

ДЕТЕКЦИЯ *SALMONELLA ENTERICA* ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМАЛЬНОЙ АМПЛИФИКАЦИЕЙ ДНК С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛУОРЕСЦЕНТНО МЕЧЕНОГО ПЕТЛЕВОГО ПРАЙМЕРА

Д. В. Шамовская¹, М. А. Гордукова², М. А. Смертина¹, Е. В. Галеева², И. П. Оскорбин¹, Е. А. Храпов¹, У. А. Боярских¹, М. Л. Филипенко^{1,3}✉

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Детская городская клиническая больница № 9 им. Г. Н. Сперанского, Москва, Россия

³ Институт трансляционной медицины и биотехнологий, Сеченовский университет, Москва, Россия

Сальмонеллез остается одной из ведущих причин бактериальных кишечных инфекций человека и животных. Молекулярная диагностика радикально трансформировала диагностический ландшафт сальмонеллезной инфекции, однако остается времени- и ресурсозатратной. Изотермическая амплификация ДНК, например, петлевая изотермальная амплификация (LAMP), выполняемая при постоянной температуре, является основой разработки быстрых диагностических тестов, которые могут быть адаптированы к формату point-of-care (PoC) и выполнены в условиях ограниченных ресурсов и вдали от централизованных лабораторий. Целью исследования было разработать и валидировать новый метод детекции *Salmonella enterica* в образцах кала человека методом LAMP, в котором мониторинг результатов амплификации достигается с помощью петлевого флуоресцентно меченого праймера, несущего также внутренний гаситель флуоресценции. Предложенный метод имеет предел обнаружения (LoD 95%) 250 копий на реакцию, чувствительность 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%) и специфичность — 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) относительно qPCR, а также показал большую устойчивость к ингибиторам амплификации ДНК в образцах фекалий. Введение разных флуоресцентных меток в петлевые праймеры для FLP-LAMP с разными мишенями потенциально обеспечивает возможность мультиплексирования и одновременного выявления нескольких патогенов, что увеличивает диагностические возможности изотермальной амплификации.

Ключевые слова: *Salmonella enterica*, LAMP, петлевой флуоресцентный праймер, флуоресцентный зонд, аналитическая валидация, ингибиторы ДНК

Финансирование: исследование поддержано в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 125012300671-8.

Вклад авторов: Д. В. Шамовская, М. А. Смертина, Е. А. Храпов — оптимизация и валидация LAMP на клинических образцах; М. А. Гордукова, Е. В. Галеева — сбор клинических образцов и данных пациентов; И. П. Оскорбин — планирование экспериментов LAMP; У. А. Боярских — дизайн праймеров LAMP; М. Л. Филипенко — идея исследования, написание и редактирование статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом ИХБФМ СО РАН (протокол № 4 от 25 мая 2022 г.), этическим комитетом при ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского ДЗМ» (протокол № 44 от 19 апреля 2022 г.). Пациенты подписали добровольное информированное согласие.

✉ Для корреспонденции: Максим Леонидович Филипенко
ул. Проспект Лаврентьева, д. 8, г. Новосибирск, 630090, Россия; mlfilipenko@gmail.com

Статья получена: 23.11.2025 **Статья принята к печати:** 13.12.2025 **Опубликована онлайн:** 22.12.2025

DOI: 10.24075/vrgmu.2025.066

Авторские права: © 2025 принадлежат авторам. **Лицензиат:** РНИМУ им. Н. И. Пирогова. Статья размещена в открытом доступе и распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

DETECTION OF *SALMONELLA ENTERICA* BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION OF DNA USING A FLUORESCENTLY LABELED LOOP PRIMER

Shamovskaya DV¹, Gordukova MA², Smertina MA¹, Galeeva EV², Oskorbin IP¹, Khrapov EA¹, Boyarskikh UA¹, Filipenko ML^{1,3}✉

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Speransky City Children's Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russia

³ Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov University, Moscow, Russia

Salmonellosis remains one of the leading causes of bacterial gastrointestinal infections in humans and animals. Molecular diagnostics has dramatically reshaped the diagnostic landscape for *Salmonella* infection; however, it remains time- and resource-intensive. Isothermal DNA amplification, for example loop isothermal amplification (LAMP), performed at a constant temperature, is the basis for the development of rapid diagnostic tests that can be adapted to the point-of-care (PoC) formats and implemented in resource-limited settings or remote from centralized laboratories. The aim of this study was to develop and validate a novel LAMP-based method for detecting *Salmonella enterica* in human stool samples, wherein amplification results are monitored using a loop primer labeled with a fluorophore and an internal quencher. The proposed method achieves a limit of detection (LoD₉₅) of 250 copies per reaction, with a sensitivity of 86.84% (95% CI: 71.91–95.59%) and specificity of 96.49% (95% CI: 87.89–99.57%) relative to qPCR, and demonstrates increased robustness against DNA amplification inhibitors present in fecal samples. Incorporation of distinct fluorophores into loop primers for FLP-LAMP targeting different genes could potentially enable multiplexing and simultaneous detection of multiple pathogens, thereby expanding the diagnostic utility of isothermal amplification.

Keywords: *Salmonella enterica*, LAMP, fluorescent loop primer, fluorescent probe, analytical validation, DNA amplification inhibitors

Funding: This work was supported by the Russian state-funded project for the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences (Grant No. 125012300671-8).

Author contribution: Shamovskaya DV, Smertina MA, Khrapov EA — LAMP assay optimization and validation on clinical samples; Gordukova MA, Galeeva EV — collection of clinical specimens and patient data; Oskorbin IP — experimental design for LAMP assays; Boyarskikh UA — LAMP primer design; Filipenko ML — conceptualization, writing, and editing of the manuscript.

Compliance with ethical standards: The study was approved by the Ethics Committees of the Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS (Protocol No. 4, May 25, 2022) and the City Clinical Hospital for Children No. 9 named after G. N. Speransky, Moscow Healthcare Department (Protocol No. 44, April 19, 2022). All patients provided written informed consent.

✉ Correspondence should be addressed: Mikhail L. Filipenko
Prospekt Lavrenteva, 8, Novosibirsk, 630090, Russia; mlfilipenko@gmail.com

Received: 23.11.2025 **Accepted:** 13.12.2025 **Published online:** 22.12.2025

DOI: 10.24075/brsmu.2025.066

Copyright: © 2025 by the authors. **Licensee:** Pirogov University. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Сальмонеллез — одна из наиболее распространенных антропозоонозных инфекций, вызываемых грамотрицательными бактериями рода *Salmonella*, преимущественно подвидом *enterica* [1]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), ежегодно регистрируется 93–200 млн случаев сальмонеллеза, провоцирующего острый гастроэнтерит, около 155 000 случаев заканчиваются летальным исходом по всему миру [2]. Таким образом, сальмонеллез является серьезной проблемой общественного здравоохранения в развитых и развивающихся странах.

Диагностика сальмонеллеза подразумевает анализ эпидемиологических и эпизоотологических данных, клинических признаков и патоморфологических изменений, на основании которых можно поставить предварительный диагноз. Окончательно диагноз ставят на основании лабораторных диагностических методов. Прижизненная диагностика сальмонеллеза предполагает использование серологических, молекулярно-генетических и микробиологических методов.

На сегодняшний день в клинической практике для выявления сальмонеллеза «золотым стандартом» является микробиологический способ, а именно бактериологический посев отобранного у пациента материала на селективные питательные среды (например, среду Раппапорта–Василиадиса) [3]. Основные недостатки метода — длительность анализа (48–96 ч), ограничивающая своевременное назначение специфической терапии, а также низкая чувствительность метода при применении антибиотиков пациентом до сбора образца. Микробиологические исследования требуют специализированного помещения, оборудования, высококвалифицированного персонала, обладают низкой производительностью, не позволяя проводить массовый скрининг и эпидемиологический мониторинг.

К экспресс-методам диагностики можно отнести использование аллель-специфичной риал-тайм ПЦР, ИФА (иммуноферментный анализ). Метод количественной АС-ПЦР позволяет существенно сократить время диагностики (до 2–4 ч) и повысить аналитическую чувствительность до 1–10 колониеобразующих единиц на миллилитр (КОЕ/мл) [4]. Мишени для АС-ПЦР — гены *invA*, *ttr*, *bcfD* и другие консервативные последовательности, специфичные для *Salmonella* [5]. Однако применение метода ограничено во многих регионах из-за дорогостоящего оборудования (термоциклер реального времени), недостаточной квалификации персонала в КДЛ и довольно высокой стоимости анализа.

Решением для PoC-диагностики (point-of-care diagnostics) стали методы изотермальной амплификации, в частности LAMP (loop-mediated isothermal amplification), разработанная Notomi et al. Диагностика методом LAMP позволяет проводить амплификацию ДНК при постоянной температуре 60–65 °C без необходимости циклического изменения температуры, что свойственно PCR. Для анализа используют термостабильную ДНК-полимеразу (например, большой фрагмент ДНК-полимеразы I из *Geobacillus stearothermophilus*) и высокоспецифичный набор из четырех (реже шести) праймеров, распознающих шесть (или восемь) различных участков целевой ДНК. Это обеспечивает исключительно высокую специфичность амплификации целевого участка ДНК [6]. LAMP обладает рядом преимуществ перед PCR/qPCR: высокую специфичность благодаря использованию шести специфичных последовательностей вместо двух; быстроту

(20–30 мин); высокую устойчивость к ингибиторам амплификации, содержащимся в клинических образцах; отсутствие необходимости в дорогостоящем оборудовании [7]. Различные модификации LAMP активно применяют в разработке «бесприборных» тестов или интегрируют в портативные устройства формата point-of-care для использования в полевых условиях [8].

Для визуализации и мониторинга результатов LAMP предложены различные методы [9]: турбидиметрия, основанная на регистрации помутнения реакционной смеси при образовании магний-пирофосфатного осадка; колориметрические тесты, использующие изменение цвета красителей (pH-зависимые, pH-индикаторы) при изменении концентрации пирофосфата и pH реакционной среды; интеркалирующие флуоресцентные красители (SYTO, SYBR Green I и др.), которые встраиваются в двухцепочечную ДНК и генерируют флуоресцентный сигнал; различные модификации олигонуклеотидов и их комплексов, несущих флуоресцентные метки (праймеры-зонды, молекулярные маячки, гибридизационные зонды).

Последний подход, а именно использование модифицированных флуоресцентно меченых олигонуклеотидов, представляет наибольший интерес, так как имеет потенциал для мультиплексирования и одновременного выявления нескольких мишеней или контрольных локусов в одной реакции благодаря применению нескольких флуоресцентных зондов с разными типами красителей (FAM, HEX, ROX, Cy5) [8]. Несмотря на это, использование петлевых флуоресцентно меченых праймеров с внутренним гасителем в LAMP остается малоизученным направлением.

Целью настоящей работы было разработать и валидировать новый метод генерации флуоресцентного сигнала при проведении LAMP с использованием петлевого флуоресцентно меченого праймера, несущего также внутренний гаситель флуоресценции (quencher), на модели диагностической амплификации фрагмента гена *bcfD* *Salmonella enterica*. Предполагалось, что применение петлевых праймеров-зондов обеспечит надежный мониторинг амплификации в реальном времени, сопоставимый с методом интеркалирующих красителей, при этом открывая возможности для будущего мультиплексирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Подготовка контрольного материала

Фрагмент гена *bcfD* размером 211 нуклеотидов (NC_003197, *Salmonella enterica* subsp. *Enterica*) амплифицировали на геномной ДНК *Salmonella* с использованием праймеров *bcfD*-F3 и *bcfD*-B3 и клонировали в вектор с помощью набора Quick-TA («Евроген», Россия) согласно инструкции производителя. Структуру плазмидных клонов подтверждали секвенированием по Сэнгеру с использованием набора BigDye Terminator 3.1 (Applied Biosystems, США) на генетическом анализаторе ABI 3730 (Applied Biosystems, США) в лаборатории молекулярной диагностики ИХБФМ СО РАН.

Контрольную плазмиду (pBCFD) линеаризовали рестриктазой BamHI и измеряли концентрацию с помощью набора Spectra Q BR («Сесана», Россия). Линеаризованную плазмиду разводили серийно в диапазоне 10^0 – 10^6 копий в буфере, содержащем 10 mM Tris-HCl (pH 8,0), РНК дрожжей 2,5 мкг/мл и 0,01% NaN₃. Количество копий в разведениях определяли методом цифровой ПЦР (ddPCR) на системе

Таблица 1. Структуры олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно меченых зондов

| Название | Последовательность |
|----------|---|
| bcdD-FIP | GCACTTTACCGGTACGCTGAATACAGCGGCAATTTCAACCA |
| bcdD-BIP | CGGTCTGGATTTCGACAGGTCAAAGCGATAGCCTGGGGAAC |
| bcdD-F3 | CCGACAAACGATTCTGGTA |
| bcdD-B3 | CCGACATCGGCATTATCCG |
| bcdD-LF | TACCCCTCCGGCTTTTG |
| bcdD-LB | ACAATGCGTCTTATCGTACG |
| SLF-RB1H | HEX-TTTTTTACCCCT(T-BHQ1)CCGGCTTTTG |
| SLB-LB1F | FAM-AAAAACAATGCGTC(T-BHQ1)TATCGTACG |
| SLB-LB2F | FAM-ACAATGCGTCT(T-BHQ1)ATCGTACG |
| Slm1 | GGCAATTTCAACCATGCAGGC |
| Slm2 | CCAGACCGCTGCACCTTACCG |
| Slm-PF | FAM-AGCCGGAGGGGTACGAGCG-BHQ1 |

QX200™ Droplet Digital™ PCR (Bio-Rad, Hercules, CA, США) согласно инструкции производителя с праймерами Slm1 и Slm2 (600 нМ) и флуоресцентно меченым зондом Slm-PF (200 нМ).

LAMP

Стандартные LAMP-реакции объемом 20 мкл содержали: 1× буфер для полимеразы Gss-Sto (40 mM Tris-HCl pH 8,9; 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 10 mM KCl; 8 mM MgSO_4 ; 2,5% DMSO; 0,1% Triton X-100), 1,5 mM каждого dNTP, 0,4 мкМ внешних праймеров (F3/B3), 0,3 мкМ петлевых праймеров (LF/LB), 1,6 мкМ внутренних праймеров (FIP/BIP), матрицу ДНК и три единицы полимеразы Gss-Sto (ИХБФМ СО РАН). Для мониторинга флуоресценции использовали либо флуоресцентно меченые петлевые праймеры (SLB-LB1F, SLB-LB2F, SLF-LB1H), либо интеркалирующий краситель SYTO-13 в концентрации 0,5 мкМ. LAMP-реакции проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, Hercules, CA, США) по следующей программе: 120 циклов амплификации при 60 °C с регистрацией флуоресценции в канале HEX/FAM каждые 15-30 с. Для контроля специфичности применяли электрофорез в 1,8%-м агарозном геле для проверки характерного рисунка LAMP-ампликонов или их отсутствия в отрицательном контроле (данные не приведены). Результаты амплификации оценивали по параметру Tt (time-to-threshold) — времени до пересечения кривой флуоресценции с пороговой линией, установленной на уровне среднего значения + три стандартных отклонения от отрицательного контроля.

ПЦР в режиме реального времени (qPCR)

ПЦР-реакции объемом 20 мкл содержали: 1× ПЦР-буфер (64 mM Tris-HCl pH 8,9; 16 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0,05% Tween-20; 3 mM MgCl_2 ; 0,002% NaN_3), 0,6 мкМ праймеров (прямой и обратный) и 0,15 мкМ флуоресцентно меченого зонда (табл. 1), 2 единицы Taq-полимеразы (СибЭнзим, Россия) и матрицу ДНК. Программа включала: активацию Taq-полимеразы при 96 °C в течение 15 мин; далее 45 циклов: денатурация при 95 °C (10 с); отжиг и удлинение при 60 °C (40 с) с регистрацией флуоресценции в каналах FAM и Cy5. Результаты обрабатывали в программе CFX Manager (Bio-Rad).

Оценка предела обнаружения (LoD), клинической чувствительности и специфичности

Предел обнаружения (LoD 95%) оценивали путем варьирования концентрации контрольной плазмиды: 65, 125, 250, 500 и 1000 копий на реакцию, с 20 техническими повторами для каждой концентрации. LoD95% определяли как концентрацию ДНК, при которой позитивная реакция (Tt отрицательного контроля — Tt образца > 10 мин) наблюдалась в ≥ 95% технических реплик.

Клиническую чувствительность и специфичность теста оценивали на 95 образцах ДНК из кала детей, собранных в ДГКБ № 9 им. Г. Н. Сперанского. В качестве «золотого» стандарта использовали qPCR, направленную на ген *bcdD*. Образцы считали положительными по qPCR, если значение Cq (cycle quantification) было менее 34, что соответствовало установленному для этой системы LoD 95% ≤ 12,5 копий на реакцию.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дизайн и оптимизация петлевого флуоресцентно меченого праймера

Разработка метода визуализации результатов LAMP с использованием флуоресцентно меченых петлевых праймеров была основана на ранее опубликованной и хорошо охарактеризованной системе олигонуклеотидных праймеров для LAMP, специфичных к фрагменту гена *bcdD*. Мы применили концепцию, проверенную в Taq-man-зондах, которые генерируют флуоресцентный сигнал не за счет ферментативного гидролиза, а за счет гибридизации [10]. В свободном состоянии Taq-man зонд образует трехмерную структуру, сближающую флуорофор и гаситель флуоресценции (quencher), что приводит к гашению флуоресцентного сигнала (FRET-эффект). При гибридизации зонда с комплементарной последовательностью мишени зонд становится линейным, расстояние между флуорофором и гасителем увеличивается, что приводит к восстановлению флуоресценции.

На основе этого принципа мы синтезировали серию петлевых флуоресцентно меченых праймеров-зондов для LAMP (табл. 1). Каждый олигонуклеотид содержал: 1) флуорофор (FAM или HEX) на 5'-конце; 2) свободный

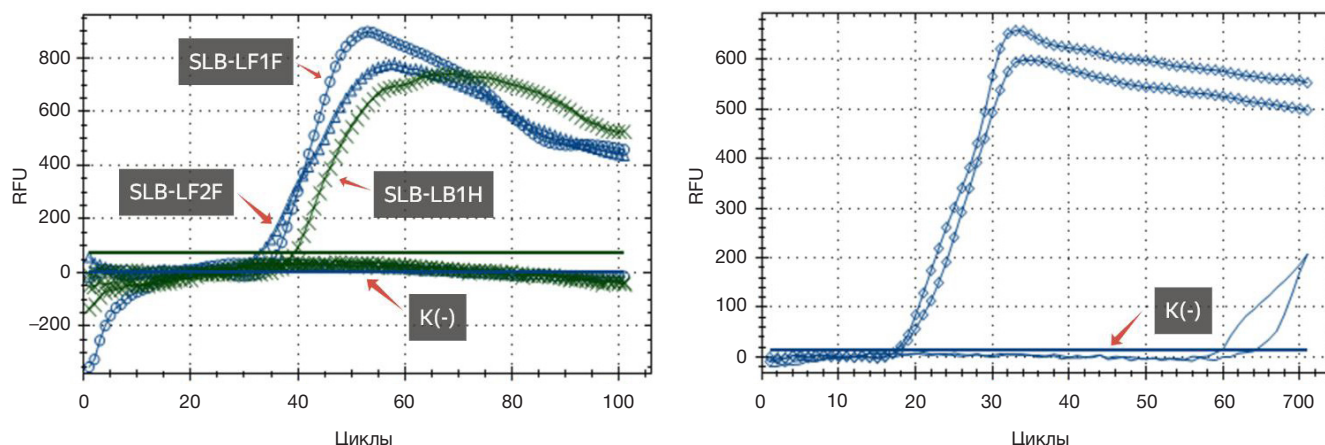


Рис. 1. Кривые накопления продуктов LAMP. Слева: визуализация с помощью флуоресцентных петлевых праймеров-зондов. Справа: визуализация с помощью интеркалирующего красителя SYTO-13

для элонгации 3'-конец; 3) внутренний гаситель BHQ1, введенный через остаток тимина (T-BHQ1), расположенный вблизи 3'-конца.

Дизайн проводили на основе структур «классических» петлевых праймеров bcfD-LF и bcfD-LB. Для трех олигонуклеотидов варьировали расстояние между флуорофором и гасителем: на 5'-конец олигонуклеотида SLB-LB1F добавили 5 остатков дезоксиаденозина (5 dA), а на 5'-конец SLF-LB1H — 5 остатков дезокситимидина (5 dT) для увеличения дистанции FRET-пары. Третий вариант (SLB-LB2F) содержал флуорофор, помещенный непосредственно на нативный 5'-конец олигонуклеотида без удлинения.

Сравнение различных петлевых флуоресцентных праймеров-зондов

При замене классического петлевого праймера (LF или LB) на флуоресцентно меченый петлевой праймер-зонд (в концентрации 0,3 мкМ) в LAMP-реакции с матрицей pBCFD (3000 копий на реакцию) генерировалась четкая кривая нарастания флуоресценции, зависящая от типа синтезированного олигонуклеотида (рис. 1). Все три варианта петлевых праймеров-зондов демонстрировали способность к генерации флуоресцентного сигнала при встраивании в растущий ампликон.

Значения амплитуды разгорания флуоресцентного сигнала были схожими при использовании различных флуоресцентно меченых петлевых праймеров-зондов, однако олигонуклеотид с удлиненной дистанцией между флуорофором и гасителем (SLB-LB1F) демонстрировал большую амплитуду сигнала (~35–40% от базовой флуоресценции), хотя разница кажется незначительной. Как и ожидалось, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 значение Tt (время до пересечения порога) было существенно меньше (~9–10 мин) по сравнению с петлевыми флуоресцентно мечеными праймерами-зондами (~16–19 мин), что объясняется большим количеством молекул красителя, связывающихся с ампликоном.

Увеличение концентрации петлевого флуоресцентно меченого праймера-зонда SLF-LB1H с 0,3 до 0,6 мкМ не влияло существенно на параметр Tt, но существенно улучшало амплитуду разгорания флуоресцентного сигнала с ~10–15% до 15–35% от базовой флуоресценции смеси до амплификации (рис. 2). Дальнейшее увеличение концентрации не приводило к заметному увеличению

амплитуды, поэтому оптимальной концентрацией была принята 0,6 мкМ для всех последующих экспериментов. Далее для экспериментов использовали петлевой праймер-зонд SLF-LB1H в концентрации 150 нМ.

Определение предела обнаружения

Предел обнаружения (LoD95%) является ключевым аналитическим параметром, определяющим минимальное количество целевой ДНК, которое можно надежно выявить с использованием диагностического теста. Мы оценили LoD для обеих систем визуализации, титруя ДНК-матрицу в диапазоне 65, 125, 250, 500 и 1000 копий на реакцию. Для каждой концентрации проводили 20 технических повторов.

Для системы bcfD-LAMP-SLF-LB1H LoD 95% составил 250 копий/реакция (19 из 20 повторов позитивны, Tt = 20,67 ± 2,60 мин). Для сравнения, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 LoD был несколько ниже: 125 копий/реакция (20 из 20 повторов, Tt = 17,78 ± 2,07 мин), что соответствует примерно двукратному различию в чувствительности между двумя методами визуализации.

Критическим параметром проведения диагностического LAMP является его продолжительность, так как время амплификации строго ограничено риском образования побочных продуктов в отрицательных контролях (NTC, no template control). Слишком длительная инкубация повышает риск ложноположительных результатов и, как следствие, неправильной клинической интерпретации. Учитывая, что нарастание флуоресценции в отрицательных контролях не

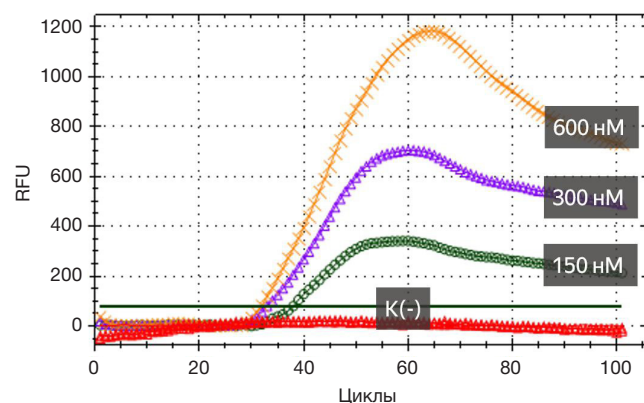


Рис. 2. Влияние концентрации петлевого праймера-зонда SLF-LB1H на амплитуду разгорания флуоресцентного сигнала

Таблица 2. Результаты анализа 95 образцов ДНК из кала детей на наличие *Salmonella*

| | qPCR (+) | qPCR (-) | N |
|-------------------|----------|----------|----|
| LAMP-SLF-LB1H (+) | 33 | 2 | 35 |
| LAMP-SLF-LB1H (-) | 5 | 55 | 60 |
| N | 38 | 57 | |
| | qPCR (+) | qPCR (-) | N |
| LAMP-SYTO13 (+) | 36 | 2 | 38 |
| LAMP-SYTO13 (-) | 2 | 55 | 57 |
| N | 38 | 57 | |

наблюдалось до 60 мин и более, а наибольшее значение T_t для позитивных образцов при концентрации матрицы, равной $LoD_{95\%}$, не превышало 25 мин для bcfD-LAMP-SLF-LB1H, продолжительность проведения диагностического LAMP была установлена в 30 мин.

Тестирование на клинических образцах

Для определения клинической чувствительности и специфичности метода bcfD-LAMP-SLF-LB1H анализировали 95 образцов ДНК из кала детей. В качестве золотого стандарта использовали qPCR, также направленную на ген bcfD с установленным ранее $LoD_{95\%} \leq 12,5$ копий/реакция ($C_q \sim 34$). Образцы считали положительными по qPCR, если C_q был менее 34.

Клиническая чувствительность LAMP-SLF-LB1H составила 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%), а специфичность 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%). Для сравнения, при использовании интеркалирующего красителя SYTO-13 чувствительность была выше (94,74%), но специфичность существенно не отличалась. Коэффициент каппа Коэна, статистический показатель согласованности между двумя классификационными системами, составил 0,844 (95% ДИ: 0,734–0,955) для LAMP-SLF-LB1H в сравнении с qPCR, что соответствует «хорошей» согласованности. Для LAMP-SYTO13 коэффициент каппа был выше: 0,912 (95% ДИ: 0,828–0,996), что указывает на «хорошую» согласованность.

Анализ дискордантных результатов и устойчивость к ингибиторам

Основной причиной несовпадения результатов между LAMP-SLF-LB1H и qPCR явилось различие в их LoD : у метода с петлевыми флуоресцентно мечеными праймерами он выше (т. е. чувствительность ниже), чем у qPCR. Анализ дискордантных образцов (положительные по qPCR, отрицательные по LAMP) показал, что их C_q находился в диапазоне 31–33, близком к пороговому значению 34. Возможно, что эти образцы содержали погранично низкие количества целевой ДНК.

Для изучения причин дискордантности два образца, позитивных по LAMP-SLF-LB1H, но негативных по первичному анализу qPCR, повторно анализировали на

qPCR после пятикратного разбавления образцов ДНК. Разбавление применяют для снижения концентрации ингибиторов амплификации, которые могут присутствовать в образцах кала. После разбавления оба образца давали позитивный результат с пограничными значениями C_q (32–33), что дополнительно свидетельствует о большей устойчивости LAMP-SLF-LB1H к ингибиторам амплификации ДНК, содержащимся в фекальных образцах. Этот результат согласуется с известным свойством LAMP проявлять повышенную устойчивость к различным ингибиторам, включая гемоглобин, билирубин, гемоцидин и другие компоненты кала.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Интерес к методам изотермической амплификации, таким как LAMP, неуклонно растет в связи с их потенциалом для децентрализованной диагностики. К настоящему времени предложено несколько подходов генерации флуоресцентного сигнала в LAMP с использованием различных модифицированных олигонуклеотидов [11]. К ним относятся: молекулярные маячки (molecular beacons), гибридизирующиеся с ампликоном и изменяющие конформацию; гибридизирующиеся зонды (TaqMan-like probes), функционирующие на основе гибридизации без расщепления; интеркалирующие красители (SYBR Green, SYTO), выстраивающиеся в двухцепочечную ДНК; флуоресцентные нуклеотиды (FL-dNTPs), встраиваемые непосредственно в ампликон при синтезе.

В нашем исследовании мы разработали и оценили LAMP-тест с флуоресцентной детекцией сигнала, использующий петлевые флуоресцентно меченые праймеры-зонды, которые непосредственно встраиваются в растущий ампликон. Принципиальное преимущество этого подхода состоит в том, что каждая молекула встроенного в ампликон праймера-зонда генерирует флуоресцентный сигнал, пропорциональный количеству образовавшегося продукта. При встраивании петлевого флуоресцентно меченого праймера в конкатемеры ампликона олигонуклеотид становится линейным, значительно увеличивается расстояние между флуорофором (5'-конец) и гасителем (T-BHQ1), что приводит к восстановлению флуоресценции. Увеличение расстояния между флуорофором и гасителем путем добавления

Таблица 3. Диагностические показатели LAMP-методов в сравнении с qPCR

| Показатель | LAMP-SLF-LB1H | LAMP-SYTO13 |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Чувствительность | 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%) | 94,74% (95% ДИ: 82,25–99,36%) |
| Специфичность | 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) | 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) |
| Коэффициент каппа Коэна | 0,844 (95% ДИ: 0,734–0,955) | 0,912 (95% ДИ: 0,828–0,996) |
| Позитивное предсказательное значение | 94,29% | 94,74% |
| Отрицательное предсказательное значение | 91,67% | 96,49% |

дополнительных нуклеотидов (5 dA или 5 dT) обеспечивает повышение амплитуды флуоресцентного сигнала, хотя эффект был умеренным.

Наиболее близким аналогом нашей системы является FLOS-LAMP (fluorescence of loop primer upon self-dequenching) [12, 13]. В данном подходе флуоресцентный краситель вводится внутрь 3'-области петлевого праймера в определенном нуклеотидном контексте, что вызывает его гашение в несвязанном состоянии, а при включении в двойную спираль ампликона увеличение флуоресценции. Надо отметить, что наш вариант дизайна праймера значительно проще.

На контрольных образцах с известной концентрацией ДНК LAMP-SLF-LB1H продемонстрировал LoD95% 250 копий/реакция, что в два раза выше, чем у LAMP-SYTO13 (125 копий/реакция). Это различие ожидаемо, так как с ампликоном связывается гораздо больше молекул интеркалирующего красителя и генерирует больший флуоресцентный сигнал. Тем не менее, LoD95% 250 копий/реакция для LAMP-SLF-LB1H остается приемлемым для клинической диагностики, так как типичные нагрузки *Salmonella* в образцах кала пациентов с острым гастроэнтеритом значительно превышают эту величину [14]. Более того, дальнейшая более тщательная оптимизация условий амплификации может обеспечить увеличение чувствительности и сокращения времени теста. На панели из 95 клинических образцов ДНК из кала LAMP-SLF-LB1H достигал чувствительности 86,84% и специфичности 96,49% при сравнении с qPCR как золотым стандартом. Дискордантные результаты ($n = 5$ образцов, позитивных по qPCR, но негативных по LAMP-SLF-LB1H) содержали ДНК с Cq 31–33, граничащими с порогом позитивности (Cq = 34), что объясняет различие в результатах и отражает просто разницу в чувствительности двух методов. Интересно, что два образца, которые были позитивны по LAMP-SLF-LB1H, но первично негативны по qPCR, дали позитивный результат при повторном анализе после разбавления, что свидетельствует о наличии ингибиторов амплификации. Изотермическая амплификация, включая LAMP, известна своей повышенной устойчивостью к различным ингибиторам амплификации ДНК, присутствующим в клинических образцах [7]. Также ДНК-полимераза Gss-Sto, содержащая ДНК-связывающий домен, проявляет большую толерантность к ингибиторам по сравнению с нативными ферментами [15]. Наблюдение о большей резистентности к ингибиторам LAMP-SLF-LB1H по сравнению с qPCR согласуется с литературой и имеет практическое значение для клинического применения, так как позволяет снизить требования к подготовке образцов и использовать менее трудоемкие протоколы экстракции ДНК. Безусловно, это должно быть показано более тщательно на большей выборке.

Потенциальное преимущество использования петлевых флуоресцентно меченых праймеров состоит в возможности применения праймеров с различными флуорофорами (FAM, HEX, ROX, Cy5) для одновременного выявления нескольких мишеней в одной LAMP-реакции. Это особенно важно для диагностики смешанных инфекций или для разработки панельных тестов, выявляющих несколько возбудителей (например, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*). Потенциальная мультиплексная LAMP-система с флуоресцентными петлевыми праймерами может стать основой для разработки надежной point-of-care диагностической платформы для быстрого выявления множественных патогенов [16, 17].

Следует отметить несколько ограничений настоящего исследования. Это относительно небольшой размер клинической панели для надежной валидации диагностического теста. Кроме того, хотя ген *bcfD* считается специфичным для *Salmonella*, необходимо провести перекрестное тестирование на других близкородственных энтеробактериях и кишечных патогенах. Исследование проведено с использованием качественного оборудования (CFX96 Touch, Bio-Rad), что может не отражать реальные условия применения PoC-тестов. К тому же, мы пока намеренно отказались от интенсивной оптимизации теста для оценки устойчивости воспроизведения нашей концепции в рутинных условиях LAMP.

Несмотря на эти ограничения, полученные результаты демонстрируют потенциал петлевых флуоресцентно меченых праймеров как системы визуализации для LAMP. Метод может быть адаптирован к портативным флуоресцентным приборам для использования в PoC-диагностике. Возможность использования различных флуорофоров открывает перспективы для разработки мультиплексных тестов и интеграции в устройства для молекулярной диагностики в условиях ограниченных ресурсов.

ВЫВОДЫ

Нами разработан и валидирован новый дизайн LAMP с использованием петлевого флуоресцентно меченого праймера-зонда, генерирующего флуоресцентный сигнал в режиме реального времени для детекции *Salmonella enterica* на основе гена *bcfD*.

Метод обеспечивает приемлемые аналитические характеристики: LoD95% = 250 копий/реакция, чувствительность 86,84% (95% ДИ: 71,91–95,59%) и специфичность 96,49% (95% ДИ: 87,89–99,57%) при сравнении с qPCR. Использование петлевых флуоресцентно меченых праймеров с различными флуорофорами открывает перспективы разработки мультиплексной LAMP для одновременного выявления нескольких патогенов в одной реакции.

Литература

1. Hugas M, Beloeil PA. Controlling Salmonella along the food chain in the European Union — progress over the last ten years. *Eurosurveillance*. 2014; 19 (19): 1–4. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.19.20804.
2. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog*. 2012; 8–10: 1002933. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002933.
3. Pimenov NV, Laishevtcev AI. Modern methods of epizootic and epidemiological monitoring in the poultry industry on the example of Salmonella infection. *Russ J Agric Socio-Economic Sci*. 2017; 64–4: 257–69. DOI: 10.18551/rjoas.2017-04.33.
4. Fu H, Xu W, Huang M, Cong Y. Molecular Detection of Salmonella. *J Food Prot*. 2025; 88–12:100659. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100659.
5. Chirambo AC, Nyirenda TS, Jambo N, Msefula C, Kamngona A, Molina S, et al. Performance of molecular methods for the detection of Salmonella in human stool specimens. *Wellcome Open Res*. 2021; 5: 237. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2.

6. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28–12: 63e–63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci.* 2022; 3: 100120. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100120.
8. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017; 7–1: 45601. DOI: 10.1038/srep45601.
9. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog. Dis.* 2018; 15–6: 309–31. DOI: 10.1089/fpd.2018.2445.
10. Zhuang L, Gong J, Li Q, Zhu C, Yu Y, Dou X, et al. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcd* gene. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59–6: 658–64. DOI: 10.1111/lam.12328.
11. Chen S, Wang F, Beaulieu JC, Stein RE, Ge B. Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77–12: 4008–16. DOI: 10.1128/AEM.00354-11.
12. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018; 8–1: 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1.
13. Lee S-Y, Oh S-W. Point-of-Care Diagnostic System for Viable *Salmonella* Species via Improved Propidium Monoazide and Recombinase Polymerase Amplification Based Nucleic Acid Lateral Flow. *Diagnostics.* 2024; 14–8: 831. DOI: 10.3390/diagnostics14080831.
14. Abdullah J, Saffie N, Sjasri FAR, Husin A, Abdul-Rahman Z, Ismail A, et al. Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian J. Microbiol.* 2014; 45–4: 1385–91. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400032.
15. Ocorbin IP, Belousova EA, Boyarskikh UA, Zakabunin AI, Khrapov EA, Filipenko ML. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45–16: 9595–10. DOI: 10.1093/nar/gkx645.
16. Pusterla N, Naranatt P, Swadia H, Winfield L, Hartwig A, Barnum S, et al. Multi-Centered Field Evaluation of a *Salmonella* spp. Point-of-Care PCR Assay Using Equine Feces and Environmental Samples. *J Equine Vet Sci.* 2023; 126: 104538. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104538.
17. Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. *Diagnostics.* 2023; 13–9: 1530. DOI: 10.3390/diagnostics13091530.

References

1. Hugas M, Beloeil PA. Controlling *Salmonella* along the food chain in the European Union — progress over the last ten years. *Eurosurveillance.* 2014; 19 (19): 1–4. DOI: 10.2807/1560-7917.ES2014.19.19.20804.
2. de Jong HK, Parry CM, van der Poll T, Wiersinga WJ. Host-Pathogen Interaction in Invasive Salmonellosis. *PLoS Pathog.* 2012; 8–10: 1002933. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002933.
3. Pimenov NV, Laishchev AI. Modern methods of epizootic and epidemiological monitoring in the poultry industry on the example of *Salmonella* infection. *Russ J Agric Socio-Economic Sci.* 2017; 64–4: 257–69. DOI: 10.18551/rjoas.2017-04.33.
4. Fu H, Xu W, Huang M, Cong Y. Molecular Detection of *Salmonella*. *J Food Prot.* 2025; 88–12: 100659. DOI: 10.1016/j.jfp.2025.100659.
5. Chirambo AC, Nyirenda TS, Jambo N, Msefula C, Kamngona A, Molina S, et al. Performance of molecular methods for the detection of *Salmonella* in human stool specimens. *Wellcome Open Res.* 2021; 5: 237. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.16305.2.
6. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28–12: 63e–63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
7. Garg N, Ahmad FJ, Kar S. Recent advances in loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid and efficient detection of pathogens. *Curr Res Microb Sci.* 2022; 3: 100120. DOI: 10.1016/j.crmicr.2022.100120.
8. Liu N, Zou D, Dong D, Yang Z, Ao D, Liu W, et al. Development of a multiplex loop-mediated isothermal amplification method for the simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *Vibrio parahaemolyticus*. *Sci Rep.* 2017; 7–1: 45601. DOI: 10.1038/srep45601.
9. Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for *Salmonella* Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog. Dis.* 2018; 15–6: 309–31. DOI: 10.1089/fpd.2018.2445.
10. Zhuang L, Gong J, Li Q, Zhu C, Yu Y, Dou X, et al. Detection of *Salmonella* spp. by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method targeting *bcd* gene. *Lett Appl Microbiol.* 2014; 59–6: 658–64. DOI: 10.1111/lam.12328.
11. Chen S, Wang F, Beaulieu JC, Stein RE, Ge B. Rapid Detection of Viable *Salmonellae* in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77–12: 4008–16. DOI: 10.1128/AEM.00354-11.
12. Gadkar VJ, Goldfarb DM, Gantt S, Tilley PAG. Real-time Detection and Monitoring of Loop Mediated Amplification (LAMP) Reaction Using Self-quenching and De-quenching Fluorogenic Probes. *Sci Rep.* 2018; 8–1: 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1.
13. Lee S-Y, Oh S-W. Point-of-Care Diagnostic System for Viable *Salmonella* Species via Improved Propidium Monoazide and Recombinase Polymerase Amplification Based Nucleic Acid Lateral Flow. *Diagnostics.* 2024; 14–8: 831. DOI: 10.3390/diagnostics14080831.
14. Abdullah J, Saffie N, Sjasri FAR, Husin A, Abdul-Rahman Z, Ismail A, et al. Rapid detection of *Salmonella* Typhi by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Brazilian J. Microbiol.* 2014; 45–4: 1385–91. DOI: 10.1590/S1517-83822014000400032.
15. Ocorbin IP, Belousova EA, Boyarskikh UA, Zakabunin AI, Khrapov EA, Filipenko ML. Derivatives of Bst-like Gss-polymerase with improved processivity and inhibitor tolerance. *Nucleic Acids Res.* 2017; 45–16: 9595–10. DOI: 10.1093/nar/gkx645.
16. Pusterla N, Naranatt P, Swadia H, Winfield L, Hartwig A, Barnum S, et al. Multi-Centered Field Evaluation of a *Salmonella* spp. Point-of-Care PCR Assay Using Equine Feces and Environmental Samples. *J Equine Vet Sci.* 2023; 126: 104538. DOI: 10.1016/j.jevs.2023.104538.
17. Zhang X, Zhao Y, Zeng Y, Zhang C. Evolution of the Probe-Based Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assays in Pathogen Detection. *Diagnostics.* 2023; 13–9: 1530. DOI: 10.3390/diagnostics13091530.