. 2021; 2(1): e13–22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5)
18. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020; 395(10229): 1054–62. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(20)30566-3)
19. La Scola B., Le Bideau M., Andreani J., Hoang V.T., Grimaldier C., Colson P., et al. Viral RNA load as determined by cell culture as a management tool for discharge of SARS-CoV-2 patients from infectious disease wards. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2020; 39(6): 1059–61. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03913-9>
20. Bullard J., Dust K., Funk D., Strong J.E., Alexander D., Garnett L., et al. Predicting infectious severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from diagnostic samples. *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(10): 2663–6. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa638>
21. Mora-Cárdenas E., Marcello A. Switch-on the LAMP to spot Zika. *Ann. Transl. Med.* 2017; 5(24): 500. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.10.19>
22. Augustine R., Hasan A., Das S., Ahmed R., Mori Y., Notomi T., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, sensitive, specific, and cost-effective point-of-care test for coronaviruses in the context of COVID-19 pandemic. *Biology (Basel)*. 2020; 9(8): 182. <https://doi.org/10.3390/biology9080182>
23. Rabe B.A., Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020; 117(39): 24450–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011221117>
24. Yu L., Wu S., Hao X., Dong X., Mao L., Pelechano V., et al. Rapid detection of COVID-19 coronavirus using a reverse transcriptional loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) diagnostic platform. *Clin. Chem.* 2020; 66(7): 975–7. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaa102>