

УДК 619:636.3:577.29:578.834

DOI: 10.31073/vet\_biotech44-08

МОЛОЖАНОВА А.В.\*, e-mail: veterenery@ukr.net,

НИЧИК С.А., д-р вет. наук, проф., чл.-кор. НААН, e-mail: snychuk@gmail.com

Інститут ветеринарної медицини НААН

## ПРОВЕДЕННЯ ВАЛІДАЦІЇ З ВИЗНАЧЕННЯ АНАЛІТИЧНОЇ СПЕЦИФІЧНОСТІ ІЗОТЕРМІЧНОЇ ПЕТЛЕВОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ (RT-LAMP) ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВІРУСУ SARS-COV-2 У ТВАРИН

У даній статті представлені отримані результати валідації розробленої тест-системи щодо виявлення вірусу SARS-CoV-2 методом петлевої ізотермічної ампліфікації (LAMP, loop-mediated amplification). В публікації наведені результати визначення аналітичної специфічності, які свідчать про відсутність неспецифічних реакцій зі штамами інших сторонніх вірусів та можливість її застосування для швидкого і ефективного діагностування SARS-CoV-2. Діагностику LAMP можна використовувати в умовах обмежених ресурсів, просто нагріваючи зразки та реагенти в одній реакційній пробірці при одній постійній температурі, і готувати результати отримати протягом 30 хвилин

**Ключові слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, RT-LAMP, LAM.

**Вступ.** COVID-19 є першою світовою пандемією, яка спричинена коронавірусом SARS-CoV-2, це вже третій вірус із родини *Coronaviridae*, який викликає смертельні інфекції у людей після SARS-CoV та MERS-CoV [1–4].

Також пандемія COVID-19 зачепила і тварин [5, 6]. Коронавіруси можуть інфікувати як людей, так і різноманітні види тварин, зафіксовано випадки інфікування вірусом SARS-CoV-2 домашніх тварин, норок, тварин з зоопарків та дикої природи [7–10]. Міжвидові передачі коронавірусів між різними господарями утворюють складну екосистему, яка потребує уважного вивчення [11–13]. Базовою стратегією має бути підхід єдиного здоров'я, коли системи охорони здоров'я людини, тварин і довкілля діють разом, регулярно обмінюються інформацією і реагують синхронно, таким чином можна мінімізувати поширення та спалахи зоонозних захворювань.

Коронавіруси (CoV) є найбільшими РНК-вірусами з розміром геному від 28 до 32 тис. нуклеотидних пар. Вони належать до родини *Coronaviridae*, ряд *Nidovirales*, і завдячують назвою своїй специфічній структурі, що нагадує корону на зображенні електронного мікроскопа. CoV відповідальний за низку респіраторних, травних та нервових інфекцій у ссавців та птахів. Їхня

\* Аспірант, науковий керівник – д-р вет. наук, проф., чл.-кор. НААН С.А. Ничик

схильність до рекомбінації та властива РНК-вірусам висока частота мутацій дозволяють їм час від часу передавати віруси та адаптуватися до нових господарів та екологічних ніш. Їхня поширеність у природі дуже висока [14–16]. У свиней, наприклад, найбільш важливими з клінічної та епідеміологічної точки зору є CoV, що викликають шлунково-кишкові інфекції [17, 18]. Тоді як кишковий коронавірус котів (FCoV) викликає легку або безсимптомну інфекцію у домашніх котів, але у 7–10% котів відбувається мутація вірусу, що призводить до розвитку більш складної хвороби під назвою котячий інфекційний перитоніт (FIP) [19]. Вірус CoV великої рогатої худоби, щурячий CoV та вірус інфекційного бронхіту (IBV) викликають легкі та важкі інфекції дихальних шляхів у великої рогатої худоби [20], щурів та курей відповідно.

Виникнення пандемії, що викликана важким гострим респіраторним синдромом, коронавірусом 2 (SARS-CoV-2), підкреслила необхідність швидких, простих і економічно ефективних тестів, таких як RT-LAMP, для діагностики нових патогенів [21–23]. Ізотермічна ампліфікація, опосередкована петлею зворотної транскрипції (RT-LAMP), може використовуватись в умовах низьких ресурсів, просто нагріваючи зразки та реагенти в одній реакційній пробірці при одній постійній температурі, і готові результати отримати протягом 30 хвилин.

**Метою роботи** було проведення етапу валідації з визначення аналітичної специфічності RT-LAMP для виявлення вірусу SARS-CoV-2.

**Матеріали і методи досліджень.** Дослідження було проведено на базі лабораторії «Науково-дослідний навчальний центр діагностики хвороб тварин» Інституту ветеринарної медицини НААН.

Для проведення досліджень використовували набори праймерів RT-LAMP, розраховані на ділянки генів: нуклеокапсидний ген N-ген та оболонковий ген S-ген SARS-CoV-2.

Для дослідження аналітичності специфічності RT-LAMP було використано наступний біологічний матеріал: зразки виділеної РНК вірусу SARS-CoV-2, надані Центром громадського здоров'я МОЗ України, а також РНК/ДНК збудників хвороби Ауескі штам «Петріківський-2006»; вірусу ЕДС штам «U-14», коронавірус великої рогатої худоби (*Coronavirus bovinum*) штам С-197; культура клітин Vero (негативний біологічний матеріал – НБМ).

Реакційну суміш готували безпосередньо перед проведенням досліджень, змішуючи 10X буфер для LAMP – 2,5 мкл; 100 мкМ MgSO<sub>4</sub> (NEB) – 1,13 мкл; 10 мкМ суміш dNTPs – 3,5 мкл; 10X суміш праймерів – 2,5 мкл; Bst 1.0 полімераза – 1 мкл; RTx – 0,5 мкл; Nuclease-free water – 2,87 мкл; розчину SYBR Green (інтеркалятор) – 1 мкл (у розрахунку на одну пробу).

Виділену ДНК/РНК дослідних і контрольних зразків додавали в об'ємі 5,0 мкл. Загальний об'єм складає 25 мкл.

Результат ампліфікації РНК вірусу SARS-CoV-2 реєстрували на каналі флуоресценції FAM/SYBR. Облік отриманих результатів ПЛР аналізу: позитивним вважається значення Ct FAM/SYBR менше або дорівнює 35 ( $Ct \leq 35$ ), це свідчить про ампліфікацію гена, що кодує специфічну ділянку вірусу SARS-CoV-2; негативний результат – це значення Ct FAM/SYBR відсутнє. Для проведення ампліфікації у реальному часі було використано «Rotor-Gene Q», виробник «QIAGEN Hilden» (Німеччина).

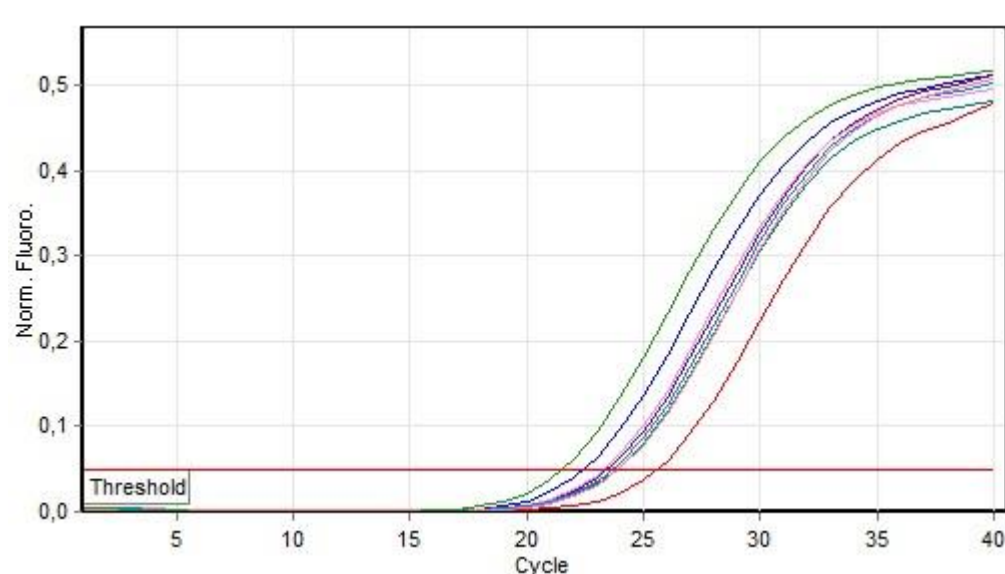
**Результати досліджень та їх обговорення.** Діагностичний метод на основі ізотермічної ампліфікації, опосередкованої петлею (LAMP), створено як швидкий, точний діагностичний тест для виявлення наявних вірусних інфекцій як в лабораторії, так і в польових умовах; отже, він може бути чудовою альтернативою для виявлення SARS-CoV-2

Для визначення специфічності в якості позитивного біологічного матеріалу (ПБМ) було використано РНК вірусу SARS-CoV-2 надані Центром громадського здоров'я МОЗ України, за негативний біологічний матеріал (НБМ) щодо вірусу SARS-CoV-2 брали культуру клітин Vero, а також ДНК/РНК трьох сторонніх збудників вірусних захворювань (хвороби Ауескі, вірусу ЕДС, Коронавірус ВРХ (BCoV)). Результати дослідження зведені в таблиці 1 та представлені на рис. 1.

Таблиця 1

**Результати визначення аналітичної специфічності RT-LAMP**

№ з/п	Назва досліджуваного матеріалу	Кількість проб	Результати детекції вірусу SARS-CoV-2	
			Ct, FAM (M±m)	результат
1	Культура клітин Vero	5	–	негативні
2	РНК вірусу SARS-CoV-2	8	23,22±0,85	<b>позитивні</b>
3	РНК (Coronavirus bovinum) штам С-197	3	–	негативні
4	РНК ЕДС штам «U-14»	3	–	негативні
5	ДНК Ауескі штам «Петріківський-2006»	3	–	негативні



**Рис. 1. Результати ампліфікації специфічної ділянки вірусу SARS-CoV-2 (Ct FAM/ SYBR) щодо визначення аналітичної специфічності.**

Аналітична специфічність визначається, як здатність аналізу відрізнити цільову ДНК (мішень) від ДНК інших інфекційних агентів. За результатами проведених досліджень встановлена відсутність перехресних реакцій з штамами інших вірусів, що свідчить про специфічність розробленої тест-системи. У той же час, в пробах біологічного матеріалу, що містили вірус SARS-CoV-2, було виявлено специфічну кДНК. Значення Ct позитивних проб на каналі FAM були встановлені в межах 21,35–26,21. Це вказує на здатність обраних нами праймерів точно розпізнавати цільову ділянку вірусу SARS-CoV-2 і зв'язуватися з нею за принципом компліментарності.

**Висновки та перспективи подальших досліджень.** За результатами проведених досліджень встановлена відсутність реакцій зі штамами сторонніх вірусів, що свідчить про специфічність RT-LAMP. Отримані результати досліджень вказують на можливість її використання в лабораторній діагностиці.

**VALIDATION TO DETERMINE THE ANALYTICAL SPECIFICITY OF LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (RT-LAMP) FOR THE DIAGNOSIS OF THE SARS-COV-2 VIRUS IN ANIMALS / Molozhanova A.V., Nychyk S.A**

***Introduction.** COVID-19 is the first global pandemic caused by the SARS-CoV-2 coronavirus, the third virus from the Coronaviridae family to cause fatal infections in humans after SARS-CoV and MERS-CoV.*

*The COVID-19 pandemic has also affected animals. Coronaviruses can infect both humans and various species of animals, and cases of SARS-CoV-2 infection in pets, minks, zoo animals, and*

wildlife have been reported. Interspecies transmission of coronaviruses between different hosts forms a complex ecosystem that requires careful study.

The emergence of the SARS-CoV-2 pandemic has highlighted the need for rapid, simple and cost-effective tests, such as RT-LAMP, to diagnose emerging pathogens.

**The goal of the work** was to conduct a validation phase to determine the analytical specificity of RT-LAMP for the detection of SARS-CoV-2 virus.

**Materials and methods.** Primer sets for RT-LAMP were used for the study, designed for gene regions: nucleocapsid gene N-gene and envelope gene S-gene of SARS-CoV-2.

To study the analytical specificity of RT-LAMP, the following biological material was used: samples of isolated SARS-CoV-2 virus RNA provided by the Center for Public Health of the Ministry of Health of Ukraine, as well as RNA/DNA from three additional pathogens.

The reaction mixture was prepared immediately before the test by mixing 10X LAMP buffer – 2.5 µL; 100 µM MgSO<sub>4</sub> (NEB) – 1.13 µL; 10 µM dNTPs mixture – 3.5 µL; 10X primer mixture – 2.5 µL; Bst 1.0 polymerase – 1 µL; RTx - 0.5 µL; Nuclease-free water – 2.87 µL; SYBR Green solution (intercalator) – 1 µL (per sample). The isolated DNA/RNA of the experimental and control samples was added in a volume of 5.0 µL. The total volume was 25 µL.

**Research results and discussion.** Analytical specificity is defined as the ability of the assay to distinguish the target DNA from the DNA of other infectious agents. According to the results of the studies, there were no cross-reactions with strains of other viruses, which indicates the specificity of the designed test system. At the same time, specific cDNA was detected in samples of biological material containing SARS-CoV-2 virus. This indicates the ability of our selected primers to accurately recognize the target site of SARS-CoV-2 virus and bind to it on the principle of complementarity.

**Conclusions and prospects for further research.** The results of our studies showed the absence of nonspecific reactions with strains of additional viruses, which indicates the specificity of RT-LAMP. The obtained results indicate the possibility of its use in laboratory diagnostics.

**Keywords:** COVID-19, SARS-CoV-2, RT-LAMP, LAMP.

## REFERENCES

1. da Costa, V.G., Moreli, M.L., & Saivish, M.V. (2020). The emergence of SARS, MERS and novel SARS-2 coronaviruses in the 21st century. *Archives of Virology*, 165(7), 1517-1526. doi: 10.1007/s00705-020-04628-0.
2. Song, Z., Xu, Y., Bao, L., Zhang, L., Yu, P., Qu, Y., Zhu, H., Zhao, W., Han, Y., Qin, C. (2019). From SARS to MERS, Thrusting Coronaviruses into the Spotlight. *Viruses*, 11(1), 59. <https://doi.org/10.3390/v11010059>.
3. Zhu, Z., Lian, X., Su, X., Wu, W., Marraro, G.A., Zeng, Y. (2020). From SARS and MERS to COVID-19: a brief summary and comparison of severe acute respiratory infections caused by three highly pathogenic human coronaviruses. *Respir Res*, 21(1), 224. doi: 10.1186/s12931-020-01479-w.
4. Zeidler, A., & Karpinski, T.M. (2020). SARS-CoV, MERS-CoV, SARS-CoV-2 Comparison of Three Emerging Coronaviruses. *Jundishapur J Microbiol.*, 13(6), e103744. <https://doi.org/10.5812/jjm.103744>.
5. Chandler, J.C., Bevins, S.N., Ellis, J.W., Linder, T.J., Tell, R.M., Jenkins-Moore, M., Root, J.J., Leno, J.B., Robbe-Austerman, S., DeLiberto, T.J., et al. (2021). SARS-CoV-2 exposure in wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 118(47), e2114828118. doi: 10.1073/pnas.2114828118.

6. Cui, S.J., Liu, Y.M., Zhao, J.C., Peng, X.M., Lu, G.L., Shi, W.X., Pan, Y., Zhang, D.T., Yang, P., Wang, Q.Y. (2022). An updated review on SARS-CoV-2 infection in animals. *Viruses-Basel*, 14(7), 1527. doi: 10.3390/v14071527.
7. Ferasin, L., Fritz, M., Ferasin, H., Becquart, P., Corbet, S., Gouilh, M.A., Legros, V., Leroy, E.M. (2021). Infection with SARS-CoV-2 variant B.1.1.7 detected in a group of dogs and cats with suspected myocarditis. *Vet Rec.*, 189(9), e944. doi: 10.1002/vetr.944.
8. Fernandez-Bellon, H., Rodon, J., Fernandez-Bastit, L., Almagro, V., Padilla-Sole, P., Lorca-Oro, C., Valle, R., Roca, N., Grazioli, S., Trogu, T., et al. (2021). Monitoring natural SARS-CoV-2 infection in lions (*Panthera leo*) at the Barcelona Zoo: viral dynamics and host responses. *Viruses-Basel*, 13(9), 1683. doi: 10.3390/v13091683.
9. Fritz, M., de Riols, de Fonclare D., Garcia, D., Beurlet, S., Becquart, P., Rosolen, S.G., Briend-Marchal, A., & Leroy, E.M. (2022). First evidence of natural SARS-CoV-2 infection in domestic rabbits. *Vet Sci.*, 9(2), 49. doi: 10.3390/vetsci9020049.
10. Gaudreault, N.N., Trujillo, J.D., Carossino, M., Meekins, D.A., Morozov, I., Madden, D.W., Indran, S.V., Bold, D., Balaraman, V., Kwon, T., et al. (2020). SARS-CoV-2 infection, disease and transmission in domestic cats. *Emerg Microbes Infect.*, 9(1), 2322-2332. doi: 10.1080/22221751.2020.1833687.
11. Hamer, S.A., Pauvolid-Corrêa, A., Zecca, I.B., Davila, E., Auckland, L.D., Roundy, C.M., Tang, W., Torchetti, M.K., Killian, M.L., Jenkins-Moore, M., et al. (2021). SARS-CoV-2 infections and viral isolations among serially tested cats and dogs in households with infected owners in Texas, USA. *Viruses*, 13(5), 938. doi: 10.3390/v13050938.
12. Hayashi, T., Abiko, K., Mandai, M., Yaegashi, N., Konishi, I. (2020). Highly conserved binding region of ACE2 as a receptor for SARS-CoV-2 between humans and mammals. *Vet Q.*, 40(1), 243-249. doi: 10.1080/01652176.2020.1823522.
13. Hoppe, J.M., Fießl, L.U., Hartmann, K., Hofmann-Lehmann, R., Graf, A., Krebs, S., Blum, H., Badell, I., Keppler, O.T., Muenchhoff, M. (2023). Secondary zoonotic dog-to-human transmission of SARS-CoV-2 suggested by timeline but refuted by viral genome sequencing. *Infection*, 51(1), 253-259. doi: 10.1007/s15010-022-01902-y.
14. Gozalo, A.S., Clark, T.S., & Kurtz, D.M. (2023). Coronaviruses: Troubling Crown of the Animal Kingdom. *Comp Med.*, 73(1), 6-44. doi: 10.30802/AALAS-CM-21-000092.
15. Ruiz-Aravena, M., McKee, C., Gamble, A., Lunn, T., Morris, A., Snedden, C.E., Yinda, C.K., Port, J.R., Buchholz, D.W., Yeo, Y.Y., Faust, C., Jax, E., Dee, L., Jones, D.N., Kessler, M.K., Falvo, C., Crowley, D., Bharti, N., Brook, C.E., Aguilar, H.C., Peel, A.J., Restif, O., Schountz, T., Parrish, C.R., Gurley, E.S., Lloyd-Smith, J.O., Hudson, P.J., Munster, V.J., Plowright, R.K. (2022). Ecology, evolution and spillover of coronaviruses from bats. *Nat Rev Microbiol.*, 20(5), 299-314. doi: 10.1038/s41579-021-00652-2.
16. Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J.M., Glaunsinger, B.A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *J Biol Chem.*, 295(37), 12910-12934. doi: 10.1074/jbc.REV120.013930.
17. Liu, Q., & Wang, HY. (2021). Porcine enteric coronaviruses: an updated overview of the pathogenesis, prevalence, and diagnosis. *Vet Res Commun.*, 45, 75-86. <https://doi.org/10.1007/s11259-021-09808-0>.
18. Turlewicz-Podbielska, H., & Pomorska-Mól, M. (2021). Porcine Coronaviruses: Overview of the State of the Art. *Virol. Sin.*, 36, 833-851 <https://doi.org/10.1007/s12250-021-00364-0>.

19. Oguzoglu, T.C., Koc, B.T., & Akkutay-Yoldar, A.Z. (2021). Triple viral infections in the same cats: Feline coronavirus, feline parvovirus, feline foamy virus. *Rev MVZ Cordoba*, 26(3) e2182. doi: 10.21897/rmvz.2182.
20. Vlasova, A.N., Saif, L.J. (2021). Bovine coronavirus and the associated diseases. *Front. Veterinary Sci.*, 8, 643220. doi: 10.3389/fvets.2021.643220.
21. Becherer, L., Borst, N., Bakheit, M., Frischmann, S., Zengerleab, R. & von Stetten, F. (2020). Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – Review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Method.*, 12, 717-746. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.
22. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N. & Hase, T. (2000). Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 28(12), e63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63.
23. Kubo, S., Niimi, H. & Kitajima, I. (2023). Loop-mediated isothermal amplification assay for fluorescence analysis and lateral flow detection of male DNA. *Analytical Biochemistry*, 664, 115029. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2022.115029>.